

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS TECNOLÓGICOS E
AMBIENTAIS**

Venâncio Alves Amaral

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS LAMINAR PARA
REGENERAÇÃO DE TECIDO CARTILAGINOSO TRAQUEAL**

Sorocaba/SP

2017

Venâncio Alves Amaral

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS LAMINAR PARA
REGENERAÇÃO DE TECIDO CARTILAGINOSO TRAQUEAL**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud.

Sorocaba/SP

2017

Ficha Catalográfica

A518d Amaral, Venâncio Alves
Desenvolvimento e caracterização de scaffolds laminar para
regeneração de tecido cartilaginoso traqueal / Venâncio Alves
Amaral. – 2017.
85 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud
Dissertação (Mestrado em Processos Tecnológicos e Ambientais)
– Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2017.

1. Materiais biomédicos. 2. Tecido (Anatomia e fisiologia). 3.
Engenharia biomédica. I. Chaud, Marco Vinícius, orient. II.
Universidade de Sorocaba. III. Título.

Venâncio Alves Amaral

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS LAMINAR PARA
REGENERAÇÃO DE TECIDO CARTILAGINOSO TRAQUEAL**

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Processos
Tecnológicos e Ambientais da Universidade
de Sorocaba.

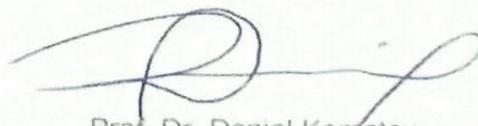
Aprovado em: **19/12/2017**

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

Universidade de Sorocaba



Prof. Dr. Daniel Komatsu

Pontifícia Universidade Católica de São Paulo



Profa. Dra. Andréa Arruda Martins Shimojo

Universidade Estadual de Campinas

Sorocaba/SP

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que esteve sempre ao meu lado, zelando por cada passo nesta minha caminhada.

Aos meus pais Valdinilson e Silvana, que são as inspirações da minha vida. Obrigado pelo exemplo de caráter, de humildade, por todo o ensinamento e pelo apoio mesmo à distância, principalmente nos dias mais difíceis, quando a saudade atormentava e o desejo de voltar se fazia mais forte. Agradeço a vocês, meus amados pais por não medirem esforços para me ajudar. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Vinícius e Vanessa, por todo apoio, pelos conselhos, até quando havia discussão, por que me tiravam de uma certa zona de conforto, trazendo reflexões. Sou muito grato!

Aos meus sobrinhos, Adryan Vinícius e Henzo Gabriel, por não deixar o tio ficar tão preso a rotina e relembrar o quanto é bom ser criança. Amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud, obrigado pela orientação, dedicação e por compartilhar comigo sua sabedoria e ensinamentos. Agradeço muito por acreditar em meu potencial e capacidade.

Agradeço ao grupo de pesquisa do LaBNUS: Denicezar, Juliana, Fernando, Marcia, Mirella, Carol, Jaqueline, Katusca, Thais, Cecília e Ana Carolina. Obrigado pela amizade, pelas histórias, conversas, risadas, por compartilharem comigo experiências e conhecimentos diversos e pela companhia no laboratório durante o mestrado! Foi muito bom saber que podia contar com cada um de vocês. Sou muito grato!

Ao Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior e ao Laboratório de Física Nuclear aplicada da Universidade de Sorocaba, pela contribuição ao realizar as análises de microtomográficas computadorizada.

A Profa. Dra. Renata Lima e ao Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Sorocaba pela contribuição ao realizar as análises de viabilidade celular.

Ao Laboratório de Caracterização de Recursos Analíticos e de Calibração da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela contribuição ao realizar as análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de Sorocaba (PUC) pelo fornecimento do copolímero Poli (L-co-D,L ácido láctico)/PLDLA (70:30).

À Universidade de Sorocaba (UNISO) pela recepção desde a graduação e também por tornar possível a realização do mestrado.

Muito obrigado!

Nordestino (*adj.*)

É que tem a alma forte. É quem assusta a própria seca. É quem respira cultura. É a planta que conhece a própria (*e boa*) raiz. Filhos e filhas do sol. É o povo da culinária bonita e do sotaque gostoso. É quem chama por mãeinha. Sinônimo de dedicação.

É quem sente orgulho de onde nasceu (*e se precisou sair, sente saudade de onde cresceu*)

(João Doederlein)

RESUMO

INTRODUÇÃO: O processamento tecnológico de polímeros naturais e sintéticos tem sido estudado para fabricação de dispositivos tridimensionais porosos, comumente denominados de *scaffolds*. **OBJETIVO:** Desenvolver e caracterizar *scaffolds* laminar, para aplicação na regeneração de tecido cartilaginoso traqueal. **MÉTODOS:** Os *scaffolds* foram preparados com poli (L-co-D,L ácido lático) (PLDLA), polietilenoglicol (PEG) 400 e 4000 e com agente porogênico, sacarose (SAC) e colágeno (COL). Preparados na proporção 1:2:2 (m/m) pela técnica de evaporação de solvente. As formulações foram avaliadas quanto as estruturas de superfície por microscopia óptica, propriedades físico-químicas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria diferencial exploratória (DSC), as propriedades fisiomecânicas foram medidas pela resistência a tração, compressão e mucoadesão, e no estudo *in vitro*, foram avaliados o perfil de desintegração e intumescimento em três diferentes meios (água ultrapura, meio tamponado e fluido salivar simulado-FSS) e avaliados até 120 horas. Após essas análises, as formulações PLDLA/PEG400/SAC e PLDLA/PEG400/COL foram selecionadas, e seguiram para análise de microscopia eletrônica de varredura, microtomografia computadorizada e ensaio de viabilidade celular. **RESULTADOS:** As micrografias exibiram alteração na estrutura de superfície com formação de poros. Os espectros de FTIR com os termogramas de DSC sugerem interação química entre os componentes dos *scaffolds*. Os resultados apresentados nas propriedades fisiomecânicas, de uma forma geral, mostraram que os *scaffolds* com PEG 400 e COL são favoráveis para o uso traqueal. O perfil de desintegração apresentou inicialmente uma perda de massa para todos os *scaffolds*, sendo menor para as que continham COL. Em contrapartida, os perfis de intumescimento para estas amostras foram maiores. O *scaffold* PLDLA/PEG400/SAC apresentou porosidade de 63,25% após 120h em FSS. Já o *scaffold* PLDLA/PEG400/COL apresentou porosidade de 58,97% após 120h em FSS. Os ensaios de viabilidade celular mostraram que os *scaffolds* não são citotóxicos. **CONCLUSÃO:** As análises dos resultados apresentados indicam que ambas as composições PLDLA/PEG400/SAC e PLDLA/PEG400/COL são estruturalmente adequados para serem utilizados na regeneração de tecido cartilaginoso.

Palavras-chave: Biomateriais; Scaffolds; Engenharia de Tecido; Tecido Cartilaginoso.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The technological processing of natural and synthetic polymers has been studied for the manufacture of porous three-dimensional devices, commonly known as scaffolds. **OBJECTIVE:** To develop and characterize laminar scaffolds for application in the regeneration of tracheal cartilage tissue. **METHODS:** The scaffolds were prepared with poly (L-co-D, L lactic acid) (PLDLA), polyethylene glycol (PEG) 400 and 4000 and with porogenic agent, being sucrose (SUC) and collagen (COL). Prepared in the ratio 1:2:2 (w/w) by the solvent evaporation technique. The formulations were evaluated for surface structures by optical microscopy, physicochemical properties by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC), the biomechanical properties were measured by tensile strength, compression and mucoadhesion, and in the in vitro study, the disintegration and swelling profile in three different media (ultrapure water, buffered medium and salivary fluid simulated-SFS) were evaluated and evaluated up to 120 hours. After these analyzes, the PLDLA/PEG400/SAC and PLDLA/PEG400/COL formulations were selected and followed for scanning electron microscopy, computerized microtomography and cell viability assay. **RESULTS:** The micrographs showed alterations in the surface structure with pore formation. The FTIR spectra with the DSC thermograms suggest chemical interaction between scaffold components. The results presented in the physiological properties generally showed that scaffolds with PEG 400 and COL are favorable for tracheal use. The disintegration profile initially presented a loss of mass for all scaffolds, being smaller for those containing COL. In contrast, the swelling profiles for these samples were higher. The scaffold PLDLA/PEG400/SAC had porosity of 63.25% after 120h in SFS. The scaffold PLDLA/PEG400/COL had porosity of 58.97% after 120h in SFS. Cell viability assays have shown that the scaffolds are no cytotoxic. **CONCLUSION:** Analyzes of the results indicated that both PLDLA/PEG400/SAC and PLDLA/PEG400/COL compositions are structurally suitable for use in the regeneration of cartilaginous tissue.

Keywords: Biomaterials; Scaffolds; Tissue Engineering; Cartilaginous Tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia traqueal.....	12
Figura 2 – Corte histológico da traqueia.....	13
Figura 3 – Estrutura esquemática do copolímero PLDLA.....	23
Figura 4 – Estrutura esquemática do PEG.....	24
Figura 5 – Estrutura molecular do COL: (a) forma de triplete presente nas matrizes; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla.....	25
Figura 6 – Representação esquemática do delineamento experimental para caracterização das matérias primas, desenvolvimento e avaliação dos <i>scaffolds</i>	28
Figura 7 – Imagem fotográfica dos <i>scaffolds</i>	38
Figura 8 – Imagem fotográfica do <i>scaffold</i> em sistema chave-fechadura.....	39
Figura 9 – Microscopia óptica (40x) dos <i>scaffolds</i> . Antes da lixiviação (A) e após lixiviação durante 24 horas (B).....	39
Figura 10 – Resultados dos espectros de FTIR dos componentes e dos <i>scaffolds</i>	42-43
Figura 11 – Monômero do (poli) etilenoglicol.....	44
Figura 12 – Estrutura molecular do Poli (L-co-D,L ácido láctico).....	44
Figura 13 – Estrutura molecular do colágeno.....	45
Figura 14 – Curva termoanalítica dos (Painel A) componentes da formulação e (Painel B) dos <i>scaffolds</i>	48
Figura 15 – Ensaio de propriedades mecânicas de perfuração, relaxação, resiliência, tração e mucoadesão dos <i>scaffolds</i> . Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores ($p>0,05$) ($n=3$).....	51
Figura 16 – Perfil de desintegração dos <i>scaffolds</i> (Painel A) e Intumescimento (Painel B). Os ensaios foram realizados em água ultrapura a temperatura $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação de 50 rpm. ($n=2$).....	54
Figura 17 – Perfil de desintegração dos <i>scaffolds</i> (Painel A) e Intumescimento (Painel B) dos. Os ensaios foram realizados em meio tamponado (pH 7,4) a temperatura $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação de 50 rpm. ($n=2$).....	54

Figura 18 – Perfil de desintegração dos scaffolds (Painel A) e Intumescimento (Painel B). Os ensaios foram realizados em FSS (pH 6,9) a temperatura $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação de 50 rpm. (n=2).....	55
Figura 19 – Perfil de desintegração dos scaffolds em água ultrapura; meio tamponado (pH7,4) e FSS (pH 6,9).....	56
Figura 20 – Perfil de intumescimento dos scaffolds em água ultrapura; meio tamponado (pH7,4) e FSS (pH 6,9).....	57
Figura 21 – (Painel A) – Micrografias do scaffold PLDLA/PEG400/COL obtida por microscopia óptica em tempos pré-determinando durante ensaio <i>in vitro</i>	59
Figura 21 – (Painel B) – Micrografias do scaffold PLDLA/PEG4000/COL obtida por microscopia óptica em tempos pré-determinando durante ensaio <i>in vitro</i>	60
Figura 21 – (Painel C) – Micrografias do scaffold PLDLA/PEG400/SAC obtida por microscopia óptica em tempos pré-determinando durante ensaio <i>in vitro</i>	61
Figura 21 – (Painel D) – Micrografias do scaffold PLDLA/PEG4000/SAC obtida por microscopia óptica em tempos pré-determinando durante ensaio <i>in vitro</i>	62
Figura 22 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos scaffolds.....	65
Figura 23 – Microtomografia dos scaffolds.....	67
Figura 24 – Resultados das análises de disco-difusão em ágar. PLDLA/PEG 400 (1); PLDLA/PEG400/COL (2); PLDLA/PEG400/SAC (3) e controle positivo (4).....	68
Figura 25 – Viabilidade celular dos scaffolds, medidos por atividade mitocondrial – MTT (24h – Painel A e 48h – Painel B) e por atividade lisossomal – vermelho neutro (24h – Painel C e 48h – Painel D). Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores ($p>0,05$).....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para avaliação das propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i>	32
Tabela 2 – Propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> . (n=3).....	50
Tabela 3 – Descrição da porosidade (%), poros fechados (%), volume dos poros abertos (mm-3), poros abertos (%) dos <i>scaffolds</i>	66

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR: Reflectância total atenuada

COL: Colágeno

CH₂Cl₂: Diclorometano

DMEM: Meio de cultura Eagle modificado por Dubbecco

DSC: Calorimetria diferencial exploratória

FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

FSS: Flúido salivar simulado

LIX: Lixiviação

MEC: Matriz extracelular

MO: Microscopia óptica

PEG: Polietilenoglicol

PDLA: Poli (D-ácido láctico)

PDLLA: Poli (D,L-ácido láctico)

PLDLA: Poli (L-co-D,L ácido láctico)

PLLA: Poli (L-ácido láctico)

SAC: Sacarose

V79: Fibroblasto de pulmão de hamster Chinês

μCT: Microtomografia computadorizada

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS

Da: Dalton

°C: Grau Celsius

μL: Microlitro

μm: Micrômetro

cm: Centímetro

g: Grama

h: Hora

mg: Miligrama

min: Minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mm/s: Milímetro por segundo

mm³: Milímetro cúbico

m/v: Massa/volume

m/m: Massa/massa

nm: Nanômetro

N: Newton

°: Celsius

rpm: Rotações por minuto

s: Segundo

%: Porcentagem

<: Menor que

>: Maior que

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Traqueia: anatomia, fisiologia e histologia.....	12
2.2 Tecido cartilaginoso	14
2.3 Condrócitos	15
2.4 Engenharia de tecidos.....	15
2.5 Biomateriais.....	16
2.6 Scaffolds.....	19
2.7 Propriedades necessárias para obtenção dos <i>scaffolds</i>	19
2.7.1 Biocompatibilidade	19
2.7.2 Biodegradabilidade.....	20
2.7.3 Propriedades mecânicas	21
2.7.4 Porosidade e interconectividade dos poros.....	21
2.7.5 Diâmetro dos poros	22
2.8 Biomateriais aplicados na obtenção do <i>scaffolds</i>	22
2.8.1 Poli (L-co-D,L ácido lático) (PLDLA).....	22
2.8.2 Polietilenoglicol.....	23
2.8.3 Colágeno	24
3. OBJETIVO.....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos	27
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.1 Materiais.....	29
5.2 Métodos.....	29
5.2.1 Preparação dos <i>scaffolds</i> PLDLA/PEG400/SAC e PLDLA/PEG4000/SAC	29
5.2.2 Preparação dos <i>scaffolds</i> PLDLA/PEG400/COL e PLDLA/PEG4000/COL	30
5.2.3 Caracterização da estrutura de superfície dos <i>scaffolds</i>	30

5.2.4	Processo de lixiviação para remoção do agente porogênico	30
5.2.5	Microscopia óptica.....	30
5.2.6	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .	31
5.2.7	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	31
5.2.8	Propriedade mecânica.....	31
5.2.9	Ensaio de mucoadesão	32
5.2.10	Estudo <i>in vitro</i> – Desintegração e em água ultrapura; meio tamponado (pH 7,4); fluído salivar simulado (FSS)	33
5.2.11	Caracterização dos <i>scaffolds</i> durante os ensaios	33
5.2.12	Perda de massa e Capacidade de intumescimento	33
5.2.13	Seleção dos <i>scaffolds</i>	34
5.2.14	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	34
5.2.15	Microtomografia computadorizada	35
5.2.16	Viabilidade celular – Disco-difusão em ágar	35
5.2.17	Viabilidade celular – Preparo de meio de cultura	35
5.2.18	Ensaio de atividade mitocondrial - MTT	36
5.2.19	Ensaio de atividade lipossomal - Vermelho neutro	36
5.2.20	Análises estatísticas.....	36
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.1	Caracterização macroscópica da estrutura de superfície dos <i>scaffolds</i> .	37
6.2	Caracterização da estrutura de superfície dos <i>scaffolds</i> após lixiviação	39
6.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).	41
6.4	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).	47
6.5	Propriedades mecânicas	50
6.6	Caracterização dos <i>scaffolds</i> após estudo <i>in vitro</i>	53
6.6.1	Perda de massa (desintegração) e Capacidade de intumescimento.	53
6.6.2	Avaliação de superfície dos <i>scaffolds</i> durante ensaio <i>in vitro</i>	58
6.6.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) após ensaio <i>in vitro</i>	63
6.7	Seleção dos <i>scaffolds</i>	63
6.8	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	63
6.9	Microtomografia computadorizada	66
6.10	Viabilidade celular – Disco-difusão em ágar.....	68
6.11	Viabilidade celular – MTT e Vermelho Neutro	68

7.	CONCLUSÃO.....	71
8.	Referências	72
9.	Apêndice.....	80

1. INTRODUÇÃO

As doenças de tecidos cartilagosos representam um importante problema de saúde mundial e vêm sendo objeto de estudos nos últimos anos. Diante deste contexto, a engenharia de tecidos se apresenta como um ramo científico promissor, capaz de originar protocolos para as doenças degenerativas dos tecidos cartilagosos (NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016).

Um dos elementos básicos da engenharia de tecido para a regeneração e/ou construção de um novo tecido biológico é a fabricação de dispositivos tridimensionais porosos, denominados de *scaffolds*, capazes de mimetizar as características da matriz extracelular (MEC), proporcionando um microambiente apropriado para facilitar a organização das células, e desta forma, controlar e direcionar a formação de um novo tecido (SIMBARA et al., 2014; SANTOS JR; WADA, 2007).

Os *scaffolds* são normalmente obtidos utilizando materiais biocompatíveis, biodegradáveis e bioreabsorvíveis. Para preparação de uma estrutura tridimensional porosa, deve ser considerado a formação de poros que sejam interconectados, para que as células possam migrar, se multiplicar e adentrar no *scaffold*, e com isso, permitir a difusão de oxigênio e nutrientes para as partes mais internas. Portanto, para que o *scaffold* bem sucedido, ele deve possuir propriedades mecânicas e estruturais de materiais compatíveis com o tecido a ser regenerado, fornecendo um microambiente viável para as células (KHORSHIDI et al., 2016; CUI et al., 2012; SUÁREZ-GONZÁLEZ et al., 2010)

Além das características dos materiais utilizados, o sucesso de um projeto relacionado a obtenção de *scaffold* depende muito do método de fabricação utilizado, juntamente ao conhecimento anatômico e fisiológico do tecido de interesse.

Atualmente não há um método de produção em massa para os *scaffolds* biocompatíveis. Alguns métodos de fabricação existentes são demorados, caros e geralmente de baixa reprodutibilidade, para se obter *scaffolds* que possam ter porosidade, interconectividade, uniformidade de tamanho e morfologia de poros controlados. No entanto, é possível utilizar a técnica da matriz de sacrifício (adição e eliminação por retirada de agentes porogênicos), um método simples que permite o uso de uma elevada gama de materiais orgânicos formadores de poros (FERNANDES; MORELLI, 2017; STUART et al., 2006).

No presente estudo foi utilizado o poli (L-co-D,L-ácido lático), polietilenoglicol, colágeno e sacarose, capazes de formar blendas sem alterar as propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Estes biomateriais foram utilizados neste estudo para a fabricação de *scaffold* laminar para regeneração de tecido cartilaginoso traqueal.

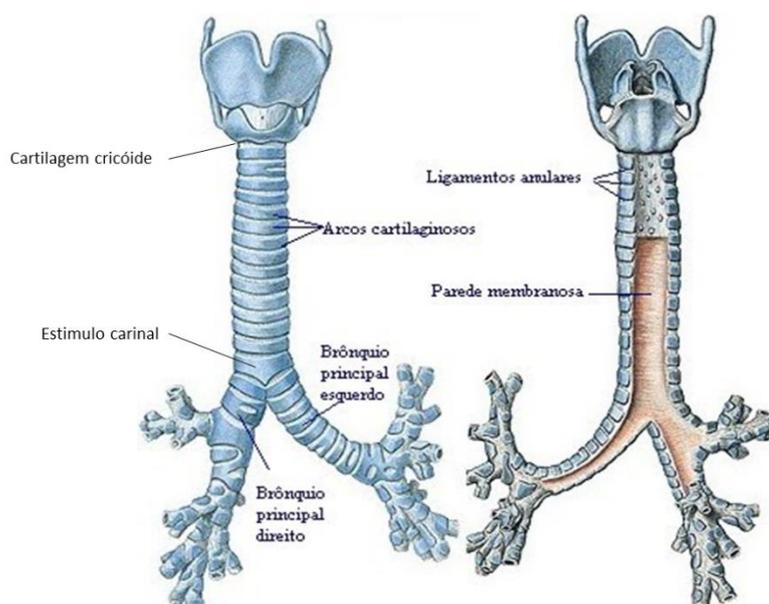
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Traqueia: anatomia, fisiologia e histologia

O aparelho respiratório se divide em duas partes condutora e respiratória. A traqueia é um órgão que corresponde a parte condutora, que ainda é composta de fossas nasais, nasofaringe, laringe e brônquios. A parte respiratória é constituída pelos bronquíolos, ductos alveolares e alvéolos, nos quais ocorre a troca de gases (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A traqueia é um órgão que apresenta característica tubular oca, cartilaginosa e membranosa medindo aproximadamente 11 cm de comprimento e 15-25 mm de diâmetro no indivíduo adulto (CROWLEY; BIRCHALL; SEIFALIAN, 2015). A traqueia conecta a laringe aos brônquios dos pulmões, tendo início na borda inferior da cartilagem cricóide até o estômulo carinal (MORALES-VALENCIA et al., 2016; SUZUKI et al., 2008), Figura 1.

Figura 1- Anatomia traqueal



Fonte: adaptado de CESAR, 2017.

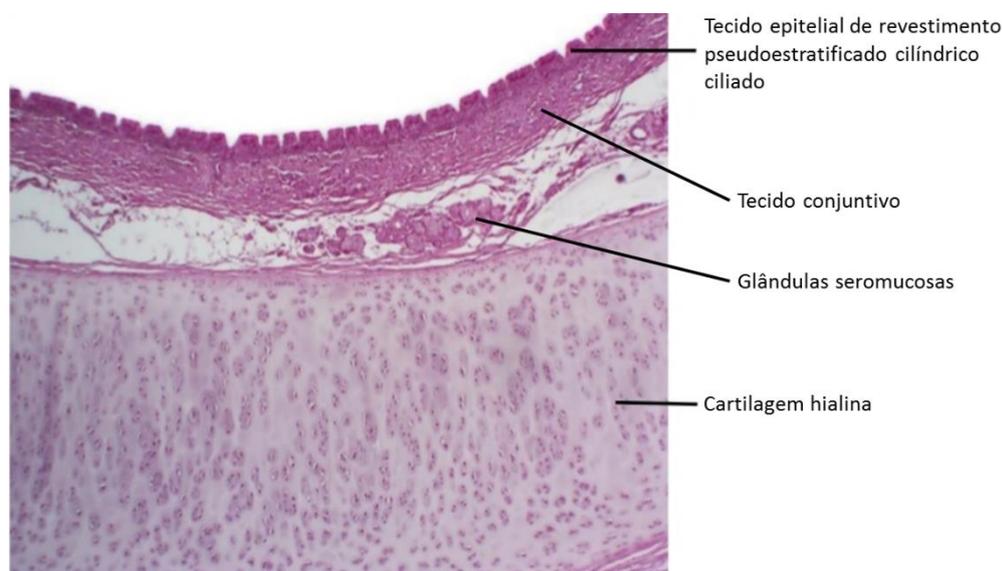
A estrutura traqueal é constituída por um número variável (16 a 20) de peças cartilaginosas do tipo hialino, em formato de C (chamados de anéis traqueais), cujas extremidades livres estão voltadas para a região dorsal. Esta região da traqueia, devido à ausência de anéis, é constituída por ligamentos fibroelásticos e feixes de músculo liso, que se prendem ao pericôndrio e unem as porções abertas das peças cartilaginosas (PARK et al., 2015; CROWLEY; BIRCHALL; SEIFALIAN, 2015).

Os anéis cartilaginosos são responsáveis por garantir a resistência mecânica da parede traqueal e junto com os ligamentos fibroelásticos eles impedem a distensão excessiva do lúmen traqueal. Os feixes musculares presentes nesta região possibilitam a regulação do lúmen durante os movimentos respiratórios. Além disso, essas estruturas garantem flexibilidade e mobilidade suficientes para assegurar a estabilidade da traqueia mesmo durante a rotação, flexão e extensão do pescoço (PARK et al., 2015).

Fisiologicamente a contração da musculatura é um sistema de defesa deste órgão porque causa a redução do lúmen traqueal, aumentando a velocidade do ar expirado e quando necessário facilita a remoção de secreções ou de corpos estranhos, acidentalmente deglutidos (RAINS et al., 1992).

Histologicamente, a traqueia é composta por três camadas: mucosa, submucosa e camada adventícia (GARTNER; HIATT, 2007). A Figura 2 mostra um corte histológico da traqueia humana.

Figura 2 – Corte histológico de traqueia humana.



Nota: Corte de traqueia. Coloração: hematoxilina e eosina.
Fonte: ANDRADE; FERRARI, 2014.

A camada da mucosa traqueal é constituída por epitélio pseudoestratificado, cilíndrico e ciliado com células calciformes e por lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, rico em fibras elásticas separando a mucosa da submucosa. Na camada da submucosa traqueal há tecido conjuntivo contendo numerosas glândulas seromucosas. Pequenos ductos destas glândulas atravessam a lâmina elástica e a lâmina própria para se abrirem no lúmen traqueal (GARTNER; HIATT, 2007).

A camada adventícia traqueal é constituída por tecido conjuntivo frouxo. A principal característica desta camada é representada pelos anéis na forma de C e por ancorar a traqueia aos tecidos adjacentes. Os anéis na forma de C são formados por cartilagem hialina e recobertos pelo pericôndrio (camada de tecido conjuntivo, denso na sua maior parte) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; GARTNER; HIATT, 2007).

2.2 Tecido cartilaginoso

O tecido cartilaginoso é uma forma especializada de tecido conjuntivo de consistência rígida. Desempenha a função de suporte de tecidos moles, reveste superfícies articulares, absorve choques e facilita o deslizamento dos ossos nas articulações. Como os demais tipos de tecido conjuntivo, o tecido cartilaginoso é composto por diferentes tipos de células, entre as quais prevalece os condrócitos que ficam localizados nas lacunas da MEC (SANTOS JR; WADA, 2007).

A cartilagem é um tecido que não possui vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos, cuja nutrição é feita por difusão de nutrientes e oxigênio a partir da matriz cartilaginosa (CAMILLO et al., 2017). As funções do tecido cartilaginoso estão diretamente ligadas a composição da MEC e é constituído por colágeno ou colágeno mais elastina, em associação com macromoléculas de proteoglicanos (proteínas + glicosaminoglicanos), ácido hialurônico e outras glicoproteínas (SANTOS JR; WADA, 2007).

De acordo com as diversas necessidades funcionais do organismo, a cartilagem se diferencia em três tipos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; GARTNER; HIATT, 2007):

- A cartilagem hialina, a mais abundante no corpo humano, contém delicadas fibrilas constituídas principalmente por colágeno tipo II em sua matriz.

- A cartilagem elástica é constituída por poucas fibrilas de colágeno tipo II e abundantes fibras elásticas dispersas responsáveis pela flexibilidade da matriz.
- A cartilagem fibrosa ou fibrocartilagem que apresenta matriz constituída por densas e espessas fibras colágeno tipo I, o que lhe permite resistir às forças de tensão mais elevada.

A bainha de tecido conjuntivo que envolve a maioria das cartilagens é denominada pericôndrio. Esta bainha onde estão localizados vasos sanguíneos e linfáticos e as enervações deste tecido é, juntamente com a MEC, responsável pela nutrição, oxigenação e eliminação dos refugos metabólicos da cartilagem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.3 Condrócitos

Os condrócitos são células com um núcleo grande e um nucléolo saliente, responsáveis pela secreção dos componentes da matriz cartilaginosa, como colágeno, principalmente tipo II, proteoglicanos e glicoproteínas (CRUZ et al., 2017).

Na periferia da cartilagem hialina, os condrócitos apresentam forma alongada, enquanto que, os situados mais profundamente são arredondados, com diâmetro entre 10 e 30 μm (GARTNER; HIATT, 2007). Em geral, eles aparecem em grupos de até oito células denominados grupos isógenos, ou seja, originados de um único condroblasto (CAMILLO et al., 2017). A principal função dos condrócitos é assegurar as propriedades biomecânicas, pela síntese dos componentes da MEC (LOMBELLO, DOS REIS JR; COHEN, 2003).

2.4 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que evoluiu em paralelo com a ciência dos biomateriais e a biotecnologia (LIAO et al., 2011). Ela tem o objetivo de promover a cura e idealmente a regeneração das estruturas teciduais, restabelecendo as funções mecânicas e fisiológicas de forma rápida e auto reconstrutiva (GUIMARÃES et al., 2016).

Por ser um campo multidisciplinar, se faz necessário ordenar sua complexidade, que contém elementos básicos para a construção de um novo tecido

biológico como: células responsivas, biomateriais e agentes morfogênicos (FERNANDES et al., 2015; LANGER; VACANTI, 1993).

- Células responsivas, são células sensíveis à sinalização que podem ser obtidas a partir de abordagens básicas. Um dos métodos de obtenção é o modo autólogo, no qual, por meio de uma biópsia, as células são colhidas e dissociadas do tecido ou órgão doador. Essa técnica se aplica à maioria dos órgãos (incluindo fígado, pâncreas, cartilagem e osso). Contudo, para alguns tecidos ou órgãos como as válvulas cardíacas a biópsia direta é uma alternativa inviável. No entanto, para suprir este método, existe outra opção para obtenção de células responsivas, que consiste no isolamento de células-tronco embrionárias/adultas ou precursoras (FERNANDES et al., 2015; KHANG et al., 2007).
- Os biomateriais são compostos de origem natural ou sintética, que podem ser utilizados como matéria-prima para obter *scaffolds* com o objetivo de criar um microambiente apropriado para o cultivo de células, para então serem reinseridas no tecido funcional (KHANG et al., 2007).
- Os agentes morfogênicos, também chamados de fatores de crescimento, são proteínas solúveis que atuam na proliferação, migração e diferenciação tecidual. Além disso, regulam positiva ou negativamente a síntese de proteínas, fatores de crescimento e de receptores (FERNANDES et al., 2015; KHANG et al., 2007).

2.5 Biomateriais

O termo biomaterial de acordo com a 2ª Conferência de Consenso sobre Definições de Biomateriais, realizada pela European Society for Biomaterials-ESB no ano de 1991, definiu biomateriais como: “materiais destinados a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (WILLIAMS, 1999). O termo biomaterial ainda pode ser entendido como qualquer material sintético ou natural, que juntamente com as células constituem toda ou parte de uma estrutura viva ou de um dispositivo biomédico capaz de executar, substituir ou melhorar uma função natural sem que dê origem a reações tóxicas de qualquer natureza (DUTTA et al., 2017).

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com sua origem em naturais (derivados de plantas ou animais), ou sintéticos (metais, cerâmicas, polímeros ou compósitos) (BHAT; KUMAR, 2013):

- Os biomateriais derivados de recursos naturais têm a vantagem da similaridade biológica, podendo atuar positivamente na adesão e no crescimento celular. Estes materiais são, geralmente, biocompatíveis e biodegradáveis e não causam respostas inflamatórias ou imunes (CHANG et al., 2017). Alguns biomateriais podem ser obtidos a partir do próprio paciente (autógenos), ou mesma espécie (alógenos), ou de espécie diferente (xenógenos) (SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013). Por exemplo colágenos, gelatinas, alginatos, ácido hialurônico, entre outros, são amplamente utilizados nas áreas de saúde, especialmente na fabricação de *scaffolds* para o crescimento e proliferação celular (BHAT; KUMAR, 2013), para tratamento de feridas e liberação controlada de fármacos (PIRES et al., 2015). Estas matérias-primas tem resistência mecânicas limitadas, o que restringe suas aplicações em regiões que suportam carga mecânica elevada. No entanto, possibilitam modificações químicas que melhoram suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas (BHAT; KUMAR, 2013).
- Entre os materiais sintéticos disponíveis para a obtenção de biomateriais, a classe dos metais destaca-se por apresentar excelente condutividade elétrica, térmica e propriedades mecânicas como alta resistência à fadiga e à fratura. Devido à estas características, os biomateriais metálicos têm sido utilizados para fixação de fraturas ósseas, articulações artificiais e próteses (PARK; BRONZINO, 2002).

As cerâmicas do ponto de vista químico são compostos inorgânicos, geralmente constituídos por elementos metálicos e não-metálicos unidos por ligações iônicas e/ou covalentes (RATNER et al., 1996). Possuem densidade moderada, elevada biocompatibilidade e boa resistência à compressão, sendo utilizados como implantes dentários e como material de preenchimento (DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2014; FISHER; REDDI, 2003).

Os polímeros são macromoléculas de alta massa molar, compostos por pequenas unidades estruturais repetitivas ao longo da cadeia chamados monômeros, unidos geralmente por ligações químicas covalentes. As principais

vantagens dos biomateriais poliméricos em comparação com os biomateriais metálicos ou cerâmicos está na versatilidade, capacidade de fabricação e manipulação (POINERN; BRUNDAVANAM; FAWCETT, 2012). Somados às propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, os polímeros sintéticos são aplicados como implantes ou dispositivos biomédicos, sendo utilizados em próteses faciais, tubos traqueais, componentes cardíacos, partes do rim e do fígado (BHAT; KUMAR, 2013).

Os biomateriais compósitos são uma combinação de dois ou mais tipos de materiais de modo que as propriedades mecânicas resultantes sejam superiores à dos componentes de forma isoladamente. No entanto, para sua utilização biomédica, os compósitos mesmo que alcancem o desempenho mecânico desejado, é primordial que sejam orientados para melhoria da biocompatibilidade do material, uma vez que a compatibilidade biológica é mais importante do que a compatibilidade mecânica (GOMES, 2010; WANG, 2003). A formação dos compósitos pode se dar por diversas combinações, sendo que as principais combinações são do tipo polímero-cerâmica e metal-cerâmica (PIRES et al., 2015).

Os biomateriais também podem ser classificados de acordo com resposta induzida ao meio biológico, sendo biotoleráveis, bioinertes, bioativos, bioabsorvíveis ou bioreabsorvível:

- Os materiais biotoleráveis e bioinertes provocam uma reação orgânica de encapsulamento, formando uma camada de tecido fibroso entre o material e o tecido biológico, onde pode ser notado a presença de macrófagos e células fagocitárias (SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; GOMES, 2010).
- Os bioativos possuem a capacidade de interagir intimamente com o organismo, sendo incorporado ao tecido biológico sem a formação de membrana de interface (SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; GOMES, 2010).
- Os bioabsorvíveis podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molar. Os bioreabsorvíveis mostram degradação através da diminuição de tamanho, gerando subprodutos (compostos de baixa massa molar) e que são reabsorvidos e eliminados por rotas metabólicas do organismo (VERT et al., 2012; BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

2.6 Scaffolds

Os *scaffolds* são definidos como matrizes tridimensionais porosas, temporárias, degradáveis que fornecem suporte necessário para fixação, proliferação, diferenciação e orientação celular, permitindo assim o crescimento de tecido semelhante. Esta estrutura busca mimetizar as características da MEC, a fim de fornecer o ambiente biomecânico apropriado para diferenciação celular e crescimento do tecido (CUI et al., 2012; BERNER et al., 2014; MITSUISHI et al., 2013).

A seleção dos biomateriais mais adequados para obtenção de *scaffolds* para engenharia de tecido requer o cumprimento de alguns requisitos, cujo efeitos negativos sobre o organismo sejam os mínimos possíveis. As propriedades de maior relevância para obtenção de *scaffolds* incluem: biocompatibilidade; biodegradabilidade; propriedades mecânicas; porosidade e interconectividade dos poros e morfologia da superfície (KHORSHIDI et al., 2016; CUI et al., 2012; SUÁREZ-GONZÁLEZ et al., 2010; MAIA et al., 2010).

2.7 Propriedades necessárias para obtenção dos *scaffolds*

2.7.1 Biocompatibilidade

O *scaffold* quando projetado para ser utilizado em contato íntimo com tecidos vivos, tem como critério e ponto crítico do processo de obtenção, empregar matérias-primas que não causem efeitos nocivos (CHEN; LIANG; THOUAS, 2013). Desta forma, a biocompatibilidade é considerada propriedade fundamental para os dispositivos biomédicos, e tem como definição a capacidade de um material em executar uma função específica com uma resposta apropriada por parte do hospedeiro (CHEN; THOUAS, 2015; MITSUISHI et al., 2013).

Os requisitos necessários para a biocompatibilidade dos *scaffolds* são complexos e variam de acordo com o local de aplicação. O dispositivo ao ser implantado no corpo pode apresentar reações, podendo ser positivas ou negativas. Em curto prazo, essa propriedade é determinada pela capacidade de superfície do dispositivo aderir no tecido adjacente e interação célula-matriz, enquanto que a longo prazo é determinado pelas características químicas do biomaterial e subprodutos gerados (CHEN; LIANG; THOUAS, 2013).

O principal objetivo de se avaliar a biocompatibilidade é detectar quaisquer efeitos adversos gerados, portanto, o biomaterial deve ser avaliado de acordo com

sua capacidade de induzir citotoxicidade (morte celular ou tecidual), mutagenicidade (dano genético), carcinogenicidade (a formação de câncer), pirogenicidade e alergenicidade (respostas imunes) ou trombogenicidade (coagulação do sangue) (MITSUISHI et al., 2013).

Por conseguinte, as pesquisas estão sendo direcionadas na busca por materiais bioativos, ou por modificações de superfície, através da biofuncionalidade. Para tanto, são utilizados revestimentos para modular a resposta celular mimetizando características específicas da MEC para estimular a migração, adesão e proliferação celular (MITSUISHI et al., 2013; CHEN; LIANG; THOUASB, 2013).

2.7.2 Biodegradabilidade

O termo biodegradação é definido como um fenômeno no qual um material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, podendo seus subprodutos serem eliminados do organismo, desaparecendo do sítio de implantação. Os produtos de degradação do *scaffold* devem ser atóxicos, facilmente absorvidos ou excretados do organismo pelas vias metabólicas (SULTANA; WANG, 2011; TABATA, 2009).

A degradação do material pode acontecer por hidrólise, reticulação ou por ação enzimática. Na hidrólise ou por ação enzimática, a cadeia principal do material é hidrolisada (por ação da água) ou digerida enzimaticamente, diminuindo a massa molar e fazendo o material gradativamente desaparecer. Na reticulação o material é quimicamente reticulado, formando assim, um hidrogel insolúvel em água. Quando a ligação cruzada é degradada, gera fragmentos solúveis que serão lavados do local implantado, resultando na eliminação do material (MAIA et al., 2010; TABATA, 2009).

A taxa de degradação do biomaterial, utilizado para obtenção do *scaffold*, deve apresentar compatibilidade com a taxa de neoformação tecidual, promovendo assim uma transição gradual. Entretanto, a taxa de degradação do *scaffold* depende de sua composição, nível de pressão e do ambiente onde ele é implantado (MAIA et al., 2010). Se a taxa de degradação for rápida, acarretará perda da função para suportar o crescimento celular. Enquanto, que uma taxa de degradação lenta acarretará no aparecimento de uma resposta inflamatória indesejada, comprometendo a formação do novo tecido (CHANG et al., 2017; ZHU, 2010; ANDERSON; LANGONE, 1999).

2.7.3 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos materiais representam um importante conjunto de características a serem consideradas na fabricação do *scaffold* (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008). Idealmente, devem ser as mais próximas possíveis do tecido a ser substituído, e de uma perspectiva prática, devem ser fortes o suficiente para permitir o manuseio cirúrgico durante sua implantação (O'BRIEN, 2011).

As propriedades mecânicas do *scaffold*, como resistência a tração, flexão e compressão, ductilidade (propriedade de suportar a deformação sem romper ou fraturar) e módulo de elasticidade ou módulo de Young (razão entre tensão e deformação na zona elástica) são determinadas tanto pelas propriedades, quanto pela estrutura do material (macro, micro e nanoestrutura). A combinação das propriedades mecânicas com o local de implantação é extremamente importante para que a recuperação tecidual não seja limitada por falhas mecânicas (NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016; MUSCHLER; NAKAMOTO; GRIFFITH, 2004).

Embora estas características sejam importantes a todos os tecidos, a produção de *scaffold* com propriedades mecânicas adequadas é um dos grandes desafios na tentativa de regeneração de tecido cartilaginoso. O *scaffold* implantado deve ter uma integridade mecânica suficiente desde o momento da implantação até a regeneração total do tecido (O'BRIEN, 2011; HUTMACHER, 2000). Portanto, os biomateriais utilizados na obtenção do *scaffold* devem ter propriedades mecânicas que sejam mais próximas possíveis aos do tecido saudável durante o período biodegradação e regeneração tecidual (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008).

2.7.4 Porosidade e interconectividade dos poros

O *scaffold* deve possuir poros abertos, com geometria interconectada em uma matriz altamente porosa, capaz de aumentar a superfície de fixação, permitindo o crescimento e a distribuição celular de forma organizada em toda estrutura e facilitando a neovascularização. A porosidade e interconectividade também são importantes para difusão fisiológica de nutrientes, gases e para a remoção de resíduos metabólicos resultante da atividade celular na estrutura do *scaffold* (RODRIGUEZ-VAZQUEZ et al., 2015; SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004).

O grau de porosidade sempre influencia outras propriedades dos *scaffolds*, como estabilidade mecânica. Portanto, seu valor, deve ser equilibrado com as

necessidades mecânicas do tecido específico a ser substituído (SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004).

Assim, o *scaffold* ideal deve apresentar um volume 80-90% de porosidade (RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ et al., 2015). No entanto, se a taxa de porosidade for menor, irá acontecer a oclusão dos poros pelas células, desta forma, evitando a permeação celular, produção de MEC e neovascularização das áreas internas (SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004).

2.7.5 Diâmetro dos poros

Diante da natureza diversa das arquiteturas dos tecidos orgânicos, os órgãos requerem diferentes microambientes para a sua regeneração, que inclui o emprego de *scaffold* com dimensões de poros compatíveis com cada tecido específico, levando em consideração o diâmetro das células existente no tecido (REBELO et al., 2016; LEONG; CHEAH; CHUA, 2003). Ikada (2006) sugere que o tamanho ideal dos poros para promover a proliferação celular seja faixa de 100 a 500 μm .

2.8 Biomateriais aplicados na obtenção do *scaffolds*

2.8.1 Poli (L-co-D,L ácido lático) (PLDLA)

A família dos Poli (α - hidroxí ácidos), como os poli (ácido lácticos) englobam os materiais de maior destaque na classe de polímeros bioreabsorvíveis (DUARTE et al., 2016; MOTTA; DUEK, 2008; BARAÚNA et al., 2007).

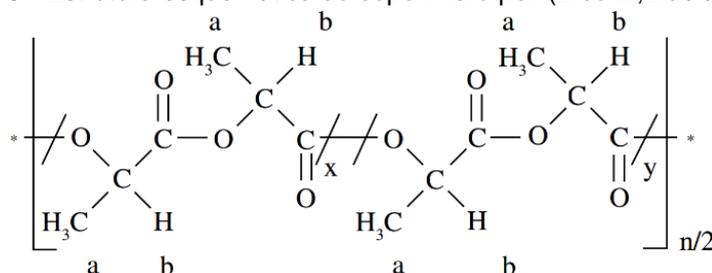
A grande vantagem desses polímeros está em reunir características como bioreabsorção, biocompatibilidade e biodegradabilidade (MESSIAS et al., 2014) que ocorrem por hidrólise de suas ligações ésteres, gerando produtos não tóxicos (ácido lático, CO_2 e H_2O) que serão absorvidos pelo organismo sem prejuízo das funções fisiológicas gerais (DUARTE et al., 2014; FERREIRA et al., 2008; DRUMOND; WANG; MOTHÉ, 2004).

O poli (ácido lático) possui um carbono beta assimétrico que permite a obtenção de formas químicas específicas: forma levógira - poli (L-ácido lático)/PLLA, forma dextrógira - poli (D-ácido lático)/PDLA e forma racêmica - poli (D,L-ácido lático)/PDLLA (ERBETTA et al., 2011; MERKLI et al., 1998), passíveis de serem combinados, formando assim um novo composto, como o copolímero poli (L-co-D,L ácido

lático)/PLDLA, que apresenta propriedades diferentes daquelas exibidas por cada monômero de forma isolada (ESPOSITO, 2009; MOTTA; DUEK, 2008).

O copolímero PLDLA, tem como característica aliar as particularidades mecânicas que a presença do monômero L-ácido lático lhe confere, contudo, sem a desvantagem do elevado tempo de degradação requerido por esse polímero. Esta propriedade é possível pela presença da cadeia polimérica do D,L ácido lático, que por gerar segmentos completamente amorfos, contribuindo para que o tempo de biodegradação do copolímero PLDLA seja diminuído (ESPOSITO et al. 2009; MOTTA; DUEK, 2008; MESSIAS et al. 2007; BARAÚNA et al., 2007). Uma representação da estrutura química do PLDLA é apresentada na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura esquemática do copolímero poli (L-co-D,L ácido lático)



Fonte: MARTINS et al., 2014

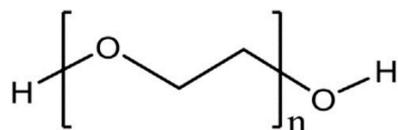
Devido as características apresentadas pelo PLDLA, este copolímero está sendo utilizado em diversas aplicações, como membranas utilizadas em curativos para feridas (CHAUD et al., 2017), *scaffolds* para reparo ou substituição de tecidos (RONCA et al., 2016; MESSIAS et al., 2014), na preparação de dispositivos de fixação (ADRIANA et al., 2016), próteses temporárias para recuperação de fraturas ósseas (MOTTA; DUEK, 2008), e sistemas de liberação controlada de fármaco (MOTTA; DUEK, 2009).

2.8.2 Polietilenoglicol

O polietilenoglicol (PEG) é um homopolímero sintético linear obtido a partir do etilenoglicol. Este composto está disponível em várias massas molares, apresentando fórmula molecular $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$, onde n é o número médio de grupos de óxido de etileno presentes na molécula, denominado grau de polimerização (CÔRTEZ et al., 2013; ALESSI et al., 2005). Além disso, o grupamento hidroxila terminal, pode ser facilmente modificado por vários grupos funcionais, tais como carbóxilo, tiol, acrilato

ou moléculas bioativas (CHANG et al., 2017). Uma representação da estrutura química do PEG é apresentada na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura esquemática do polietilenoglicol



PEG

Fonte: CHANG et al., 2017

Atualmente o PEG está sendo amplamente utilizado em produtos industriais em aplicações médicas, biomédicas, ambientais e de engenharia (BUZZI; YUAN; ROUTLEY, 2017). O fato de possuir ótima solubilidade em água, ser biodegradável e não tóxico justifica tais aplicação (DE MEDEIROS; KANIS, 2010; HARRIS, 1992). Além destas características, o PEG tem a capacidade de formação de estruturas mais porosas (CÔRTEZ et al., 2013; SCOTT et al., 2010; ZANETTI-RAMOS et al., 2006).

O PEG pode ser utilizado como surfactante, estabilizador coloidal (SANTOS et al., 2009), agente plastificante na formulação de formas de dosagem sólidas (ZANETTI-RAMOS et al., 2006), agente de reticulação (química, física ou iônica) na formulação de hidrogéis (CHANG et al., 2017) e de biofilmes (DIAS et al., 2014). Os plastificantes são adicionados a um material polimérico, com a finalidade de modificar as propriedades do mesmo, com o intuito de melhorá-las. A adição de agente reticulante é outra forma de melhorar as propriedades dos polímeros (RAPHAEL; SONE; GIMENES, 2014).

2.8.3 Colágeno

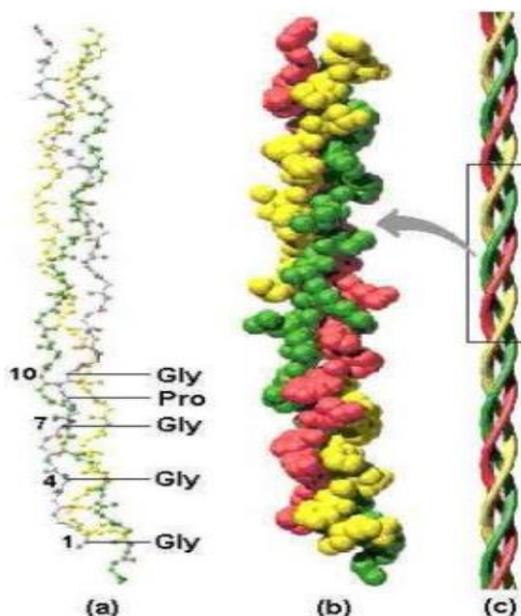
O colágeno (COL) é a proteína mais abundante do organismo humano, compõem uma família que inclui mais de 20 membros, de natureza fibrosa, e é especialmente encontrada no tecido conjuntivo. Representa cerca de 25 a 30% da massa de toda proteína corporal (WALTERS; STEGEMANN, 2014; CHAK; KUMAR; VISHT, 2013; SHIRANE et al., 2010). Desempenha um papel importante na manutenção da integridade biológica e estrutural da MEC, proporcionando suporte físico aos tecidos (MOHSENI et al., 2017; SADEGHI-AVALSHAHR et al., 2017). A proteína COL está abundantemente presente em tecidos fibrosos do corpo, como nos

ossos, tendões, cartilagens, veias, ligamentos, pele, dentes, disco intervertebral, intestino, bem como nos músculos e na camada córnea dos olhos (CHAK; KUMAR; VISHT, 2013; SILVA; PENNA, 2012).

O COL é classificado como estriado (fibroso), não fibroso (formador de rede), microfibrilar (filamentoso) e associado às fibrilas. A unidade básica desta proteína é o tropocolágeno, formado por três cadeias de polipeptídeos unidas por ligações de hidrogênio que se entrelaçam uma em torno da outra em arranjo helicoidal, formando assim uma molécula linear com 180nm de comprimento, 1,4 a 1,5nm de largura e massa molar de 360.000Da (PRESTES, 2015).

De modo geral o COL é constituído por cerca de 30% de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina, 10% de hidroxiprolina, 1% de hidroxilisina e pequenas quantidades de aminoácidos polares e carregados. Os aminoácidos glicina, prolina e alanina são alifáticos, e a lisina é um aminoácido com características básicas (GONÇALVES et al., 2015; PRESTES, 2013; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Uma representação da estrutura molecular do COL é apresentada na Figura 5.

Figura 5 – Estrutura molecular do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla.



Fonte: GONÇALVES et al.
Nota: Gly: Glicina; Pro: Prolina

O COL é uma das principais proteínas constituintes da MEC, sendo um substrato natural para as células, orientando e estimulando a formação tecidual, além de propriedades como hidrofiliabilidade, excelente biocompatibilidade e estabilidade

(SADEGHI-AVALSHAHR et al., 2017; PIRES, 2015). Suas propriedades únicas e abundância no tecido vivo, tornaram o colágeno uma escolha apropriada para preparação de biomateriais de diferentes formas e aplicações, como curativos e enxertos de pele, membranas e esponjas para revestimento de queimaduras, géis para hemostasia e *scaffolds* para o crescimento de células (PIRES, 2015).

O colágeno tipo I é o mais comum, geralmente são encontrados em locais que resistem a grandes tensões como, por exemplo, na pele, tendões, ligamentos e ossos. Este colágeno é uma proteína macromolecular constituída de três cadeias polipeptídicas (duas Alfa-1 e uma Alfa-2) que estão sob a forma helicoidal em sua porção central, já nas extremidades amínica e carboxílica permanece na forma globular (PRESTES, 2013; TORLEY; ARCY; TROUT, 2000).

O colágeno tipo II é a proteína fibrilar mais abundante presente na cartilagem. A composição e a organização estrutural entre colágeno e proteoglicanos, possibilita as características de resistência, elasticidade e compressibilidade da cartilagem (ROSSI, 2008), A síntese do colágeno tipo II ocorre nos condroblastos. Morfologicamente não é possível distingui-lo do colágeno tipo I (GONÇALVES et al., 2015).

3. OBJETIVO

3.1 Geral

Desenvolver e caracterizar *scaffold* laminar para aplicação na regeneração de tecido cartilaginoso traqueal.

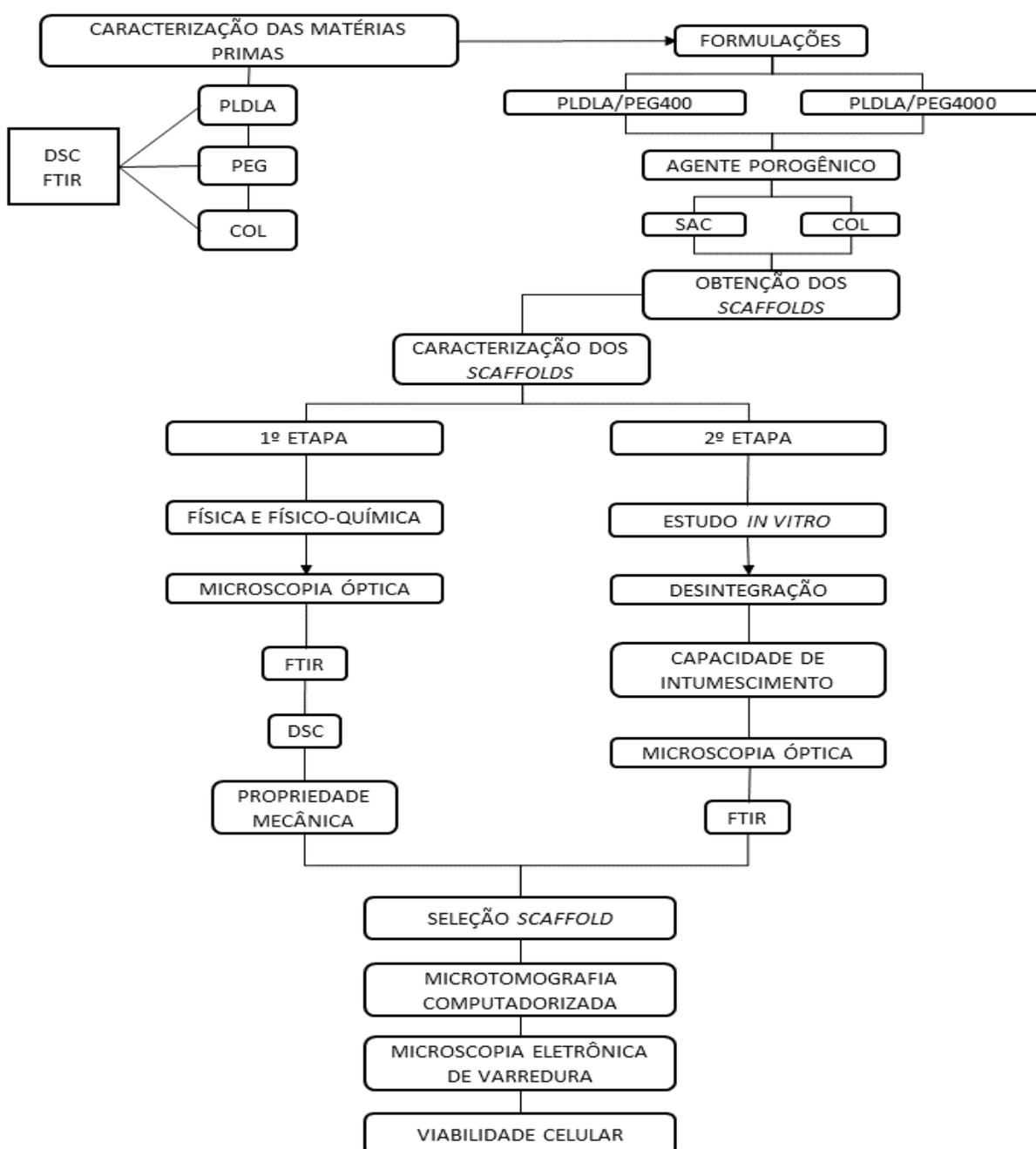
3.2 Específicos

- Desenvolver e avaliar o *scaffold* laminar;
- Avaliar os pontos críticos e caracterizar a estrutura de superfície dos *scaffolds*;
- Caracterizar as propriedades físicas, físico-química e (físio)mecânicas dos *scaffolds*;
- Identificar e avaliar a formação de poros, volume e interconectividade dos poros dos *scaffolds*;
- Avaliar o perfil de desintegração e intumescimento dos *scaffolds*.
- Avaliar a viabilidade celular dos *scaffolds*.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento dos estudos foram realizados passos que envolveram a caracterização das matérias-primas, preparação e caracterização dos *scaffolds* (Figura 6). As análises de caracterização foram baseadas na identificação de propriedades físicas, físico-químicas, (físio)mecânicas e biológicas de *scaffold* destinado à regeneração do tecido cartilaginoso traqueal.

Figura 6 – Representação esquemática do delineamento experimental para caracterização das matérias primas, desenvolvimento e avaliação dos *scaffolds*.



Fonte: Elaboração própria.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

Água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$); Colágeno bovino em pó (Novaprón. Lote: 112520160725); Cloreto de metileno (Diclorometano) (CH_2Cl_2) (Synth. Lote: 194256, Brasil); Fosfato de potássio bibásico anidro (K_2HPO_4) (Dinâmica. Lote: 49054, Brasil); Fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4) (Synth. Lote: 87959, Brasil); Mucina de estômago de porco (Sigma Aldrich. Lote: SLBF3229V) Polietilenoglicol 400 ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$) (Dinâmica. Lote: 63611, Brasil); Polietilenoglicol 4000 ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$) (Vetec. Lote: 0801464, Brasil); Poli (L-co-D,L ácido láctico)/PLDLA (70:30) (fornecido pelo Labiomat/PUC-Sorocaba); Sacarose grau alimentício ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) (União Refinado, Brasil); os demais materiais utilizados nos ensaios são de grau farmacêutico.

5.2 Métodos

5.2.1 Preparação dos *scaffolds* PLDLA/PEG400/SAC e PLDLA/PEG4000/SAC

O *scaffold* laminar foi preparado utilizando a técnica de evaporação de solvente, adicionando sacarose com agente porogênico. No ensaio, a sacarose (SAC) foi padronizada em tamis de 60 mesh (250-300 μm).

Para obtenção das amostras foram preparadas misturas PLDLA/PEG400/SAC (1:2:2 m/m) e PLDLA/PEG4000/SAC (1:2:2 m/m). O PLDLA (0,25 g) foi solubilizado em quantidade suficiente de diclorometano (CH_2Cl_2) para obter uma solução a 10% (m/v), nesta mistura foi adicionado PEG400 ou PEG 4000 (0,5 g). previamente dissolvido em CH_2Cl_2 . Ambas as dispersões foram homogeneizadas manualmente durante 3 min e a sacarose (0,5 g) foi adicionada durante a agitação. A solução polimérica foi estendida sobre placa de vidro, previamente desengordurada, com auxílio de um extensor calibrado para vazão de $0,25 \text{ mL} \cdot \text{seg}^{-1}$. A secagem para eliminação do solvente foi realizada a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ \text{C}$). O controle da secagem foi feito por gravimetria até que o *scaffold* laminado permanecesse com massa constante.

5.2.2 Preparação dos *scaffolds* PLDLA/PEG400/COL e PLDLA/PEG4000/COL

O *scaffold* laminar foi preparado utilizando a técnica de evaporação de solvente como descrito anteriormente, mas neste caso o colágeno em pó foi usado como agente porogênico.

Para obtenção dos *scaffolds* foram preparadas misturas PLDLA/PEG400/COL (1:2:2 m/m) e PLDLA/PEG4000/COL (1:2:2 m/m). O PLDLA foi solubilizado em CH₂Cl₂ para obter uma solução a 10% (m/v). O colágeno em pó (0,5 g) foi adicionado sob agitação manualmente por 3 min. A solução polimérica foi estendida sobre placa de vidro, previamente desengordurada, com auxílio de um extensor calibrado para vazão de 0,25 mL. seg⁻¹. A secagem para eliminação do solvente foi realizada temperatura ambiente (23±2° C). O controle da secagem foi feito por gravimetria até que o *scaffold* laminado permanecesse com massa constante.

5.2.3 Caracterização da estrutura de superfície dos *scaffolds*

Para avaliação dos *scaffolds*, as formulações PLDLA/PEG400/SAC, PLDLA/PEG4000/SAC, PLDLA/PEG400/COL e PLDLA/PEG4000/COL foram submetidos a processo de lixiviação para remoção do agente porogênico. Em seguida foram secas e analisadas quanto a presença de poros usando microscopia óptica (MO).

5.2.4 Processo de lixiviação para remoção do agente porogênico

Os agentes porogênicos foram removidos das formulações por lixiviação em água ultrapura (18,2 MΩ. cm⁻¹). As amostras foram incubadas em excesso de água, para evitar saturação do meio, e mantidas sob agitação orbital (Incubadora com agitação orbital, TE-4200, TECNAL. Piracicaba, Brasil), a 37±1 °C, a 50 rpm durante 24 horas.

5.2.5 Microscopia óptica

A superfície da estrutura porosa das formulações dos *scaffolds* foram analisadas por ensaio de MO (Microscópio óptico, Alpha phot-2-YS2. Nikon. Tóquio, Japão) com aumento óptico em 40x. Para captura das imagens as amostras foram dispostas sobre lâminas de vidro para microscopia.

5.2.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos grupamentos químicos específicos dos componentes PLDLA, PEG400, PEG4000, COL e as formulações dos *scaffolds* PLDLA/PEG400/SAC, PLDLA/PEG4000/SAC (estas formulações foram analisadas sem a presença do agente porogênico sacarose), PLDLA/PEG400/COL e PLDLA/PEG4000/COL foram realizadas por ensaio de FTIR (Shimadzu, FTIR IRAffinity-1S. Kyoto, Japão) no modo de reflectância total atenuada (ATR). Antes da análise por FTIR o PLDLA foi dissolvido em CH₂Cl₂ e seco a temperatura ambiente (23 °C±2). Os demais componentes da formulação foram analisados sem tratamento prévio.

Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda 600 - 4.000 cm⁻¹ com 128 scans. Os espectros foram normalizados e as bandas de estiramentos foram associadas aos principais grupos químicos de cada componente.

5.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para caracterização termoanalítica (DSC) foi analisado o perfil térmico dos componentes PLDLA, PEG400, PEG4000, COL e das formulações dos *scaffolds* PLDLA/PEG400/SAC, PLDLA/PEG4000/SAC (estas formulações foram analisadas sem a presença do agente porogênico sacarose), PLDLA/PEG400/COL e PLDLA/PEG4000/COL. No ensaio por DSC (Thermal Analyzer TA 60W – Shimadzu DSC-60. Kyoto, Japão) foi utilizado cadinho de alumínio contendo aproximadamente 2 mg de amostra. O cadinho foi hermeticamente fechado, usando como referência (branco) um cadinho vazio. O aquecimento foi realizado na faixa entre 25 e 400° C, sob uma razão de aquecimento de 10° C.min⁻¹ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 35 mL. min⁻¹.

5.2.8 Propriedade mecânica

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* PLDLA/PEG400/SAC, PLDLA/PEG4000/SAC, PLDLA/PEG400/COL e PLDLA/PEG4000/COL foram avaliados utilizando texturômetro (Stable Micro Systems - TA-XT Plus, Surrey, Reino Unido) e os resultados foram registrados pelo software Exponente Texture Analysis. Para este teste foram analisadas a resistência à tração, compressão (relaxação,

resiliência, perfuração) e mucoadesão. Os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 1. As medidas foram feitas em triplicata.

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para avaliação das propriedades mecânicas dos *scaffolds*

Parâmetros	Perfuração	Resiliência	Relaxação	Tração
Aparato	Suporte do Filme Part. Código. HDP/FSR Lote nº 13085	Suporte do Filme Part. Código. HDP/FSR Lote nº 13085	Suporte do Filme Part. Código. HDP/FSR Lote nº 13085	Mini presilhas Part Código. A/MTG Lote nº 13101
Modo de teste	Compressão	Compressão	Compressão	Tensão
Pré-Teste velocidade	2 mm/s	1 mm/s	1 mm/s	1 mm/s
Teste velocidade	1 mm/s	0,5 mm/s	0,5 mm/s	2 mm/s
Pós-teste velocidade	10 mm/s	0,5 mm/s	10 mm/s	10 mm/s
Modo alvo	Distância	Distância	Distância	Distância
Distância	5 mm	*2 mm	*2 mm	**30 mm
Tipo de gatilho	Auto	Auto	Auto	Auto
Tipo de força	5g	5g	5g	5g

*Houve alteração na distância para 1 mm na avaliação das formulações PLDLA/PEG4000/COL; PLDLA/PEG4000/SAC; PLDLA/4000 e PLDLA.

** Houve alteração na distância para 50 mm para formulação PLDLA/PEG400.

Fonte: Elaboração própria

5.2.9 Ensaio de mucoadesão

A capacidade mucoadesiva foi avaliada pela força necessária para destacar o disco de mucina da superfície do *scaffold*. Os discos de mucina com 8 mm de diâmetro foram preparados por compressão (Lemaq, Máquina compressor rotativa, Mini Express LM-D8, Diadema, BR). As amostras do *scaffold* foram fixadas em plataforma apropriada e mantidas em banho de água com temperatura ajustada para $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O disco de mucina foi previamente hidratado e fixado na extremidade inferior da sonda

analítica (P/10). Sendo, em seguida comprimido no sentido apical → basal sobre a superfície das amostras, com força de 0,049 N. O tempo de contato do disco com a superfície das amostras foi de 300 s. O deslocamento da sonda analítica no sentido basal → apical foi programada para 0,5 mm.s⁻¹. A força necessária para destacar o disco de mucina da superfície do *scaffold* foi determinada pela relação tempo (s) x força (N)

5.2.10 Estudo *in vitro* – Desintegração e em água ultrapura; meio tamponado (pH 7,4); fluído salivar simulado (FSS)

As amostras dos *scaffolds* PLDLA/PEG400/SAC, PLDLA/PEG4000/SAC, PLDLA/PEG400/COL e PLDLA/PEG4000/COL foram cortadas em dimensões 2x2 cm, pesadas e transferidas para Erlenmeyer contendo os meios específicos: água ultrapura, meio tamponado (pH 7,4) e FSS (pH 6,9) preparado como descrito por De Moraes Porto e Almeida (2013). Foram selados e mantidas sob agitação orbital em incubadora, a 37°C±1°C, a 50 rpm, nos tempos zero (material seco), 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Em cada tempo uma amostra foi removida do meio de incubação pesada e a massa úmida foi comparada com a massa seca do *scaffold* antes de adicionar no meio de incubação (tempo zero).

5.2.11 Caracterização dos *scaffolds* durante os ensaios

As amostras foram removidas do Erlenmeyer nos tempos pré-determinados. A solução remanescente na superfície dos *scaffolds* foi retirada com papel absorvente. Neste ensaio foi avaliado a perda de massa, a capacidade de intumescimento, o teor de umidade residual, a presença ou ausência de poros na superfície dos *scaffolds* (avaliados em cada tempo do ensaio, após verificação do teor de umidade residual) por MO, como descrito no item 5.2.3.2 e por ensaio de FTIR, como descrito no item 5.2.4.

5.2.12 Perda de massa e Capacidade de intumescimento

Este ensaio consiste em comparar a massa inicial das formulações (tempo zero) com a massa das formulações após os tempos previamente determinados. Para determinar a perda de massa o excesso de umidade foi removido com papel absorvente e a secagem do *scaffold* foi realizada utilizando balança analítica acoplada a um sistema de secagem por radiação infravermelha (Shimadzu – MOC-63U. Kyoto,

Japão). As condições de secagem na balança analítica foram mantidas no modo “slow”, 60 °C, variação de massa de 5% e precisão de 0,001 g. Para os testes as amostras foram colocadas em cadinho de alumínio e expostas a radiação infravermelha até massa constante. A variação da massa permitiu determinar o percentual de erosão da amostra. Para determinar a relação entre o grau de intumescimento da amostra e o percentual de erosão foi utilizado o modelo matemático descrito por RENOUF-GLAUSER et al., 2005 (equação 1). Os ensaios foram realizados em duplicata.

Capacidade de intumescimento (%) = $[(m_u - m_s)/m_i] \cdot 100\%$ (equação 1) onde:

m_u : média da massa úmida

m_s : média da massa seca (desintegração)

m_i : média da massa inicial

5.2.13 Seleção dos *scaffolds*

Os *scaffolds* foram selecionados a partir dos resultados obtidos nas análises de MO; FTIR; DSC; ensaio de propriedade mecânica e estudo *in vitro* de desintegração e capacidade de intumescimento. Os *scaffolds* selecionados foram avaliados por ensaio de microtomografia computadorizada, microscopia eletrônica de varredura e ensaio de viabilidade celular por vermelho neutro.

5.2.14 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Uma pequena porção dos *scaffolds* foi colocada em uma fita adesiva de carbono dupla face presa a um stub de alumínio. Os suportes foram recobertos com uma fina camada de ouro no metalizador (SC7620 Spatter Coater). As amostras foram submetidas à condição de vácuo, o gás argônio foi liberado como meio que forma o plasma para ionizar a placa metálica de ouro e a corrente foi ajustada para 3 mA, durante 3 min para obter um filme de recobrimento com espessura ~ 92 Å. Em seguida, as amostras foram aleatoriamente microfotografadas e digitalizadas. Para a análise das amostras foi utilizada tensão de aceleração igual 15 kV e corrente do feixe igual a 100 pA. (Ensaio desenvolvido no LRAC – UNICAMP).

5.2.15 Microtomografia computadorizada

As características morfométricas de porosidade, interconectividade dos poros e polidispersividade do tamanho dos poros dos *scaffolds* foi determinada por microtomografia computadorizada (μ CT). A imagem dos *scaffolds* foi capturada por microtomógrafo X-Ray (Brucker-micro CT – SkyScan 1174, Kontich, Bélgica) com scanner de alta resolução, com 28 μ m pixel e tempo de integração de 1,7s. A fonte de raios-X foi de 34 keV de energia e 790 mA de corrente. O raio X foi filtrado através de filtro Al. As projeções foram adquiridas em uma faixa de 180° com um passo angular de 1° de rotação. Modelos virtuais em 3D representativos de várias regiões dos *scaffolds* foram criados, visualizados e registrados. Os dados foram tratados matematicamente pelo software CT Analyser v.1.13.5.

5.2.16 Viabilidade celular – Disco-difusão em ágar

A linhagem celular de V79 foi plaqueada em placas de Petri de 50mm, na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL utilizando meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino pelo período de 48h a 37°C em estufa com ambiente de 5% de CO₂. A seguir o meio líquido foi descartado e o meio sólido “overlay” (meio Eagle, 2x concentrado, ágar a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro como corante vital) foi adicionado sobre o tapete celular. Após solidificação o material foi depositado no centro da placa e incubado por 24h a 37°C em ambiente de 5% de CO₂. As leituras das placas inoculadas foram feitas macroscopicamente, onde a presença da citotoxicidade foi constatada por halo claro ao redor do material tóxico correspondente às células mortas e microscopicamente para as alterações morfológicas das células circundando a amostra.

5.2.17 Viabilidade celular – Preparo de meio de cultura

Para a avaliação da viabilidade celular inicialmente foi realizado o extrato do material mantendo este em exposição ao meio de cultura por 24h. O extrato foi feito utilizando um fragmento de 4cm² em 10mL de meio de cultura. Esta concentração do material equivale a exposição de 1.6 m de material em um indivíduo de 70kg.

A seguir este extrato foi colocado em contato com as células, sendo utilizado o meio de forma 100%, e em diluições de 50% e 25%.

5.2.18 Ensaio de atividade mitocondrial - MTT

Foram plaqueadas aproximadamente 105 células/poço em uma placa de 96 poços, após 24h e aderência total das células os tratamentos foram realizados, sendo e deixados por um período de 24h e 48h. Após o tratamento o meio de cultura foi removido e foram adicionados 100 µl de solução de 5mg/ml de MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium Bromide) em cada um dos poços. Após 3 horas na estufa a 37°C, a solução de MTT foi retirada e foram adicionados 100µl de DMSO por poço para a fixação das células. A leitura foi realizada utilizando equipamento de leitura de microplacas à 570nm.

5.2.19 Ensaio de atividade lipossomal - Vermelho neutro

Foram utilizadas aproximadamente 105 células/poço. Após aderência das células, as culturas ficaram em exposição por 24h e 48h, após período de exposição as culturas foram lavadas com PBS seguida de adição de 100 µl de solução de 50mg/ml de vermelho neutro em cada um dos poços. As placas foram mantidas por 3 horas na estufa de CO₂ a 37°C e em seguida adicionar 100 µl de etanol por poço para a fixação das células. A leitura foi realizada a 570nm.

5.2.20 Análises estatísticas

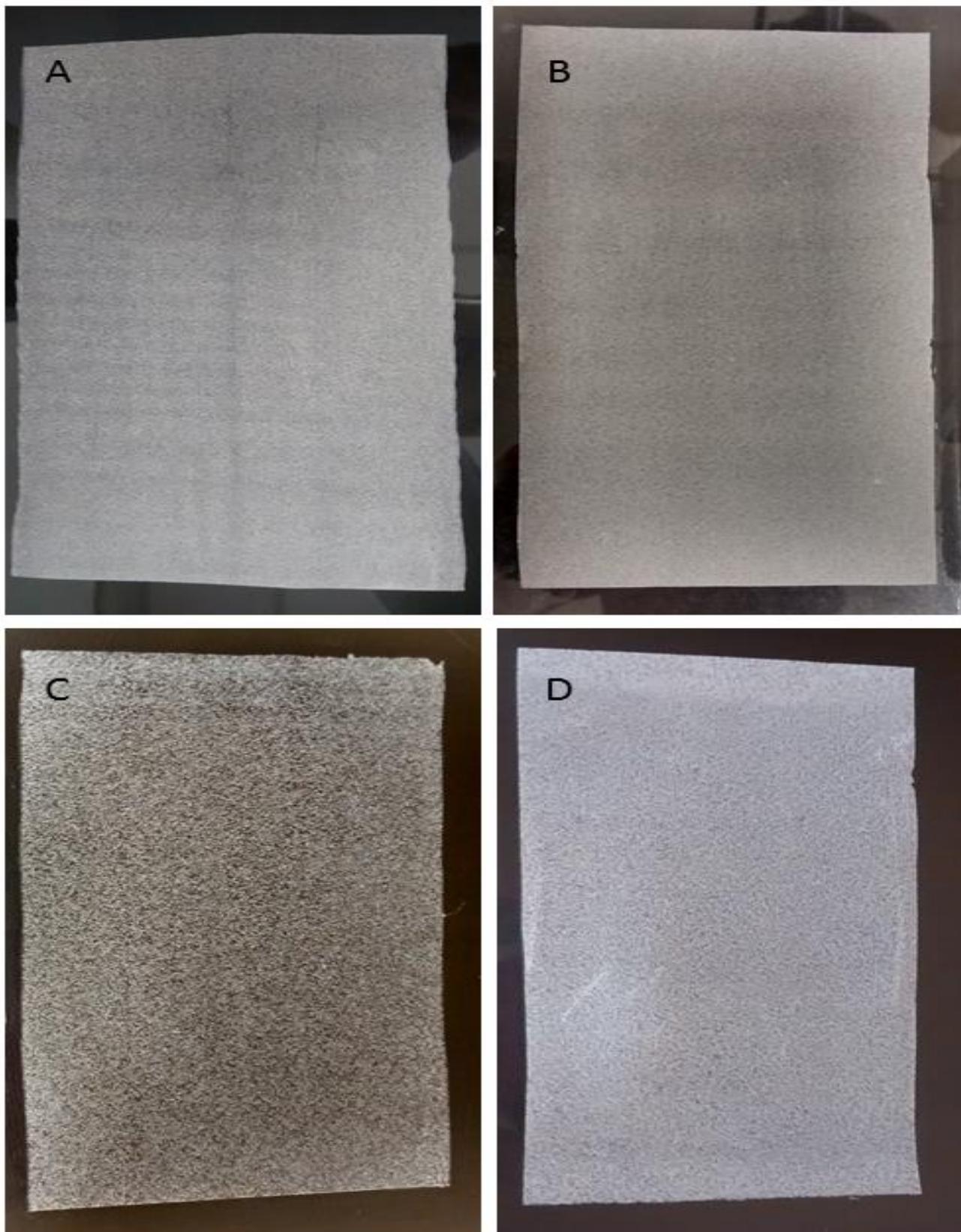
A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey para comparação das médias, e determinada com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Sendo representado por letras, onde letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização macroscópica da estrutura de superfície dos *scaffolds*

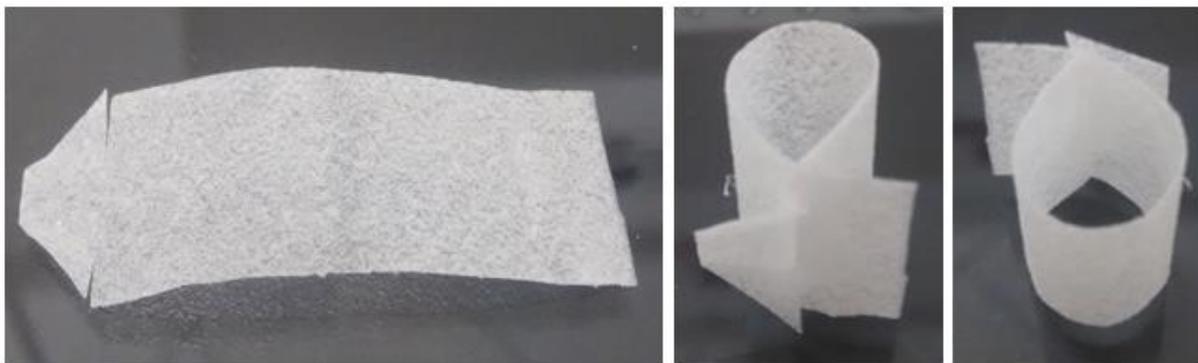
Os *scaffolds* após a secagem foram removidos das placas de vidro (Figura 7). Macroscopicamente os *scaffolds* apresentaram aparência de uma folha de papel, maleável e flexível a ponto de poderem ser dobradas como origami, evidenciado na Figura 8, onde foi realizado um sistema chave-fechadura. Os *scaffolds* contendo colágeno (Figura 7A e 7B) apresentaram mais uniforme sugerindo dispersão homogênea dos polímeros PLDLA-PEG (400 e 4000)-COL. Os *scaffolds* contendo sacarose foram mais rígidos, porém não menos flexíveis. As partículas de sacarose foram visíveis macroscopicamente e, assim, a superfície eram mais ásperas (menor uniformidade). A presença da sacarose sugeriu uma maior eficiência na formação de poros quando comparado como o colágeno.

Figura 7 – Imagem fotográfica dos *scaffolds* PLDLA/PEG400/COL (A); PLDLA/PEG4000/COL (B); PLDLA/PEG400/SAC (C) e PLDLA/PEG4000/SAC.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 8: Imagem fotográfica do *scaffold* em sistema chave-fechadura.

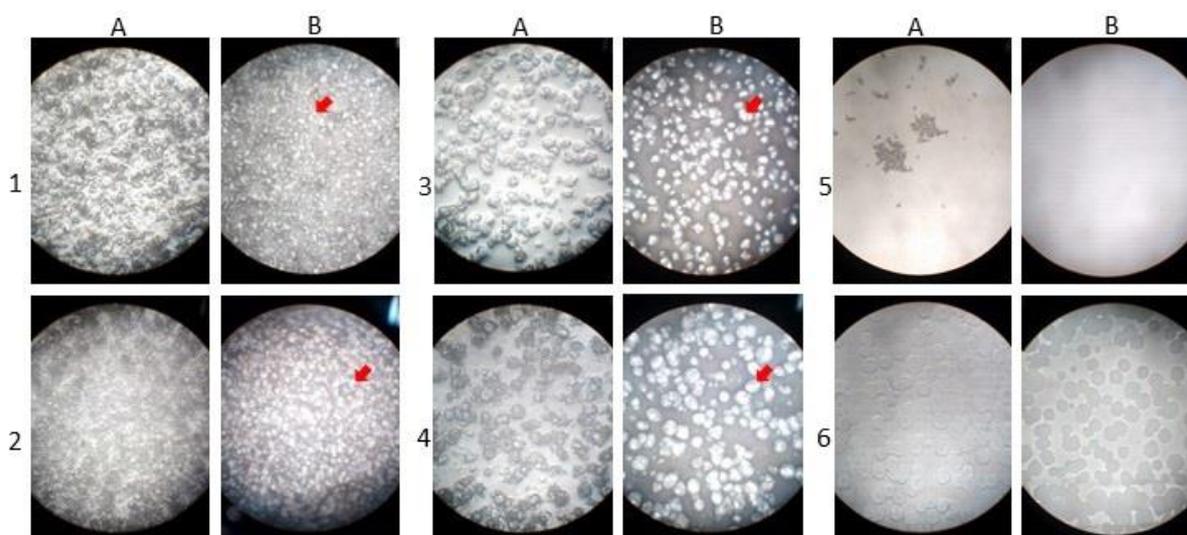


Fonte: Elaboração própria.

6.2 Caracterização da estrutura de superfície dos *scaffolds* após lixiviação

As estruturas de superfície de um material podem influenciar diretamente o comportamento das células, da mesma maneira que a estrutura tridimensional dos *scaffolds* desempenha um papel crítico na orientação celular para formação do tecido *in vivo* (BERNER et al., 2014). A Figura 9 apresenta imagens micrográficas da estrutura de superfície dos *scaffolds*, antes e após processo de lixiviação por 24 horas em água 37°C.

Figura 9 – Microscopia óptica (40x) dos *scaffolds*. Antes da lixiviação (A) e após lixiviação durante 24 horas (B).



Nota: PLDLA/PEG400/COL (1); PLDLA/PEG4000/COL (2); PLDLA/PEG400/SAC (3); PLDLA/PEG4000/SAC (4); PLDLA/PEG400 (5) e PLDLA/PEG4000 (6). As setas indicam a presença de poros.

Fonte: Elaboração própria.

A imagem micrográfica da formulação PLDLA/PEG400 (5A) apresenta estrutura de superfície regular, sugerindo uma dispersão homogênea do PLDLA com

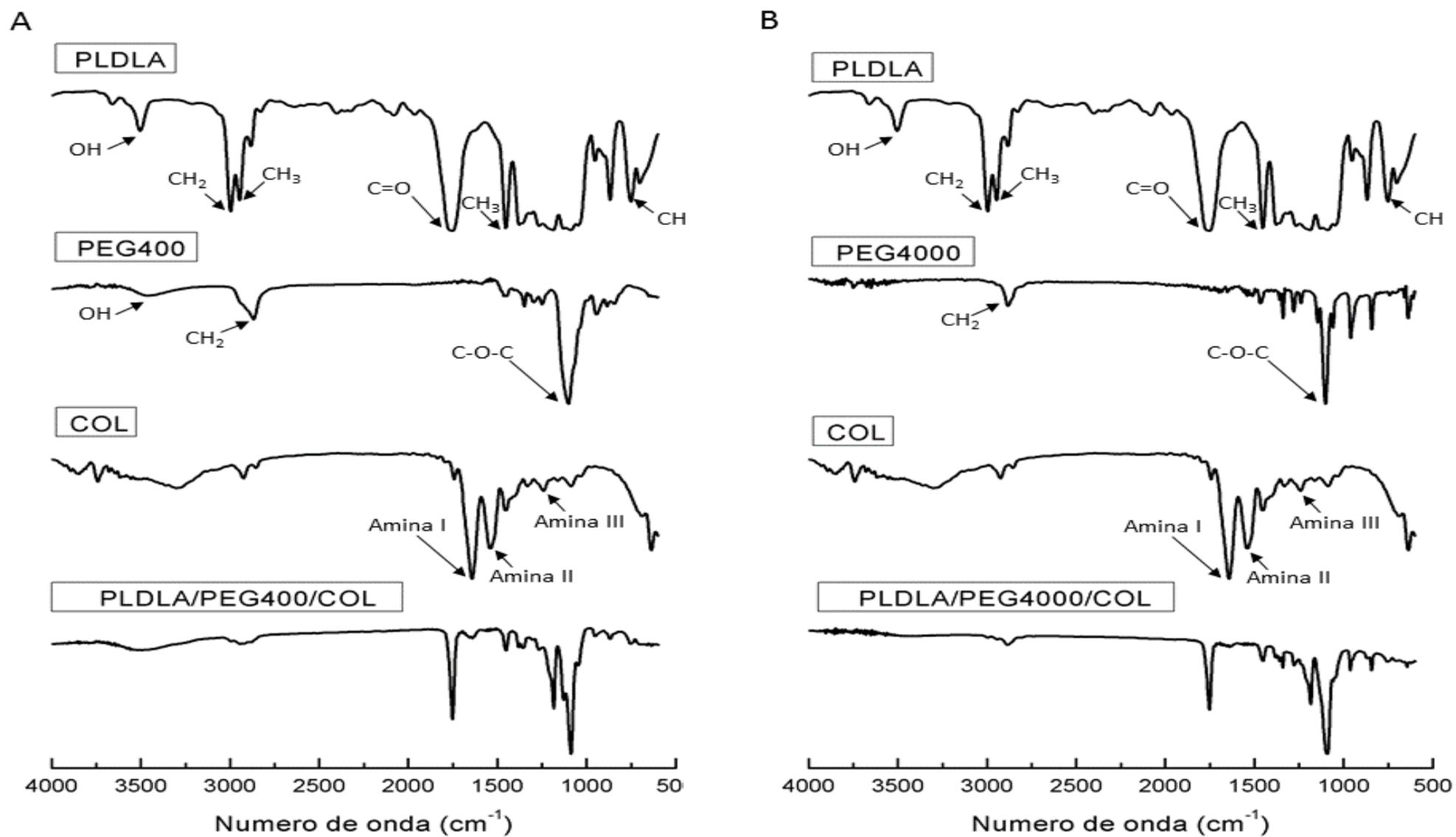
o PEG400. Porém, durante o registro da imagem micrográfica foi possível observar uma reação química, gerando regiões com pontos escuros na amostra, isso se deve ao calor emitido pela luz do microscópio, que em contato com a amostra promove uma reação com PEG400 na superfície, evento não observado após imersão por 24 horas em água ultrapura (imagem 5B), sugerindo a migração do PEG400 da estrutura de superfície para o meio, no entanto, sem a formação de poros na superfície. Já na imagem da formulação PLDLA/PEG4000 (6A) apresenta uma estrutura de superfície irregular, sendo observado formas circulares na estrutura de superfície da amostra. Estas formas circulares na superfície são observadas mesmo após 24 horas em água ultrapura, sugerindo que a massa molar do PEG interfere na homogeneização da formulação dos scaffolds.

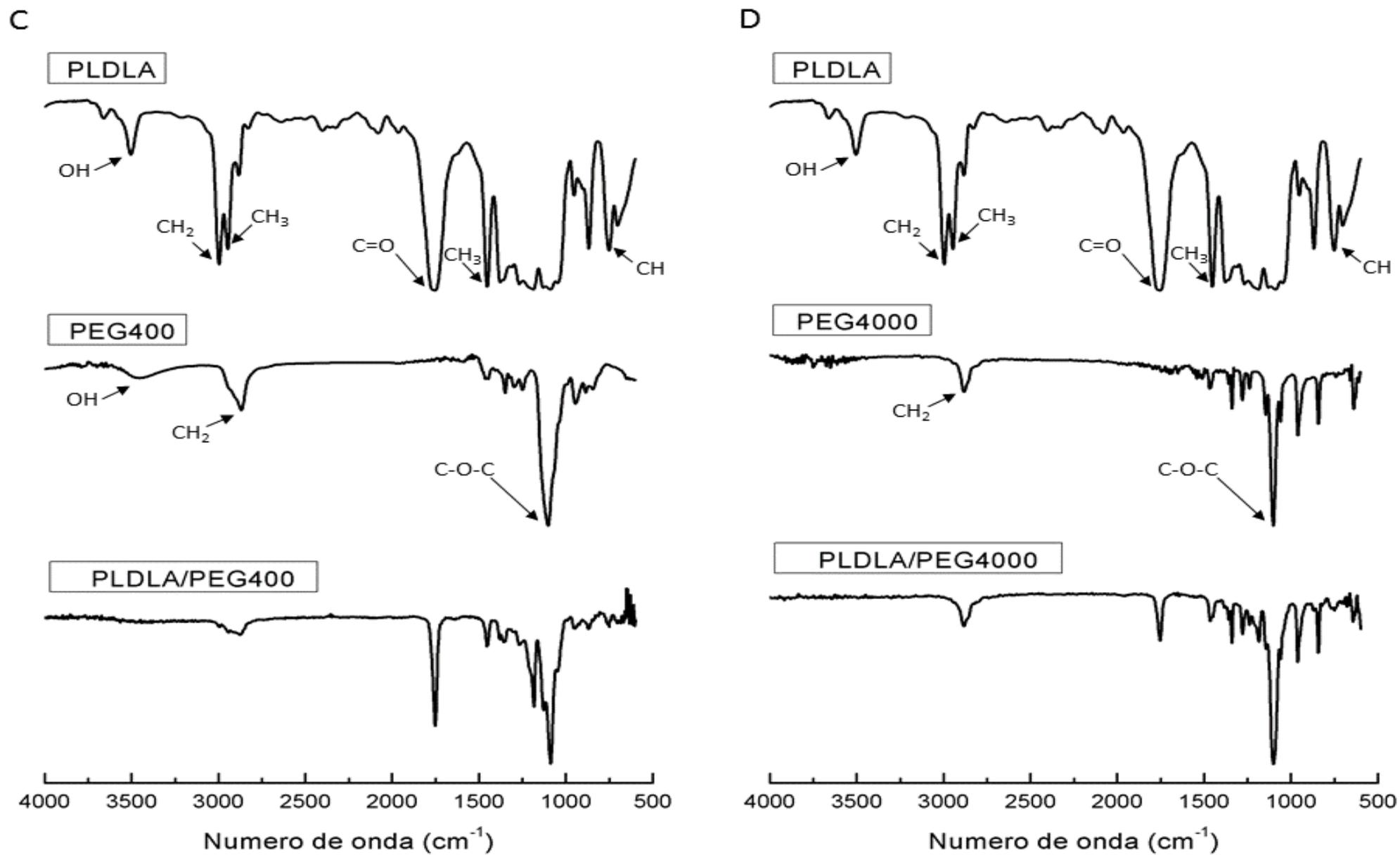
As imagens micrográficas das formulações PLDLA/PEG400/COL (1A) e PLDLA/PEG4000/COL (2A) dos *scaffolds* antes da lixiviação apresentaram estrutura de superfície regular, sugerindo uma dispersão homogênea do colágeno independente do PEG utilizado na formulação. As imagens micrográficas PLDLA/PEG400/SAC (3A) e PLDLA/PEG4000/SAC (4A) dos *scaffolds* antes da lixiviação apresentam superfície irregular como consequência da separação de fases após extensão dos polímeros sobre a placa de vidro. Após 24 horas de lixiviação foram observadas alterações na morfologia de superfície dos *scaffolds* com a formação de poros. As imagens obtidas por microscopia confirmam os resultados de homogeneidade observados macroscopicamente. A sacarose por ser facilmente solúvel, não apresentar afinidade química ou física pelos polímeros formando poros proporcionais ao tamanho do grânulo. Este resultado sugere que o tamanho dos poros e o número de poros pode ser controlado pela granulometria do agente porogênico e pela área de superfície do mesmo além da solubilidade em meio aquoso. Nossos resultados estão em acordo com os resultados obtidos por Sader, Ferreira e Dias (2006), em seu estudo de preparação e caracterização de estruturas porosas de Poli(3-hidroxi-butirato), utilizou agente porogênico com diferentes granulometrias, constatando a influência da granulometria no tamanho e no número de poros.

O colágeno mesmo adicionado na forma de pó apresenta poros de menor tamanho devido a granulometria ser muito inferior a granulometria da sacarose. Além deste fator o colágeno tem maior afinidade pelos polímeros e forma misturas mais homogêneas com o mesmo. A afinidade do colágeno com os polímeros não é apenas física como demonstrado por FTIR e DSC.

6.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Os resultados dos espectros de infravermelho são apresentados na Figura 10: Painel A, Painel B, Painel C e Painel D.

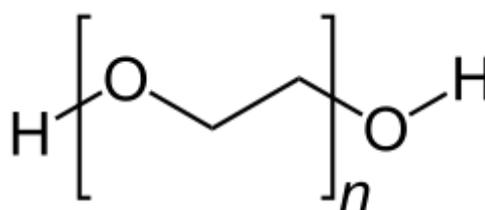
Figura 10 - Resultados dos espectros de FTIR dos componentes e dos *scaffolds*.



Nota: PLDLA – Poli (L-co-D,L ácido láctico); PEG – Polietilenoglicol (400 e 4000); COL – Colágeno.
 Fonte: Elaboração própria.

No espectro do PEG 400, podem ser observados picos característicos nas regiões de 3500 cm^{-1} ($3454,51\text{ cm}^{-1}$) referente ao grupamento hidroxila OH, pico não evidenciado no espectro do PEG 4000. O pico 2888 cm^{-1} (PEG400: $2868,15\text{ cm}^{-1}$; PEG4000: $2883,58\text{ cm}^{-1}$) foi atribuído ao alongamento de grupos CH_2 . O maior pico próximo a 1100 cm^{-1} (PEG400 e PEG400: $1101,35\text{ cm}^{-1}$) corresponde ao pico C-O-C (PEREIRA et. al., 2016; LI et al., 2001; ALCANTAR; AYDIL; ISRAELACHVILI, 2000). Como observado na Figura 11.

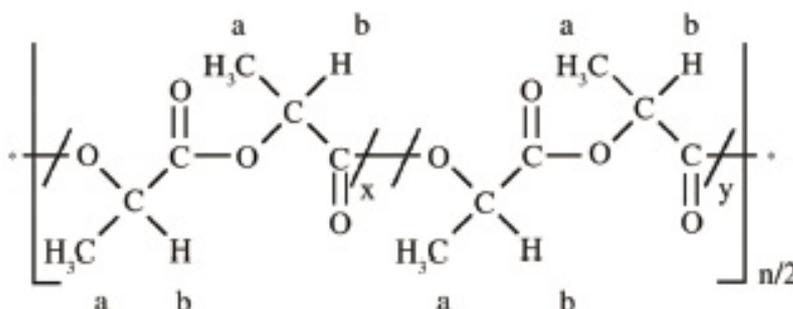
Figura 11 – Monômero do (poli) etilenoglicol



Fonte: CHANG et al., 2017

A partir das análises dos resultados foi possível identificar os picos característicos para o PLDLA. O pico referente a CH foi observado na região 750 cm^{-1} ($752,24\text{ cm}^{-1}$). O pico referente ao dobramento CH_3 pode ser identificado em 1450 cm^{-1} ($1452,40\text{ cm}^{-1}$). Na região 1750 cm^{-1} ($1753,29\text{ cm}^{-1}$) é possível identificar o pico axial da carboxila $\text{C}=\text{O}$ do grupo éster. Os picos 2997 cm^{-1} ($2995,45\text{ cm}^{-1}$) – 2965 cm^{-1} ($2947,23\text{ cm}^{-1}$) são referentes aos grupamentos CH_2 e CH_3 . Estes resultados de FTIR do PLDLA estão de acordo com os resultados descritos por Duarte, Motta e Duek (2014) e Más et al. (2014). Na região $3502,73$ pode ser observado um pico correspondente ao grupamento hidroxila OH. Como observado na Figura 12.

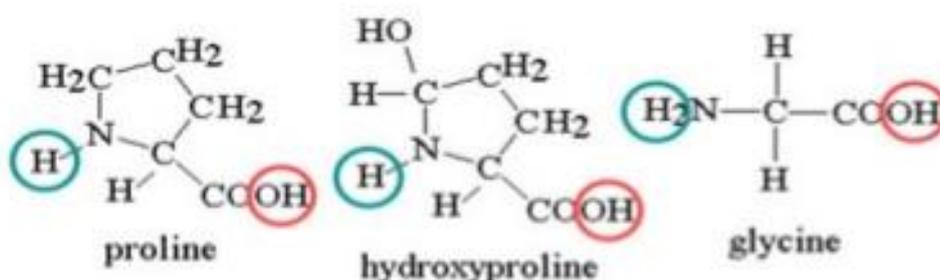
Figura 12 – Estrutura molecular do Poli (L-co-D,L ácido láctico)



Fonte: MOTTA; DUEK, 2007

O colágeno é uma proteína formada basicamente pelos aminoácidos prolina, hidróxiprolina e glicina. Assim, no espectro do COL podem ser observados os picos característicos desta proteína em 1660 cm^{-1} (COL: $1648,35\text{ cm}^{-1}$), pico típico da amida I, referente ao alongamento da carbonila. O pico em 1560 cm^{-1} (COL: $1537,27\text{ cm}^{-1}$), é referente a amida II, devido as vibrações no plano da ligação N-H e o pico C-N em 1235 cm^{-1} (COL: $1242,16\text{ cm}^{-1}$), corresponde as vibrações no plano da amida III, devido ao estiramento C-N e a deformação N-H. O pico em 1450 cm^{-1} (COL: $1454,33\text{ cm}^{-1}$), corresponde a estereoquímica dos anéis pirrolidínicos e o pico 3350 cm^{-1} (COL: $3302,13\text{ cm}^{-1}$), corresponde ao grupamento hidroxila O-H (PRESTES et al., 2013; SIONKOWSKA et al., 2004; TONHI; PLEPIS, 2002). Como observado na Figura 13.

Figura 13 – Estrutura molecular do colágeno



Fonte: Adaptado de <https://userscontent2.emaze.com/images/c636882d-71c4-4a4a-8b49-d07174a6c919/2476c9f710d2420f82a848e20a4e5f31.PNG> (22.12.2017).

A Figura 10 mostra os espectros dos *scaffolds* PLDLA/PEG4000 (D), PLDLA/PEG400 (C), PLDLA/PEG4000/COL (B) e PLDLA/PEG400/COL (A). Os espectros do *scaffold* PLDLA/PEG4000/SAC apresentaram picos semelhantes ao PLDLA na região $752,24\text{ cm}^{-1}$ (referente a CH) e $1753,29\text{ cm}^{-1}$ (pico axial da carboxila C=O, do grupo éster). Já nos picos semelhantes aos do PEG 4000 foi observado um pequeno deslocamento do pico em $1101,35\text{ cm}^{-1}$ para $1105,21\text{ cm}^{-1}$ (referente ao estiramento de éter C-O-C), o pico em $2883,58\text{ cm}^{-1}$ (alongamento de grupos CH₂).

O espectro do *scaffold* PLDLA/PEG400/SAC apresentou picos semelhantes ao PLDLA na região de $752,24\text{ cm}^{-1}$ (referente a CH), um pequeno deslocamento de $1452,40\text{ cm}^{-1}$ para $1454,33\text{ cm}^{-1}$ (dobramento CH₃) e um pico em $1753,29\text{ cm}^{-1}$ (estiramento axial da carboxila C=O, do grupo éster). Já nos picos semelhantes ao PEG 400 foi observado um pequeno deslocamento do pico $1101,35\text{ cm}^{-1}$ para $1089,78\text{ cm}^{-1}$ (referente ao estiramento de éter C-O-C) e também o pico em $2868,15\text{ cm}^{-1}$ que

apresentou um pequeno deslocamento para $2873,93\text{ cm}^{-1}$ (alongamento de grupos CH_2).

O *scaffold* PLDLA/PEG4000/COL apresentou picos semelhantes ao PLDLA na região de $752,24\text{ cm}^{-1}$ com pequeno deslocamento para $744,52\text{ cm}^{-1}$ (referente a CH), o estiramento $1452,40\text{ cm}^{-1}$ (dobramento CH_3), o pico $1753,29\text{ cm}^{-1}$ com pequeno deslocamento $1751,36\text{ cm}^{-1}$ (estiramento axial da carboxila $\text{C}=\text{O}$, do grupo éster), por fim o pico em $2947,23\text{ cm}^{-1}$ com pequeno deslocamento para $2943,37\text{ cm}^{-1}$ e $2995,45\text{ cm}^{-1}$ (grupamento CH_2 e CH_3). Já os picos semelhantes ao PEG 4000 foi observado um pequeno deslocamento do pico em $1101,35\text{ cm}^{-1}$ para $1099,43\text{ cm}^{-1}$ (referente ao estiramento de éter C-O-C), o pico em $2883,58\text{ cm}^{-1}$ com pequeno deslocamento para $2885,51\text{ cm}^{-1}$ (referente ao alongamento de grupo CH_2). Para o COL, foram observados picos característicos na região de $1242,16\text{ cm}^{-1}$ com pequeno deslocamento para $1240,23\text{ cm}^{-1}$ (vibrações no plano da amida III, devido ao estiramento C-N e a deformação N-H), o pico $1537,27\text{ cm}^{-1}$ com pequeno deslocamento para $1541,12\text{ cm}^{-1}$ (referente a amida II, devido as vibrações no plano da ligação N-H e o pico C-N), por fim o pico $1648,35\text{ cm}^{-1}$ com pequeno deslocamento para $1637,56\text{ cm}^{-1}$ (pico típico da amida I, referente ao alongamento da carbonila).

O *scaffold* PLDLA/PEG400/COL apresentou picos semelhantes ao PLDLA na região de $752,24\text{ cm}^{-1}$ (referente a CH), no pico em $1267,23\text{ cm}^{-1}$ apresentou um pequeno deslocamento para $1265,30\text{ cm}^{-1}$ (referente ao grupamento C-O), o pico em $1452,40\text{ cm}^{-1}$ (dobramento CH_3), o pico em $1753,29\text{ cm}^{-1}$ (estiramento axial da carboxila $\text{C}=\text{O}$, do grupo éster), por fim os picos $2947,23\text{ cm}^{-1}$ e $2995,45\text{ cm}^{-1}$ que apresentaram um pequeno deslocamento para $2941,44\text{ cm}^{-1}$ e $2993,52\text{ cm}^{-1}$ (grupamento CH_2 e CH_3). Já os picos semelhantes ao PEG 400 foi observado um pequeno deslocamento do pico em $1101,35\text{ cm}^{-1}$ para $1087,85\text{ cm}^{-1}$ (referente ao estiramento de éter C-O-C), o pico em $2868,15\text{ cm}^{-1}$ com pequeno deslocamento para $2877,79\text{ cm}^{-1}$ (referente ao alongamento de grupo CH_2), por fim o pico em $3454,51\text{ cm}^{-1}$ apresentou um pequeno deslocamento para $3448,72\text{ cm}^{-1}$ (referente ao grupamento OH). Para o COL, foi observado apenas um pico característico com pequeno deslocamento de $1648,35\text{ cm}^{-1}$ para $1647,21\text{ cm}^{-1}$ (estiramento típico da amida I, referente ao alongamento da carbonila).

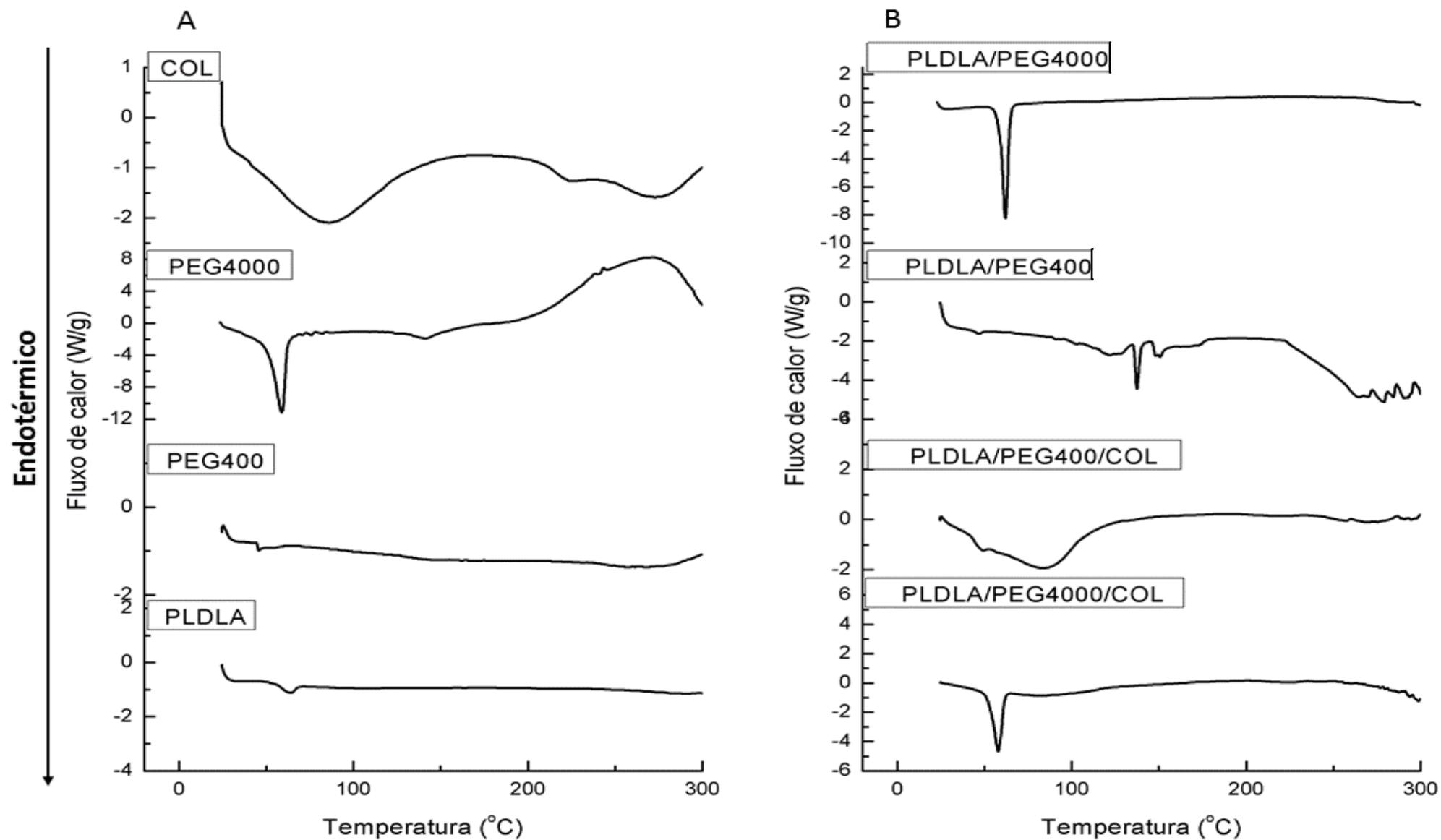
Através dos resultados de espectroscopia FTIR associados com os termogramas (Figura 10) é possível afirmar que houve interação química entre os componentes com formação de uma blenda menos cristalino que PLDLA e também

menos cristalino que PEG 4000. Sobre o colágeno e o PEG 400 os resultados não são conclusivos uma vez que ambos apresentam perfil de compostos não cristalinos.

6.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Os resultados das curvas termoanalíticas de DSC são apresentados na Figura 14: Painel A e Painel B.

Figura 14 – Curva termoanalítica dos componentes da formulação (Painel A) e dos *scaffolds* (Painel B).



Nota: PLDLA – Poli (L-co-D,L ácido láctico); PEG – Polietilenoglicol (400 e 4000); COL – Colágeno.
 Fonte: Elaboração própria.

A curva termoanalítica do colágeno apresentou um evento térmico em 39,95°C (início) – 123,36°C (final) que corresponde a desnaturação da proteína. Isso ocorre devido ao aumento da temperatura, que promove a quebra das interações de hidrogênio e de algumas ligações cruzadas, que estabilizam a estrutura nativa, resultando na perda da estrutura proteica tridimensional. Portanto, a temperatura de desnaturação depende diretamente do número de ligações cruzadas e do teor de água na estrutura do COL (TONHI; PLEPIS, 2002).

No PEG 4000 foi observado evento endotérmico entorno de 52,65°C (início) – 62,89°C (final) correspondente ao ponto de fusão do polímero (LIU; DESAI, 2005). Já na curva termo analítica do PEG 400 foi observado evento térmico entorno de 42,70°C (início) – 44,43°C (final).

No PLDLA, pode ser visualizado um evento de transição vítrea (T_g) na temperatura 57,64°C (início) – 64,92°C (final), nosso resultado está de acordo com o descrito por Duarte et al., 2016, caracterizando o polímero como amorfo. Esta característica é importante, pois implica diretamente na taxa de degradação do polímero (MARTINS et al., 2014).

Na Figura 14 (Painel B) pode ser observado na curva termoanalítica da amostra PLDLA/PEG4000 apenas um evento térmico em 58,97°C (início) – 64,49°C (final), sugerindo ponto de fusão do material, não havendo eventos térmicos característicos do PLDLA. Enquanto que na amostra PLDLA/PEG400 foi evidenciado um evento térmico em 43,48°C (início) – 48,88°C (final) o que sugere uma transição vítrea, outro evento térmico foi observado em 135,40°C (início) – 140,77°C (final), este evento não é observado no PLDLA e PEG400.

Nos eventos térmicos referente a amostra PLDLA/PEG400/COL, pode ser visualizado um evento térmico em 47,46°C (início) – 52,68°C (final) sugerindo uma transição vítrea e um evento térmico em 65,91°C (início) – 100,41°C (final) sugerindo que houve uma desnaturação decorrente do COL da composição. Na amostra PLDLA/PEG4000/COL foi evidenciado um evento térmico em 53,05°C (início) – 61,26°C (final) sugerindo ponto de fusão do material, não sendo observado eventos térmicos característicos do PLDLA e COL.

As mudanças observadas nos eventos térmicos dos *scaffolds* sugerem a interação química entre os componentes, estes resultados indicam que à interação do COL com PLDLA.

6.5 Propriedades mecânicas

A avaliação das propriedades de textura dos *scaffolds* PLDLA/PEG400/SAC, PLDLA/PEG4000/SAC, PLDLA/PEG400/LIX, PLDLA/PEG4000/LIX, PLDLA/PEG400/COL e PLDLA/PEG4000/COL, PLDLA; PLDLA/PEG400 e PLDLA/PEG4000, foram avaliados quanto a tração e compressão (resiliência, perfuração, relaxação) e mucoadesão. Os resultados apresentados na Tabela 2 e Figura 15 mostram a influência dos componentes da formulação nas propriedades do PLDLA.

Somente foram avaliados os *scaffolds* lixiviados com sacarose. Como comentado anteriormente, o colágeno foi adicionado aos *scaffolds* por ser o principal componente da matriz extracelular de tecidos cartilagosos e para que os poros fossem formados *in situ*.

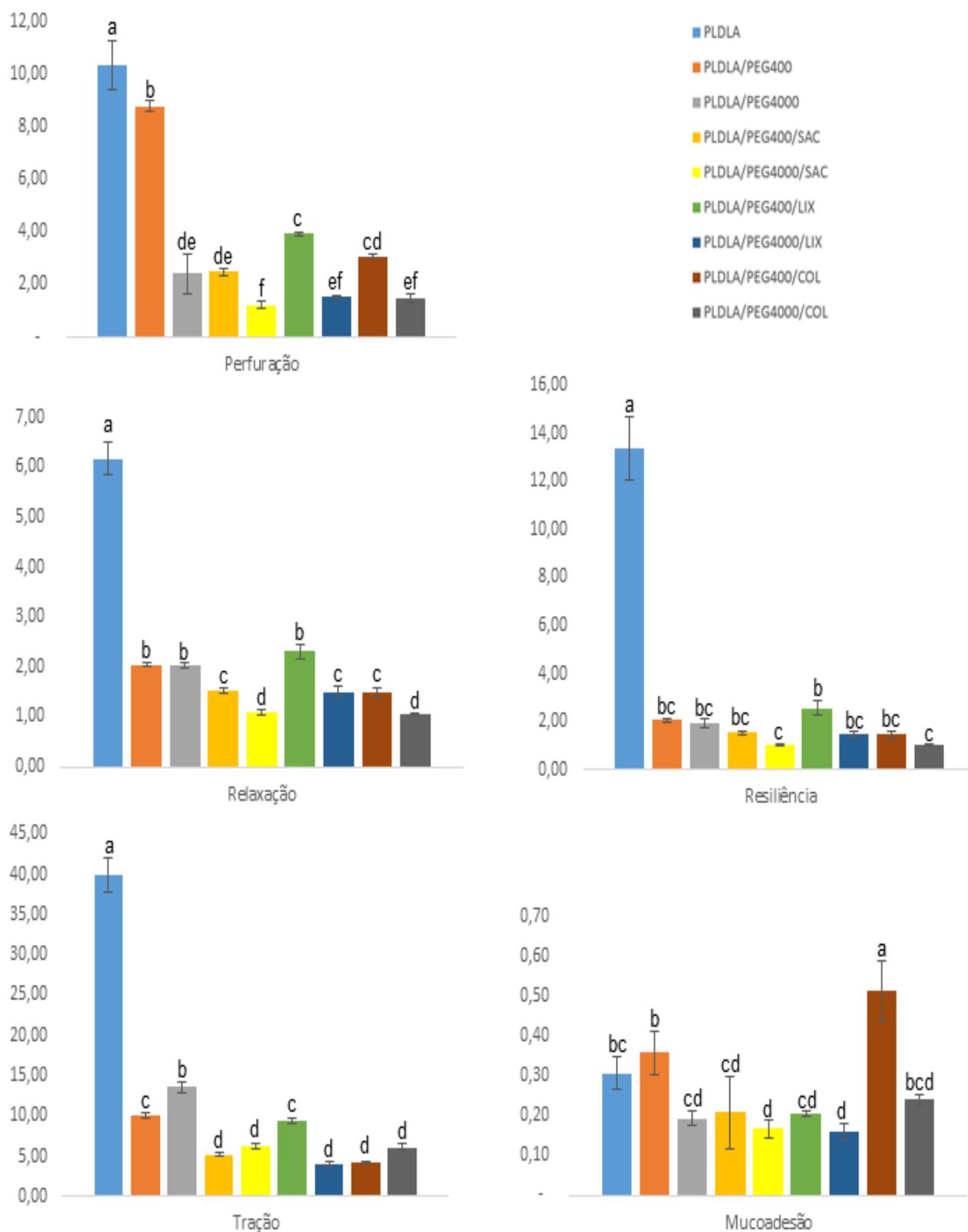
Tabela 2 – Propriedades mecânicas dos *scaffolds*. (n=3).

<i>Scaffolds</i>	Perfuração (N s ⁻¹)	Relaxação (N s ⁻¹)	Resiliência (N s ⁻¹)	Tração (N s ⁻¹)	Mucoadesão (N s ⁻¹)
PLDLA	10,32±0,93	6,17±0,32	13,38±1,29	39,95±2,17	0,31±0,04
PLDLA/PEG400	8,76±0,20	2,04±0,03	2,05±0,09	9,99±0,35	0,36±0,06
PLDLA/PEG4000	2,43±0,75	2,01±0,05	1,93±0,18	13,58±0,65	0,19±0,02
PLDLA/PEG400/SAC	2,50±0,14	1,52±0,05	1,52±0,07	5,20±0,27	0,21±0,09
PLDLA/PEG4000/SAC	1,24±0,11	1,08±0,03	1,02±0,05	6,17±0,30	0,17±0,02
PLDLA/PEG400/ LIX	3,94±0,06	2,30±0,15	2,56±0,31	9,38±0,25	0,21±0,01
PLDLA/PEG4000/LIX	1,54±0,06	1,49±0,10	1,48±0,10	3,95±0,39	0,16±0,02
PLDLA/PEG400/COL	3,07±0,08	1,48±0,09	1,48±0,15	4,25±0,05	0,52±0,07
PLDLA/PEG4000/COL	1,49±0,16	1,06±0,02	1,03±0,04	6,09±0,44	0,24±0,01

Nota: PLDLA – Poli (L-co-D,L ácido láctico); PEG – Polietilenoglicol (400 e 4000); SAC – Sacarose; LIX – Lixiviação (24 horas); COL – Colágeno.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 – Ensaio de propriedades mecânicas de compressão (perfuração; relaxação; resiliência), tração e mucoadesão dos *scaffolds*. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores ($p > 0,05$) ($n=3$).



Nota: PLDLA – Poli (L-co-D,L ácido láctico); PEG – Polietilenoglicol (400 e 4000); SAC – Sacarose; LIX – Lixiviação (24 horas); COL – Colágeno.

Fonte: Elaboração própria.

As análises dos resultados mostram que ambos os PEG mudaram as propriedades mecânicas do PLDLA. Este resultado está em acordo com os termogramas apresentados, os quais sugerem a formação de compósitos entre os polímeros resultando em menor resistência mecânica à compressão e tração ($p < 0,05$). Menor efeito nas propriedades do PLDLA foi observado na resistência à perfuração para *scaffolds* PLDLA/PEG 400. Contudo, embora não apresente diferença significativa ($P > 0,05$), nominalmente a mucoadesão dos *scaffolds* PLDLA/PEG400 é maior que para o PLDLA puro. Comparando as formulações dos *scaffolds* PLDLA/PEG, as diferenças significativas entre as formulações foram encontradas para resistência à perfuração e mucoadesão (PLDLA/PEG400 > PLDLA/PEG4000), tração (PLDLA/PEG 400 < PLDLA/PEG 4000). A análise dos resultados de perfuração e tração mostram maior elasticidade dos *scaffolds* na presença de PEG 400, este fenômeno pode ser explicado pela estrutura cristalina do PEG 4000 e amorfa do PEG 400. A menor cristalinidade do PEG 400 favorece o entrelaçamento das cadeias dos polímeros com a mucina.

Scaffolds preparados com PEG 4000 e com o agente porogênico sacarose antes as propriedades mecânicas de compressão são menores que com PEG 400 ($p < 0,05$), exceto para resiliência ($p > 0,05$). Em relação propriedades mecânicas de tração e mucoadesão os *scaffolds* contendo sacarose são estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

Após a lixiviação as propriedades mecânicas de compressão dos *scaffolds* aumentaram, estes resultados sugerem que a retirada do agente porogênico sacarose melhorou as propriedades de perfuração, relaxação e resiliência. A imersão das formulações em água ultrapura por 24 horas, além da remoção do agente porogênico, promoveu um relaxamento das cadeias. Após lixiviação, os *scaffolds* contendo PEG 400 apresentaram maior resistência à tração ($p < 0,05$). Nenhuma diferença significativa foi observada em relação à mucoadesão ($p > 0,05$).

Para os *scaffolds* composto de PEG 4000 e colágeno as propriedades mecânicas de compressão são estatisticamente diferentes para perfuração e relaxação, mas não para resiliência ($p > 0,05$). A resistência à tração dos *scaffolds* na presença de colágeno é estatisticamente semelhante nas formulações com PEG 4000 e 400 ($p > 0,05$). O melhor resultado para mucoadesão foi encontrado para formulação contendo PEG400/COL.

De uma forma geral os scaffolds com PEG 400 e colágeno reúnem propriedades mecânicas favoráveis para uso traqueal, com destaque para mucoadesão uma vez que esta propriedade é importante para fixação do *scaffold*.

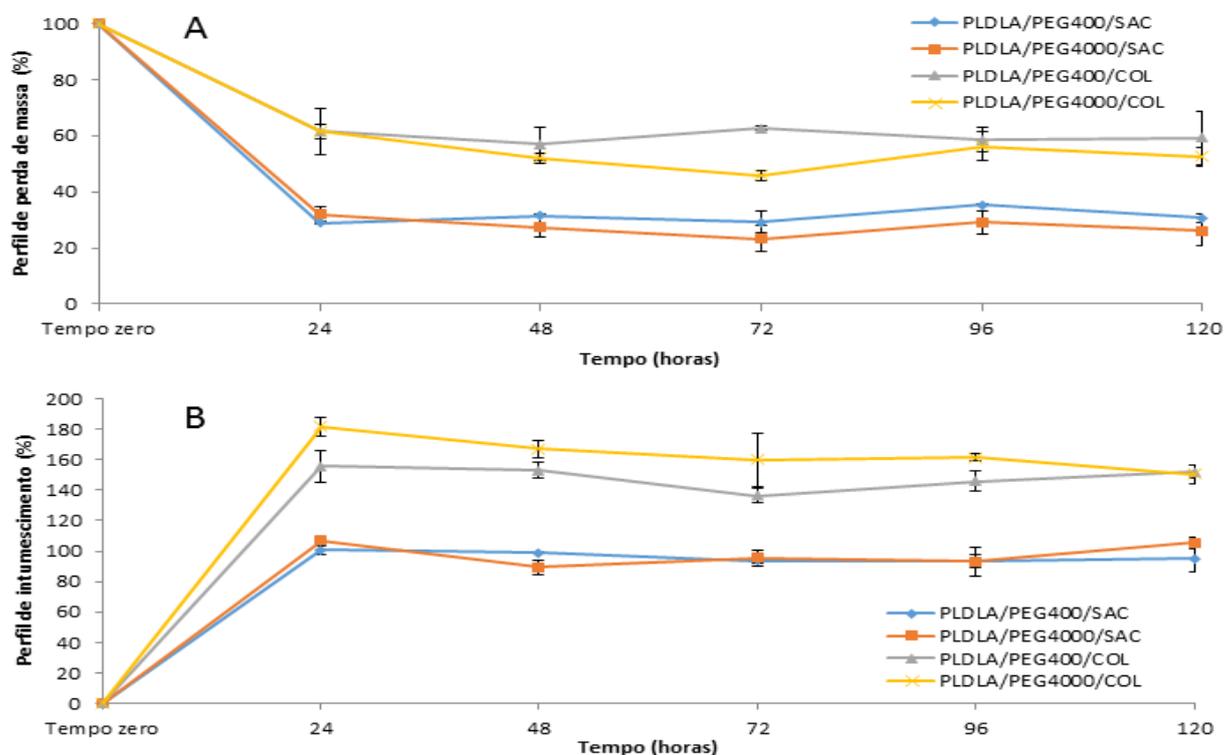
6.6 Caracterização dos scaffolds após estudo *in vitro*.

6.6.1 Perda de massa (desintegração) e Capacidade de intumescimento.

Os resultados obtidos para perda de massa (desintegração) em função do tempo (120 horas), durante estudo *in vitro*, são apresentados nas Figuras 16-18. O estudo de desintegração realizado em água ultrapura, meio tamponado (pH 7,4) e FSS (pH 6,9) na temperatura $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação de 50 rpm. Para avaliar a perda de massa do *scaffold* a massa de sacarose (40% da massa do *scaffold*) foi previamente descontada da massa total.

As Figuras 16A e 16B mostram respectivamente o perfil de desintegração e de intumescimento dos scaffolds em água ultrapura para um intervalo de tempo de 120 horas. Inicialmente houve uma perda de massa para todos scaffolds sendo menor para os scaffolds com colágeno. Paralelamente o intumescimento para estes scaffolds foram maiores. Isto ocorre devido à menor solubilidade do colágeno em água e sua maior facilidade para formar ligações de hidrogênio com os grupamentos amina e carboxílico dos aminoácidos. Após o tempo 24 a perda de massa (Figura 16A) e o intumescimento (Figura 16B) permaneceram estáveis ($p > 0,05$) durante o tempo de estudo restante sugerindo troca de massa entre o *scaffold* e o meio de imersão. Embora haja pequenas alterações nos valores absolutos, o perfil de desintegração e intumescimento dos scaffolds não altera para os meios tamponados pH 7,4 (Figura 17A e 17B) e FSS pH 6,9 (Figura 18A 18B) em relação a água.

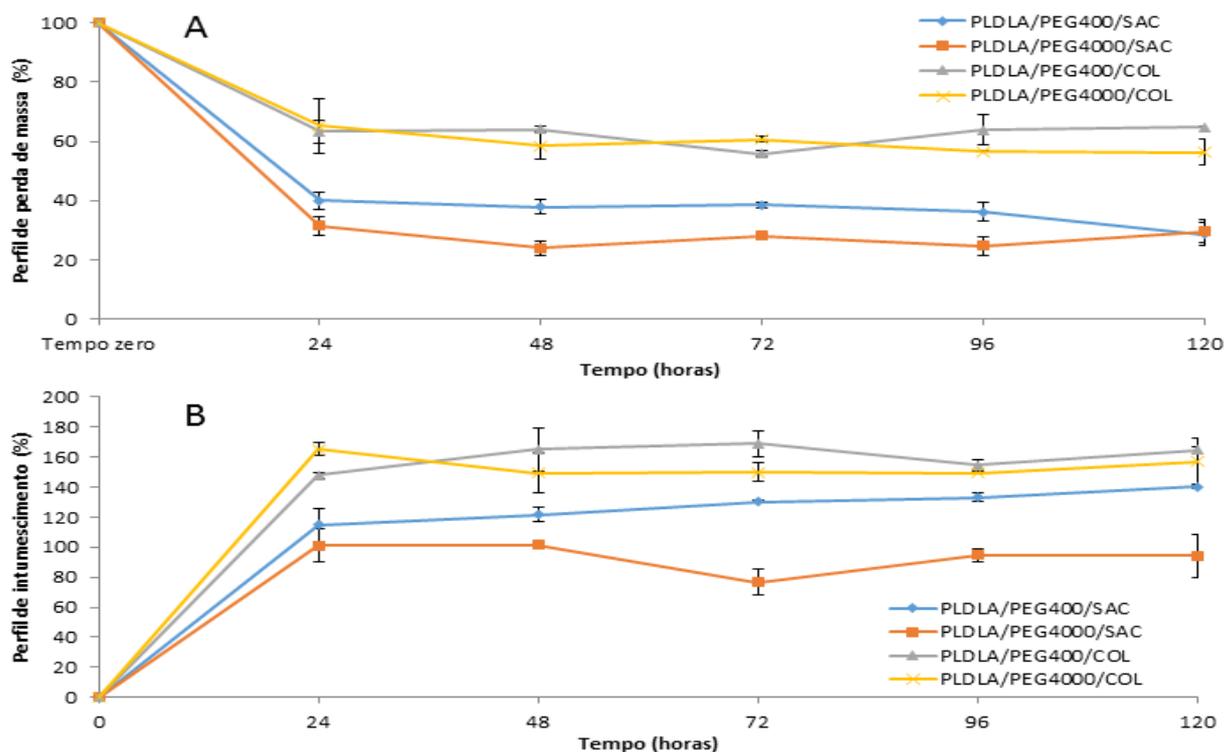
Figura 16 – Perfil de desintegração (Painel A) e Intumescimento (Painel B) dos *scaffolds*. Os ensaios foram realizados em água ultrapura a temperatura $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação de 50 rpm. (n=2).



Nota: PLDLA – Poli (L-co-D,L ácido láctico); PEG – Polietilenoglicol (400 e 4000); SAC – Sacarose; COL – Colágeno.

Fonte: Elaboração própria.

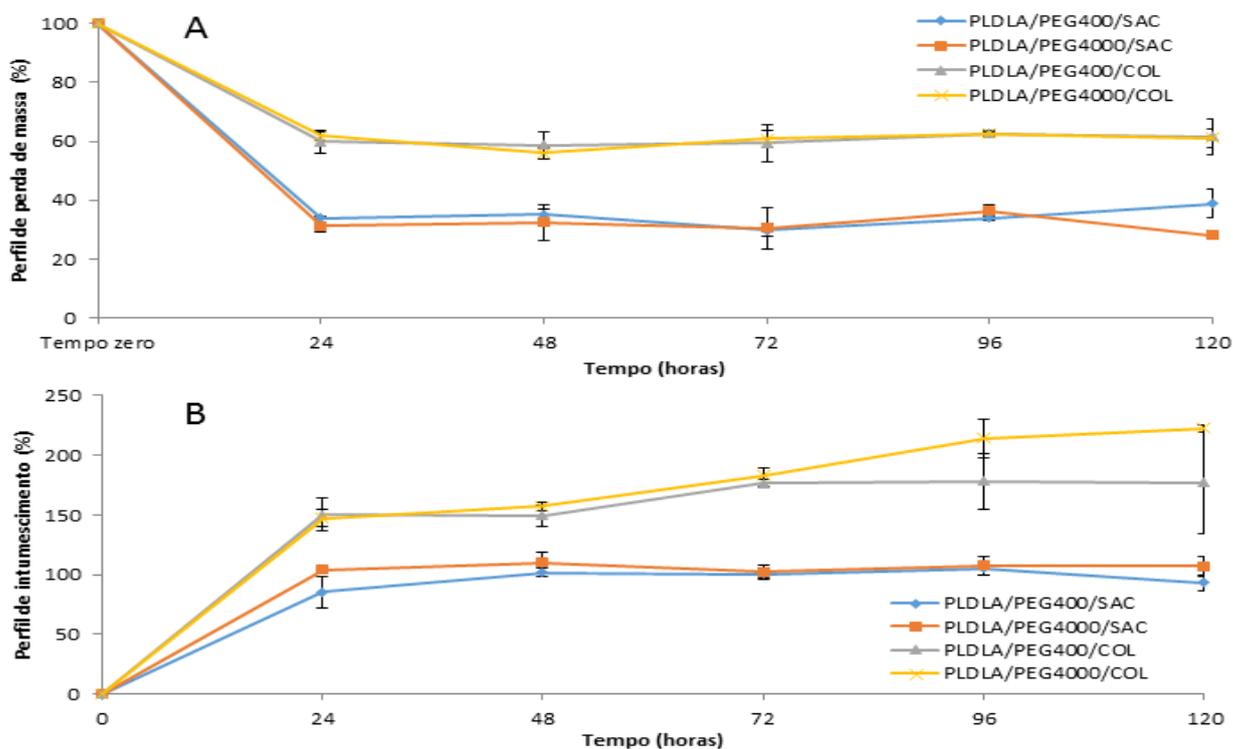
Figura 17 - Perfil de desintegração (Painel A) e Intumescimento (Painel B) dos *scaffolds*. Os ensaios foram realizados em meio tamponado (pH 7,4) a temperatura $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação de 50 rpm. (n=2).



Nota: PLDLA – Poli (L-co-D,L ácido láctico); PEG – Polietilenoglicol (400 e 4000); SAC – Sacarose; COL – Colágeno.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 18 - Perfil de desintegração (Painel A) e Intumescimento (Painel B) dos *scaffolds*. Os ensaios foram realizados em FSS (pH 6,9) a temperatura $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação de 50 rpm. (n=2).



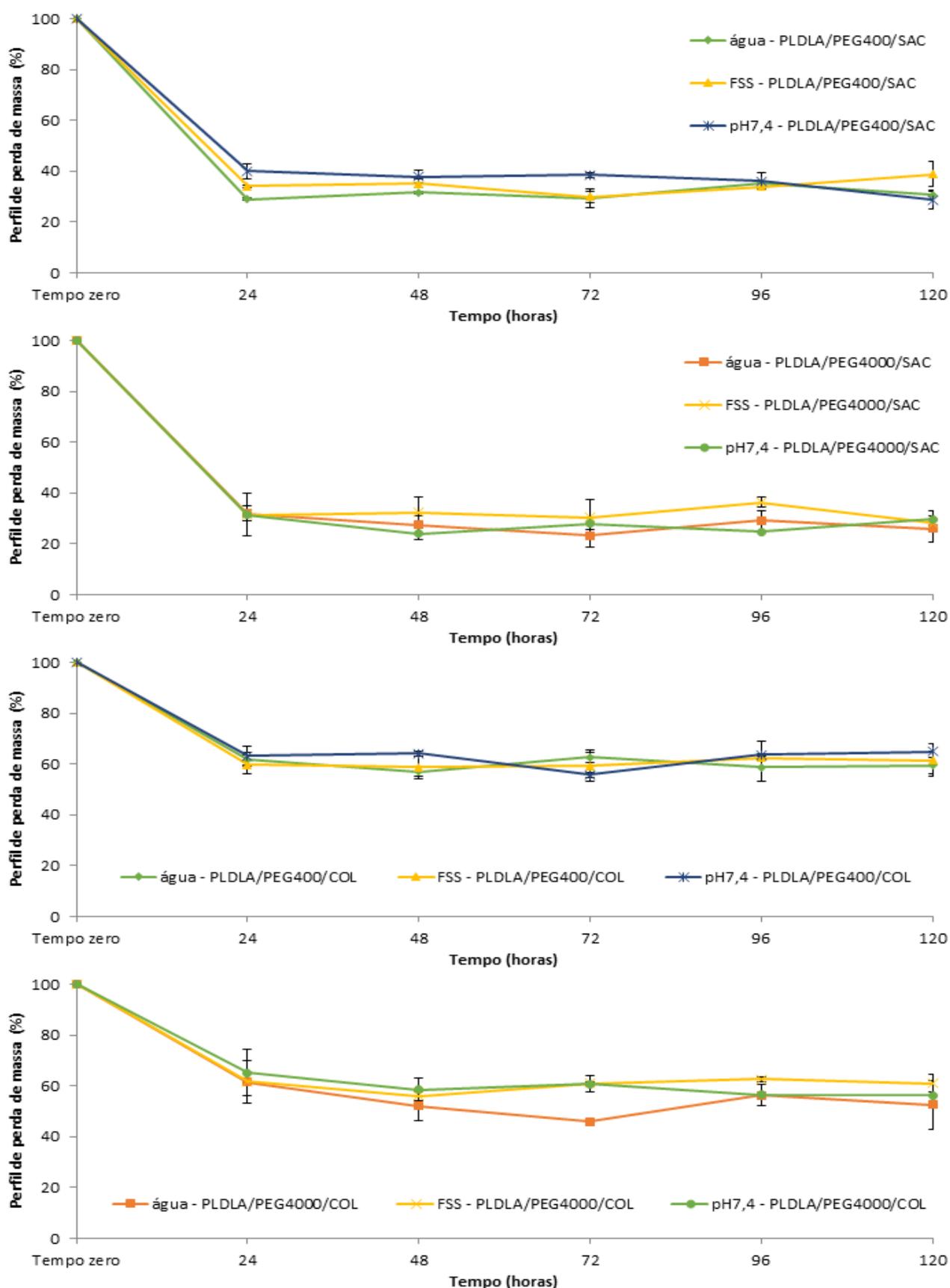
Nota: PLDLA – Poli (L-co-D,L ácido lático); PEG – Polietilenoglicol (400 e 4000); SAC – Sacarose; COL – Colágeno.

Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 19 são apresentados os resultados obtidos para perda de massa (desintegração) para cada *scaffold* nos meios de incubação estudados, água ultrapura, meio tamponado (pH 7,4) e FSS (pH 6,9). Os resultados mostram que o *scaffold* PLDLA/PEG400/SAC obteve maior perda de massa em meio tamponado (71,39%), já a formulação PLDLA/PEG4000/SAC obteve maior perda de massa em água ultrapura (73,96%). Os *scaffolds* PLDLA/PEG400/COL e PLDLA/PEG4000/COL apresentaram maior perda de massa em água ultrapura, respectivamente 40,64% e 47,40%.

Os resultados apresentados na Figura 20 mostram os perfis de intumescimento para *scaffold* nos meios de incubação estudados. Os resultados de intumescimento mostram que o *scaffold* PLDLA/PEG400/SAC obteve maior intumescimento em meio tamponado (140,12%), já a formulação PLDLA/PEG4000/SAC obteve maior intumescimento em FSS (107,25%). Os *scaffolds* PLDLA/PEG400/COL e PLDLA/PEG4000/COL apresentaram maior intumescimento em FSS, respectivamente 176,88% e 222,51%. Estes resultados são importantes uma vez que a traqueia está sujeita a alterações de força iônica e salina.

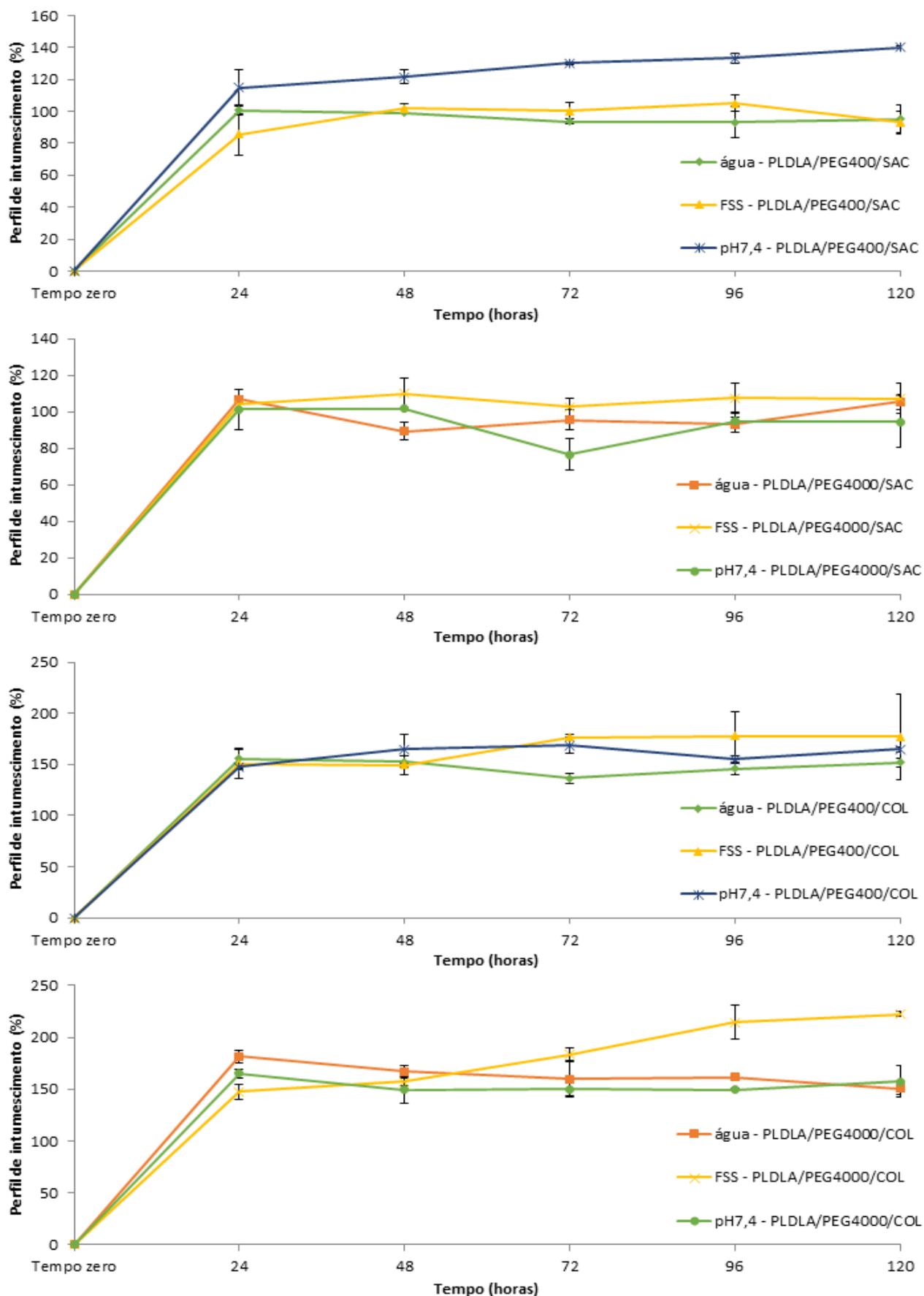
Figura 19 – Perfil de desintegração dos *scaffolds* em água ultrapura; meio tamponado (pH 7,4) e FSS (pH 6,9).



Nota: PLDLA – Poli (L-co-D,L ácido láctico); PEG – Polietilenoglicol (400 e 4000); SAC – Sacarose; COL – Colágeno.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 20 - Perfil de intumescimento dos *scaffolds* em água ultrapura; meio tamponado (pH 7,4) e FSS (pH 6,9).



Nota: PLDLA – Poli (L-co-D,L ácido láctico); PEG – Polietilenoglicol (400 e 4000); SAC – Sacarose; COL – Colágeno.

Fonte: Elaboração própria.

6.6.2 Avaliação de superfície dos *scaffolds* durante ensaio *in vitro*

Os *scaffolds* foram avaliados por microscopia óptica (40x) quanto a presença ou ausência de poros, homogeneidade e integridade dos poros durante os tempos pré-determinados (zero, 24, 48, 72, 96 e 120 horas) em água ultrapura, meio tamponado (pH 7,4) e FSS (pH 6,9). Os resultados das micrografias da estrutura de superfície dos *scaffolds* estão apresentados na Figura 21 onde PLDLA/PEG400/COL, (Painel A) PLDLA/PEG4000/COL (Painel B), PLDLA/PEG400/SAC (Painel C) e PLDLA/PEG4000/SAC (Painel D).

Os matizes de colorações diferentes são efeitos do fator de iluminação sobre as amostras. As imagens capturadas com câmera eletrônica de 5 megapixel mostram uma diferença na aparência estrutural de superfície no tempo 24 horas que ocorreu em função do rápido intumescimento das amostras. Os pontos brancos nas imagens indicam a passagem de luz e, portanto, a presença de poros. Embora haja diferença no número de poros em função do tempo de contato com o meio de incubação, a microscopia óptica não é a melhor ferramenta para realização deste ensaio de avaliação.

Neste caso o ensaio de microscopia foi útil para verificar a integridade da estrutura de superfície dos *scaffolds* com colágeno (Painéis A e B) e dos *scaffolds* com sacarose (Painéis C e D). Nos tempos zero (antes do intumescimento) é possível visualizar as partículas de sacarose, nos tempos seguinte os pontos luminosos aparecem em função da lixiviação da sacarose e formação dos poros.

Quando comparamos microscopicamente os poros dos *scaffolds* com colágeno ou sacarose é nítido o maior número de poros para os *scaffolds* com colágeno, e o maior volume dos poros para os *scaffolds* com sacarose, respectivamente, em função da área de superfície e da granulometria dos agentes porogênicos

Figura 21 (Painel A) - Micrografias do *scaffold* PLDLA/PEG400/COL obtida por microscopia óptica em tempos pré-determinado durante ensaio *in vitro*

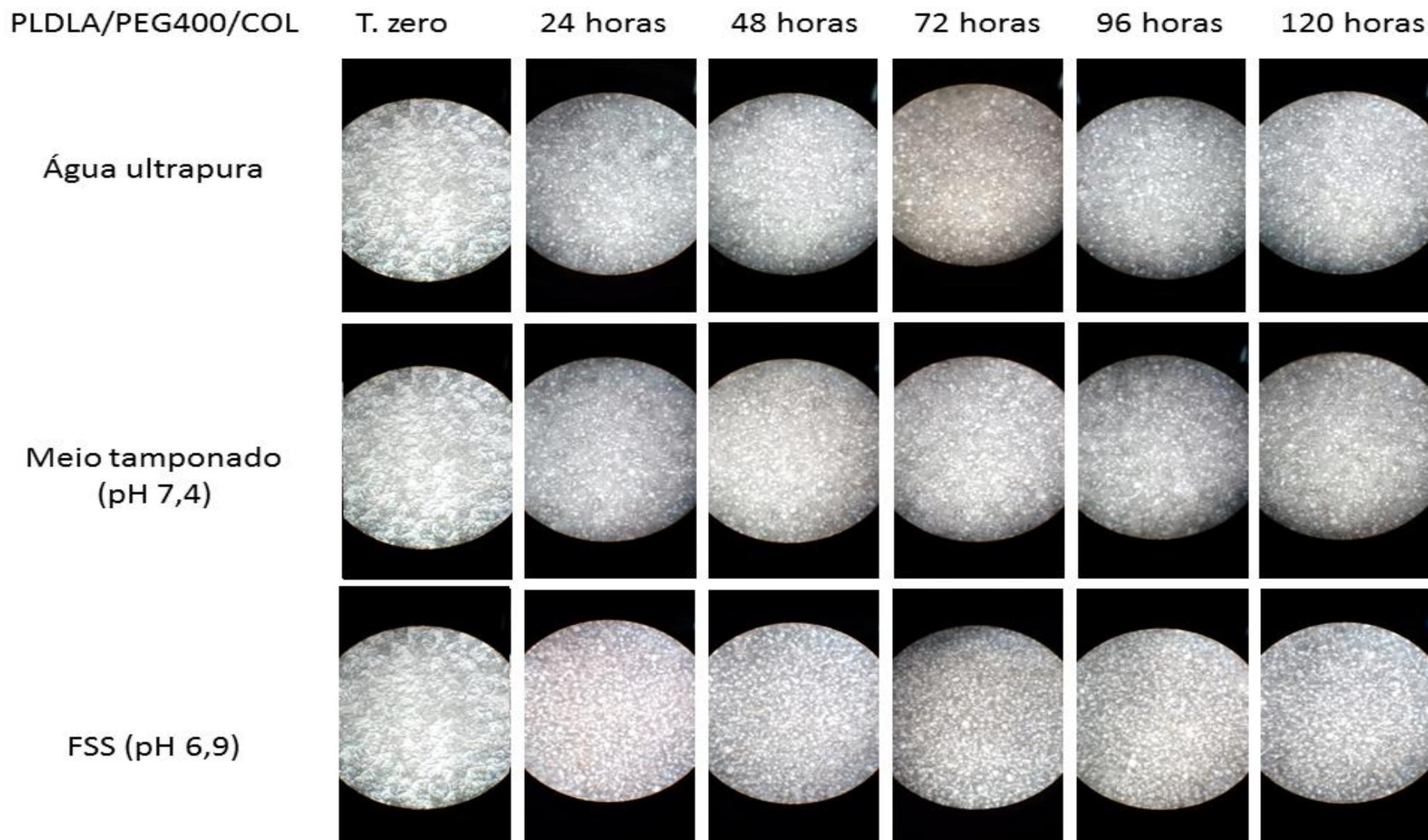


Figura 21 (Painel B) - Micrografias do scaffold PLDLA/PEG4000/COL obtida por microscopia óptica em tempos pré-determinado durante ensaio *in vitro*

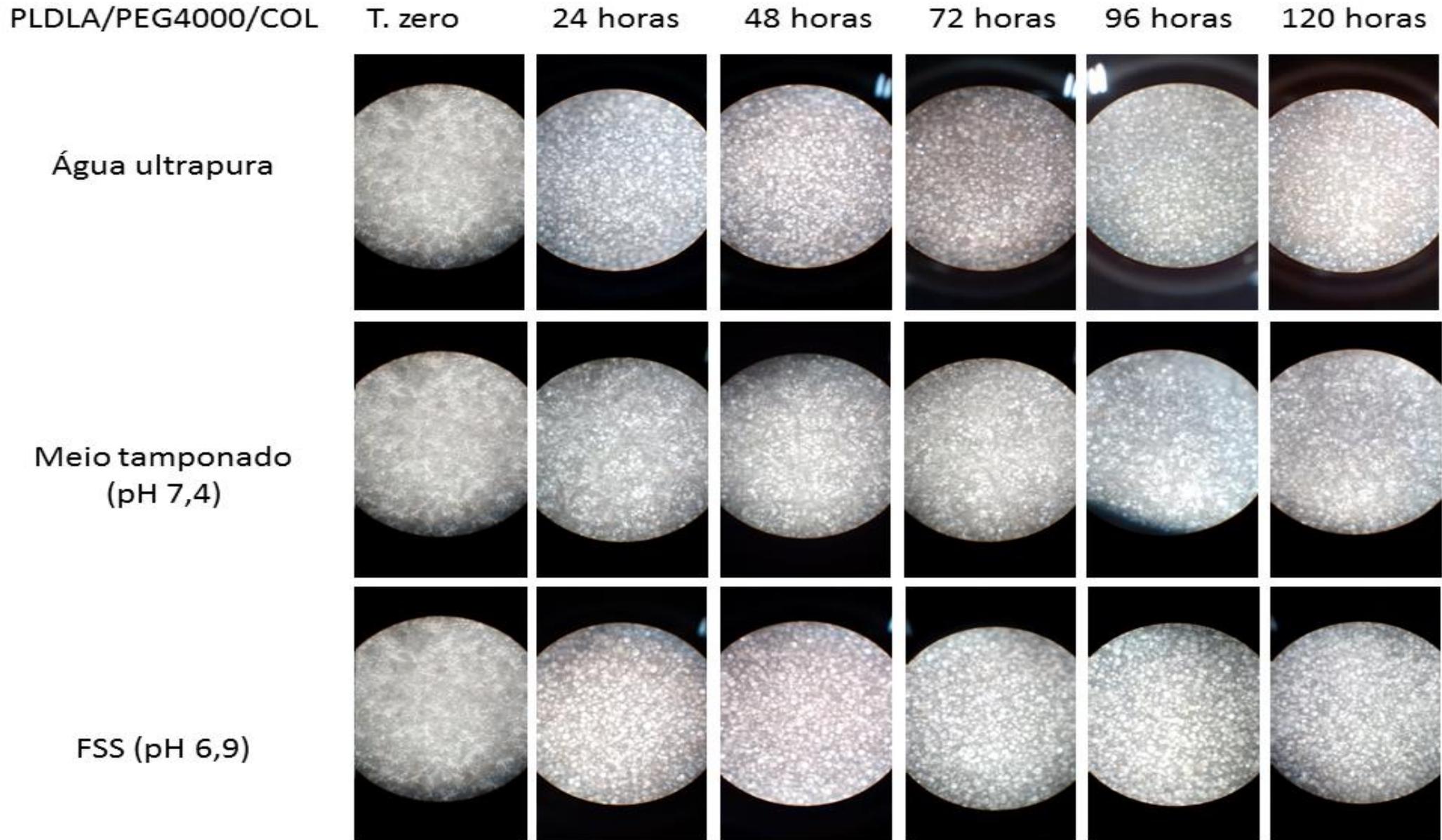


Figura 21 (Painel C) - Micrografias do *scaffold* PLDLA/PEG400/SAC obtida por microscopia óptica em tempos pré-determinado durante ensaio *in vitro*

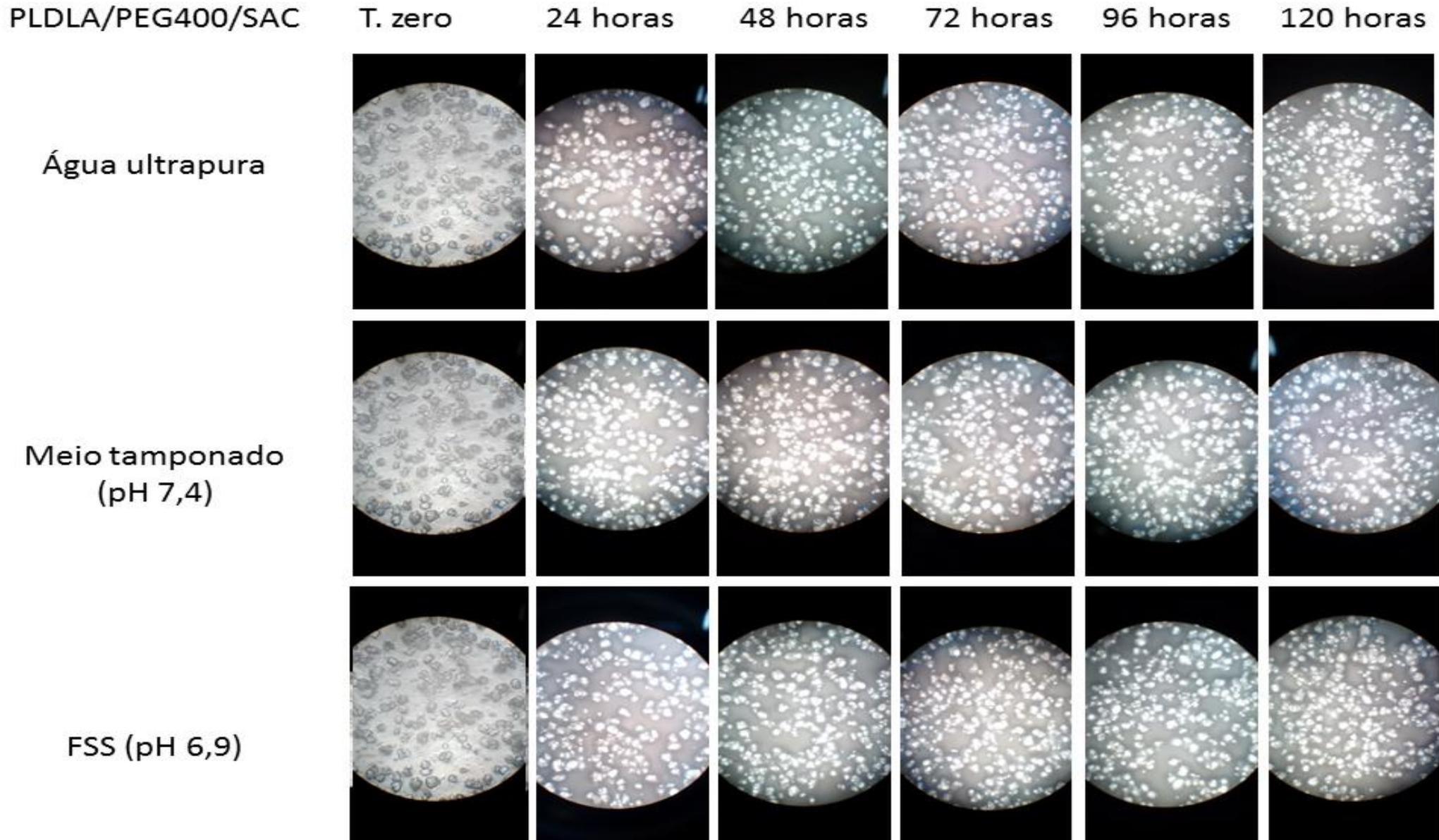
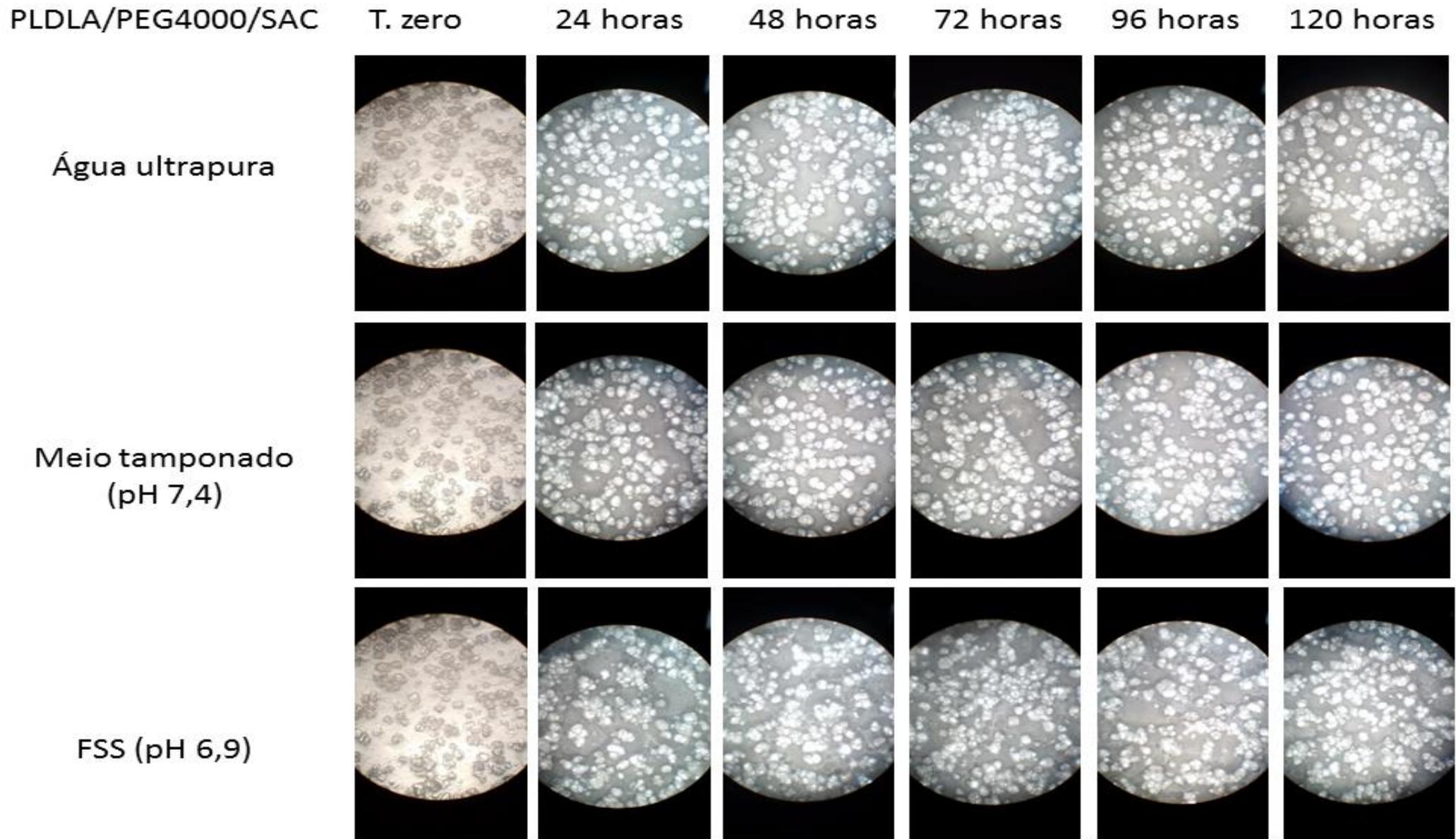


Figura 21 (Painel D) - Micrografias do scaffold PLDLA/PEG4000/SAC obtida por microscopia óptica em tempos pré-determinado durante ensaio *in vitro*



6.6.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) após ensaio *in vitro*

Após cada período do ensaio de desintegração, os *scaffolds* foram submetidos a ensaio por FTIR para avaliar possíveis reações químicas entre os componentes da formulação dos *scaffolds* no meio de incubação (meios reacionais em função do pH, e concentração iônica) em função do tempo (até 120h). Os resultados são apresentados no apêndice 1. As análises dos resultados mostram que os meios de incubação não influenciam na estabilidade química dos compósitos que deram origem aos *scaffolds*.

6.7 Seleção dos *scaffolds*

A partir dos resultados obtidos a partir das análises de MO, FTIR, DSC, ensaio de propriedade biomecânica e estudo *in vitro* de desintegração e capacidade de intumescimento foram selecionados os *scaffolds* PLDLA/PEG400/SAC-LIX e PLDLA/PEG400/COL. Selecionados para análise por microtomografia computadorizada, microscopia eletrônica de varredura e ensaio de viabilidade celular. Uma amostra de *scaffold* sem agente porogênico foi utilizado como comparação (PLDLA/PEG400).

6.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

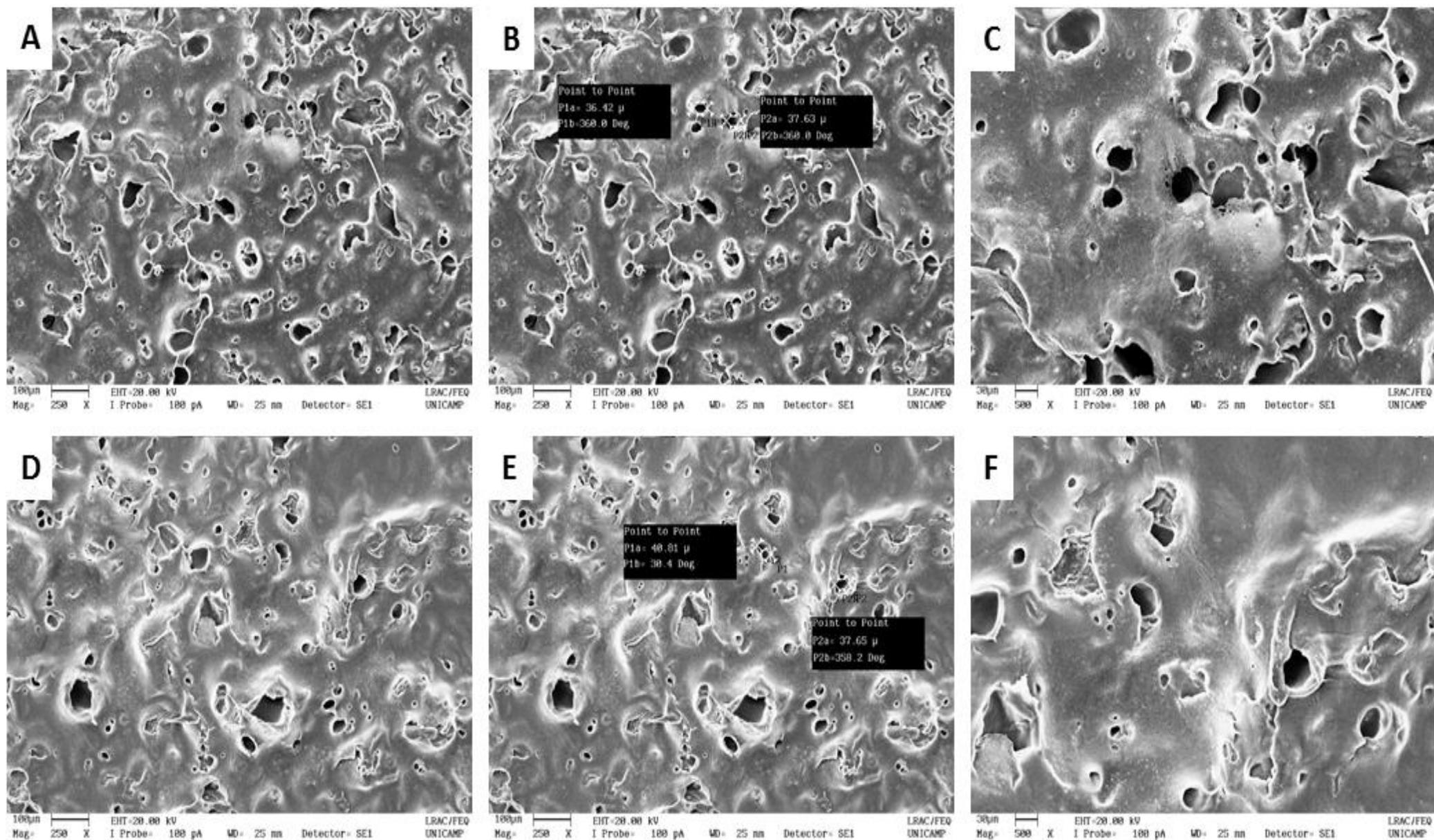
A Figura 22 (A-C) e 22 (D-F) mostram as imagens de MEV para os *scaffolds* PLDLA/PEG400/COL e PLDLA/PEG400/SAC após 120 horas em FSS. A imagem de PLDLA/PEG400/COL (A) obtida com magnitude de 250x e escala de 100 μm exibe poros com formatos irregulares e tamanho variados, constatando que houve a liberação do COL para o meio. A imagem B apresenta os resultados descritos do tamanho dos poros (P1a) 36,42 μm e (P2a) 37,63 μm . na imagem C obtida com magnitude de 500x e escala de 30 μm , pode ser observado a estrutura dos poros num aumento maior.

A imagem de PLDLA/PEG400/SAC (D) obtida com magnitude de 250x e escala de 100 μm exibe poros com formatos irregulares e tamanhos variados, no entanto, maiores em comparação com os poros formados pelo COL. A imagem E apresenta os resultados descritos do tamanho dos poros (P1a) 40,81 μm e (P2a) 37,65 μm . Na imagem F obtida com magnitude de 500x e escala de 30 μm , pode ser

observado os poros num aumento maior, evidenciando a estrutura de superfície da amostra após retirada da SAC.

Os resultados de MEV colaboram para esclarecer a relação entre a estrutura de superfície e a porosidade dos *scaffolds*.

Figura 22 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds*.



Nota: (A-C) *scaffold* PLDLA/PEG400/COL e (D-F) PLDLA/PEG400/SAC

Fonte: Elaboração própria .

6.9 Microtomografia computadorizada

A Tabela 3 mostra a porosidade (%), poros fechados (%), poros abertos (%) e volume de poros abertos (mm^3) dos *scaffolds* selecionados nos tempos zero (antes da lixiviação) e após 120 horas em FSS. O volume de poros abertos (mm^3) representa a interconectividade entre os poros dos *scaffolds*, os quais estão relacionados ao percentual de poros fechados + poros abertos e o volume de poros (mm^3). A Figura 23 (Painéis A-E) mostra as imagens micrográficas da superfície dos *scaffolds*. O Painel A (PLDLA/PEG) serve como comparação para a presença de colágeno (Painel B) e sacarose (Painel D). A diferença na coloração ocorre em função da densidade das matérias primas. No Painel B (tempo zero) os pontos escuros na tonalidade avermelhada correspondem ao colágeno e no Painel C (tempo 120 horas) os pontos brancos são poros (ausência de matéria). No Painel D (tempo zero) os pontos brancos correspondem aos grânulos de sacarose e no Painel E (tempo 120 horas) os poros são representados pelos orifícios escuros. A mudança de cor no Painel E está relacionada ao filtro utilizado no ensaio. A Tabela 3 mostra com melhor detalhamento a relação entre o percentual de poros para cada formulação e o volume dos poros formados. Como era esperado o percentual de poros nos *scaffolds* PLDLA/PEG400/SAC após 120 horas é maior que o seu correspondente PLDLA/PEG400/COL devido à maior solubilidade da sacarose no FSS. O volume dos poros nos *scaffolds* com COL é maior que que dos *scaffolds* com SAC devido à coalescência dos poros formados durante a exposição ao meio de incubação.

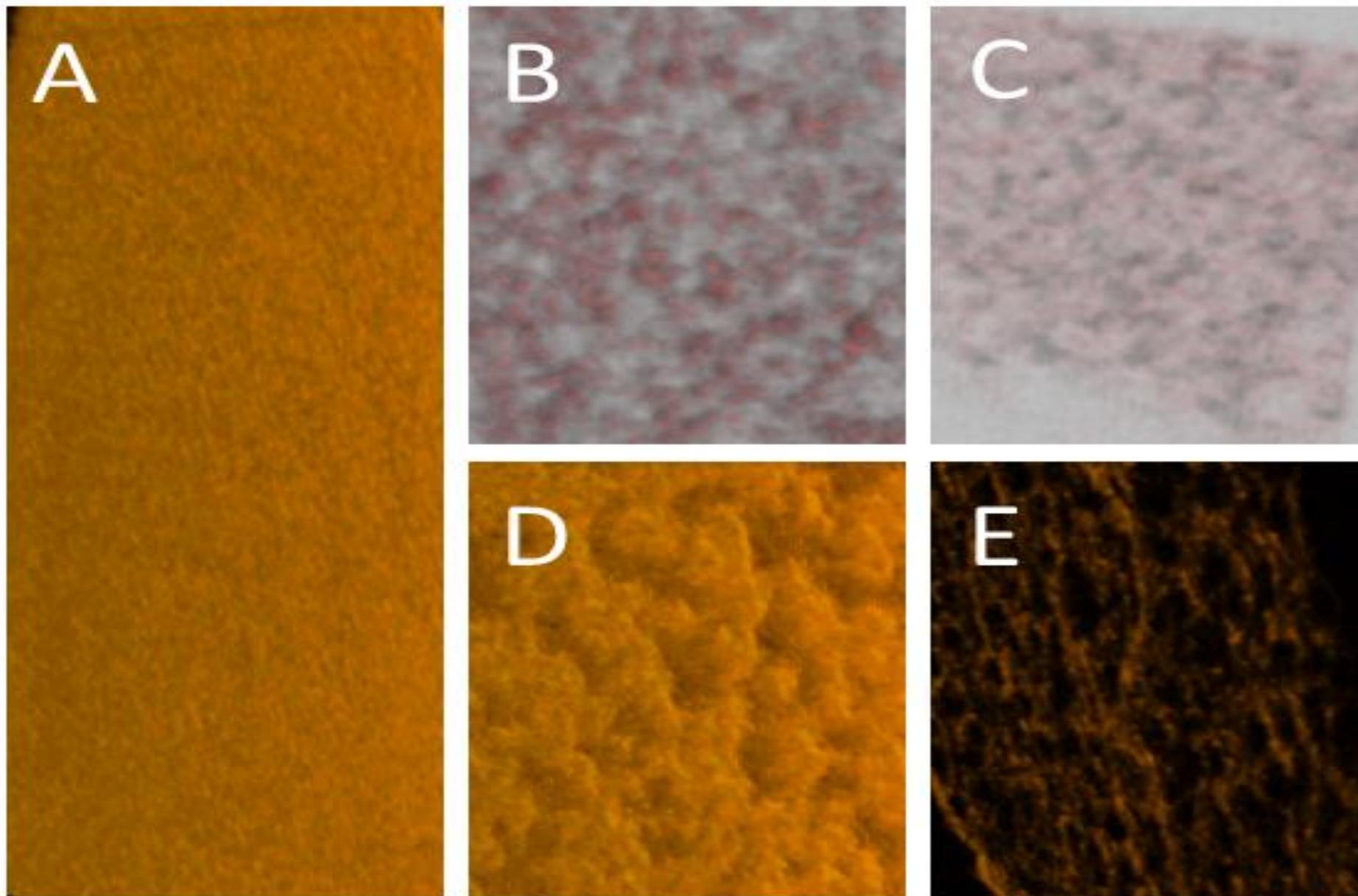
Tabela 3 – Descrição da porosidade (%), poros fechados (%), volume dos poros abertos (mm^3), poros abertos (%) dos *scaffolds*.

Propriedades	PLDLA/ PEG400	PLDLA/PEG 400/SAC (tempo zero)	PLDLA/PEG 400/SAC (120 horas)	PLDLA/PEG 400/COL (tempo zero)	PLDLA/PEG 400/COL (120 horas)
Porosidade (%)	35,80	51,37	63,25	28,88	58,97
Poros fechados (%)	0,03	0,11	0,03	0,04	0,03
Volume dos poros abertos (mm^3)	0,02	0,07	0,08	0,57	1,00
Poros abertos (%)	35,82	51,32	63,24	28,85	58,96

Nota: PLDLA – Poli (L-co-D,L ácido láctico); PEG – Polietilenoglicol (400); SAC – Sacarose; COL – Colágeno.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 23 - Microtomografia dos scaffolds.



Nota: PLDLA/PEG400 (A), PLDLA/PEG400/COL tempo zero (B), PLDLA/PEG400/COL após 120 horas (C), PLDLA/PEG400/SAC tempo zero (D) e PLDLA/PEG400/SAC após 120 horas (E)
Fonte: Elaboração própria.

6.10 Viabilidade celular – Disco-difusão em ágar

Os resultados mostraram não haver morte celular causada pelo contato do material, em análise microscópica as células apresentavam integridade, apresentando alterações de morfologia e morte apenas no controle positivo (Figura 24).

Figura 24 – Resultados das análises de disco-difusão em ágar. PLDLA/PEG 400 (1); PLDLA/PEG400/COL (2); PLDLA/PEG400/SAC (3) e controle positivo (4).



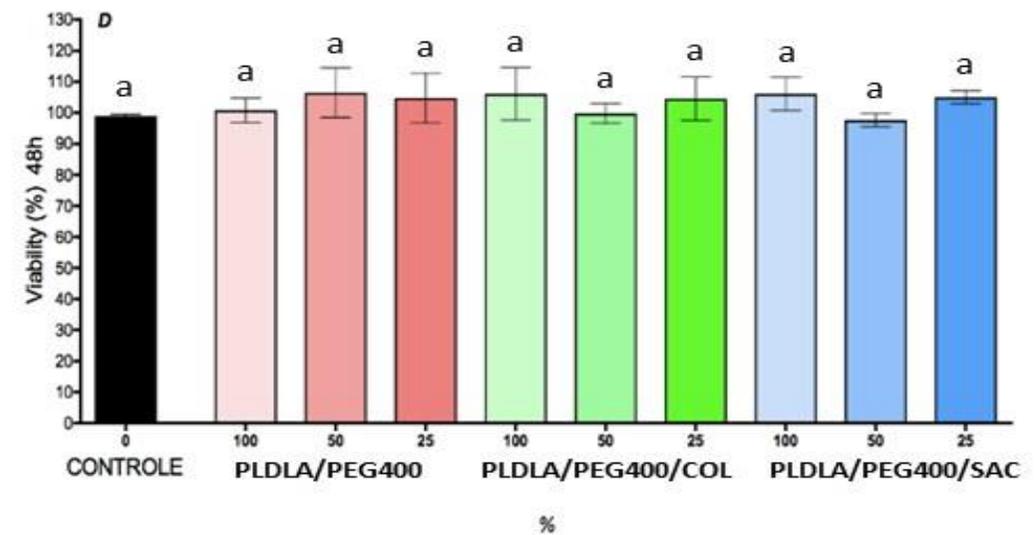
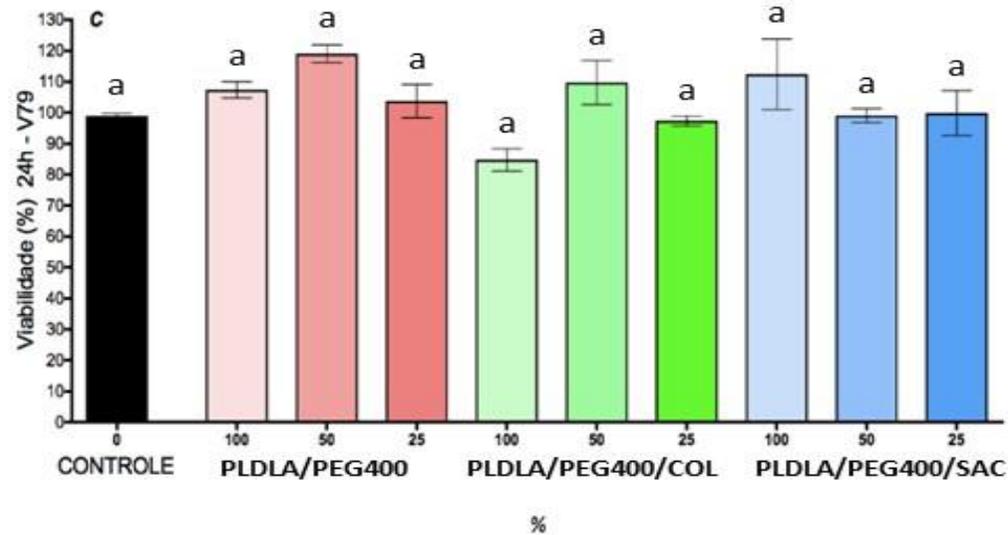
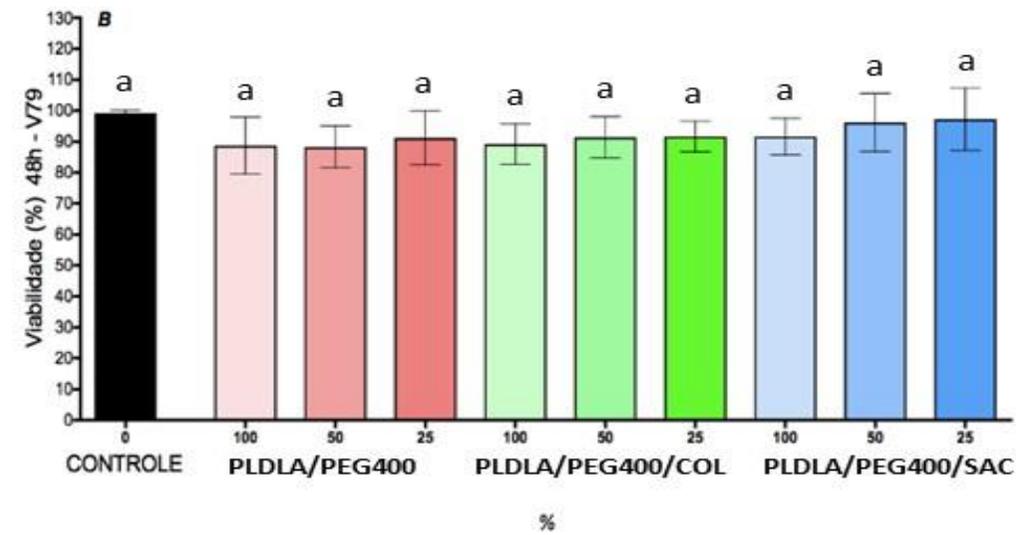
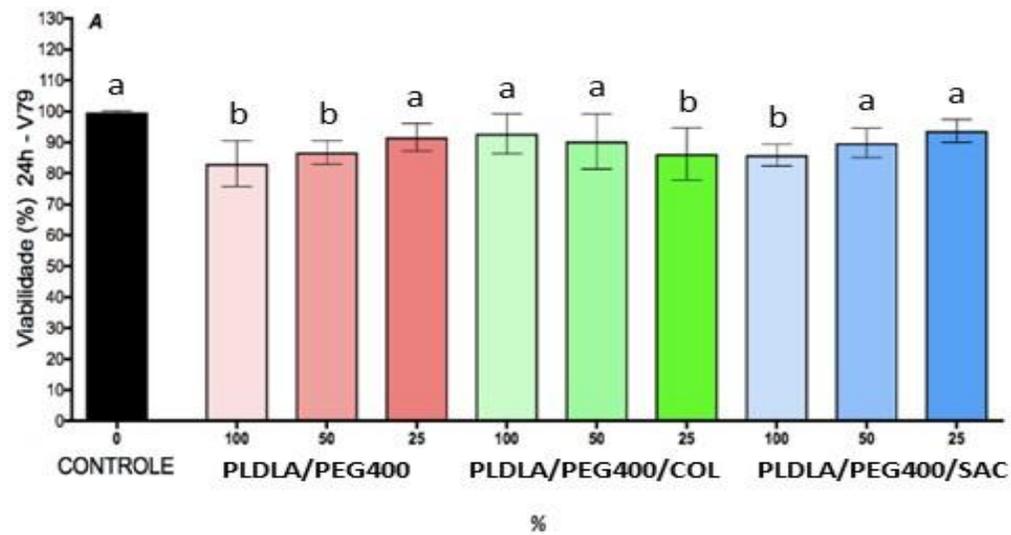
Fonte: Elaboração própria

6.11 Viabilidade celular – MTT e Vermelho Neutro

Os resultados das análises de viabilidade celular por MTT e Vermelho neutro em períodos de exposição por 24 e 48h quando comparadas com os controles não apresentaram diferenças significativas nas análises de exposição no período de 48h (Figura 25B e 25D).

Nas análises realizadas pelo período de 24 horas a avaliação por MTT (avaliação de atividade mitocondrial) apresentou diferenças significativas para as amostras de PLDLA/PEG400 e PLDLA/PEG400/COL (Figura 25A), porém após 48h estas não foram mais observadas (Figura 25B). Uma explicação plausível é o contato inicial ter desestabilizado as células, ficando estas em metabolismo basal baixo, porém com o tempo estas voltaram a estabilidade. Para as análises de viabilidade por vermelho neutro (atividade lisossomal) em tempos de exposição 24 e 48h não apresentaram alterações significativas em relação ao controle (Figura 25C e 25D).

Figura 25 – Viabilidade celular dos *scaffolds*, medidos por atividade mitocondrial – MTT (24h – Paineis A e B) e por atividade lisossomal – vermelho neutro (24h – Paineis C e D). Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos valores ($p > 0,05$).



Nota: PLDLA – Poli (L-co-D,L ácido láctico); PEG – Polietilenoglicol (400); SAC – Sacarose; COL – Colágeno.

Fonte: Elaboração própria

Logo, em resumo inicialmente as células apresentaram alteração no metabolismo mitocondrial, a qual foi estabelecida com o passar do tempo, não havendo morte celular com a exposição ao material, conforme confirmado com a análises do teste de difusão em ágar.

7. CONCLUSÃO

As análises dos resultados apresentados mostraram que ambos os *scaffolds* PLDLA/PEG400/LIX e PLDLA/PEG400/COL são estruturalmente adequados para serem utilizados na regeneração de tecido cartilaginoso traqueal. No entanto, devido à semelhança com a matriz extracelular o *scaffold* PLDLA/PEG400/COL possa ser mais indicado para adesão e proliferação celular de condrócitos. Esta hipótese, no entanto, precisa ser confirmada em estudos pré-clínicos e clínicos. Outros estudos complementares precisam ser iniciados e novos biomateriais precisam ser avaliados. Contudo, consideramos que estamos abrindo caminhos para o avanço da ciência na área de engenharia de tecidos destinada à regeneração de órgãos.

8. Referências

- ADRIANA, M. et al. Characterization of pin blends Poly (L-co-D,L lactic acid)/Poly (caprolactone diol) (PLDLA / PCL-T) and analysis of mechanical property of pins during in vitro degradation. v. 26, n. 2, p. 185–191, 2016.
- ALCANTAR, N. A.; AYDIL, E. S.; ISRAELACHVILI, J. N. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, n. 3, p. 343-351, 2000.
- ALESSI, M. L. et al. Helical and coil conformations of poly(ethylene glycol) in isobutyric acid and water. **Macromolecules**, v. 38, n. 22, p. 9333–9340, 2005.
- ANDERSON, J. M.; LANGONE, J. J. Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n. 2, p. 107–113, 1999.
- ANDRADE, F. G; FERRARI, O. Atlas digital de histologia básica. **Universidade Estadual de Londrina Centro de Ciências Biológicas Departamento de Histologia**. 1º Edição, Londrina, 2014. (Disponível em: <http://www.uel.br/ccb/histologia>). Acesso em 05.10.2017.
- BARAÚNA, G. S. et al. Estudo da degradação “ in vivo ” de poli (L-co-D , L-ácido láctico) aplicado como prótese para regeneração nervosa periférica. **Revista Matéria**, v. 12, p. 298–306, 2007.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, v. 15, p. 13–21, 2005.
- BERNER, A. et al. Effects of scaffold architecture on cranial bone healing. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 4, p. 506–513, 2014.
- BHAT, S.; KUMAR, A. Biomaterials and bioengineering tomorrow’s healthcare. **Biomatter**, v. 3, n. 3, p. e24717-1-e24717-12, 2013.
- BUZZI, O.; YUAN, S.; ROUTLEY, B. Development and validation of a new near-infrared sensor to measure polyethylene glycol (PEG) concentration in water. **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 6, p. 1-11, 2017.
- CAMILLO, C. da S. et al. **Caderno de histologia: texto e atlas**. Natal, RN. EDUFRN. 2017.
- CESAR, Daniel. Anatomia online – O site mais completo de anatomia humana. (Disponível em: <http://anatomiaonline.com/traqueia/>). Acesso em 18.10. 2017.
- CHAK, V.; KUMAR, D.; VISHT, S. A review on collagen based drug delivery

- systems. **Int J Pharm Teach Pract**, v. 4, n. 4, p. 811-820, 2013.
- CHANG, B. et al. Injectable scaffolds: Preparation and application in dental and craniofacial regeneration. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 111, p. 1–26, 2017.
- CHAUD, M. V. et al. Characterization of membrane of poly (L,co-D,L-lactic acid-co-trimethylene carbonate) (PLDLA-co-TMC) (50/50) loaded with Silk Fibroin. **SDRP Journal of Biomedical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2017.
- CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G. A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 3–4, p. 584–671, 2013.
- CÔRTEZ, M. A et al. Imunomodulação de fagócitos do sangue humano pelo extrato de *Strychnos Pseudoquina* ST . HILL adsorvido em microesferas de polietilenoglicol. **Polimeros**, v. 23, p. 1–8, 2013.
- CROWLEY, C.; BIRCHALL, M.; SEIFALIAN, A. M. Trachea transplantation: from laboratory to patient. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 9, n. 4, p. 357-367, 2015.
- CRUZ, I. B. M. DA et al. Potencial regenerativo do tecido cartilaginoso por células-tronco mesenquimais: atualização, limitações e desafios. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 52, n. 1, p. 2–10, 2017.
- CUI, Z. et al. Fabrication and characterization of injection molded poly (ϵ -caprolactone) and poly (ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 6, p. 1674–1681, 2012.
- DE MEDEIROS, J.; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 796–802, 2010.
- DE MORAES PORTO, I. C. C.; ALMEIDA, A. G. A. Avaliação em curto e médio prazo da sorção e da solubilidade de resinas compostas à base de metacrilato e de silorano em saliva artificial. **Rev Odontol UNESP**, v. 42, n. 3, p. 176-181, 2013.
- DIAS, D. B. et al. Caracterização de filmes de sericina modificados com polietilenoglicol. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 8932-8939, 2015.
- DOS SANTOS ALMEIDA, R. et al. Avaliação da fase inicial do reparo ósseo após implantação de biomateriais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 331-336, 2015.
- DRUMOND, W. S.; WANG, S. H.; MOTHE, C. G. Síntese e caracterização do

- copolímero poli (ácido láctico-b-glicol etilênico). **Polímeros**, v. 14, p. 74–79, 2004.
- DUTTA, R. C. et al. Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 2, p. 240–250, 2017.
- DUARTE, M. A. T.; MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. de R.. Mechanical properties of membranes of poly (L-co-DL-lactic acid) with poly (caprolactone triol) and study *in vivo*. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, 2014.
- ERBETTA, C. D. C. et al. Síntese e caracterização térmica e química do copolímero poli (D, L-lactídeo-co-glicolídeo). **Polímeros**, v. 21, n. 5, p. 376-382, 2011.
- ESPOSITO, A. R. Arcabouços de PLDLA/PCL-T como dispositivos para prótese de menisco. **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros (10º CBPol)**. Foz do Iguaçu, PR. n. 4, 2009.
- FERNANDES, E. et al. Engenharia tecidual de cartilagem articular com ênfase em odontologia. **Revista da Faculdade de Odontologia-UPF**, v. 20, n. 3, 2016.
- FERNANDES, M. C. S.; MORELLI, M. R. Desenvolvimento de arcabouços de óxido de titânio e. v. 63, p. 263–270, 2017.
- FERREIRA, B. M. P. et al. Haste intramedular polimérica bioreabsorvível (PLLA/PHBV) para uso na recuperação de fraturas ósseas. **Polímeros**, v. 18, n. 4, p. 312–319, 2008.
- FISHER, J.; REDDI, A. Functional tissue engineering of bone: signals and scaffolds. **Topics in Tissue Engineering**. v. 1 p. 1-29, 2003.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores 3ª ed.** [s.l.] Elsevier Brasil, 2007.
- GOMES, L. S. M. Biomateriais em artroplastia de quadril: Propriedades, estrutura e composição. **O Quadril. São Paulo: Atheneu**, p. 121–143, 2010.
- GONÇALVES, G. et al. Benefícios da ingestão de colágeno para o organismo humano. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, v. 1, n. 2, p. 190–207, 2015.
- GUIMARÃES, F. B. A. P. et al. Sol-gel synthesis of bioactive glass porous scaffolds with addition of porogen agent. **Cerâmica**, v. 62, n. 364, p. 328-337, 2016.
- HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2529–2543, 2000.
- IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 3, n. 10, p. 589-601, 2006.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Basica 12ª ed - Junqueira e Carneiro**,

- Rio de Janeiro, RJ. GUANABARA KOOGAN, 2013.
- KHANG, G.; KIM, M. S.; LEE, H. B. (Ed.). **A manual for biomaterials/scaffold fabrication technology**. World Scientific Publishing Company, 2007.
- KHORSHIDI, S. et al. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 10, n. 9, p. 715-738, 2016.
- LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920–926, 1993.
- LEE, J.; CUDDIHY, M. J.; KOTOV, N. A. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 14, n. 1, p. 61–86, 2008.
- LEONG, K. F.; CHEAH, C. M.; CHUA, C. K. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2363–2378, 2003.
- LI, Y. P. et al. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. **Journal of Controlled Release**, v. 71, n. 2, p. 203-211, 2001.
- LIU, C.; DESAI, K. G. H. Characteristics of rofecoxib-polyethylene glycol 4000 solid dispersions and tablets based on solid dispersions. **Pharmaceutical development and technology**, v. 10, n. 4, p. 467-477, 2005.
- LIAO, G. Y. et al. Electrospun poly (L-lactide)/poly (ϵ -caprolactone) blend fibers and their cellular response to adipose-derived stem cells. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, n. 4, p. 2154-2165, 2011.
- LOMBELLO, C.; DOS REIS JR, G. M.; COHEN, M. Estudo da viabilidade da cultura de condrócitos humanos visando aplicação clínica para o transplante autólogo. **Einstein**, v. 1, p. 84–88, 2003.
- MAIA, M. et al. Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (Impresso)**, v. 25, n. 3, p. 566–572, 2010.
- MÁS, B. A. et al. Surface characterization and osteoblast-like Cells culture on collagen modified PLDLA scaffolds. **Materials Research**, v. 17, n. 6, p. 1523-1534, 2014.
- MARTINS, K. F. et al. Preparation and characterization of paclitaxel-loaded PLDLA microspheres. **Materials Research**, v. 17, n. 3, p. 650–656, 2014.
- MERKLI, A. et al. Biodegradable Polymers for the Controlled Release. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 563–580, 1998.
- MESSIAS, A.D. et al. Morfologia de osteoblastos sobre PLDLA obtido pela litografia.

Anais do 9º Congresso Brasileiro de Polímeros (9º CBPol). Campina Grande, PB., 2007.

MESSIAS, A. D. et al. Synthesis , characterization , and osteoblastic cell culture of poly (L-co-D,L-lactide-co-trimethylene carbonate) scaffolds. v. 2014, 2014.

MITSUISHI, M. et al. Biomanufacturing. **CIRP Annals - Manufacturing Technology**, v. 62, n. 2, p. 585–606, 2013.

MOHSENI, M. et al. Assessment of tricalcium phosphate/collagen (TCP/collagene)nanocomposite scaffold compared with hydroxyapatite (HA) on healing of segmental femur bone defect in rabbits. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 1401, p. 1–8, 2017.

MORALES-VALENCIA, M. et al. Evaluación del método químico-enzimático de descelularización para la obtención de matrices extracelulares de tráquea en el modelo porcino. **IATREIA** v. 29, n. 2, p. 144-156, 2016

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Estudo inicial da degradação “in vitro” de poli (L-co-DL ácido láctico) sintetizado em laboratório. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 13, n. 3, p. 429–438, 2008.

MUSCHLER, G.; NAKAMOTO, C.; GRIFFITH, L. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 86, n. 7, p. 1541–1558, 2004.

NASCIMENTO, M. H. M. DO; LOMBELLO, C. B. Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. **Polímeros**, v. 26, n. 4, p. 360–370, 2016.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.

PARK, J. H. et al. A novel tissue-engineered trachea with a mechanical behavior similar to native trachea. **Biomaterials**, v. 62, p. 106-115, 2015.

PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. (Ed.). **Biomaterials: principles and applications**. Boca Raton, FL. CRC press LLC, 2002.

PEREIRA, E. D. et al. Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. **Polímeros**, v. 26, n. 2, p. 137-143, 2016.

PRESTES, R. C. et al. Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. **Rev Bras Prod Agroindustr [Internet]**, v. 15, n. 4, p. 375-82, 2013.

PRESTES, R. C. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 1, 2015.

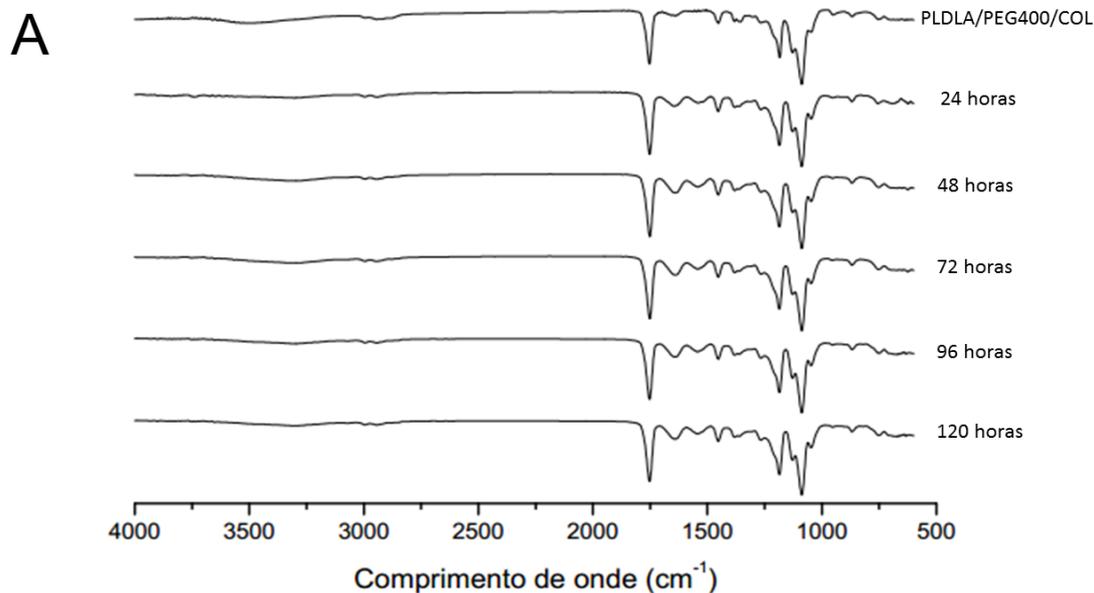
- PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.
- POINERN, G. E. J.; BRUNDAVANAM, S.; FAWCETT, D. Biomedical magnesium alloys: a review of material properties, surface modifications and potential as a biodegradable orthopaedic implant. **American Journal of Biomedical Engineering**, v. 2, n. 6, p. 218-240, 2012.
- RAPHAEL, E. G.; SONE, A. P.; GIMENES, M. L. Uso de sericina de Bombyx Mori no preparo de biomateriais combinados com quitosana e alginato. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 8811-8818, 2015.
- RAINS, J. K. et al. Mechanical properties of human tracheal cartilage. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 1, p. 219-225, 1992.
- RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. San Diego, CA. Elsevier Academic Press, 2004.
- REBELO, M. A. et al. Chitosan-based scaffolds for tissue regeneration: preparation and microstructure characterization. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 15–24, 2016.
- RENOUF-GLAUSER, A. C. et al. A degradation study of PLLA containing lauric acid. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2415-2422, 2005.
- RODRIGUEZ-VAZQUEZ, M. et al. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. **BioMed research international**, v. 2015, p. 821279, 2015.
- ROSSI, E.; SADER, C. S. Envelhecimento do sistema osteoarticular. **Einstein**, v. 6, n. 1, p. S7-12, 2008.
- SADEGHI-AVALSHAHR, A. R. et al. Synthesis and characterization of PLGA/collagen composite scaffolds as skin substitute produced by electrospinning through two different approaches. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 1, p. 1-14, 2017.
- SADER, M. S.; FERREIRA, M.; DIAS, M. L. Preparação e caracterização de estruturas porosas de poli(3-hidroxibutirato). **Polímeros**, v. 16, n. 1, p. 12–18, 2006.
- SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 8, p. 743–765, 2004.
- SANTOS, L. C. et al. The UV/H₂O₂ - photodegradation of poly(ethyleneglycol) and model compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, p. 1467–1472, 2009.

- SANTOS JR, A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros**, v. 17, n. 4, p. 308–317, 2007.
- SCOTT, E. A. et al. Modular scaffolds assembled around living cells using poly(ethylene glycol) microspheres with macroporation via a non-cytotoxic porogen. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 1, p. 29–38, 2010.
- SHIRANE, H. Y. et al. Implantes de biomateriais em falha óssea produzida na fíbula de ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 45, n. 5, p. 478–482, 2010.
- SILVA, F. de T.; PENNA, B. A. L. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 3, p. 530-539, 2012.
- SILVA, E. F. et al. Engenharia tecidual de cartilagem articular com ênfase em odontologia. **RFO UPF**, v. 20, n. 3, p. 372-379, 2015.
- SIONKOWSKA, A. et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 795-801, 2004.
- SINHORETI, M. A. C.; VITTI, R. P.; CORRER-SOBRINHO, L.. Biomateriais na odontologia: Panorama atual e perspectivas futuras. **Revista da Associação Paulista de Cirurgios Dentistas**, v. 67, n. 4, p. 256-261, 2013.
- SIMBARA, M. M. O. et al. Porosidade de scaffolds: Picnometria x processamento de imagens. **XXVI Congresso de Engenharia Biomédica-CBEB 2014**. Santo André, SP. p. 1538–1541, 2014.
- STUDART, A. R. et al. Processing routes to macroporous ceramics: A review. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 89, n. 6, p. 1771–1789, 2006.
- SUÁREZ-GONZÁLEZ, D. et al. Controlled nucleation of hydroxyapatite on alginate scaffolds for stem cell-based bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 95, n. 1, p. 222–234, 2010.
- SULTANA, N.; WANG, M. PHBV Tissue engineering scaffolds fabricated via emulsion freezing/freeze-drying: Effects of processing parameters. In: **International Conference on Biomedical Engineering and Technology**, v. 11, n. 2011, p. 29–34, 2011.
- SUZUKI, T. et al. Regeneration of the trachea using a bioengineered scaffold with adipose-derived stem cells. **Annals of Otology, Rhinology and Laryngology**, v. 117, n. 6, p. 453–463, 2008.
- TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 6, n. Suppl_3, p. S311–S324, 2009.

- TORLEY, P. J.; D'ARCY, B. R.; TROUT, G. R. The effect of ionic strength, polyphosphates type, pH, cooking temperature and preblending on the functional properties of normal and pale, soft, exudative (PSE) pork. **Meat Science**, v. 55, n. 4, p. 451-462, 2000.
- TONHI, E. et al. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.
- VERT, M.; DOI, Y.; HELLWICH, K.; HESS, M.; HODGE, P.; KUBISA, P.; RINAUDO, M.; SCHUE, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure Appl. Chem.**, v. 84, n. 2, p. 377–410, 2012.
- WALTERS, B. D.; STEGEMANN, J. P. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 4, p. 1488–1501, 2014.
- WANG, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2133–2151, 2003.
- WILLIAMS, D. F. **The Williams dictionary of biomaterials**. Liverpool, Reino Unido. Liverpool University Press, 1999.
- ZANETTI-RAMOS, B. et al. The effect of polyethylene glycol on drug content, particle morphology, and carbamazepine release profiles of sustained release microspheres prepared from cellulose acetate butyrate. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 177–183, 2006.
- ZHU, J. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 17, p. 4639–4656, 2010.

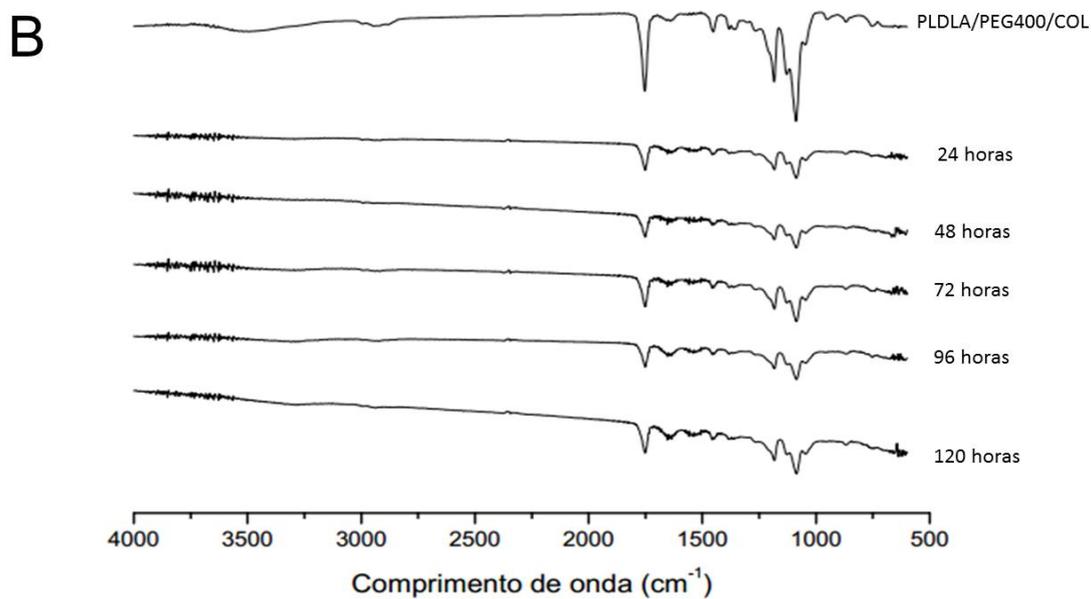
9. Apêndice

Apêndice 1 (A) - Resultados dos espectros de FTIR do *scaffold* PLDLA/PEG400/COL em água ultrapura.



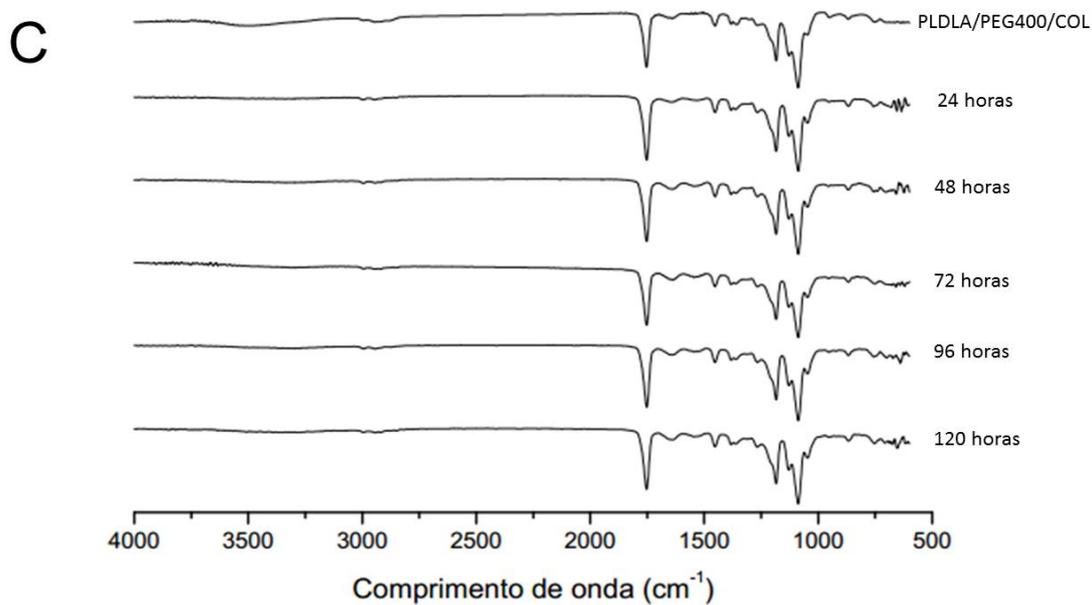
Fonte: Elaboração própria.

Apêndice 1 (B) - Resultados dos espectros de FTIR do *scaffold* PLDLA/PEG400/COL em FSS.



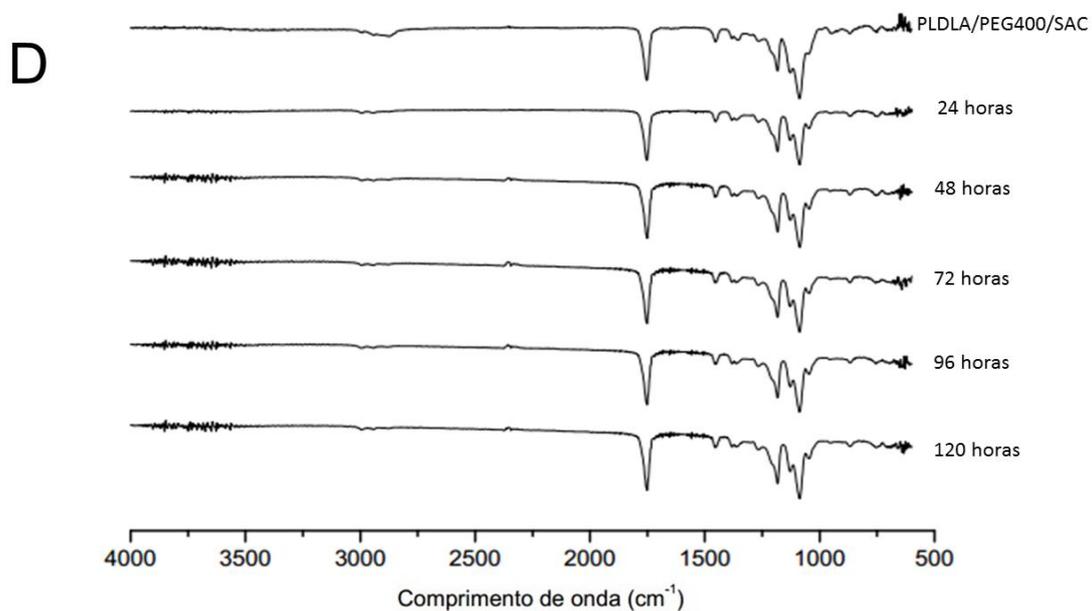
Fonte: Elaboração própria.

Apêndice 1 (C) - Resultados dos espectros de FTIR do *scaffold* PLDLA/PEG400/COL em meio tamponado.



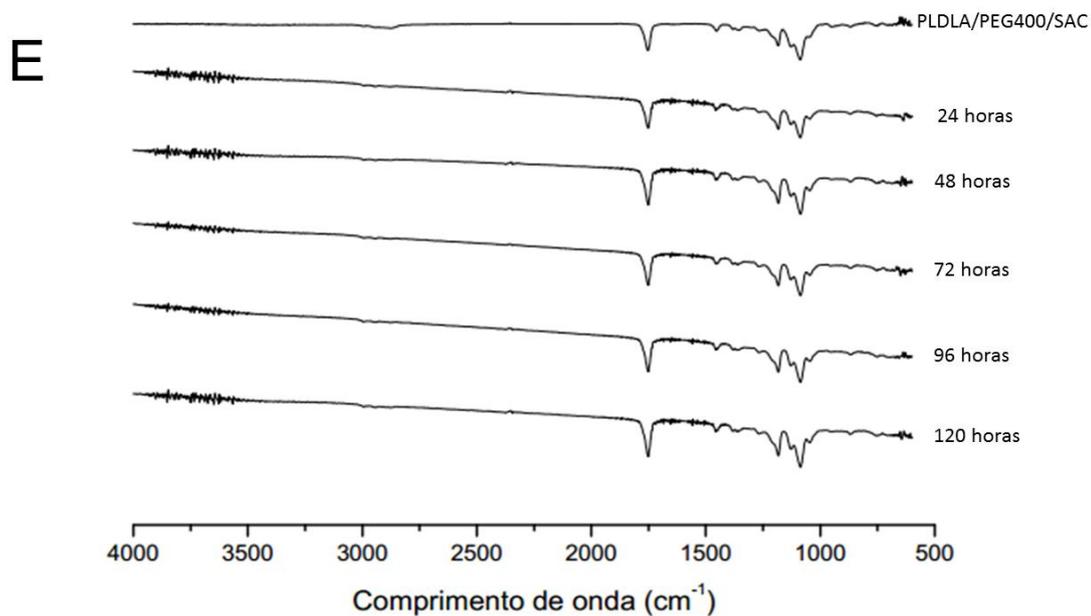
Fonte: Elaboração própria.

Apêndice 1 (D) - Resultados dos espectros de FTIR do *scaffold* PLDLA/PEG400/SAC em água ultrapura.



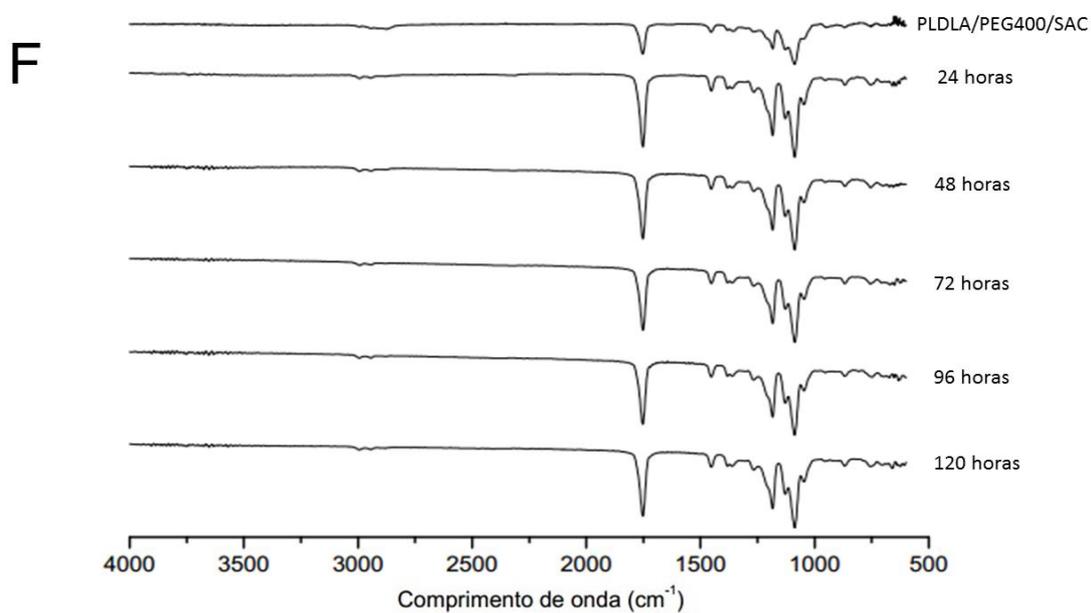
Fonte: Elaboração própria.

Apêndice 1 (E) - Resultados dos espectros de FTIR do *scaffold* PLDLA/PEG400/SAC em FSS.



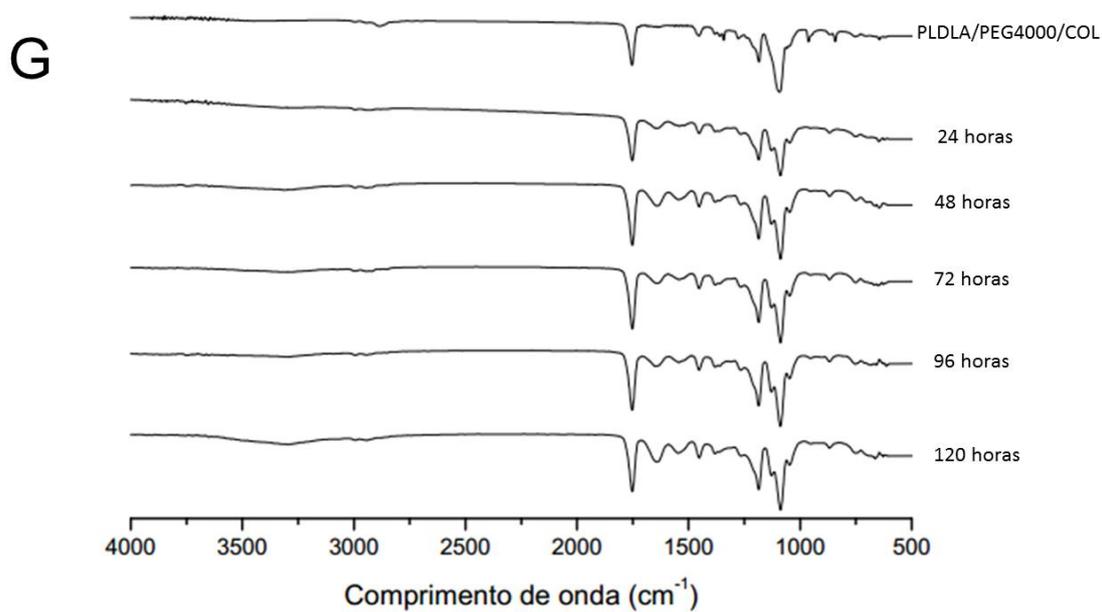
Fonte: Elaboração própria.

Apêndice 1 (F) - Resultados dos espectros de FTIR do *scaffold* PLDLA/PEG400/SAC em meio tamponado.



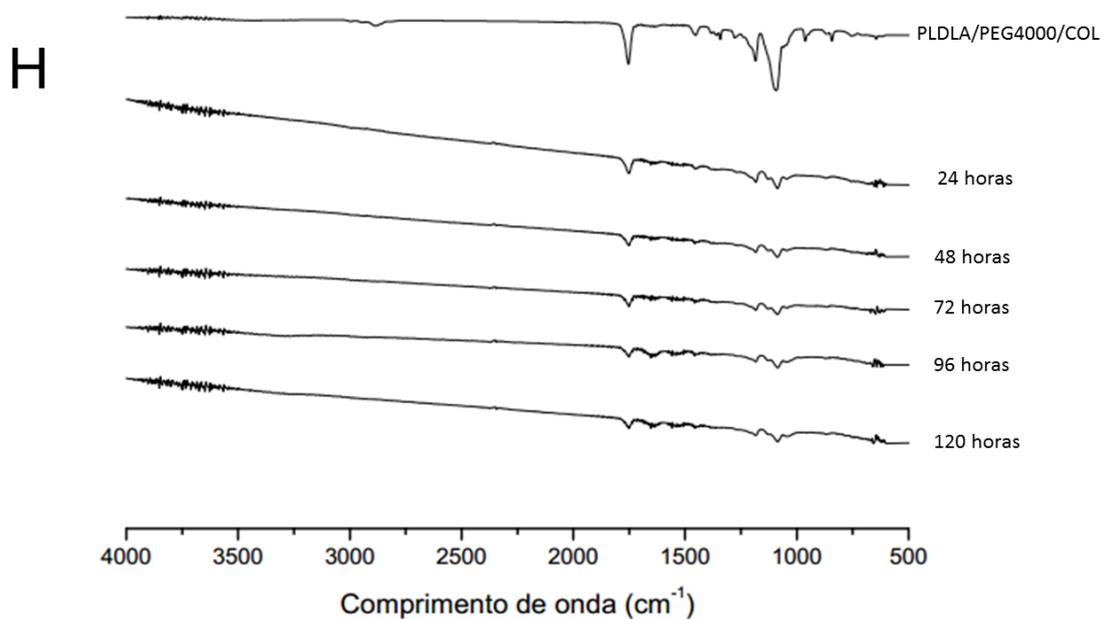
Fonte: Elaboração própria.

Apêndice 1 (G) - Resultados dos espectros de FTIR do *scaffold* PLDLA/PEG4000/COL em água ultrapura.



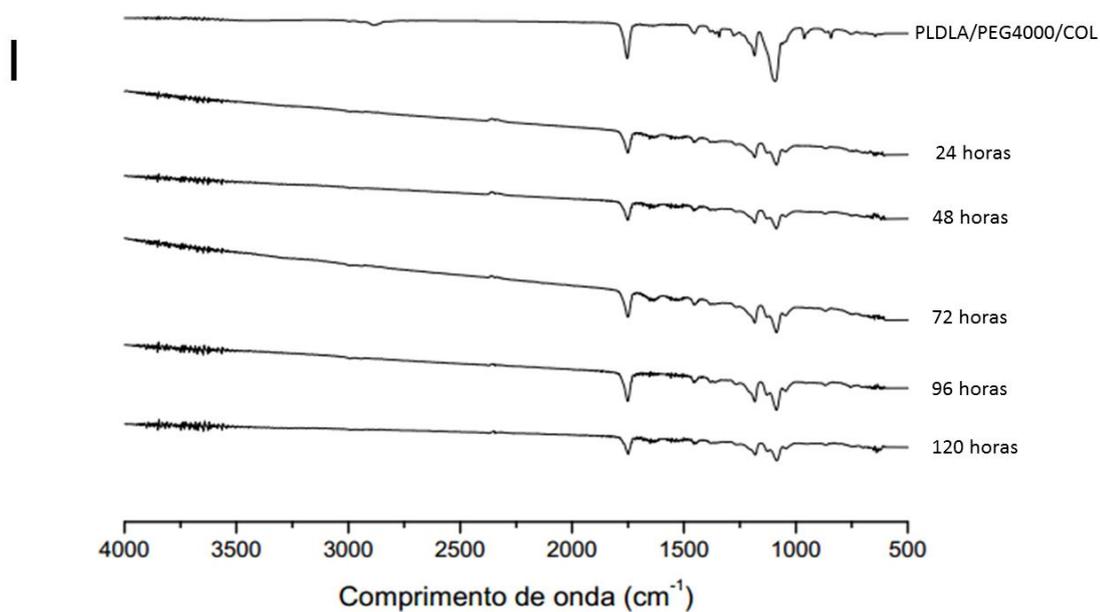
Fonte: Elaboração própria.

Apêndice 1 (H) - Resultados dos espectros de FTIR do *scaffold* PLDLA/PEG4000/COL em FSS.



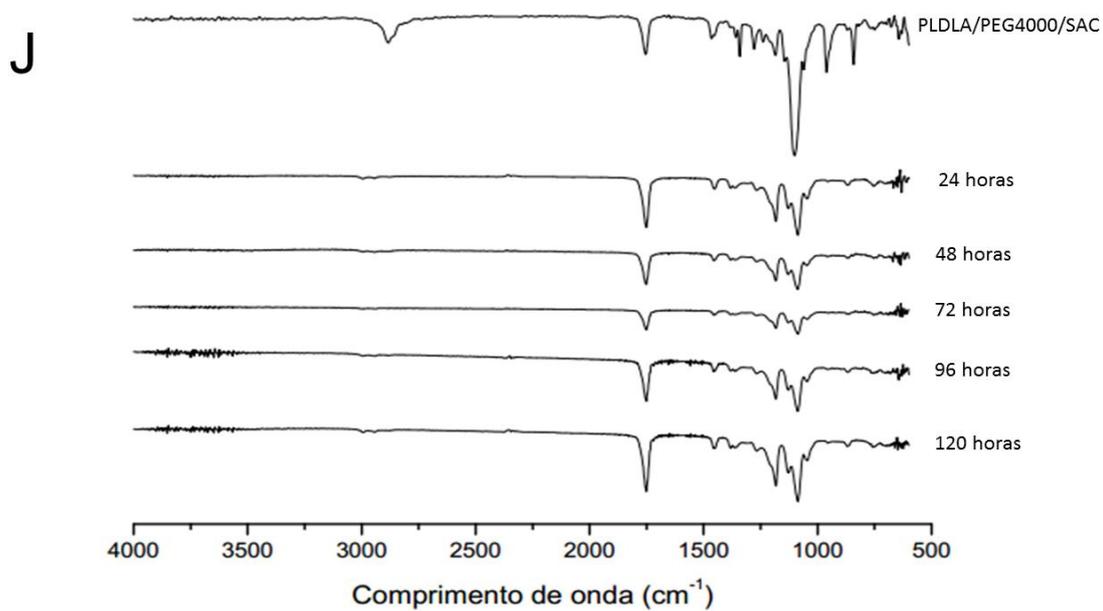
Fonte: Elaboração própria.

Apêndice 1 (I) - Resultados dos espectros de FTIR do *scaffold* PLDLA/PEG4000/COL em meio tamponado.



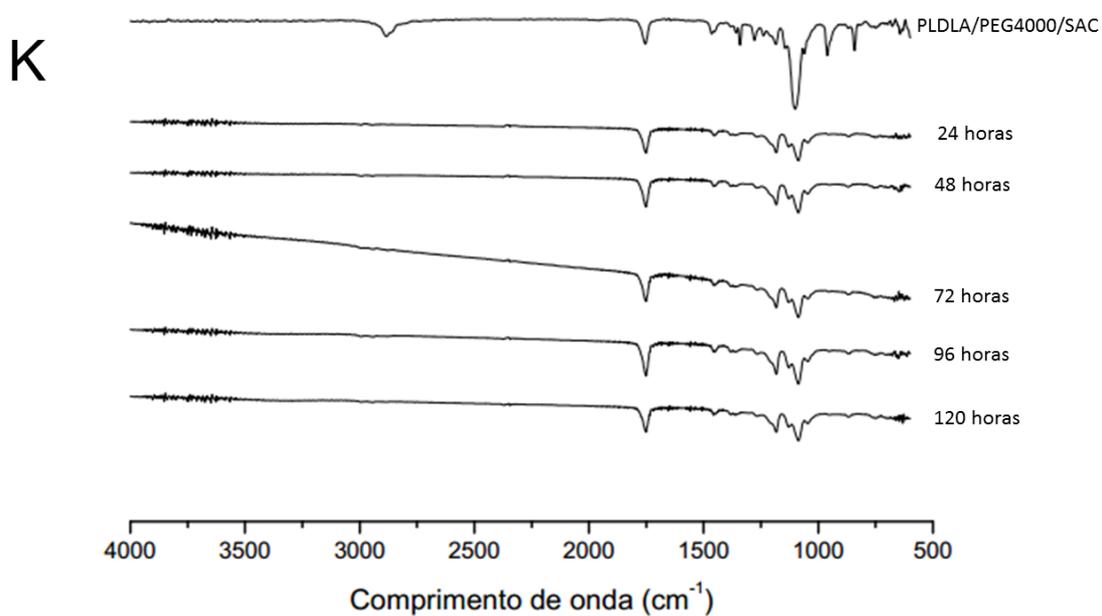
Fonte: Elaboração própria.

Apêndice 1 (J) - Resultados dos espectros de FTIR do *scaffold* PLDLA/PEG4000/SAC em água ultrapura.



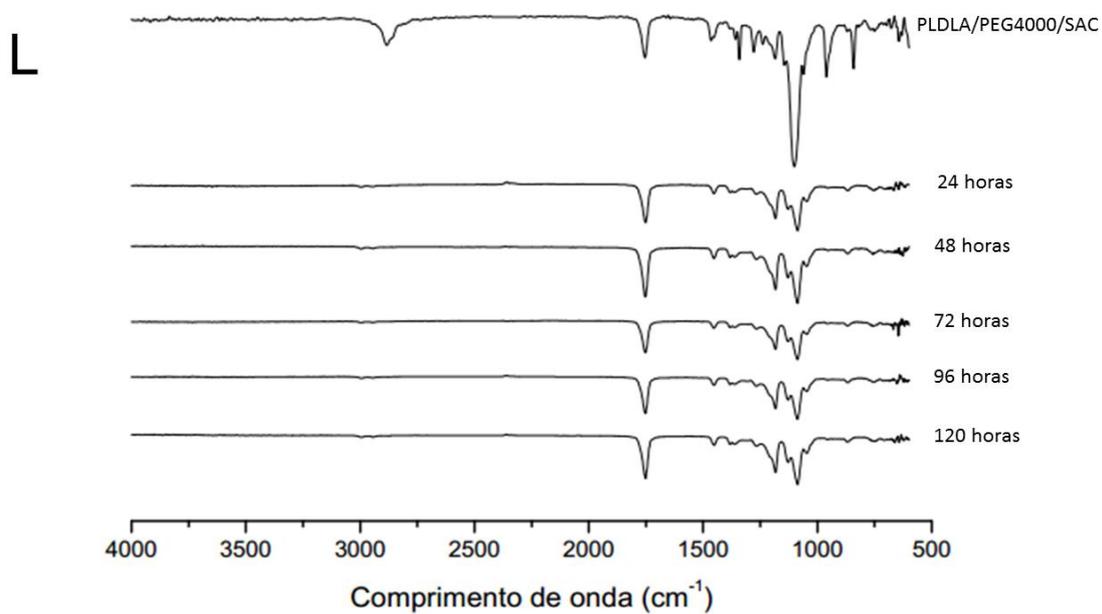
Fonte: Elaboração própria.

Apêndice 1 (K) - Resultados dos espectros de FTIR do *scaffold* PLDLA/PEG4000/SAC em FSS.



Fonte: Elaboração própria.

Apêndice 1 (L) - Resultados dos espectros de FTIR do *scaffold* PLDLA/PEG4000/SAC em meio tamponado.



Fonte: Elaboração própria.