UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Venâncio Alves Amaral

Otimização do Processo de Desenvolvimento e Preparação de *Scaffolds* Poliméricos para Engenharia de Tecido Traqueal.

Sorocaba/SP
2021

Venâncio Alves Amaral

Otimização do Processo de Desenvolvimento e Preparação de *Scaffolds* Poliméricos para Engenharia de Tecido Traqueal.

Optimization of the Development and Preparation Process of Polymeric Scaffolds for Tracheal Tissue Engineering.

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud.

Sorocaba/SP

2021

Ficha Catalográfica

Amaral, Venâncio Alves

A518o Otimização do processo de desenvolvimento e preparação de scaffolds poliméricos para engenharia de tecido traqueal / Venâncio Alves Amaral. – 2021.

197 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.

1. Traquéia - Doenças. 2. Traquéia – Estenose. 3. Materiais biomédicos. 4. Engenharia tecidual. 5. Polímeros na medicina. I. Chaud, Marco Vinícius, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Elaborada por Regina Célia Ferreira Boaventura – CRB-8/6179

Venâncio Alves Amaral

Otimização do Processo de Desenvolvimento e Preparação de *Scaffolds* Poliméricos para Engenharia de Tecido Traqueal.

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovada em: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud
Universidade de Sorocaba – UNISO.

Profª. Drª. Ana Carolina de Oliveira Plens
Universidade de Sorocaba – UNISO.

Prof. Dr. Edgard Robles Tardelli
Universidade de Sorocaba – UNISO.

Profª. Drª. Thais Francine Ribeiro Alves
Universidade de Sorocaba – UNISO.

Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Dedico este trabalho à minha família, amigos e a todas as pessoas que me ajudaram ao longo desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

É neste espaço de agradecimentos que peço licença as normas da ABNT, que fiquem exclusivamente para o restante da tese. Pois quero a liberdade nesta parte da escrita para transpor os agradecimentos, mas sem essa de estar preocupado com a falta ou não de coerência e coesão, o que não poderá faltar e sinceridade no decorrer das linhas.

De antemão, já deixo claro que não será possível nomear a todos, minha memória não é das melhores, por isso não quero correr o risco de esquecer alguém, no entanto, deixo descrito neste parágrafo meus agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desta tese.

Agradeço a Deus que está sempre ao meu lado, olhando e zelando por cada passo nesta caminhada, talvez tenha dado risada de algumas trapalhadas que faço, o que deve ser normal, até eu dou risada disso.

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 largar tudo e pegar o caminho de voltar se fez mais forte. Agradeço a vocês, meus 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 deixarem o tio tão preso a rotina de palavras em Times New Roman (ou Arial), tamanho 12, espaçamento de 1,5, margem direita e superior de 3 cm e esquerda e inferior de 2 cm, citações, referências... E não é que ABNT apareceu... Obrigado sobrinhos por relembrar o quanto é bom ser criança. Amo vocês!

Agradeço a todos que compõem o grupo de pesquisa LaBNUS! Obrigado pela amizade, pelas histórias, conversas, risadas, por compartilharem comigo experiências e conhecimentos diversos e pela companhia no laboratório! Muito bom saber que podia contar com cada um de vocês. Sou muito grato!

Neste parágrafo, dedico o agradecimento aos dois grandes marcos em minha trajetória acadêmica e na pesquisa científica. Ao Prof. Dr. Marcos Antonio dos Santos Reigota e ao Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud, sou extremamente grato pela orientação,

dedicação e por compartilharem comigo sua sabedoria e ensinamentos. Agradeço muito por acreditarem em meu potencial e capacidade.

Ao Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior, ao Denicezar Angelo Baldo e ao Laboratório de Física Nuclear aplicada da Universidade de Sorocaba (LAFINAU), pela contribuição ao realizar as análises por microtomografia computadorizada e microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Dr. Norberto Aranha pela contribuição ao doar os casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*).

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

À Capes pela concessão de bolsa/taxa PROSUC (Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições Comunitárias de Educação Superior).

Muito obrigado!

“Rapadura é doce, mas não é mole não.”

“Devagar se vai ao longe.”

“É terra quente que ensina o sapo a pular.”

“Árvore que dá bons frutos, é a mais apedrejada.”

(Ditados – Sabedoria Popular).

RESUMO

A engenharia reversa de cartilagem em especial do tecido traqueal é uma tendência da medicina regenerativa como solução para regenerar tecidos cartilaginosos danificado por doenças ou lesões traumáticas. Processamentos tecnológico para associação de polímeros naturais e sintéticos possibilitam fabricação de dispositivos laminados ou lamelares, tridimensionais, porosos, biocompatíveis e biodegradáveis. Estes dispositivos denominados *scaffolds* podem ser projetados para mimetizar a matriz extracelular das cartilagens, estimulando o crescimento de um novo tecido orgânico *like-with-like*. Os *scaffolds* laminados ou lamelares foram obtidos, respectivamente, por extensão ou compressão plástica da mistura polimérica, previamente preparados. As blendas poliméricas foram formadas com 2 ou mais dos seguintes polímeros: poli (L-co-D, L ácido láctico) (PLDLA 70:30), polietilenoglicol 400 (PEG400), colágeno tipo I (COL), fibroína de seda (SF), policaprolactona (PCL), poliuretano diol solução (PU) e compostos fenólicos totais (TPC), obtendo dispositivos tridimensionais porosos, isotrópicos ou anisotrópicos e miméticos a matriz extracelular. Desta forma, considerando as características morfológicas e morfométricas, as propriedades mecânicas, capacidade de intumescimento e taxa de biodesintegração, os *scaffolds* poliméricos obtidos neste estudo podem fornecer um caminho para melhorar as condições estruturais, fisiológicas e biológica de cartilagens lesionadas e que viabilize o uso em ensaios pré-clínicos para tratamento de tecido traqueal em condições de estenose ou após remoção de tumores.

Palavras-chave: Estenose traqueal, câncer de traqueia, engenharia de tecidos, *scaffold* laminado, *scaffold* lamelar denso.

ABSTRACT

The reverse engineering of cartilage, especially tracheal tissue, is a trend in regenerative medicine as a solution to regenerate cartilage tissue damaged by diseases or traumatic injuries. Technological processing for the association of natural and synthetic polymers makes it possible to manufacture laminated or lamellar, three-dimensional, porous, biocompatible and biodesintegrable devices. These devices called scaffolds can be designed to mimic the extracellular matrix of cartilages, stimulating the growth of new like-with-like organic tissue. The laminated or lamellar scaffolds were obtained, respectively, by extension or plastic compression of the polymeric mixture, previously prepared. The polymer blends were formed with 2 or more of the following polymers: poly (L-co-D, L lactic acid) (PLDLA 70:30), polyethylene glycol 400 (PEG400), type I collagen (COL), silk fibroin (SF), polycaprolactone (PCL), polyurethane diol solution (PU) and total phenolic compounds (TPC), obtaining porous, isotropic or anisotropic and mimetic three-dimensional devices to the extracellular matrix. Thus, considering the morphological and morphometric characteristics, the mechanical properties, swelling capacity and rate of biodesintegration, the polymeric scaffolds obtained in this study can provide a way to improve the structural, physiological and biological conditions of injured cartilages and to enable the use in pre-clinical trials for the treatment of tracheal tissue under conditions of stenosis or after removal of tumors.

Keywords: Tracheal stenosis, tracheal cancer, tissue engineering, laminated scaffold, dense lamellar scaffold.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: Revisão bibliográfica.

Figura 1 – Representação esquemática do sistema respiratório.....30

Figura 2 – Anatomia da traqueia.....31

Figura 3 – Representação esquemática da histologia da traqueia.....33

Figura 4 – Representação esquemática dos tipos de tecidos cartilaginosos.....35

Figura 5 – Sistema de irrigação sanguínea da traqueia.....36

Figura 6 – Representação esquemática da histogênese para formação dos tecidos cartilaginosos.....38

Figura 7 – Representação esquemática de tumor traqueal localizado.....39

Figura 8 – Representação esquemática de estenose traqueal.....41

Figura 9 – Sistema de classificação pela obstrução causada por estenose traqueal...43

Figura 10 – Representação esquemática da aplicação de balonete (A) e *stent* (B).....44

Figura 11 – Estrutura molecular do colágeno.....49

Figura 12 – Estrutura molecular da fibroína de seda.....51

Figura 13 – Estrutura molecular dos compostos fenólicos: catecol; ácido caféico; quercetina.....52

Figura 14 – Estrutura molecular do poli (L-co-D, L ácido láctico.....54

Figura 15 – Estrutura molecular do polietilenoglicol.....56

Figura 16 – Estrutura molecular da policaprolactona.....57

Figura 17 – Estrutura molecular do poliuretano.....59

Capítulo II: Dense lamelar scaffold the base of collagen, silk fibroin and polyethylene glycol 400: Evaluation of freezing parameters associated with plastic compression technique.

Figure 1 – Graphical representation of obtaining dense lamellar scaffold using the plastic compression technique.....83

Figure 2 – FTIR spectra of components (A) and scaffolds (B). Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C).....84

Figure 3 – Hypothesis of interactions between the chemical species of dense lamellar scaffolds.....85

Figure 4 – DSC thermograms curves of the components (A) scaffolds (B) and hydrated scaffolds (C). Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C).....87

Figure 5 – SEM of the scaffolds COL-SF-PEG 400 (-80) (A-a), COL-SF-PEG 400 (-50) (B-b) and COL-SF-PEG 400 (-18) (C-c). Magnification of A-C is 100x, and a-c is 250x.....90

Figure 6 – Morphological characteristic of dense lamellar scaffolds evaluated by µCT. Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C).....92

Figure 7 – Mechanical properties of elasticity (Young's modulus) of dense lamellar scaffolds. Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C). Equal letters indicate that there is no significant difference between the mean values.....94

Figure 8 – Mechanical properties of dense lamellar scaffolds. Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C). Equal letters indicate that there is no significant difference between the mean values.....95

Figure 9 – Fluid uptake of dense lamellar scaffolds (%) fluid retained by the whole scaffold structure in PBS (pH 7.4 at 37 °C). Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C). Equal letters indicate that there is no significant difference between the mean values.....96

Figure 10 – Fluid uptake of dense lamellar scaffolds (%) by the scaffold material itself in PBS (pH 7.4 at 37 °C). Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C). Equal letters indicate that there is no significant difference between the mean values…….....97

Figure 11 – Weight loss (%) of dense lamellar scaffolds in PBS (pH 7.4 at 37 °C). Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C). Equal letters indicate that there is no significant difference between the mean values……..98

Figure 12 – pH of dense lamellar scaffolds in PBS at 37 °C. Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C). Equal letters indicate that there is no significant difference between the mean values…….....99

Capítulo III: *Scaffold* lamelar denso como material biomimético para engenharia de tecido traqueal: Efeito da adição de compostos fenólicos totais extraídos das folhas de *Psidium guajava* Linn.

Figura 1 – Aspectos macroscópicos dos *scaffolds* lamelares densos.....113

Figura 2 – Espectros de FTIR dos componentes (A) e *scaffolds* lamelares densos (B).....115

Figura 3 – Medidas de potencial zeta dos compostos fenólicos totais (TPC) no pH 2,68 e pH 10,00.....116

Figura 4 – Hipótese de interações entre as espécies químicas dos *scaffolds* lamelares densos.....117

Figura 5 – Curvas termoanalíticas de DSC dos componentes (A) *scaffolds* lamelares densos (B) e *scaffolds* hidratados (C).....119

Figura 6 – MEV dos *scaffolds* lamelares densos FA (A1-2), FB (B1-2), FC (C1-2)....124

Figura 7 – Características morfológicas dos *scaffolds* lamelares densos avaliados por µCT.....125

Figura 8 – Propriedades mecânicas dos *scaffolds* lamelares densos.....128

Figura 9 – Absorção de fluido dos *scaffolds* lamelares densos (%), fluido retido por toda a estrutura do *scaffold* em PBS (pH 7,4 a 37 °C).....130

Figura 10 – Absorção de fluido dos *scaffolds* lamelares densos (%) pelo próprio material dos *scaffolds* em PBS (pH 7,4 a 37 °C).....131

Figura 11 – Perda de massa (%) dos *scaffolds* lamelares densos em PBS (pH 7,4 a 37 °C).....132

Figura 12 – pH dos *scaffolds* lamelares densos em PBS a 37 °C.....133

Capítulo IV: *Scaffold* laminado como material biomimético para engenharia de tecido traqueal: Preparação, caracterização e propriedades mecânicas.

Figura 1 – Aspectos macroscópicos dos *scaffolds* laminados.....147

Figura 2 – Espectros de FTIR dos componentes (A) e *scaffolds* laminados (B).....149

Figura 3 – Curvas termoanalíticas de DSC dos componentes (A), *scaffolds* laminados (B) e *scaffolds* laminados hidratados (C).....152

Figura 4 – MEV dos *scaffolds* laminados FA (A1-2), FB (B1-2), FC (C1-2) e FD (D1-2).....154

Figura 5 – Características morfométricas dos *scaffolds* laminados avaliados por µCT.....156

Figura 6 – Propriedades mecânicas dos *scaffolds* laminados.....158

Figura 7 – Absorção de fluido dos *scaffolds* laminados (%), fluido retido por toda a estrutura do *scaffold* em PBS (pH 7,4 a 37 °C).....160

Figura 8 – Absorção de fluido dos *scaffolds* laminados (%) pelo próprio material dos *scaffolds* em PBS (pH 7,4 a 37 °C).....161

Figura 9 – Perda de massa (%) dos *scaffolds* laminados em PBS (pH 7,4 a 37 °C)...163

Figura 10 – pH dos *scaffolds* laminados em PBS a 37 °C.....164

LISTA DE TABELAS

Capítulo I: Revisão bibliográfica.

Tabela 1 – Exemplos de tumores traqueais benignos e malignos.....40

Capítulo II: Dense lamelar scaffold the base of collagen, silk fibroin and polyethylene glycol 400: Evaluation of freezing parameters associated with plastic compression technique.

Table 1 – Temperature denaturation (T_d) and enthalpies (ΔH) of dense lamellar scaffolds.....87

Table 2 – Morphometric data of dense lamellar scaffolds.....92

Capítulo III: *Scaffold* lamelar denso como material biomimético para engenharia de tecido traqueal: Efeito da adição de compostos fenólicos totais extraídos das folhas de *Psidium guajava* Linn.

Tabela 1 – Composição das formulações para a preparação dos *scaffolds* baseados em hidrogel.....111

Tabela 2 – Temperatura de desnaturação (T_d) e entalpia (ΔH) dos *scaffolds* lamelares densos.....120

Tabela 3 – Dados morfométricos dos *scaffolds* lamelares densos.....126

Capítulo IV: *Scaffold* laminado como material biomimético para engenharia de tecido traqueal: Preparação, caracterização e propriedades mecânicas.

Tabela 1 – Composição das formulações para a preparação dos *scaffolds* laminados.....146

Tabela 2 – Dados morfométricos dos *scaffolds* laminados.....157

LISTA DE EQUAÇÕES

Capítulo II: Dense lamelar scaffold the base of collagen, silk fibroin and polyethylene glycol 400: Evaluation of freezing parameters associated with plastic compression technique.

Equation 1 – Fluid uptake of scaffold (%)…….....81

Equation 2 – Weight loss (%).....82

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α: Alfa

Abs: Absorbance

AI: Aromaticity index

ATR: Reflectância total atenuada/*Attenuated total reflectance*

β: Beta

COL: Colágeno/*Collagen*

CO_2: Dióxido de carbono

C_P: Capacidade calorífera

DPPH: (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

DEGL-50: *Dry extract of guava leaves from acidified ethanol 50%*

DEGL-70: *Dry extract of guava leaves from acidified ethanol 70%*

DCM: Diclorometano

DSC: Calorimetria diferencial exploratória/*Differential scanning calorimetry*

ESB: *European Society for Biomaterials*

ε: Epsilon

FCR: *Folin-Ciocalteau reagent*

FDA: *Food and Drug Administration*

FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier/*Fourier transform infrared spectroscopy*

GAE: *Gallic acid equivalent*

GAG: *Glycosaminoglycan*

H_2O: Água

KBr: Brometo de potássio

MEC/ECM: Matriz extracelular/*Extracellular matrix*

MEV/SEM: Microscopia eletrônica de varredura/*Scanning electron microscopy*

O_2: Oxigênio

PBS: Solução tampão fosfato/*Phosphate buffered saline*

PCL: Policaprolactona

PEG: Polietilenoglicol/*Polyethylene glycol*

PLA: Poli (ácido láctico)

PDLLA: Poli (D, L-ácido láctico)

PLDLA: Poli (L-co-D, L ácido láctico)

PU: Poliuretano

ROS: *Reactive oxygen species*

RNS: *Reactive nitrogen species*

SF: Fibroína de seda/*Silk fibroin*

T_d: Temperatura de desnaturação/*Denaturation temperature*

T_g: Transição vítrea/*Glass transition*

TPA: Análise de perfil de textura/*Texture profile analysis*

TPC: Compostos fenólicos totais/*Total phenolic content*

UAE: *Ultrasound-assisted extraction*

UTIs: Unidades de terapia intensiva

µCT: Microtomografia computadorizada/*Computed microtomography*

3D: Tridimensional

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS

kDA: Quilodalton

Da: Dalton

°C: Grau Celsius

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

cm: Centímetro

Kg: Quilograma

g: Grama

h: Hora

mg: Miligrama

µm: Micrômetro

µg: Micrograma

µM: Micromolar

min: Minuto

mL: Mililitro

L: Litro

mm: Milímetro

mm/s: Milímetro por segundo

mm^3: Milímetro cúbico

cm^2: Centímetros quadrado

m/v: Massa/volume

m (w): Massa

v: Volume

qsp: Quantidade suficiente para

nm: Nanômetro

N: Newton

kN: Quilonewton

pH: Potencial hidrogeniônico

kHz: Quilo-Hertz

Ɛr: Constante dielétrica/*dielectric constant*

Kps: Medida de pressão

kV: Quilo volts

eV: Eletron volts

mA: Miliampère

∆H: Entalpia de fusão

J: Joules

Pa: Pascal

°: Grau

s: Segundo

%: Porcentagem

<: Menor que

>: Maior que

≥: Maior ou igual que

~: Aproximadamente

±: Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....25

2 OBJETIVO.....28

2.1 Geral.....28

2.2 Específicos.....28

2.2.1 *Scaffold* lamelar denso.....28

2.2.2 *Scaffold* laminado.....28

CAPÍTULO I 29

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 30

1.1 Anatomia, fisiologia e histologia da traqueia.....30

1.2 Tecido cartilaginoso.....34

1.3 Células do tecido cartilaginoso.....36

1.4 Câncer de traqueia.....38

1.5 Estenose traqueal.....41

1.6 Engenharia de tecido traqueal.....44

1.7 *Scaffolds*.....45

1.8 Biomateriais 47

1.8.1 Colágeno 48

1.8.2 Fibroína de seda 50

1.8.3 Compostos fenólicos 52

1.8.4 Poli (L-co-D, L ácido láctico).....54

1.8.5 Polietilenoglicol 55

1.8.6 Policaprolactona.....57

1.8.7 Poliuretano 58

2 CONCLUSÃO.....60

3 Referências 61

CAPÍTULO II 74

Dense lamellar scaffold the base of collagen, silk fibroin and polyethylene glycol 400: Evaluation of freezing parameters associated with plastic compression technique.....75

1 INTRODUCTION 77

2 MATERIALS E METHODS.....78

2.1 Materials 78

2.2 Methods.....79

2.2.1 Extraction of Fibroin silk.....79

2.2.2 Preparation of the COL-SF-PEG 400 hydrogel 79

2.2.3 Preparation of dense lamellar scaffold by plastic compression technique.....79

2.2.4 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) 80

2.2.5 Differential scanning calorimetry (DSC) 80

2.2.6 Scanning electron microscopy (SEM).....80

2.2.7 Computed microtomography (µCT) 80

2.2.8 Mechanical properties 81

2.2.9 Swelling efficiency.....81

2.2.10 *In vitro* biodesintegration study 82

2.2.11 Statistical analysis.....82

3 RESULTS AND DISCUSSION 82

3.1 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).....83

3.2 Differential scanning calorimetry (DSC) 86

3.3 Scanning electron microscopy (SEM).....89

3.4 Computed microtomography (µCT) 91

3.5 Mechanical properties.....93

3.6 Swelling efficiency.....96

3.7 *In vitro* biodesintegration study 97

4 CONCLUSION.....100

5 References 101

CAPÍTULO III 106

***Scaffolds* lamelar denso como material biomimético para engenharia de tecido traqueal: Efeito da adição de compostos fenólicos totais extraídos das folhas de *Psidium guajava* Linn. 107**

1 INTRODUÇÃO 109

2 MATERIAL E MÉTODOS.....110

2.1 Material 110

2.2 Métodos.....110

2.2.1 Extração de Fibroína da seda (SF) 110

2.2.2 Extração de compostos fenólicos totais (TPC).....110

2.2.3 Preparação do hidrogel COL-SF-PEG 400 com adição de TPC.....110

2.2.4 Preparação do *scaffolds* lamelar utilizando técnica de compressão plástica 111

2.2.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 111

2.2.6 Determinação do potencial zeta dos compostos fenólicos totais (TPC) 111

2.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....112

2.2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 112

2.2.9 Microtomografia computadorizada (µCT) 112

2.2.10 Propriedades mecânicas.....112

2.2.11 Eficiência de intumescimento.....112

2.2.12 Estudo de biodesintegração *in vitro* 112

2.2.13 Análise estatística.....112

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 112

3.1 Caracterização macroscópica do *scaffold* lamelar denso 112

3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.....113

3.3 Determinação do potencial zeta dos compostos fenólicos totais (TPC)... 116

3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....118

3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 122

3.6 Microtomografia computadorizada (μCT) 125

3.7 Propriedades mecânicas.....127

3.8 Eficiência de intumescimento.....129

3.9 Estudo de biodesintegração *in vitro* 131

4 CONCLUSÃO.....134

5 Referências 135

CAPÍTULO IV 140

***Scaffold* Laminado como Material Biomimético para Engenharia de Tecido Traqueal: Preparação, caracterização e propriedades mecânicas. 141**

1. INTRODUCÃO 143

2. MATERIAL E MÉTODOS.....145

2.1 Materiais 145

2.2 Métodos.....145

2.2.1 Preparação dos *scaffolds* laminados (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL.....145

2.2.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 146

2.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....146

2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 146

2.2.5 Microtomografia computadorizada (μCT) 146

2.2.6 Propriedades mecânicas.....146

2.2.7 Eficiência de intumescimento 146

2.2.8 Estudo de biodesintegração *in vitro* 146

2.2.9 Análise estatística.....147

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 147

3.1 Caracterização macroscópica dos *scaffolds* laminados.....147

3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)... 147

3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....150

3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 153

3.5 Microtomografia computadorizada (μCT) 156

3.6 Propriedades mecânicas.....158

3.7 Eficiência de intumescimento 159

3.8 Estudo de biodesintegração *in vitro* 162

4. CONCLUSÃO.....164

5 Referências 166

CONSIDERAÇÕES FINAIS 171

PERSPECTIVAS FUTURAS 173

Anexo 1 - Orientações para apresentação de dissertações/teses do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba 175

Anexo 2. Phenolic Compounds from *Psidium guajava* (Linn.) Leaves: Effect of the Extraction-Assisted Method Upon Total Phenolics and Antioxidant Activity 177

Anexo 3 – Submission Confirmation (Title: Chemical Processing of Poly (L-co-D, L lactic acid)/Polyethylene glycol Blend for Biomedical Device)…… 197

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecido é uma das tendências da medicina regenerativa, para o desenvolvimento e preparação de scaffolds poliméricos capazes de mimetizar a matriz extracelular, influenciando de forma direta na adesão e proliferação celular e subsequente formação do tecido. Entretanto, o reparo das espécies de cartilagem permanece um desafio.

Independente da espécie de cartilagem a ser tratada, seja articulação, traqueal, laríngea, cartilagem auricular, entre outras, as complicações produzidas por lesão da cartilagem, ressecção de neoplasias benignas ou malignas (tumor) permanecem um grande desafio devido à baixa capacidade de reparo do tecido cartilaginoso.

Focado neste contexto, os objetivos deste estudo foram desenvolver e caracterizar scaffolds poliméricos obtidos por materiais sintéticos e naturais para aplicações na engenharia de tecido traqueal.

O presente trabalho foi estruturado na forma de capítulos, contendo: Capítulo I – Revisão bibliográfica; Capítulo II – *Dense lamellar scaffold the base of collagen, silk fibroin and polyethylene glycol 400: Evaluation of freezing parameters associated with plastic compression technique*; Capítulo III – *Scaffold* lamelar denso como material biomimético para engenharia de tecido traqueal: Efeito da adição de compostos fenólicos totais extraídos das folhas de *Psidium guajava* Linn.; Capítulo IV – *scaffold* laminado como material biomimético para engenharia de tecido traqueal: Preparação, caracterização e propriedades mecânicas.

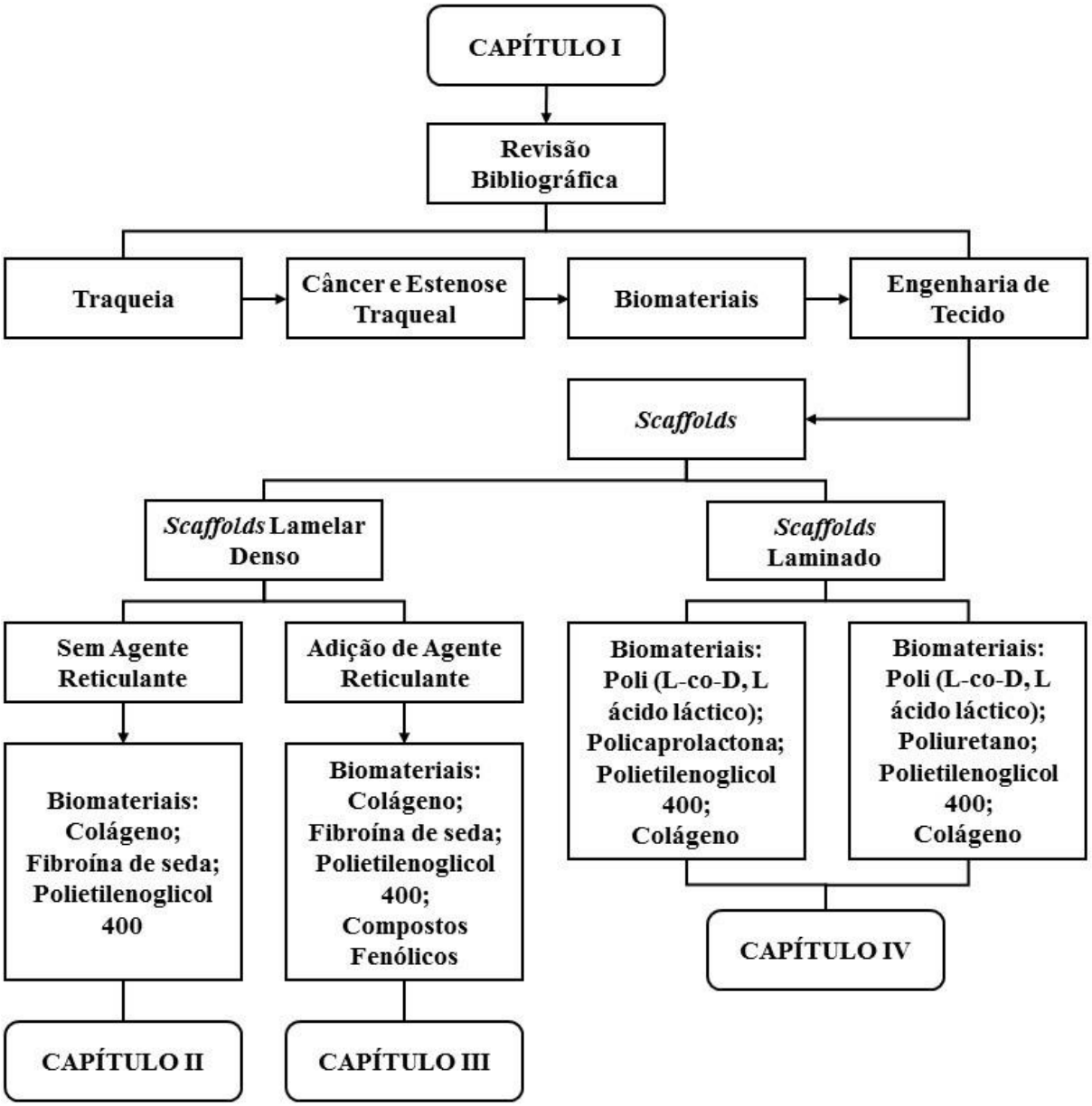
O Capítulo I aborda a revisão bibliográfica sobre o tema deste trabalho. As doenças relacionadas a traqueia representam um problema incomum de saúde, devido ausência de sintomas específicos, tornando o diagnóstico de difícil confirmação, resultando em um desafio para um diagnóstico preciso e tratamento eficiente. A engenharia de tecido traqueal é um campo emergente que busca melhorar ou reparar as funções biológicas do tecido ou do órgão danificado. Os *scaffolds* são matrizes ou estruturas tridimensionais e porosas, os quais podem ser fabricados pelo processamento de biomateriais, com o objetivo de mimetizar a matriz extracelular (MEC). Os *scaffolds* devem ser capazes de suportar mecanicamente o tecido nativo durante o reparo, bem como exercer um papel crucial na quimiotaxia para influenciar as atividades celulares.

O Capítulo II aborda um estudo de desenvolvimento e caracterização de *scaffold* lamelares densos a base de biomateriais, obtidos pela técnica de compressão plástica e liofilização, para a regeneração e/ou remodelamento do tecido traqueal. Para gerar uma estrutura lamelar densa foram utilizadas misturas poliméricas de colágeno (COL), fibroína de seda (SF) e polietilenoglicol 400 (PEG 400) associados a técnica de compressão plástica. Contudo, para gerar a estrutura porosa foram investigadas faixas distintas de congelamento (-80, -50 e -18 °C). As propriedades físico-químicas, morfológicas, mecânicas e estudo *in vitro* de biodesintegração e intumescimento confirmaram que os parâmetros de congelamento associados às técnicas compressão plástica e liofilização são capazes de modular de forma expressiva as características dos *scaffolds* lamelares densos.

O Capítulo III aborda um estudo de desenvolvimento de *scaffold* lamelar denso como material biomimético para a regeneração do tecido traqueal após ressecção cirúrgica de tumor (es). Para gerar uma estrutura lamelar densa, foi utilizado a técnica de compressão plástica. Os TPCs extraídos de *Psidium guajava* Linn. foram aplicados como potencial agente reticulante em mistura polimérica a base de COL, SF e PEG 400. Considerando os resultados obtidos, pode-se confirmar que os percentuais de TPC aplicados foram capazes de modular as propriedades dos *scaffolds*, principalmente morfológicas, morfométricas e mecânicas. Assim, este estudo pode fornecer uma maneira de melhorar a regeneração das principais estruturas traqueias após remoção cirúrgica de tumor (es).

O Capítulo IV aborda o desenvolvimento de *scaffolds* laminados como material biomimético para regeneração e/ou remodelamento do tecido traqueal estenosado. Para gerar estrutura laminada com polímeros foi utilizado a técnica de *solvent casting* associado ao método de extensão. O colágeno aplicado como agente porogênico em misturas poliméricas de poli (L-co-D, L ácido láctico), policaprolactona, poliuretano diol solução e polietilenoglicol 400 foram utilizados para obter dispositivos tridimensionais com porosidade formada *in situ*. Considerando a estrutura anisotrópica e as propriedades mecânicas, eficiência de intumescimento e taxa de biodesintegração, este estudo pode fornecer uma maneira de melhorar a remodelação da camada mucosa e submucosa da traqueia para tentativa de estabilização em quadros de estenose não cirúrgicas.

Resumo gráfico



2 OBJETIVO

2.1 Geral

Otimizar o processo de desenvolvimento e preparação de *scaffold* lamelar denso e *scaffold* laminado que mimetizem a matriz extracelular hialina.

2.2 Específicos

2.2.1 *Scaffold* lamelar denso

- Projetar *scaffold* lamelar denso com estrutura tridimensional, utilizando biomateriais sintéticos e naturais;
- Avaliar e selecionar os polímeros e os respectivos solventes de forma que a mistura lamelar possa ser obtida com, no mínimo, 70% de água;
- Avaliar e selecionar a melhor temperatura de congelamento -80, -50 e -18 °C para obter porosidade;
- Caracterizar a porosidade, interconectividade e morfologia porosa dos *scaffolds* lamelares denso;
- Caracterizar as propriedades físicas e físico-químicas dos *scaffolds* lamelares denso;
- Avaliar *in vitro* a capacidade de intumescimento e taxa de biodesintegração dos *scaffolds* lamelares denso em meio tamponado (PBS – pH 7.4).

2.2.2 *Scaffold* laminado

- Projetar *scaffold* laminado com estrutura tridimensional, utilizando biomateriais sintéticos e naturais;
- Avaliar e selecionar os polímeros e os respectivos solventes;
- Caracterizar a porosidade, interconectividade e morfologia porosa dos *scaffolds* laminados;
- Caracterizar as propriedades físicas e físico-químicas dos *scaffolds* laminados;
- Avaliar *in vitro* a capacidade de intumescimento e taxa de biodesintegração dos *scaffolds* laminados em meio tamponado (PBS – pH 7.4).

CAPÍTULO I

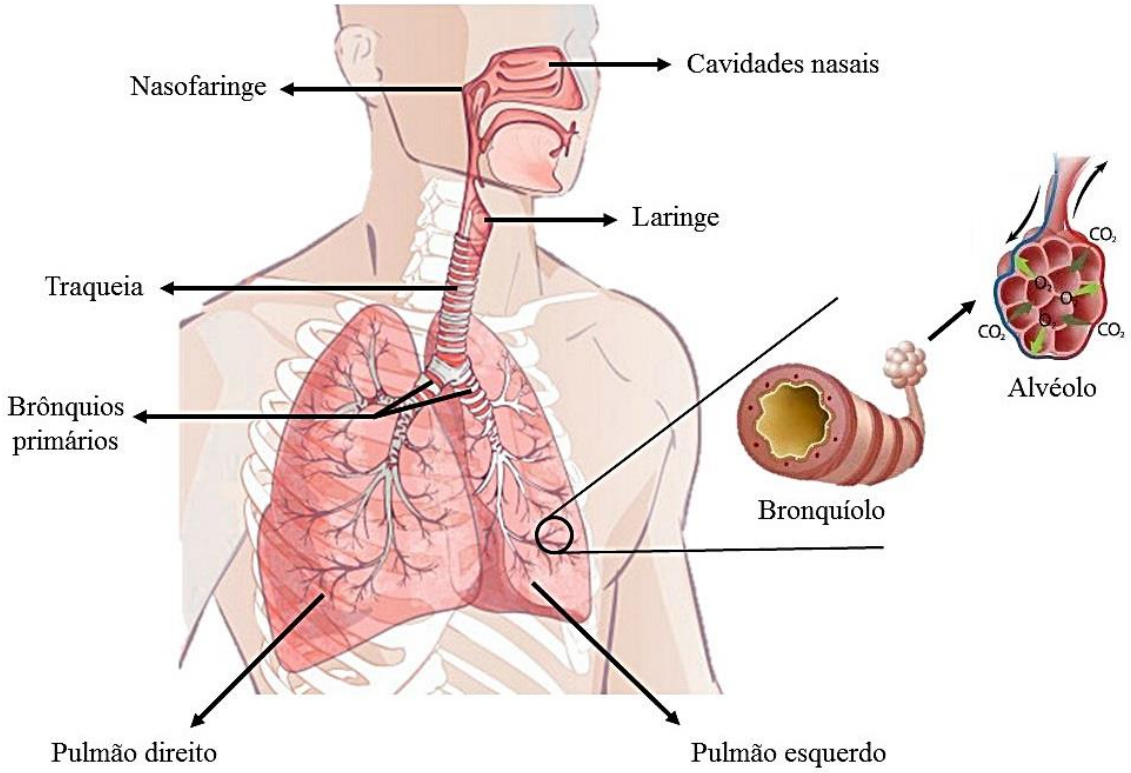
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Anatomia, fisiologia e histologia da traqueia

O sistema respiratório é uma parte fundamental do corpo humano (Figura 1), e tem por função principal a troca contínua de gases entre o ambiente e o sistema circulatório. A troca de gases ocorre pela captação de oxigênio (O_2) do ar inspirado, resultando na remoção do dióxido de carbono (CO_2) durante a expiração (HEATH; ATKINS; NORKUS, 2019).

O sistema respiratório é dividido em duas partes: porção condutora e porção respiratória, sendo a traqueia um órgão localizado na porção condutora, assim como as cavidades nasais, nasofaringe, laringe, brônquios e bronquíolos. A porção respiratória é composta pelos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos, nos quais ocorrem a troca de gases (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 1. Representação esquemática do sistema respiratório.



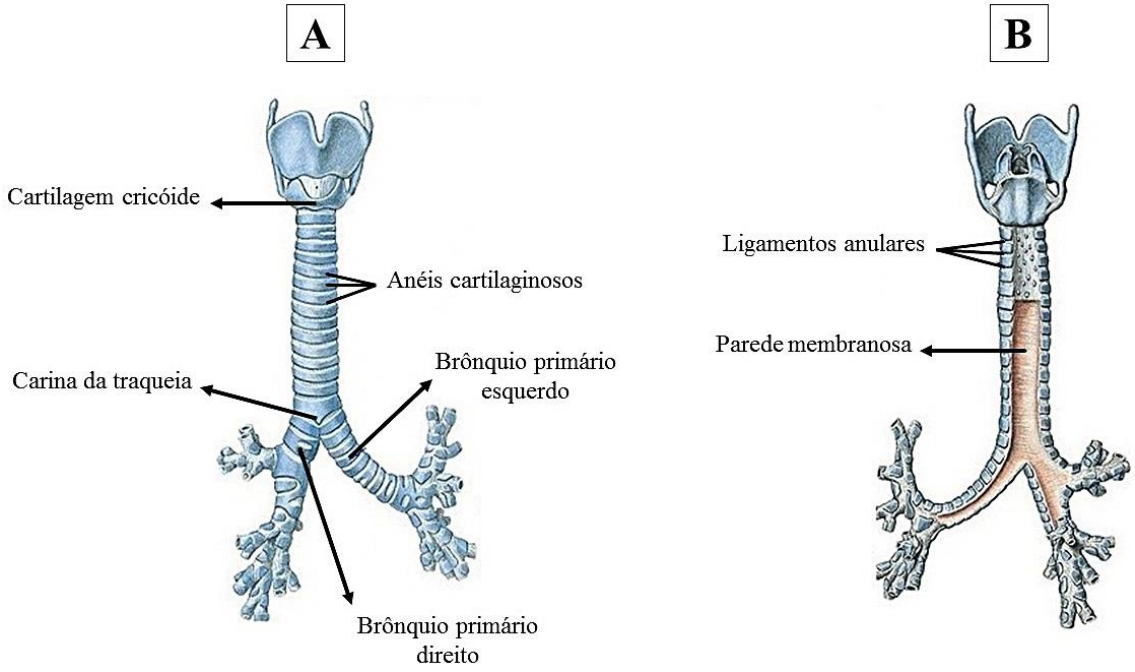
Fonte: Adaptado de DIANA, 2020 (Disponível em: https://www.todamateria.com.br/sistema-respiratorio/ acesso em: 22.06.20).

A traqueia é um órgão essencial para o trato respiratório, desempenhando múltiplas funções, como conduzir, filtrar, aquecer e umidificar o ar para as trocas gasosas do ambiente externo para os pulmões (KNANEH-MONEM *et al*., 2019). Este

órgão é constituído por uma estrutura tubular oca resistente, porém flexível, formado por tecido cartilaginoso (CROWLEY; BIRCHALL; SEIFALIAN, 2014). Em um ser humano adulto, a estrutura tubular pode medir, aproximadamente, 12 cm de comprimento e 1,9 ± 0,15 cm de diâmetro em mulheres, em homens pode medir 14 cm de comprimento e 2,2 ± 0,15 cm (JAEGER; TITUS; BLANK, 2019).

A estrutura do órgão tem início na borda inferior da cartilagem cricóde da laringe e se estende pelo plano mediano até a bifurcação da carina, desta forma, conectando a laringe aos brônquios primários (direito e esquerdo), como representado na Figura 2. Além da função condutora, a estrutura tubular também atua para limpar as secreções traqueais e brônquicas (MORALES-VALENCIA *et al*., 2016).

Figura 2. Anatomia da traqueia.



Fonte: Adaptado de Anatomia Online (Disponível em: https://www.anatomiaonline.com/traqueia/ acesso em: 22.06.20).

A parede traqueal é constituída por um número variável de 16 a 20 peças de cartilagem hialina em forma de C, denominadas de anéis traqueais**,** que mantêm a estrutura tubular aberta. As extremidades destes anéis são incompletas na região posterior (Figura 2-B), devido esta ausência, a região é constituída por ligamentos fibroelásticos e tecido muscular liso, que se prendem ao pericôndrio e unem as porções das peças cartilaginosas, o que permite a expansão do esôfago quando os

alimentos são ingeridos (CROWLEY; BIRCHALL; SEIFALIAN, 2014; SCANLON; SANDERS, 2007).

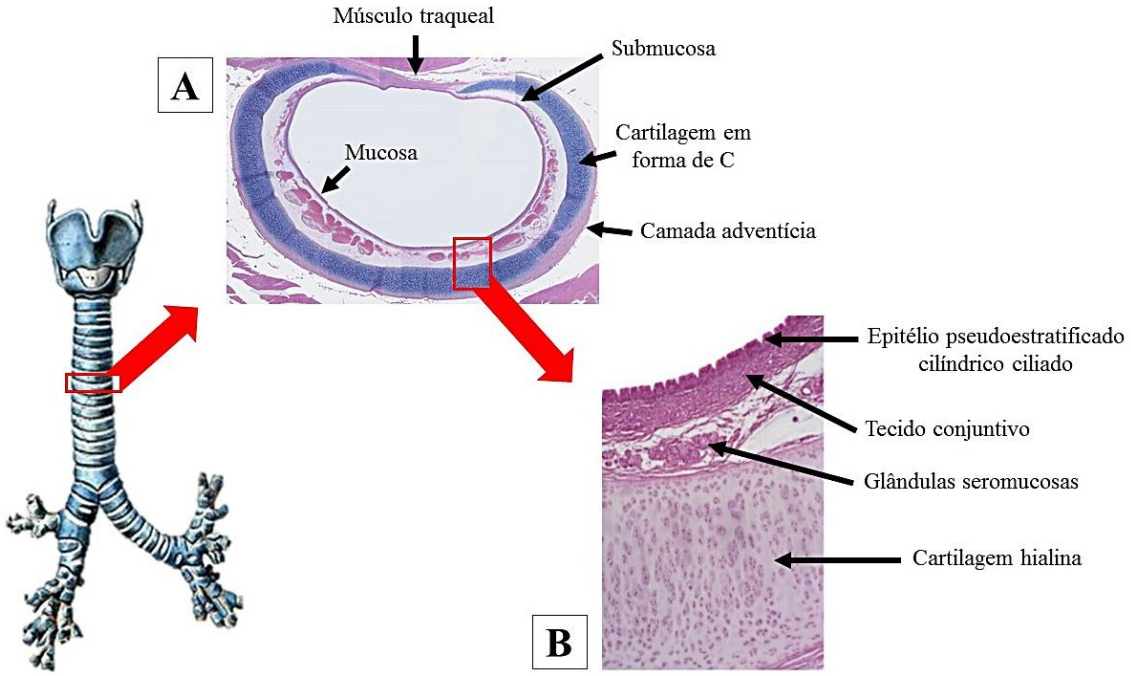
Além disso, o desempenho fisiológico da traqueia durante a respiração é extremamente dependente do seu comportamento de deformabilidade e, portanto, das propriedades mecânicas de seus componentes, em particular a cartilagem e o músculo liso (SAFSHEKAN *et al*., 2017).

Os anéis cartilaginosos são responsáveis pela rigidez da parede traqueal que, junto aos ligamentos fibroelásticos, impedem a ocorrência de uma distensão excessiva do lúmen. Enquanto que os tecidos musculares lisos presentes no órgão regulam o diâmetro do lúmen durante os movimentos respiratórios, bem como a flexibilidade e mobilidade para assegurar a estabilidade da traqueia durante os movimentos de rotação, extensão e flexão exercida pelo pescoço (PARK *et al*., 2015).

A capacidade de contração da musculatura traqueal também exerce uma função de defesa, devido ao controle da regulação do lúmen, podendo diminuir o seu diâmetro. Este estreitamento leva ao aumento do fluxo de ar expirado e, quando necessário, facilita a remoção de secreções ou de corpos estranhos, acidentalmente deglutidos, sendo expelidos por meio da tosse (GARTNER; HIATT, 2007; RAINS *et al*., 1992).

Histologicamente a traqueia possui uma estrutura composta por três camadas (mucosa, submucosa e a adventícia), bem como musculatura e a cartilagem em forma de C (SHROFF *et al*., 2016; TENG *et al*., 2012), como apresentado na Figura 3-A.

Figura 3. Representação esquemática da histologia da traqueia.



Nota: A – Corte transversal com visão panorâmica; B – Corte transversal com pequeno aumento. Coloração: Hematoxilina e Eosina.
Fonte: Adaptado de ANDARDE; FERRARI, 2018; MOL-Microscopia Online (Disponível em: http://mol.icb.usp.br/index.php/18-6-sistema-respiratorio/ acesso em: 22.06.20).

A camada mucosa é formada por epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado (também denominado como epitélio respiratório), com a presença de células caliciformes e pela lâmina própria, constituída por tecido conjuntivo frouxo, seguido por feixes relativamente espessos de fibras elásticas separando a camada mucosa da submucosa (Figura 3-B) (CAMILLO *et al*., 2017; MOUSSA; HASSAN, 2015).

A camada da submucosa é formada por tecido conjuntivo denso fibroelástico, contendo uma numerosa quantidade de glândulas mucosas e seromucosas. Os pequenos ductos provenientes destas glândulas atravessam a lâmina elástica e a lâmina própria para se abrirem no lúmen traqueal (Figura 3-B) (AL-UMERI, 2015; CAMILLO *et al*., 2017).

Já a camada adventícia é constituída por tecido conjuntivo frouxo fibroelástico. Esta camada apresenta uma característica proeminente, representada pelos anéis cartilaginosos em forma de C, cercado por denso pericôndrio do tecido conjuntivo que une a submucosa e a adventícia, a qual é responsável por ancorar a traqueia aos tecidos adjacentes (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Assim, o conjunto formado pelo epitélio traqueal é responsável por manter a homeostase das vias aéreas por meio da mediação da depuração mucociliar. Pois ao

conduzir e fornecer O_2 que requer vida para a circulação sistêmica, junto ao ar inspirado são trazidos para o trato respiratório partículas, microrganismos e materiais nocivos (RANDELL; BOUCHER, 2006; WHITSETT; ALENGHAT, 2015).

Desta maneira, o mecanismo de defesa desempenhado pelo epitélio (com células caliciformes) e as glândulas seromucosas controlam a quantidade e a composição do líquido (muco) da superfície das vias aéreas, e as células epiteliais ciliadas, por sua vez, impulsionam o muco para remover as partículas, microrganismos e materiais nocivos por meio dos batimentos ciliares. Este deslocamento na direção do exterior é importante para proteger o sistema respiratório (HOEGGER *et al*., 2014).

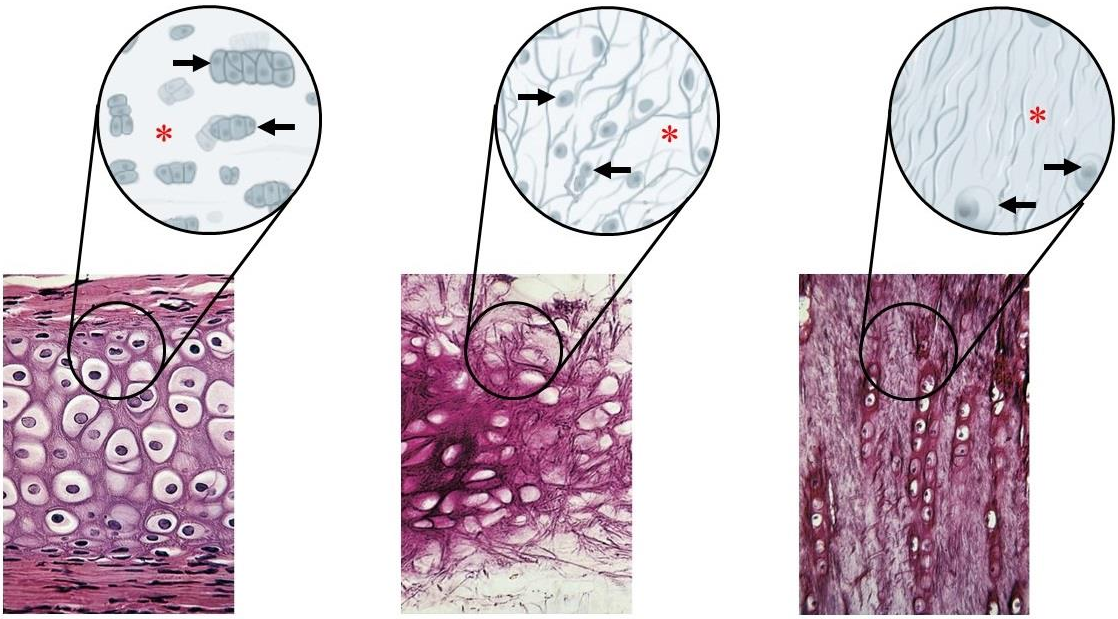
1.2 Tecido cartilaginoso

O tecido cartilaginoso ou cartilagem é uma forma especializada de tecido conjuntivo de consistência rígida, mas flexível e elástico. Desempenha a função de suporte para os tecidos moles, reveste superfícies articulares onde absorve choques, além disso, facilita o deslizamento dos ossos com as articulações e é essencial para a formação e crescimento dos ossos longos. Assim como os demais tipos de tecido conjuntivo, o tecido cartilaginoso é composto por diferentes células, prevalecendo basicamente dois tipos celulares, os condroblastos e condrócitos (PORTINHO; BOIN; BERTOLINI, 2008; SANTOS JR; WADA, 2007).

O tecido cartilaginoso é um tecido avascularizado, não possuindo vasos sanguíneos, vasos linfáticos e também nervos, apesar disso, sua nutrição é realizada a partir de vasos sanguíneos presentes nos tecidos conjuntivos que envolvem a cartilagem, por meio da difusão exercida na matriz cartilaginosa (CAMILLO *et al*., 2017). As funções desempenhadas pelo tecido cartilaginoso estão altamente ligadas a composição de sua MEC, podendo ser constituída por colágeno ou colágeno mais elastina, em associação com proteoglicanos (macromoléculas formadas por proteínas ligadas covalentemente com os glicosaminoglicanos), ácido hialurônico e outras glicoproteínas (SANTOS JR; WADA, 2007).

Segundo Junqueira; Carneiro (2013) e Gartner; Hiatt (2007) de acordo com a composição das fibras presentes na matriz, é possível distinguir o tecido cartilaginoso em três tipos: cartilagem hialina, cartilagem elástica e cartilagem fibrosa (ou fibrocartilagem) (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática dos tipos de tecidos cartilaginosos.



Nota: Fotomicrografia da cartilagem hialina em pequeno aumento (coloração por Hematoxilina e Eosina), Fotomicrografia da cartilagem elástica em médio aumento (coloração por Resorcina), Fotomicrografia da cartilagem fibrosa em médio aumento (coloração por Picrosírius-Hematoxilina). Em foco a representação da matriz, setas indicam condrócitos e os símbolos (*) a matriz extracelular.
Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; MAGALHÃES, 2020 (Disponível em: https://www.todamateria.com.br/cartilagem/ acesso em: 22.06.20).

A cartilagem hialina é o tipo mais abundante encontrado no corpo humano, contendo delicadas fibrilas formadas por colágeno tipo II associadas a ácido hialurônico, proteoglicanos muito hidratados e glicoproteínas.

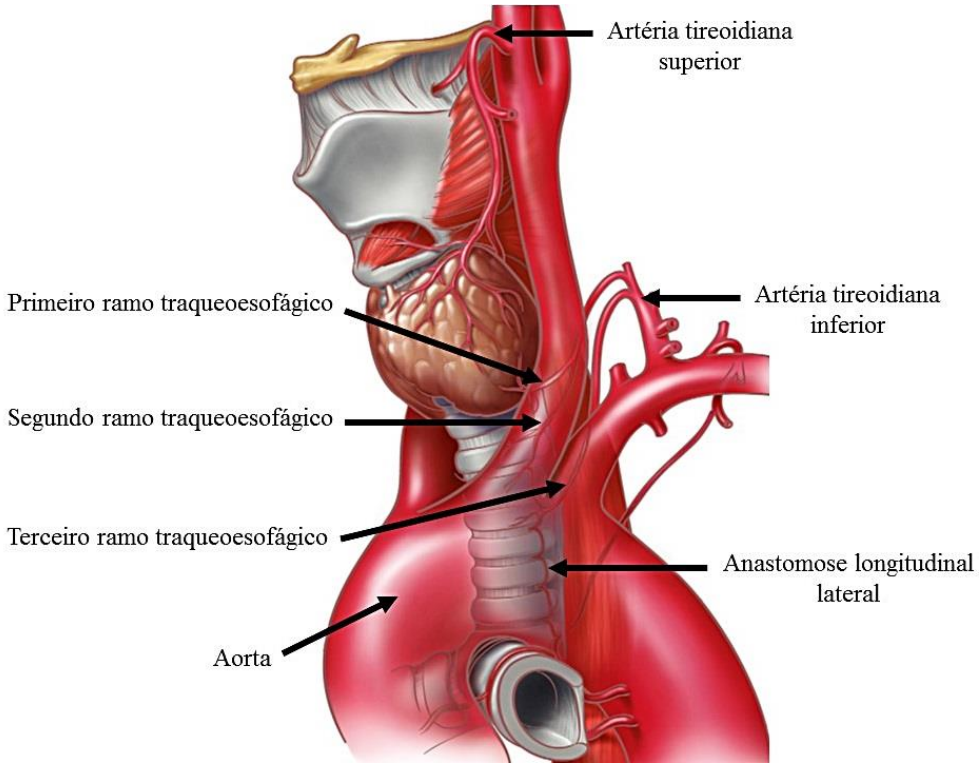
A cartilagem elástica é constituída por fibrilas de colágeno (principalmente do tipo II) e abundantes fibras elásticas (elastina) dispersas responsáveis pela flexibilidade da matriz.

A cartilagem fibrosa (ou fibrocartilagem) apresenta uma matriz acidófila, constituída por densas e espessas fibras colágenas do tipo I, o que permiti resistir a maiores forças de tensão. Outra característica desta cartilagem é a ausência de pericôndrio (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O pericôndrio consiste em uma bainha de tecido conjuntivo que evolve a maioria das cartilagens. É nesta bainha que são encontrados os vasos sanguíneos, linfáticos e inervações deste tecido que, justamente com a MEC, são responsáveis pela nutrição, fornecimento de oxigênio e pela eliminação dos refugos metabólicos da cartilagem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Em relação aos suprimentos fornecidos para a traqueia, estes são provenientes dos ramos traqueoesofágicos das artérias tireoidianas inferiores, enquanto a configuração dos ramos pode variar um pouco entre os indivíduos, em geral, o primeiro ramo traqueoesofágico fornece suprimentos a porção da traqueia cervical inferior, o segundo ramo para a porção da traqueia cervical média e por fim, o terceiro ramo fornece a porção da traqueia cervical superior (Figura 5) (FURLOW; MATHISEN, 2018; MINNICH; MATHISEN, 2007).

Figura 5. Sistema de irrigação sanguínea da traqueia.



Fonte: Adaptado de FURLOW; MATHISEN, 2018.

Embora não forneça suprimentos de maneira direta, a artéria tireoidiana superior por meio de uma anastomose (comunicação natural direta ou indireta entre dois vasos sanguíneos) com a artéria tireoidiana inferior, contribuem com a irrigação sanguínea, onde ramos finos suprem o istmo tireoidiano e a parede traqueal anterior adjacente (FURLOW; MATHISEN, 2018; MINNICH; MATHISEN, 2007).

1.3 Células do tecido cartilaginoso

Basicamente, o tecido cartilaginoso está associado a dois tipos de células, os condroblastos e os condrócitos, contudo, também é possível encontrar células denominadas de condrogênicas.

As células condrogênicas são estreitas e fusiformes, contendo um núcleo ovoide com um ou dois nucléolos e apresentam citoplasma escasso. Estas células são originárias de células mesenquimais e apresentam também como característica a capacidade de diferenciação para gerar condroblastos (GARTNER; HIATT, 2007).

Os condroblastos são células arredondadas e basófilas que possuem organelas necessárias para a síntese proteica, as quais podem ter duas origens específicas: por meio de células mesenquimais localizadas no interior dos centros de condrificação (centros de formação da cartilagem), e por meio das células condrogênicas da camada celular interna do pericôndrio (CAMILLO *et al*., 2017; GARTNER; HIATT, 2007).

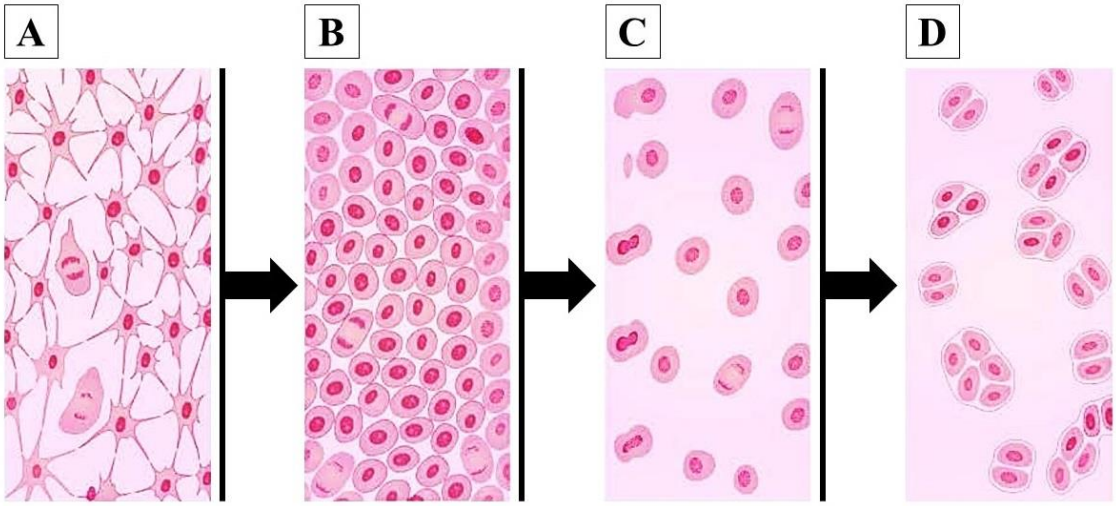
Por fim, os condrócitos são células que possuem um núcleo grande, com um nucléolo saliente e organelas responsáveis pela secreção dos componentes da matriz cartilaginosa, como colágeno, principalmente tipo II, glicoproteínas e proteoglicanas (CRUZ *et al*., 2017). Os condrócitos são originados dos condroblastos que foram circundados pela matriz, quando situados próximos à periferia da cartilagem apresentam a forma alongada, enquanto que os situados mais profundamente são arredondados, apresentando diâmetro de 10 a 30 μm (GARTNER; HIATT, 2007).

Em geral, os condrócitos podem aparecer em grupos de até oito células, denominados de grupos isógenos, uma vez que suas células são originadas por meio de um único condroblasto (CAMILLO *et al*., 2017). Uma das principais funções desempenhada pelos condrócitos é assegurar as propriedades biomecânicas do tecido cartilaginoso, por meio da síntese dos componentes da MEC (CHEN *et al*., 2013; LOMBELLO; REIS JR; COHEN, 2003).

O esboço dos tecidos cartilaginosos surge da histogênese de um tecido embrionário conhecido como mesênquima. Como ilustrado na Figura 6, a primeira modificação observada para a formação do tecido consiste no arredondamento das células mesenquimatosas, que retraem seus prolongamentos e, aumentando rapidamente a taxa de multiplicação, formando aglomerados (Figura 6-B). Devido as características adquiridas, as células assim formadas apresentam citoplasma muito basófilo e passam a ser denominadas de condroblastos. A partir deste momento, começa a síntese da matriz, afastando os condroblastos um dos outros, nesta fase, a diferenciação das cartilagens ocorre do centro para a periferia (Figura 6-C). Com o aprisionamento do condroblasto pela matriz produzida, estes passam a exercer novas características e denominam-se de condrócitos que, por meio da multiplicação

mitótica, originam os grupos isógenos nas lacunas (Figura 6-D) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 6. Representação esquemática da histogênese para formação dos tecidos cartilaginosos.



Nota: A – Multiplicação das células mesenquimais, B – Diferenciação em condroblastos, C – Produção da matriz (condroblastos se afastam) e D – Multiplicação mitótica dá origem aos grupos de condrócitos.
Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013.

Entretanto, em relação aos tipos celulares que compõem o tecido traqueal, além dos condrócitos que são responsáveis pela síntese e remodelamento dos anéis cartilaginosos que fornecem suporte ao órgão, faz-se necessária a célula do epitélio pseudoestratificado. A mesma é fundamental para o bom funcionamento da traqueia, possui formato cilíndrico ciliado, que reveste o interior das vias aéreas, sendo uma de suas funções, atuar como barreira contra corpos estranhos inalados (KNANEH-MONEM *et al*., 2019; ZANG *et al*., 2013).

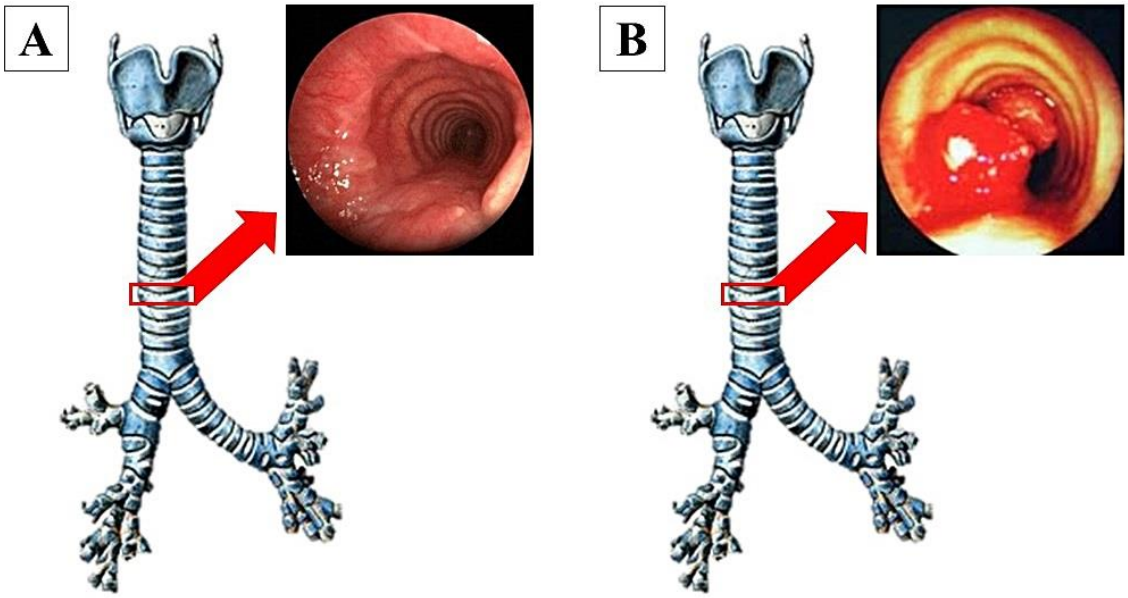
1.4 Câncer de traqueia

Os tumores relacionados a traqueia são raros e representam uma pequena proporção de neoplasias do trato respiratório, compreendendo cerca de 2% das neoplasias das vias aéreas (BOTS *et al*., 2019; CHARLTON; PITKIN, 2015).

No entanto, devido a sua raridade e associado ao fato de não apresentar sintomas específicos, os pacientes podem ser tratados, de maneira equivocada, como portadores de doenças pulmonares obstrutivas. Assim, com a resposta inadequada ao tratamento, geralmente é o que leva a suspeita de obstrução das vias aéreas, desta forma, resultando em um diagnóstico tardio (MOTA *et al*., 2010).

Os tumores traqueais podem ser caracterizados como primários ou secundários. Os tumores primários são definidos como aqueles que tem origem no próprio órgão, situada entre a borda da cartilagem cricóide se estendendo até a carina (Figura 7) (CALICE; ROCCHI, 2019).

Figura 7. Representação esquemática de tumor traqueal localizado.



Nota: A – Traqueia com destaque broncoscopia de tecido saudável, B – Traqueia com destaque broncoscopia apresentando tumor obstruindo o lúmen.
Fonte: Adaptado de Cirurgia Torácica do Vale, 2017 (Disponível em: https://cirurgiatoracicadovale.com.br/estenose-traqueia.php acesso em: 22.06.2020); MALUCELLI, 2016 (Disponível em: https://estenose.drmalucelli.com.br/traqueia/estenose-da-traqueia/#:~:text=Estenose%20da%20Traqueia%20e%20Anel,a%20pessoa%20ter%20sido%20intubada). acesso em: 22.06.2020).

Já os tumores secundários, de acordo com Madariaga; Gaissert (2018), são definidos como tumores localizados na traqueia, contudo, não sendo diretamente originário deste órgão. Os mesmos autores, acrescentam que não existem dados populacionais para estes tumores e, na prática clínica, estas lesões são provavelmente mais comuns que as neoplasias primárias. De acordo com Barnard (2020), os cânceres localizados na tireóide, laringe, pulmão, mama e colón também podem sofrer metástases na traqueia, dando origem a tumores secundários.

Em relação aos tumores primários são constatados maiores casos de tumores malignos, neste contexto, os tumores apresentam um percentual de apenas 10 a 20% para os tumores benignos (BARNARD, 2020; CAIADO; SÁ, 2008; MOTA *et al*., 2010) (Tabela 1). Além disso, os tumores malignos tendem a acontecer com maior

frequência na população adulta do que em crianças, porém, a distribuição entre os sexos é praticamente semelhante (SPINELLI *et al*., 2019).

Tabela 1. Exemplos de tumores traqueais benignos e malignos.

Tumor Benigno	**Tumor Maligno**
Papiloma	Carcinoma escamoso
Hamartoma	Carcinoma adenóide cístico
Lipoma	Carcinóide (típico e atípico)
Condroma	Mucoepidermoide
	Linfoma
	Tumores secundários
	Tumores mais raros (tumor glômico)

Fonte: BARNARD, 2020.

Mesmo representando uma doença rara, o câncer traqueal possui uma opção terapêutica curativa potencial quando o tumor está localizado (BEHRINGER; KÖNEMANN; HECKER, 2014). Diante disso, a abordagem do patologista é crítica, pois o tratamento de neoplasias benignas geralmente é conservador, enquanto as neoplasias malignas podem justificar um tratamento mais agressivo (TURK; WENIG, 2014).

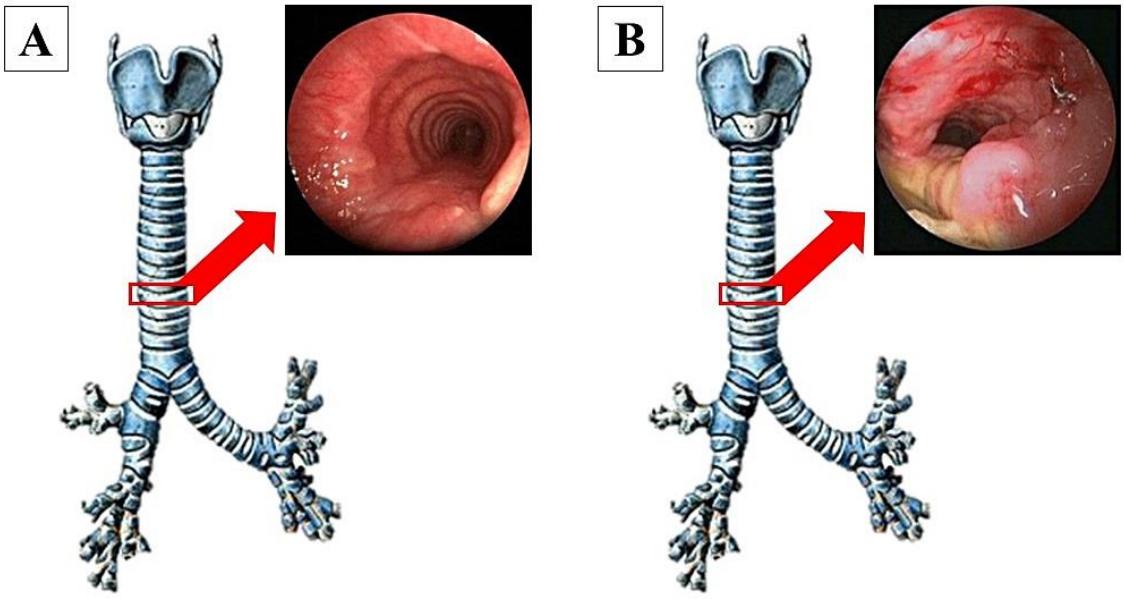
Quando possível, a ressecção cirúrgica completa do tumor representa a melhor opção de tratamento, com maiores resultados em termos de sobrevida global (SPINELLI *et al*., 2019). No entanto, existem contraindicações para o processo cirúrgico, incluindo a extensão tumoral de mais de 50% do comprimento da traqueia, além disso, o envolvimento ganglionar locorregional, vários grupos ganglionares positivos ou a presença de metástases a distância também podem inviabilizar o processo cirúrgico (CAIADO; SÁ, 2008).

Nestes casos, o tumor inoperável ainda pode ser controlado pela modalidade de radioterapia. Contudo, a radioterapia deve sempre ser aplicada a ponto de cobrir toda a área do tumor, mas poupando os tecidos saudáveis circundantes. Nos casos de tratamento de tumores traqueais, a prevenção das estruturas próximas como o esôfago, pulmões e medula espinhal são de extrema importância, evitando a irradiação acidental e limitando efeitos colaterais (SPINELLI *et al*., 2019).

1.5 Estenose traqueal

A estenose traqueal (Figura 8) é uma condição que pode ocorrer por diversos fatores, podendo ser congênitos ou adquiridos, causada por traumas, inflamações, neoplasias benignas ou malignas, primárias e/ou secundárias. Contudo, a causa mais frequente ocorre devido a complicações após o procedimento de intubação prolongado (JING *et al*., 2018).

Figura 8. Representação esquemática de estenose traqueal.



Nota: A – Traqueia com destaque broncoscopia de tecido saudável, B – Traqueia com destaque broncoscopia apresentando estenose.
Fonte: Adaptado de Cirurgia Torácica do Vale, 2017 (Disponível em: https://cirurgiatoracicadovale.com.br/estenose-traqueia.php acesso em: 22.06.2020).

A estenose traqueal foi descrita pela primeira vez por MacEwen, no ano de 1880, em um estudo que acompanhou pacientes submetidos ao procedimento de intubação endotraqueal (MACEWEN, 1880). Após seis anos desta publicação, a doença foi novamente observada em outro estudo, no qual Colles (1886) descreveu 4 casos de estenose traqueal como ocorrência da obstrução de via aérea em 57 pacientes que foram submetidos ao procedimento de traqueostomia para o tratamento da difteria (COLLES, 1886).

No início da década de 1950, com a decorrência da introdução dos suportes de intubação nas unidades de terapia intensiva (UTIs), os procedimentos de intubação endotraqueal e traqueostomia se tornaram mais comuns, permitindo uma menor

mortalidade nas UTIs, no entanto, os casos de lesões traqueias por trauma, também se tornaram mais comuns (CATANEO *et al*., 2018; COSTA *et al*., 2016).

A intubação endotraqueal é um procedimento realizado em pacientes que sofrem de desconforto respiratório. O procedimento adequado da prótese endotraqueal, bem como do manguito (dispositivo destinado a selar a via aérea) são essenciais, requerendo do profissional conhecimentos específicos e cuidados, pois o mal uso pode causar lesões ao paciente, além da estenose traqueal, a pneumonia nosocomial e até a morte secundária a pressões inadequadas (KLAMT *et al*., 2019).

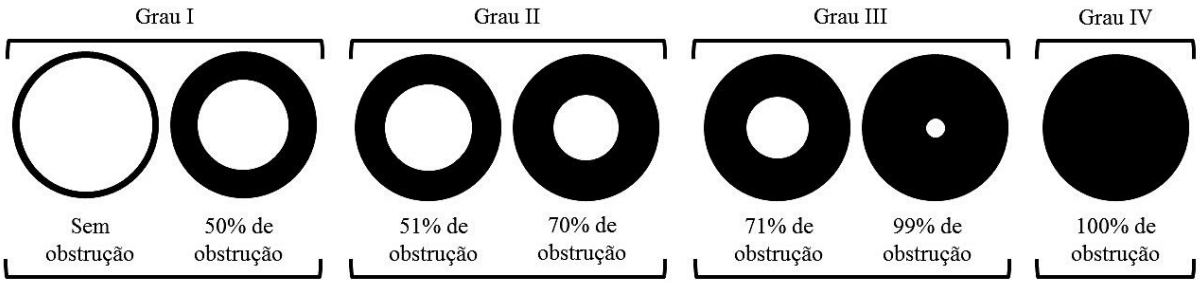
A traqueostomia é um procedimento também utilizado em pacientes com desconforto respiratório, contudo, em quadros clínicos mais crítico. A cânula de traqueostomia pode ser colocada no paciente por duas maneiras: por processo cirúrgico ou por dilatação percutânea. O procedimento tem por objetivo realizar uma abertura na parede da traqueia, permitindo assim, a respiração (MEDEIROS *et al*., 2019). Da mesma maneira que a intubação endotraqueal, a traqueostomia pode causar lesões anatômicas, resultando em estenose traqueal.

A estenose adquirida por procedimentos inadequados e/ou prolongados, seja por intubação endotraqueal ou traqueostomia, podem ocorrer em diferentes regiões da traqueia, desde o nível da ponta do tubo endotraqueal até a área da glote e subglote, contudo, os locais mais comuns são onde o manguito do tubo endotraqueal esteve em contato íntimo com a parede traqueal e no local do estoma traqueal após um procedimento de traqueostomia (ZIAS *et al*., 2008).

Para documentar melhor os resultados adquiridos e transmitir com precisão as informações a outros médicos e especialistas, as estenoses traqueais estudadas foram classificadas com sistema apropriado para determinar a fase de desenvolvimento, a extensão e a gravidade da doença (BITAR; BARAZI; BARAKEH, 2017).

O sistema de classificação proposto por Myer III; O’Connor; Cotton (1994) descreve a condição da estenose com base na redução relativa percentual em área de secção transversal e consiste em quatro graus, como apresentado na Figura 9.

Figura 9. Sistema de classificação pela obstrução causada por estenose traqueal.



Fonte: Adaptado de MYER III; O'CONNOR; COTTON, 1994.

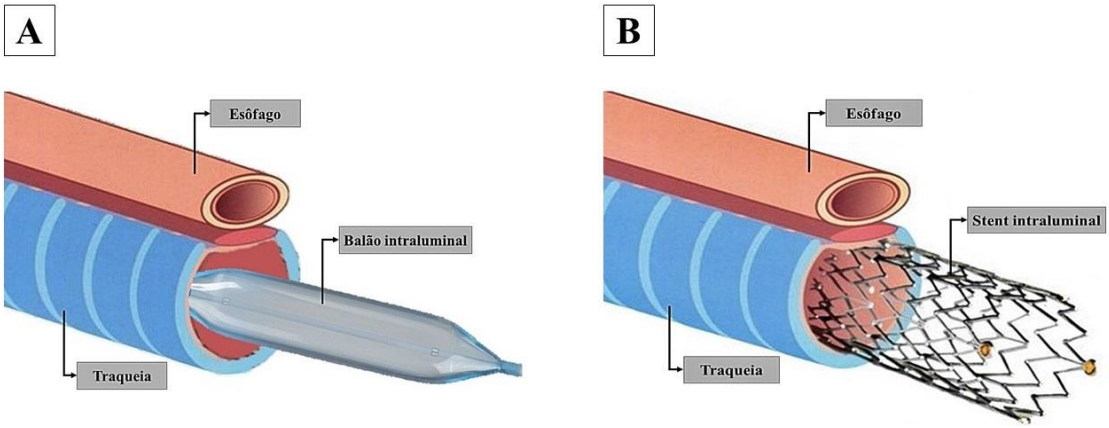
Em pacientes com estenose traqueal discretas (grau I) podem evoluir com dispneia progressiva aos exercícios físicos e pneumonia recorrente, por vezes são confundidos com asma ou doença pulmonar obstrutiva crônica. Porém, com o aumento do grau da estenose, esta condição pode levar ao surgimento de estridor aos mínimos esforços, este sintoma ocorre quando o diâmetro do lúmen traqueal é reduzido para, aproximadamente, 0,5 cm (grau III) (CARDOSO *et al*., 2014; PUCHALSKI; MUSANI, 2013).

Mesmo diante da dificuldade de diagnóstico apresentado pela estenose traqueal, esta condição apresenta diversas modalidades terapêuticas, contudo, não existe um consenso quanto ao melhor método e o momento para aplicação do tratamento (OLIVEIRA *et al*., 2019).

Devido aos avanços das técnicas cirúrgicas, a ressecção traqueal se tornou o tratamento de escolha para a maioria das estenoses, principalmente aquelas de tamanho médio, proporcionando excelente alívio a longo prazo, no entanto, se o intervalo da lesão for superior a 50% (acima de 6 cm) em adultos ou mais de 30% em crianças, esta condição aumenta a tensão, causando grave lesão anastomótica pós-operatória (CATANEO *et al*., 2018; WANG *et al*., 2016; YAMAMOTO *et al*., 2011).

Em casos onde a estenose traqueal é inoperável, os tratamentos indicados são baseados na dilatação traqueal, proporcionando um alívio temporário, sendo obtidos com aplicações sucessivas de dilatadores ou balonete (DALAR *et al*., 2016). O uso de *stent* traqueal também é uma opção aplicável, proporcionando um alívio de curto a longo prazo, dentre os tipos de *stent* amplamente utilizados estão os metálicos e os de silicone (CHIN *et al*., 2008). Como apresentado na Figura 10.

Figura 10. Representação esquemática da aplicação de balonete (A) e *stent* (B).



Nota: Adaptado de Pinterest (Disponível em: https://www.pinterest.es/pin/411657222183301858/ acesso em: 05.12.2020).

Outras modalidades terapêuticas complementares aplicadas são a ablação a laser e a braquiterapia, promovendo a remoção do tecido estenosado e proporcionando alívio temporário (ALLEN *et al*., 2012; LEVENTHAL; KREBS; ROSEN, 2009).

Contudo, as principais causas de falência das modalidades terapêuticas propostas para o tratamento da estenose traqueal estão ligadas a formação de cicatrizes, bem como a formação de tecido de granulação e a reestenose (FERREIRA *et al*., 2010).

1.6 Engenharia de tecido traqueal

A engenharia de tecido traqueal tem como objetivo promover a cura e, idealmente, a regeneração das estruturas teciduais da traqueia, restabelecendo as funções mecânicas e fisiológicas por meio da aplicação dos princípios e técnicas da engenharia de tecidos (DHASMANA; SINGH; RAWAL, 2020). Não medindo esforços para gerar protocolos alternativos devido à falta de opções terapêuticas disponíveis para os pacientes com doenças traqueais graves (BUTLER *et al*., 2017).

Para que estes protocolos sejam bem-sucedidos, a engenharia de tecidos se fundamenta em três elementos básicos: células responsivas, fatores de crescimento e o uso de biomateriais (DHASMANA; SINGH; RAWAL, 2020).

As células responsivas são células sensíveis a sinalização utilizada na regeneração de tecidos e podem ser originárias do próprio paciente (autólogo) ou de outro indivíduo da mesma espécie (alogênico). Além disso, também podem ser

adotadas em estratégia a utilização de células de animais (xenogênico) (DZOBO *et al*., 2018).

Os fatores de crescimento são proteínas solúveis que atuam na proliferação celular, síntese da matriz e na diferenciação tecidual. Além disso, são capazes de regular de maneira positiva ou negativa a síntese de proteínas, receptores de superfície e outros fatores de crescimento (SILVA *et al*., 2015).

Os biomateriais podem ser originários de fontes naturais ou sintéticas, no entanto, os obtidos de fontes naturais apresentam maior similaridade biológica, atuando de forma positiva na adesão e no crescimento celular. Diante desta similaridade, são geralmente biocompatíveis e também biodegradáveis, não causando reações inflamatórias ou imunológicas (CHANG *et al*., 2017). Semelhante as células responsivas, alguns biomateriais também podem ser originários do próprio paciente, de outro indivíduo da mesma espécie, bem como de uma espécie diferente (SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013).

A utilização de tecido natural descelularizado como matriz base para regeneração traqueal tem sido uma estratégia comum, contudo, a disponibilidade do material para transplante é limitada seja pela falta de doadores ou por imunossupressão pós-transplante (RAJA *et al*., 2019). Muitas estratégias para substituição da traqueia têm sido testadas e avaliadas.

Os homoenxertos ou traqueia cadavéricas após processamento químico tem se tornado menos imunogênicas, assim foram utilizadas como *patch* para ampliar e preservar a parede posterior existente, mas os resultados clínicos não são conclusivos e sua função a longo prazo ainda é imprevisível (MAUGHAN *et al*., 2017).

Partindo deste pressuposto, estas estratégias não fornecem resultados conclusivos, muito devido às limitações de diferentes fatores, como falta de boa resistência mecânica, epitelização deficiente, regeneração inadequada da cartilagem e falta de eficácia a longo prazo (XIA *et al*., 2019). Em contrapartida, o engenheiramento de *scaffolds* é uma área potencial de pesquisa para o processamento e aplicação de biomateriais, assim como na engenharia de tecido traqueal (HANCOX *et al*., 2019).

1.7 *Scaffolds*

Os *scaffolds* são definidos como matrizes ou suportes tridimensionais porosos, temporários e biodegradáveis projetados para mimetizar as propriedades biológicas,

mecânicas e físicas especiais do tecido a ser tratado (GHAFARI *et al*., 2019). A principal função dos *scaffolds* é fornecer suporte necessário para as células, mimetizando as características e funções da MEC, a fim de fornecer um ambiente apropriado para estimular respostas celulares específicas em nível molecular, auxiliando na adesão, proliferação, diferenciação e orientação celular, permitindo o crescimento funcional de tecido semelhante (BERNER *et al*., 2014; MITSUISHI *et al*., 2013).

As escolhas dos biomateriais mais adequados para o engenheiramento e fabricação de *scaffolds* requer alguns requisitos básicos, com o intuito de minimizar possíveis efeitos negativos sobre o organismo. Os requisitos de maior relevância incluem a biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas, morfologia de superfície, porosidade e interconectividade dos poros (CUI *et al*., 2012; KHORSHIDI *et al*., 2015; REIS *et al*., 2016):

- A biocompatibilidade, é definida como a capacidade de um material entrar em contato direto com os tecidos vivos, executando uma função específica sem causar efeitos imunológicos nocivos ao paciente (CHEN; THOUAS, 2015).
- A biodegradabilidade, definido como um fenômeno no qual um material sofre degradação ou solubilização em fluidos tissulares, podendo os subprodutos gerados serem absorvidos ou excretados do organismo por meio de vias metabólicas. Na aplicação dos *scaffolds* a taxa de biodegradação deve apresentar similaridade com a taxa de regeneração do novo tecido, promovendo uma transição gradual entre *scaffold* e regeneração (MAIA *et al*., 2010; SULTANA; WANG, 2011).
- As propriedades mecânicas representam um importante conjunto de características, idealmente devem ser as mais similares possíveis as do tecido alvo, para que possam suportar as tensões e manter o microambiente necessário para as células e, de um ponto de vista prático, devem ser resistentes o suficiente para permitir o manuseio cirúrgico durante a implantação (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008; O'BRIEN, 2011).
- A morfologia de superfície deve favorecer a quimiotaxia e possuir propriedades topográficas adequadas, permitindo a adesão e proliferação celular (BERNER *et al*., 2014; SUÁREZ-GONZÁLEZ *et al*., 2010).

- A porosidade e interconectividade dos poros devem apresentar poros uniformes, com geometria interconectada e com poros compatíveis ao fenótipo celular do tecido alvo, além de permitir o fluxo de nutrientes, oxigenação e a remoção de impurezas metabólicas (RODRIGUEZ-VAZQUEZ *et al*., 2015; SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004).

Comparado com outras resoluções mais comuns para o tratamento de doenças da traqueia, a engenharia de tecido traqueal dispensa a necessidade de doadores de órgãos, projetando o tratamento do órgão a partir de *scaffolds* fabricados de biomateriais, reduzindo a probabilidade de rejeição pelo sistema imunológico. Além disso, diferentes ambientes e geometrias podem ser obtidas pelos *scaffolds* de acordo com o processamento dos biomateriais (HANCOX *et al*., 2019).

No contexto geral de engenharia de tecidos, incluindo processamentos não específicos para aplicações na regeneração e/ou remodelamento traqueal, várias técnicas para fabricação de *scaffolds* tridimensionais foram desenvolvidos, como exemplo: *solvent casting/particulate leaching, freeze-drying, gas foaming (CO_2), thermal induced phase separation, electrospinning, 3D printing, bioextruder, particle sintering,* além de abordagem com modificações e combinações de técnicas (ASUNCION; GOH; TOH, 2016; MULDER; BUMA; HANNINK, 2009).

A maiorias das técnicas mencionadas envolvem a aplicação de calor e/ou pressão ao biomaterial escolhido, ou sua dissolução em solvente orgânico, com a finalidade de moldar o material na sua forma desejada. Apesar de cada método apresentar vantagens e desvantagens específicas, a técnica adequada deve ser selecionada para atender as características de acordo com o tecido alvo. Além disso, a escolha do (s) melhor (es) biomaterial (ais) para processamento e fabricação do *scaffold* depende de um conhecimento profundo da anatomia, morfologia, histologia e fisiologia do órgão a ser tratado (DHANDAYUTHAPANI *et al*., 2011).

1.8 Biomateriais

A *European Society for Biomaterials (ESB)* organizou no ano de 1991 a 2ª Conferência de consenso sobre Definições de Biomateriais. De acordo com a conferência, o termo biomaterial foi definido 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 também pode ser entendido como qualquer material de origem natural ou sintética que, em conjunto com as células, constituem o todo ou parte de uma estrutura viva ou de um dispositivo biomédico capaz de executar, substituir ou melhorar uma função natural do organismo sem que possa causar reações indesejáveis (DUTTA *et al*., 2017).

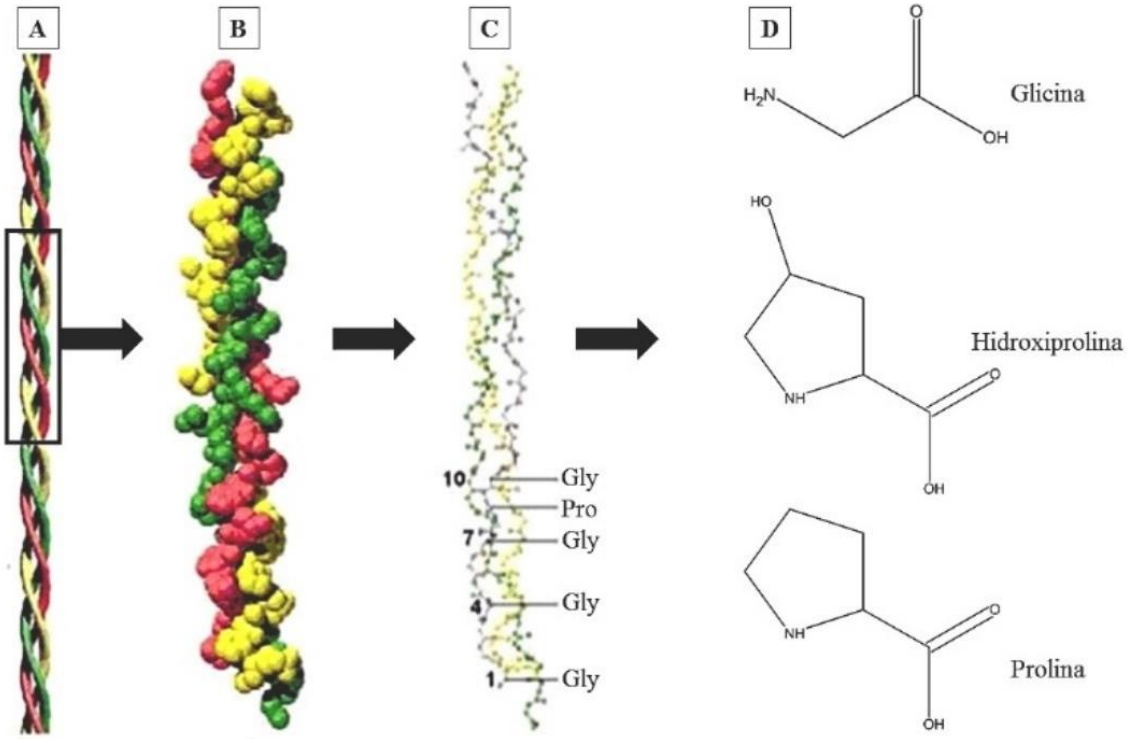
Scaffolds fabricados com biomateriais naturais e/ou sintéticos tem substituído a MEC e servido como substrato e suporte de fixação celular. Estes biomateriais podem ser de origem natural (por exemplo, colágeno, gelatinas, compostos fenólicos, alginatos, fibrina, fibroína de seda, celulose, quitosana, ácido hialurônico) ou sintéticos (por exemplo, ácido láctico e seus copolímeros, poli (álcool vinílico), policaprolactona, polietilenoglicol, poliuretano, poliésteres) (DOMENECH *et al*., 2016; FERREIRA; MOUSAVI, 2018).

1.8.1 Colágeno

O colágeno (COL) é a proteína mais presente no organismo humano, compondo uma superfamília que inclui mais de 20 membros em quantidade, funcionalidade e distribuições diversas dentro dos tecidos (WALTERS; STEGEMANN, 2014). De natureza fibrosa, esta proteína é encontrada, principalmente, nos tecidos conjuntivos e musculares, representando cerca de 25-35% da massa de toda proteína corporal (CHAK; KUMAR; VISHT, 2013).

A unidade básica do COL é o protocolágeno, formado por três cadeias polipeptídicas unidas por pontes de hidrogênio, entrelaçando uma em torno das outras para formar um arranjo helicoidal, resultando em uma macromolécula linear com massa molecular médio de aproximadamente 300 kDa, um comprimento de 300 nm e diâmetro de 1,5 nm (RADHAKRISHNAN *et al*., 2020). Os principais aminoácidos que constituem o COL são a glicina (33,5%), a prolina (12%) e a hidroxiprolina (10%), que dão origem as cadeias polipeptídicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), como apresentado na Figura 11.

Figura 11. Estrutura molecular do colágeno.



Nota: A – hélice tripla; B – tropocolágeno; C – forma de triplete presente nas matrizes; D – principais aminoácidos que compõem a estrutura do colágeno.
Fonte: Adaptado de GONÇALVES et al., 2015.

O COL é uma das principais proteínas que constituem a MEC, desempenhando uma importante função na manutenção da integridade estrutural e biológica da matriz, bem como proporcionar suporte físico aos tecidos. Além disso, o COL possui excelentes propriedades, como hidrofilicidade, biocompatibilidade e estabilidade (MOHSENI *et al*., 2017; SADEGHI-AVALSHAHR *et al*., 2017). Devido suas propriedades e grande presença nos tecidos vivos, esta proteína tem se tornado uma escolha adequada para utilização como biomaterial com diferentes formas e aplicações, sendo como curativos, enxertos de pele, membranas para revestimentos de queimaduras, géis para hemostasia e *scaffolds* acelulares ou celulares para engenharia de tecidos (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Na engenharia de tecido traqueal *scaffolds* produzidos com COL apresentam alta biocompatibilidade e permitem a migração celular pelo contato a partir da borda do defeito traqueal. Assim, a matriz temporária fornecida pelo *scaffold* de COL pode induzir a regeneração sem a necessidade de implantação de células na traqueia artificial (NAKAMURA *et al*., 2020). Contudo, estruturas produzidas somente a base de COL apresentam uma fraca resistência mecânica, o que pode limitar suas aplicações (DZOBO *et al*., 2018). Para superar isso, o COL tem sido combinado com

uma diversidade de biomateriais naturais e/ou sintéticos, seja por processo de reticulação, para o processamento de blendas ou compósitos para engenharia de tecidos (RADHAKRISHNAN *et al*., 2020).

Omori *et al*. (2005) foram os primeiros a relatar com sucesso um ensaio clínico com aplicação de enxerto traqueal por engenharia de tecidos, o reparo foi realizado em um paciente de 78 anos com câncer de tireóide causando invasão na traqueia. Os pesquisadores desenvolveram um *scaffold* de COL utilizado para recobrir um tubo de malha Marlex (polipropileno) em formato de anel para mimetizar o tecido traqueal nativo, a ressecção foi realizada na metade direita danificada dos três anéis traqueais e implantado o material do *scaffold*. Após 2 meses do procedimento cirúrgico, a cobertura do revestimento epitelial se formou e continuou por até 2 anos sem nenhuma complicação, contudo, o tecido regenerado com revestimento mucoso completo foi observado aproximadamente 5 meses depois, mostrando epitelização lenta do tecido (OMORI *et al*., 2005).

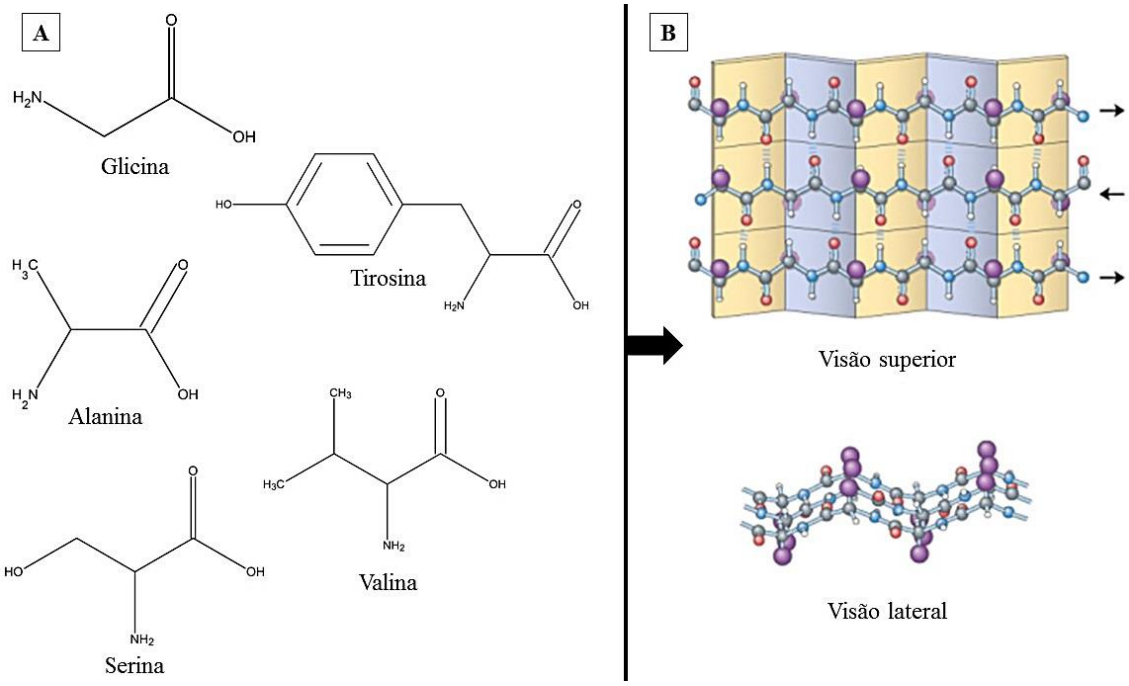
Em outro estudo, Wu *et al*. (2017) fabricaram um *scaffold* tubular bio-sintético em duas camadas consistindo de fibras de poly (L-lactide-co-caprolactone)/colágeno aplicando a técnica de *electrospinning*. Condrócitos e células epitelias foram utilizadas para formar uma estrutura semeada por células que, no estudo *in vitro*, demostrou que a arquitetura microporosa do *scaffold* resultou em melhor proliferação celular e pré-vascularização do enxerto (WU *et al*., 2017).

1.8.2 Fibroína de seda

A seda do casulo do Bicho-da-seda (*Bombyx mori*) é um polímero fibroso natural composto por duas proteínas, fibroína e sericina. A fibroína da seda (SF) possui características proeminentes, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade controlável e propriedades mecânicas notáveis. Devido as suas características, a SF possui potencial para materiais biomédicos e foi investigado o seu uso em relação ás aplicações em engenharia de tecidos para vasos sanguíneos, pele, ossos e cartilagens (KIM; PARK, 2016; LEE *et al*., 2012; MÉNDEZ; CANO; ARIAS, 2016).

A molécula da SF consiste em polipeptídeos formados por uma cadeia pesada (~390 kDa) e uma cadeia leve (~26 kDa) ligadas entre si por uma única ligação dissulfeto. Os principais aminoácidos que constituem a fibroína da seda são a glicina (45,9%), alanina (30,3%) e serina (12,1%), tirosina (5,3%), valina (1,8%) e apenas 4,7% dos outros tipos de aminoácidos (Figura 12) (QI *et al*., 2017; ZHOU *et al*., 2001).

Figura 12. Estrutura molecular da fibroína de seda.



Nota: A – principais aminoácidos que compõem a estrutura da fibroína; B – Folhas β dobradas em ziguezague, visão superior e lateral.
Fonte: Adaptado de Net Nature (Disponível em: https://netnature.wordpress.com/2018/03/09/bicho-da-seda-e-aranhas-propriedades-fisicas-quimicas-e-biologicas/ acesso em: 17.07.20).

A estrutura da SF é composta por dois domínios, o cristalino e o amorfo. O domínio cristalino consiste em repetições de alanina-glicina ligadas com os aminoácidos serina e tirosina. Já o domínio amorfo consiste em aminoácidos mais volumosos, como o ácido aspártico. Os domínios cristalinos, são responsáveis por formar a estrutura secundária em folhas-β paralela das repetições de alanina-glicina, intercalados pelas regiões amorfas mais flexíveis. Esta configuração estrutural confere as fibras de seda suas propriedades mecânicas exclusivas, que incluem alta resistência e flexibilidade (GOBIN; FROUDE; MATHUR, 2005).

A seda pode apresentar dimorfismo cristalino o que afeta as características da SF, como a solubilidade em água. A SF pode apresentar quatro estruturas diferentes: seda I, seda II, seda III e bobina aleatória. A seda I proporciona uma boa solubilidade em água, uma vez que as sedas I são formadas alternadamente por α-hélice e folha-β. A seda II é a principal configuração estrutural da fibroína, rico em folhas-β, que oferece boa resistência à solubilidade em água, além de exibirem alta propriedade mecânica e físico-química. A seda III é uma estrutura de cristal helicoidal tríplice e de difícil dissolução. A estrutura aleatória da bobina geralmente existe na solução da fibroína (LI et al., 2013). Desta maneira, as quatro estruturas da SF apresentam

propriedades adaptáveis e ajustáveis por meio de diferentes condições de processamento (LIN *et al*., 2013).

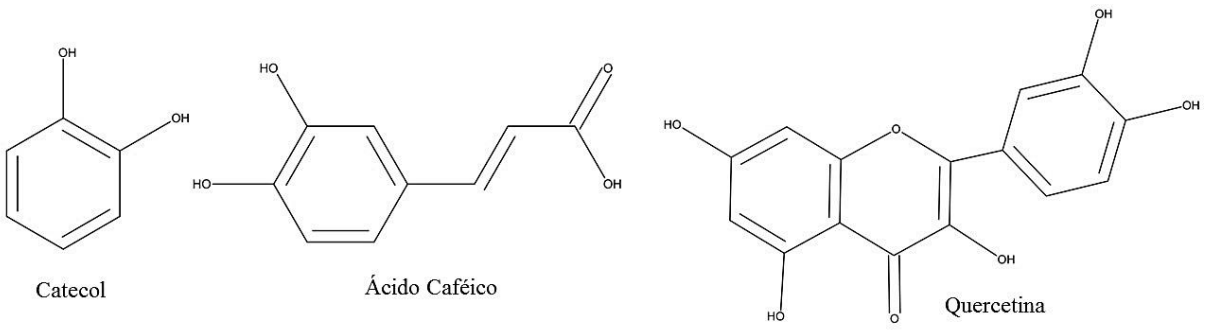
Ni *et al*. (2005) implantaram anéis de malha de titânio revestido com filme poroso e não poroso de SF, aplicado para reconstrução de tecido traqueal utilizado para o ensaio clínico em coelhos. Os resultados mostraram a formação de camada mucosa normal com revestimento epitelial ciliado em 3 meses e nenhuma filtração celular inflamatória ao redor do revestimento de SF (NI *et al*., 2008).

Em outro estudo, Varma *et al*. (2018) realizaram uma extensa análise comparativa de diferentes biomateriais para projetar um implante adequado para aplicação em engenharia de tecido traqueal, foram analisadas misturas de quitosana-colágeno, ácido hialurônico-polietilenoglicol, cola de fibrina, membrana de colágeno vitrigel, SF e, por fim, um biomaterial composto por SF e membrana de colágeno vitrigel. Os resultados mostraram que a combinação de SF e membrana de colágeno vitrigel possui força mecânica significativamente melhor, apresentando em estudo *in vitro* uma boa diferenciação celular para formar o tecido traqueal de epitélio maduro (células ciliadas e caliciformes) (VARMA *et al*., 2018).

1.8.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos representam uma enorme variedade de substâncias distribuídas no reino vegetal e são os metabolitos secundários mais numerosos encontrados nas plantas, com mais de 8000 estruturas fenólicas já detectadas, desde moléculas simples (fenóis), como ácidos fenólicos, a moléculas altamente polimerizadas (polifenóis), como taninos (AAM *et al*., 2018). Na Figura 13 são apresentados alguns exemplos de compostos fenólicos.

Figura 13. Estrutura molecular dos compostos fenólicos: catecol; ácido caféico; quercetina.



Fonte: Elaboração própria.

A estrutura química destes compostos é caracterizada pela presença de um ou mais anéis fenólicos ligados a pelo menos um radical hidroxila e/ou substitutos funcionais, e também podem ser divididos de acordo com o número de anéis fenólicos e as estruturas nas quais estão unidas, estas características conferem aos compostos fenólicos propriedades antioxidantes (D'ARCHIVIO *et al*., 2007). Além disso, devido sua alta compatibilidade, estes compostos também apresentam um potencial uso como agentes reticulantes, devido suas estruturas químicas compostas por grupos hidroxilas e outros grupos funcionais, como os grupos carboxílicos, podendo efetivamente realizar interações com biomateriais (ZHAO; SUN, 2018).

O processo de reticulação é definido como a indução de ligações químicas que ocorrem quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interconectadas por meio de ligações covalentes, formando uma rede tridimensional polimérica mais rígida, este processo também é denominado por *crosslinking* (formação de ligações cruzadas), um método simples geralmente utilizado para modificar as propriedades mecânicas, biológicas e de degradação de hidrogéis (DINIZ *et al*., 2019; ORYAN *et al*., 2018).

Um agente reticulante com características potencias para aplicação na engenharia de tecido, não deve exercer reações citotóxicas para o tecido. Existem vários agentes reticulantes utilizados para o processamento de *scaffolds*, podendo ser classificados como agentes reticulantes químicos (glutaraldeído, carbodiimida e compostos epóxi) e agentes reticulantes naturais (proantocianidina, ácido tânico e genipina). A grande vantagem apresentada pelos agentes reticulantes naturais em relação aos agentes reticulantes químicos está na compatibilidade, apresentando baixa citotoxicidade e também atividade anticalcificante (HAN *et al*., 2011; SHAVANDI *et al*., 2018).

Como resultado, o processo de reticulação de cadeias poliméricas podem afetar as propriedades físico-químicas, incluindo propriedades mecânicas como resistência a tração, rigidez e tensão, melhor desempenho em altas temperaturas, resistência à degradação enzimática e químicas, interações célula-matriz, redução de permeação de gás e manter a forma original dos produtos (CHATERJI; KEUN; PARK, 2007; ORYAN *et al*., 2018).

1.8.4 Poli (L-co-D, L ácido láctico)

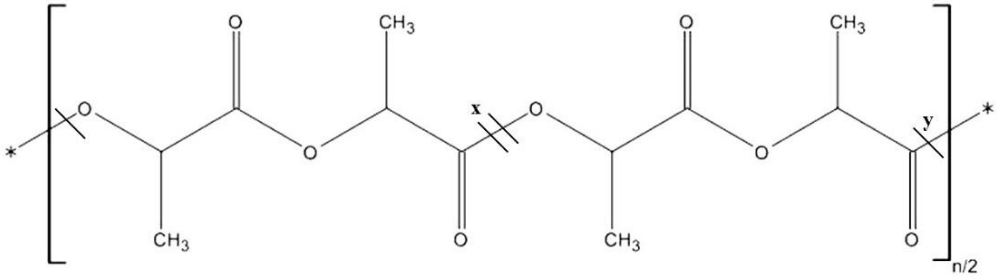
Entre os polímeros sintéticos mais estudados para aplicações médicas está a família dos poli (α-hidroxi ácidos), como o poli (ácido láctico)/PLA e seus copolímeros, que compõem os materiais de maior destaque na classe dos chamados polímeros bioreabsorvíveis (DUARTE; MOTTA; DUEK, 2016; MOTTA *et al*., 2018).

A grande vantagem destes polímeros, além de bioreabsorvíveis, está em reunir características como boa biocompatibilidade, facilidade de processamento e uma biodegradabilidade que ocorre principalmente por hidrólise das ligações ésteres, sendo os produtos gerados (ácido láctico, CO_2 e H_2O) não tóxicos e completamente absorvidos pelo organismo (DUARTE; MOTTA; DUEK, 2016; MESSIAS *et al*., 2014). Devido estas características, estes polímeros e seus copolímeros também têm despertado interesse significativo no campo de pesquisa de engenharia de tecidos (LEAL *et al*., 2019).

Os monômeros do lactídeo possuem um carbono β assimétrico que permite a obtenção de diferentes moléculas quirais, como a forma levógira (L-ácido láctico), forma dextrógira (D-ácido láctico) e também a possibilidade da forma racêmica (D, L-ácido láctico) (ERBETTA *et al*., 2011; MERKLI *et al*., 1998). Entre os polímeros derivados do lactídeo, os poli (L-ácido láctico)/PLLA e o poli (D, L-ácido láctico)/PDLLA têm sido extensivamente investigados como biomateriais (MESSIAS *et al*., 2014).

No entanto, os monômeros do lactídeo são passíveis de combinações, desta forma, podem dar origem a um novo composto, como o copolímero poli (L-co-D, L ácido láctico)/PLDLA (Figura 14), este novo composto apresenta propriedades distintas quando comparado aos polímeros formados pelos monômeros precursores (KOMATSU *et al*., 2019).

Figura 14. Estrutura molecular do poli (L-co-D, L ácido láctico).



Fonte: Elaboração própria.

Por causa da união dos monômeros a estrutura polimérica do PLDLA tem como característica aliar as propriedades mecânicas que a presença do L-ácido láctico lhe confere, no entanto, sem a desvantagem do longo período de tempo exigido para sua degradação total (~60 meses) e a alta cristalinidade, podendo gerar fragmentos e reações inflamatórias. Esta característica é possível devido a presença da cadeia polimérica do D, L-ácido láctico, uma vez que seus segmentos são completamente amorfos, contribuindo para que o tempo de degradação do PLDLA seja relativamente menor (12 a 16 meses) e sem resposta inflamatória adversa (BARAÚNA; CORAÇA-HUBER; DUEK, 2013; LEAL *et al*., 2019).

Conforme descrito em estudo realizado por Más *et al*. (2016) a degradação do PLDLA não gera fragmentos cristalinos, evitando uma resposta inflamatória aguda do tecido hospedeiro, além do mais, o PLDLA apresenta estabilidade durante o processo de degradação e propriedades mecânicas adequadas.

O PLDLA tem sido utilizado em diversas aplicações, tais como, próteses temporárias para recuperação de fraturas ósseas (MOTTA; DUEK, 2008), fabricação de dispositivos de fixação (pinos) (DUARTE; MOTTA; DUEK, 2016), processamento de *scaffolds* para reparo ou substituição de tecidos (SALMORIA *et al*., 2018), membranas para uso como curativos em feridas (KOMATSU *et al*., 2017) e dispersões sólidas para otimização na liberação e permeação de fármacos (AMARAL *et al*., 2019).

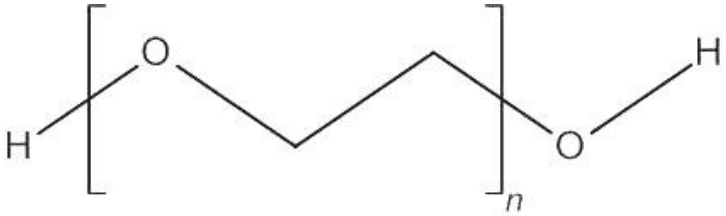
Scaffolds fabricados pela técnica *solvent casting/particulate leaching* se mostraram adequado para a engenharia de tecidos da cartilagem traqueal, demostrando que o PLA e seus copolímeros produzem estruturas de *scaffold* porosos quando combinados com vários tamanhos e tipos de agentes porogênicos em solventes. Está técnica tem mostrado que quanto maior o tamanho do porogênico utilizado, maiores os tamanhos médios de poros e porosidade, permitindo a manipulação da porosidade dos *scaffolds* para atender aos requisitos da engenharia de tecido traqueal para integração celular e resistência mecânica (HANCOX *et al*., 2019; LI *et al*., 2007; ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011).

1.8.5 Polietilenoglicol

Os polietilenoglicóis (PEG) compreendem uma família de polímeros sintéticos lineares obtidos a partir do etilenoglicol. Este polímero pode ser encontrado em diversas massas moleculares, apresentando estrutura molecular $H–(O–CH_2–CH_2)_n–$

OH (Figura 15), onde *n* é o número médio de óxido de etileno presente na molécula, denominado grau de polimerização. Geralmente as unidades são terminadas em cada extremidade por um grupo hidroxila (–OH), contudo, outras terminações são possíveis, como exemplo o grupo funcional metoxilo ($–OCH_3$), neste caso, o polímero é denominado de poli (óxido de etileno) (ALESSI *et al*., 2005; CÔRTES *et al*., 2013). Em relação ao grupo terminal OH do PEG, este pode ser facilmente modificado por vários grupos funcionais, tais como carbóxilo (–COOH), tiol (–SH), acrilato ($CH_2=CHOO^-$) ou moléculas bioativas (CHANG *et al*., 2017).

Figura 15. Estrutura molecular do polietilenoglicol.



Fonte: Elaboração própria.

O fato de possuir características proeminentes, como ótima hidrofilicidade e solubilidade em solventes orgânicos, excelente biocompatibilidade, baixa toxicidade, e não imunogenicidade (CHANG *et al*., 2017; ZHU; MARCHANT, 2011), faz com que o PEG seja amplamente aplicado em produtos industriais, farmacêuticos, alimentares, cosméticos e também em aplicações médicas, biomédicas, ambientais e de engenharia de tecidos (BUZZI; YUAN; ROUTLEY, 2017; PEREIRA *et al*., 2018). Além das características já citadas, também foi relatado que a incorporação do PEG tem a capacidade de estimular a formação de estruturas mais porosas (CÔRTES *et al*., 2013; SCOTT *et al*., 2010).

O PEG pode ser utilizado como agente plastificante, surfactante, estabilizador coloidal e agente solubilizante (DIAS *et al*., 2014; SANTOS *et al*., 2009; ZANETTI-RAMOS *et al*., 2006). Os agentes plastificantes são adicionados a outros biomateriais com a finalidade de modificar as propriedades do mesmo, com o intuito de melhoria para novas aplicações (RAPHAEL; SONE; GIMENES, 2015).

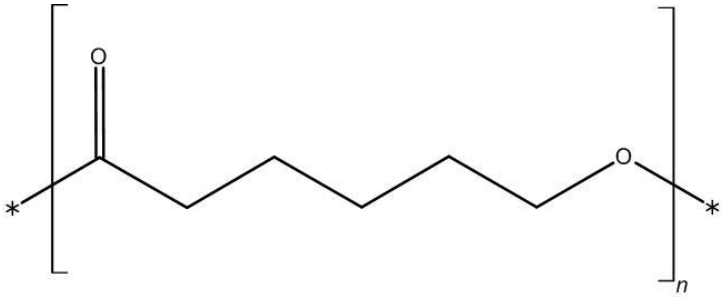
Na engenharia de tecidos o PEG tem sido utilizado na preparação de *scaffolds* devido a sua propriedade bio-inerte e sua capacidade de ser moldado em uma variedade de estruturas, formando *scaffolds* com diferentes arquiteturas (RADHAKRISHNAN *et al*., 2020).

Em estudo realizado por Sargeant *et al*. (2012) foi desenvolvido um sistema único de hidrogel injetável composto por COL e PEG, com o intuito de produzir um *scaffold* com formação *in situ* que pudesse preencher completamente os defeitos teciduais com geometrias complexas e para aderência ao tecido adjacente para proliferação celular. O hidrogel exibiu propriedades mecânicas ajustáveis, intumescimento variável, biodegradação, adesão e proliferação celular. Esses resultados sugerem que o hidrogel a base de COL e PEG exibe características adequadas para aplicação como suporte de tecido injetável para o tratamento de uma variedade de defeitos simples e complexos de tecidos, incluindo lesões neurais, infarto do miocárdio e defeitos focais da cartilagem hialina (SARGEANT *et al*., 2012).

1.8.6 Policaprolactona

A policaprolactona (PCL) é um poliéster linear semicristalino produzido pela polimerização de abertura do anel da ε-caprolactona (Figura 16), apresentando um baixo ponto de fusão em cerca de 60 °C (CARVALHO; REIS; OLIVEIRA, 2020). Este polímero sintético já é bem caracterizado com aprovação pela *Food and Drug Administration – FDA* e tem sido amplamente utilizado como biomaterial na engenharia de tecidos para o processamento de *scaffolds* (DOMENECH *et al*., 2016; YILMAZ; ZEUGOLIS, 2020).

Figura 16. Estrutura molecular da policaprolactona.



Fonte: Elaboração própria.

Em decorrência das propriedades químicas e biológicas da PCL como hidrofobicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e resistência mecânica que podem ser ajustadas, portanto, podendo se adequar para diversas aplicações (MALIKMAMMADOV *et al*., 2018; RADHAKRISHNAN *et al*., 2020). A taxa de biodegradação *in vivo* deste polímero é considerada baixa em comparação a outros poliésteres como poli (ácido láctico) e poli (láctico-co-glicólico) (CARVALHO; REIS; OLIVEIRA, 2020). Contudo, a baixa taxa de biodegradação apresentada *in vivo* pode

colaborar na prevenção de problemas causados por degradação excessiva dos enxertos traqueais, como amolecimento pós-operatório, colapso e reestenose (GHORBANI *et al*., 2017; PAN *et al*., 2019).

Outra característica a ser trabalhada da PCL é a hidrofobicidade, que afeta muito a adesão celular. No entanto, a PCL pode ser combinada com outros polímeros, como exemplo, poli (álcool vinílico), polietilenoglicol, dextrano, entre outros, que por meio desta modificações é possível melhorar diretamente as propriedades do material original, que combinam as propriedades do material nativo e dos polímeros incorporados, podendo assim promover uma melhor interação celular (DOMENECH *et al*., 2016; WU *et al*., 2018).

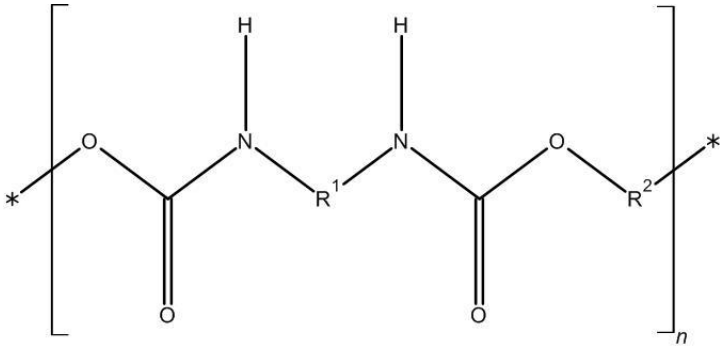
Sousa; Mendes; Bártolo (2013) desenvolveram um *scaffold* filamentoso a base de PCL por meio da técnica de *bioextruder*. Para superar a hidrofobicidade do polímero e melhorar a interação celular, a matriz de PCL foi modificada por revestimento com colágeno, resultando em melhores propriedades biológicas, como adesão, crescimento e proliferação de células, podendo ser utilizado como dispositivo biomimético para a engenharia de tecidos.

Em outro estudo, Park *et al*. (2018) constataram que *scaffold* a base de PCL por técnica *3D printing* apresentou em estudo *in vivo* em modelo de coelho aplicado em defeito traqueal, resultando em boa estabilidade mecânica do tecido regenerado e melhor taxa de cicatrização.

1.8.7 Poliuretano

O poliuretano (PU) é um grupo de polímeros amplamente utilizados em aplicações industriais e biomédicas (SILVESTRI *et al*., 2013). Estes materiais poliméricos apresentam grande versatilidade, que mostram comportamentos diferentes de acordo com a proporção de seus segmentos, podendo variar o seu comportamento de flexível (elastomérico) a rígido (quebradiço). Assim, o PU pode modificar a sua composição e serem projetados para possuir características mecânicas flexíveis ou rígidas conforme a aplicação final pretendida, com controle adequado de sua estrutura molecular (SANTOS; TAVARES; BATALHA, 2012). Uma representação da estrutura química do PU é apresentada na Figura 17.

Figura 17. Estrutura molecular do poliuretano.



Fonte: Elaboração própria.

Além da versatilidade apresentada, o PU mostra potencial para utilização como biomaterial no processamento de *scaffolds* devido as características físico-químicas, propriedades mecânicas ajustáveis, por apresentar boa taxa de degradação, bioestabilidade, biocompatibilidade e hemocompatibilidade (GANJI *et al*., 2014).

Os principais mecanismos de degradação do PU ocorrem por meio de degradação hidrolítica, enzimática ou oxidativa. Além disso, existem fatores que atuam na taxa de degradação do polímero, podendo ser influenciado pela força intramolecular, cristalinidade, hidrofobicidade, massa molecular, composição, capacidade de intumescimento, bem como condições do ambiente (exemplo o pH) (TSAI *et al*., 2015).

Best *et al*. (2018) projetaram um *scaffold* traqueal utilizando tereftalato de polietileno e PU incorporados nos anéis em forma de C em policarbonato sólido ou poroso e foram semeados com células mononucleares derivadas da medula óssea sob condição de vácuo. Os resultados indicaram que os anéis porosos e sólidos se aproximavam da propriedade biomecânica da traqueia ovina nativa, mas os anéis porosos foram mais biomiméticos. Contudo, o *scaffold* sólido apresentou maior eficiência de semeadura celular quando comparado ao poroso.

Em outro estudo, Hsieh *et al*. (2018) projetaram *scaffolds* tubulares com elasticidade e estrutura complexa a partir de múltiplos PUs por meio da técnica *3D printing*. Também foram utilizados fatores biológicos ou fármaco molecular (Y27632) para promover a condrogênese das células tronco mesenquimais. O estudo *in vitro* revelou que o *scaffold* melhora na diferenciação das células tronco mesenquimais, juntamente com a secreção de uma nova MEC rica em glicosaminoglicanos e colágeno. No modelo de camundongos nude, o implante subcutâneo do *scaffold*

traqueal recelularizado demostrou um módulo de compressão e contração semelhante aos do tecido traqueal nativo, o que indica a potencial aplicação do enxerto.

2 CONCLUSÃO

A engenharia de tecido traqueal tem realizado avanços significativos nos últimos anos, com o desenvolvimento de métodos aprimorados para a reconstrução traqueal.

O engenheiramento de *scaffolds* é uma área potencial de pesquisa e está levando o campo da engenharia de tecido traqueal a maiores níveis de complexidade, com o processamento e aplicação de biomateriais para obter dispositivos mais biomiméticos ao tecido de interesse.

Contudo, a melhor aplicação de biomateriais para cartilagem traqueal ainda permanece um desafio e mais investigações precisam ser realizadas para uma melhor compreensão, de modo a solucionar os desafios experimentais, melhorando as técnicas existentes e desenvolvendo novas técnicas, protocolos e métodos para obtenção de dispositivos pelo processamento de diferentes biomateriais.

Estudos demonstraram a integração de *scaffolds* traqueais com capacidade de melhorar a função do tecido lesionado em decorrência de doenças (câncer e estenose). Dispositivos acelulares, como *scaffolds* fabricados utilizando apenas biomateriais tem sido um campo bastante investigado pela engenharia de tecidos.

Desta forma, este estudo deverá contribuir para o avanço nas investigações de diferentes biomateriais aplicados nesta nova abordagem de terapia clínica para reparação de tecido traqueal por dispositivo acelular, auxiliando pesquisadores com projeção futura, técnica e cientificamente capacitada para demandas científicas atuais.

3 Referências

AAM, E. et al. Challenges of Extraction Techniques of Natural Antioxidants and Their Potential Application Opportunities as Anti-Cancer Agents. **Health Science Journal**, v. 12, n. 5, p. 1–25, 2018.

AL-UMERI, S. K. W. GROSSLY AND MICROSCOPIC STUDY OF THE TRACHEA AND BRONCHIAL TREE IN THE LOCAL SHEEP (OVIS ARIS). **Basrah Journal of Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 145–155, 2015.

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.

ALLEN, A. M. et al. Endobronchial brachytherapy provides excellent long-term control of recurrent granulation tissue after tracheal stenosis. **Brachytherapy**, v. 11, n. 4, p. 322–326, 2012.

AMARAL, V. A. et al. The effect of efflux bomb and the transmural potential difference in the permeation of azidothymidine across the small intestine of the rat. **Science Publishing Group - SPG BioMed**, v. 1, n. 2, p. 1–17, 2019.

ANATOMIA ONLINE. Traqueia. **Anatomia Online.** (Disponível em: <https://www.anatomiaonline.com/traqueia/>). Acesso em 22.06.2020.

ANDARDE, F. G. DE; FERRARI, O. **Atlas Digital de Histologia Básica**. 2ª Edição ed. Londrina-PR: Universidade Estadual de Londrina - UEL, 2018.

ASUNCION, M. C. T.; GOH, J. C.; TOH, S. Anisotropic silk fi broin /gelatin scaffolds from unidirectional freezing. **Materials Science & Engineering C**, v. 67, p. 646–656, 2016.

BARAÚNA, G.; CORAÇA-HUBER, D. C.; DUEK, E. A. DE R. In vitro Degradation of Poly-L-co-D, L-lactic Acid Membranes. **Materials Research**, v. 16, n. 1, p. 221–226, 2013.

BARNARD, S. Management of airway and chest wall tumours. **Cardiothoracic Surgery**, v. 38, n. 5, p. 260–265, 2020.

BEHRINGER, D.; KÖNEMANN, S.; HECKER, E. Treatment Approaches to Primary Tracheal Cancer. **Thoracic Surgery Clinics of NA**, v. 24, n. 1, p. 73–76, 2014.

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.

BEST, C. A. et al. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology Designing a tissue-engineered tracheal sca ff old for preclinical evaluation. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 104, p. 155–160, 2018.

BITAR, M. A.; BARAZI, R. AL; BARAKEH, R. Airway reconstruction: review of an

approach to the advanced-stage laryngotracheal stenosis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 83, n. 3, p. 299–312, 2017.

BOTS, E. M. T. et al. Respirology Case Reports Syncope due to tracheal adenoid cystic carcinoma. **Official Case Reports Journal of the Asian Pacific Society of Respirology**, v. 7, n. 7, p. 3–5, 2019.

BUTLER, C. R. et al. Biomaterials Vacuum-assisted decellularization: an accelerated protocol to generate tissue-engineered human tracheal scaffolds. **Biomaterials**, v. 124, p. 95–105, 2017.

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.

CAIADO, A.; SÁ, J. M. E. Revisão dos tumores da traqueia - A propósito de um caso clínico de tumos adenóide cístico. **Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)**, v. 14, n. 4, p. 527–534, 2008.

CALICE, I.; ROCCHI, A. Airway management for tracheal resection proximal to carina in a cat. **Veterinary Record Case Reports**, v. 7, n. e000874, p. 1–5, 2019.

CAMILLO, C. DA S. et al. **Caderno de histologia - Texto e atlas**. Natal-RN: EDUFRN, 2017.

CARDOSO, L. et al. INTUBAÇÃO OROTRAQUEAL PROLONGADA E A INDICAÇÃO DE TRAQUEOSTOMIA. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 16, n. 4, p. 170–173, 2014.

CARVALHO, C. R.; REIS, R. L.; OLIVEIRA, J. M. Fundamentals and Current Strategies for Peripheral Nerve Repair and Regeneration. In: **Bioinspired Biomaterials**. Singapore: Springer. p. 173–201, 2020.

CATANEO, D. C. et al. Mitomicina C no tratamento endoscópico de estenose traqueal: estudo prospectivo de coorte. **Sociedade Brasileira de Pneumonologia e Tisiologia**, v. 44, n. 6, p. 1–5, 2018.

CHAK, V.; KUMAR, D.; VISHT, S. A Review on Collagen Based Drug Delivery Systems. **International Journal of Pharmacy Teaching & Practices**, v. 4, n. 8, 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.

CHARLTON, P.; PITKIN, L. Airway compromise due to adenoid cystic carcinoma obstructing the distal trachea: a review of current management and clinical trials. **BMJ Case Reports**, p. 1–4, 2015.

CHATERJI, S.; KEUN, I.; PARK, K. Smart polymeric gels: Redefining the limits of

biomedical devices. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 1083–1122, 2007.

CHEN, C. et al. Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte. **American Physiological Society**, v. 149, p. 1202–1208, 2013.

CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 87, p. 1–57, 2015.

CHIN, C. S. et al. Airway Stents. **Annals of Surgery**, v. 85, p. S792–S796, 2008.

CIRURGIA TORÁCICA DO VALE. Estenose de traqueia. **Cirurgia torácica do Vale.** (Disponível em: <https://cirurgiatoracicadovale.com.br/estenose-traqueia.php>). Acesso em 22.06.2020.

COLLES, C. J. On Stenosis of the Trachea after Tracheotomy for Croup and Diphtheria. **Annals of Surgery**, v. 6, n. 3, p. 499–507, 1886.

CÔRTES, 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.

COSTA, C. C. et al. Decanulação: atuação fonoaudiológica e fisioterapêutica. **Distúrbios da Comunicação**, v. 28, n. 1, p. 93–101, 2016.

CROWLEY, C.; BIRCHALL, M.; SEIFALIAN, A. M. Trachea transplantation: from laboratory to patient. **Jounal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 357–367, 2014.

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.

D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità**, v. 43, n. 4, p. 348–361, 2007.

DALAR, L. et al. Bronchoscopic Treatment in the Management of Benign Tracheal Stenosis: Choices for Simple and Complex Tracheal Stenosis. **Annals of Thoracic Surgery**, n. 164, p. 1310–1317, 2016.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, p. 1–19, 2011.

DHASMANA, A.; SINGH, A.; RAWAL, S. Biomedical grafts for tracheal tissue repairing and regeneration "Tracheal tissue engineering: an overview". **Journal of**

Tissue Engineering and Regenerative Medicine, p. 1–36, 2020.

DIAS, D. B. et al. Caracterização de filmes de sericina modificados com polietilenoglicol. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ**, p. 1–8, 2014.

DIANA, Juliana. Sistema respiratório. **Toda Matéria.** (Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/sistema-respiratorio/>). Acesso em 22.06.2020.

DINIZ, C. M. G. P. et al. Estudo comparativo entre agentes reticulantes para possível aplicação no tratamento do ceratocone. **Revista Mat**, v. 24, n. 3, p. 1–12, 2019.

DOMENECH, M. et al. Tissue Engineering Strategies for Myocardial Regeneration: Acellular vs Cellular Scaffolds? **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 22, n. 6, p. 438–458, 2016.

DUARTE, M. A. T.; MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Caracterização de pinos da blenda poli (L-co-D,L ácido láctico)/poli (caprolactona triol) (PLDLA/ PCL-T) e análise das propriedade mecânicas dos pinos durante degradação in vitro. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 26, n. 2, p. 185–191, 2016.

DUTTA, R. C. et al. Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 2, p. 240–250, 2017.

DZOBO, K. et al. Review Article Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine. **Stem Cells International**, v. 2018, p. 1–24, 2018.

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.

FERREIRA, M. S. V.; MOUSAVI, S. H. Nanofiber technology in the ex vivo expansion of cord blood-derived hematopoietic stem cells. **Nanomedicine**, v. 14, n. 5, p. 1707–1718, 2018.

FERREIRA, S. et al. Técnicas de dilatação broncoscópica e aplicação tópica de mitomicina C no tratamento da estenose traqueal pós-entubação - A propósito de dois casos clínicos. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. XVI, n. 1, p. 149–156, 2010.

FURLOW, P. W.; MATHISEN, D. J. Surgical anatomy of the trachea. **Annals of Cardiothoracic Surgery**, v. 7, n. 2, p. 255–260, 2018.

GANJI, Y. et al. Synthesis and characterization of gold nanotube/nanowire–polyurethane composite based on castor oil and polyethylene glycol. **Materials Science & Engineering C**, v. 42, p. 341–349, 2014.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 2ª Edição ed. Rio de Janeiro-RJ: Elsevier Health Sciences Brazil, 2007.

GHAFARI, R. et al. Fabrication and characterization of novel bilayer scaffold from nanocellulose based aerogel for skin tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 796–803, 2019.

GHORBANI, F. et al. In-vivo characterization of a 3D hybrid scaffold based on PCL/ decellularized aorta for tracheal tissue engineering. **Materials Science & Engineering C**, v. 81, p. 74–83, 2017.

GOBIN, A. S.; FROUDE, V. E.; MATHUR, A. B. Structural and mechanical characteristics of silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 74, n. 3, p. 465–473, 2005.

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.

HAN, B. et al. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 65, n. 1, p. 118–124, 2011.

HANCOX, Z. et al. Scaffolds for tracheal tissue engineering. In: **Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume Two**. United Kingdom: Elsevier Ltd. p. 359–391, 2019.

HEATH, D. J.; ATKINS, L. B.; NORKUS, C. L. Respiratory Emergencies - Respiratory Physiology. In: NORKUS, C. L. (Ed.). . **Veterinary Technician's Manual for Small Animal Emergency and Critical Care**. Second Edi ed. p. 111–131, 2019.

HOEGGER, M. J. et al. Assessing mucociliary transport of single particles in vivo shows variable speed and preference for the ventral trachea in newborn pigs. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 111, n. 6, p. 2355–2360, 2014.

HSIEH, C. et al. 3D printing of tubular scaffolds with elasticity and complex structure from multiple waterborne polyurethanes for tracheal tissue engineering. **Applied Materials Today**, v. 12, p. 330–341, 2018.

JAEGER, J. M.; TITUS, B. J.; BLANK, R. S. Essential Anatomy and Physiology of the Respiratory System and the Pulmonary Circulation. In: **Principles and Practice of Anesthesia for Thoracic Sugery**. Springer N ed. Charlottesville, VA, USA:. p. 65–92, 2019.

JING, H. et al. Restoring tracheal defects in a rabbit model with tissue engineered patches based on TGF- β 3- encapsulating electrospun poly (l-lactic acid-co- ε -caprolactone)/ collagen scaffolds. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2018.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 12ª Edição ed. Rio de Janeiro-RJ: EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA., 2013.

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, out. 2015.

KIM, M. H.; PARK, W. H. Chemically cross-linked silk fibroin hydrogel with enhanced elastic properties, biodegradability, and biocompatibility. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 2967–2978, 2016.

KLAMT, A. P. et al. Conhecimento teórico prático dos fisioterapeutas sobre o manejo da pressão do balonete endotraqueal e suas complicações. **Revista Inspirar: Movimento & Saúde**, v. 19, n. 2, p. 1–19, 2019.

KNANEH-MONEM, H. et al. Differential epithelial growth in tissue-engineered larynx and trachea generated from postnatal and fetal progenitor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 510, n. 2, p. 205–210, 2019.

KOMATSU, D. 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.

KOMATSU, D. et al. Alternative Cutaneous Substitutes Based on Poly (L-co-D, L-lacyic acid-co-trimethylene carbonate) with Schinus terebinthifolius Raddi Extract Designed for Skin Healing. **ACS omega**, v. 4, n. 9, p. 18317–18326, 2019.

LEAL, C. V. et al. Characterization and in vitro evaluation of electrospun aligned-fiber membranes of poly (L-co-D, L-lactic acid). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 47657, p. 1–9, 2019.

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.

LEE, O. J. et al. Biodegradation behavior of silk fibroin membranes in repairing tympanic membrane perforations. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100, n. 8, p. 2018–2026, 2012.

LEVENTHAL, D. D.; KREBS, E.; ROSEN, M. R. Flexible Laser Bronchoscopy for Subglottic Stenosis in the Awake Patient. **Arch Otolaryngol Head Neck Surgery**, v. 135, n. 5, p. 467–471, 2009.

LI, G. et al. Establishing a tube foam scaffold for tracheal cartilage tissue engineering by using solvent casting/particulate leaching method. **Chinese Journal of Tissue Engineering Research**, v. 11, n. 31, p. 6278–6281, 2007.

LI, Z. H. et al. Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering. **Frontiers of Materials Science**, v. 7, n. 3, p. 237–247, 2013.

LIN, Y. et al. Tuning Chemical and Physical Cross-Links in Silk Electrogels for Morphological Analysis and Mechanical Reinforcement. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 2629–2635, 2013.

LOMBELLO, C.; REIS JR, G. M. DOS; COHEN, M. Estudo da viabilidade da cultura de condrócitos humanos visando aplicação clínica para o transplante autólogo*. **Einstein**, v. 1, p. 84–88, 2003.

MACEWEN, W. Clinical Observations on the Introduction of Tracheal Tubes by the Mouth Instead of Performing Tracheotomy or Laryngotomy. **The British Medical Journal**, v. 2, p. 122–124, 1880.

MADARIAGA, M. L.; GAISSERT, H. A. Secondary tracheal tumors: a systematic review. **Annals of Cardiothoracic Surgery**, v. 7, n. 2, p. 183–196, 2018.

MAGALHÃES, LANA. Cartilagem. **Toda Matéria.** (Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/cartilagem/>). Acesso em 22.06.2020.

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.

MALIKMAMMADOV, E. et al. **PCL and PCL-Based Materials in Biomedical Applications**. Taylor & Francis. v. 29, 2018.

MALUCELLI, Antonio Vendrami. Estenose e anel completo da Traqueia. **Estenose.** (Disponível em: <https://estenose.drmalucelli.com.br/traqueia/estenose-da-traqueia/#:~:text=Estenose%20da%20Traqueia%20e%20Anel,a%20pessoa%20ter%20sido%20intubada).>). Acesso em 22.06.2020.

MÁS, B. A. et al. Biological Evaluation of PLDLA Polymer Synthesized as Construct on Bone Tissue Engineering Application. **Materials Research**, v. 19, n. 2, p. 300–307, 2016.

MAUGHAN, E. F. et al. A comparison of tracheal scaffold strategies for pediatric transplantation in a rabbit model. **Laryngoscope**, v. 127, n. 12, p. E449–E457, 2017.

MEDEIROS, G. C. DE et al. Critérios para decanulação da traqueostomia: revisão de literatura. **CoDAS**, v. 1782, n. 6, p. 1–9, 2019.

MÉNDEZ, L. C.; CANO, J. R.; ARIAS, D. G. Evaluación de la fibroína de seda como biomaterial de soporte para el crecimiento de células mesenquimales estromales de pulpa dental. **Revista de Ciências Médicas**, v. 3, n. 1, p. 5–13, 2016.

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. Synthesis , Characterization , and Osteoblastic Cell Culture of Poly (L-co-D , L-lactide-co-trimethylene carbonate) Scaffolds. **International Journal of Biomaterials**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

MINNICH, D. J.; MATHISEN, D. J. Anatomy of the Trachea, Carina, and Bronchi. **Thoracic Surgery Clinics**, v. 17, p. 571–585, 2007.

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, n. May, p. 1–8, 2017.

MOL-Microscopia Online. Histologia - Sistema respiratório. **MOL-Microscopia Online.** (Disponível em: <http://mol.icb.usp.br/index.php/18-6-sistema-respiratorio/>). Acesso em 22.06.2020.

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 (Medellín, Colombia)**, v. 29, n. 2, p. 144–156, 2016.

MOTA, V. T. et al. Lipoma de traqueia simulando doença pulmonar obstrutiva. **Jornal Brasileiro de Pneumologia - Relato de Caso**, v. 36, n. 1, p. 152–155, 2010.

MOTTA, A. C. et al. In vitro and in vivo studies on devices of poly (L-co-D, L lactic acid)-co-TMC for bone repair. **Polymer Bulletin**, v. 75, n. 10, p. 4515–4529, 2018.

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

MOUSSA, E. A.; HASSAN, S. A. Histology and Scanning Electron Microscopy of the Lower Respiratory Tract in the Adult Red Fox (Vulpes vulpes). **International Journal of Morphology**, v. 33, n. 1, p. 267–274, 2015.

MULDER, E. L. W. DE; BUMA, P.; HANNINK, G. Anisotropic Porous Biodegradable Scaffolds for Musculoskeletal Tissue Engineering. **Materials**, v. 2, p. 1674–1696, 2009.

MYER III, C. M.; O’CONNOR, D. M.; COTTON, R. T. PROPOSED GRADING SYSTEM FOR SUBGLOTTIC STENOSIS BASED ON ENDOTRACHEAL TUBE SIZES. **Annals of Otology, Rhinology & Laryngology**, v. 103, n. 4, p. 319–323, 1994.

NAKAMURA, R. et al. Evaluation of Cilia Function in Rat Trachea Reconstructed Using Collagen Sponge Scaffold Seeded with Adipose Tissue-Derived Stem Cells. **The Anatomical Record**, v. 303, n. 3, p. 471–477, 2020.

NET NATURE. Bicho-da-seda e Aranhas - Propriedades Físicas, Químicas e Biológicas. **Net Nature.** (Disponível em: <https://netnature.wordpress.com/2018/03/09/bicho-da-seda-e-aranhas-propriedades-fisicas-quimicas-e-biologicas/>). Acesso em 17.07.2020.

NI, Y. et al. Radiologic and histologic characterization of silk fibroin as scaffold

coating for rabbit tracheal defect repair. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 139, p. 256–261, 2008.

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

OLIVEIRA, H. G. DE et al. Stent biodegradável em paciente com estenose recorrente após transplante de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia - Carta ao Editor**, v. 45, n. 5, p. 5–6, 2019.

OMORI, K. et al. Regenerative Medicine of the Trachea: The First Human Case. **Annals of Otology, Rhinology & Laryngology**, v. 114, n. 6, p. 429–433, 2005.

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

PAN, S. et al. Selection of the optimum 3D-printed pore and the surface modification techniques for tissue engineering tracheal scaffold in vivo reconstruction. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 107, n. 2, p. 360–370, 2019.

PARK, H. S. et al. A 4-Axis Technique for Three-Dimensional Printing of an Artificial Trachea. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 15, n. 4, p. 415–425, 2018.

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

PEREIRA, A. R. F. et al. Anafilaxia por polietilenoglicol em dieta parenteral. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia - ASBAI**, v. 2, n. 4, p. 463–466, 2018.

PINTEREST. Colapso de Traqueia. **Pinterest.** (Disponível em: (<https://www.pinterest.es/pin/411657222183301858/>). Acesso em 05.12.2020.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomaterials: Types, Applications, and Market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PORTINHO, D.; BOIN, V. G.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos Sobre o Tecido Ósseo e Cartilagem Articular Provocados Pela Imobilização e Remobilização em Ratos Wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 5, p. 408–411, 2008.

PUCHALSKI, J.; MUSANI, A. I. Tracheobronchial Stenosis Causes and Advances in Management. **Clinics in Chest Medicine**, v. 34, n. 3, p. 557–567, 2013.

QI, Y. et al. A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures. **International Journal of Molecular Science**, v. 18, n. 3, p. 237, 2017.

RADHAKRISHNAN, S. et al. Collagen Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Review. In: **Processes and Phenomena on the Boundary Between**

Biogenic and Abiogenic Nature. Springer Nature Switzerland. p. 3–22, 2020.

RAINS, J. K. et al. Mechanical properties of human tracheal cartilage. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 1, p. 219–225, 1992.

RAJA, T. I. et al. Nanoengineered biomaterials for tracheal replacement. In: **Nanoengineered Biomaterials for Regenerative Medicine**. United Kingdom: Elsevier Inc. p. 285–303, 2019.

RANDELL, S. H.; BOUCHER, R. C. Effective Mucus Clearance Is Essential for Respiratory Health. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 20–28, 2006.

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 (XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ)**, v. 1, n. 2, p. 8811–8818, 2015.

REIS, L. A. et al. Biomaterials in myocardial tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 10, p. 11–28, 2016.

RODRIGUEZ-VAZQUEZ, M. et al. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. **BioMed research international**, v. 2015, n. 821279, p. 1–15, 2015.

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. 0–1, 2017.

SAFSHEKAN, F. et al. Viscoelastic Properties of Human Tracheal Tissues. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 139, p. 1–9, 2017.

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.

SALMORIA, G. V. et al. Properties of PLDLA/bioglass scaffolds produced by selective laser sintering. **Polymer Bulletin**, v. 75, n. 3, p. 1299–1309, 2018.

SANTOS, D. J. DOS; TAVARES, L. B.; BATALHA, G. F. Mechanical and physical properties investigation of polyurethane material obtained from renewable natural source. **Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering**, v. 54, n. 2, p. 211–217, 2012.

SANTOS JR, A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 4, p. 308–317, 2007.

SANTOS, L. C. et al. The UV/H_2O_2 - photodegradation of poly(ethyleneglycol) and model compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, p. 1467–

1472, 2009.

SARGEANT, T. D. et al. Acta Biomaterialia An in situ forming collagen-PEG hydrogel for tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 124–132, 2012.

SCANLON, V. C.; SANDERS, T. **Essentials of Anatomy and Physiology - 5th ed.** F. A. Davi ed. Philadelphia - USA: p. 1–622, 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.

SHAVANDI, A. et al. Biomaterials Polyphenol uses in biomaterials engineering. **Biomaterials**, v. 167, p. 91–106, 2018.

SHROFF, G. S. et al. Pathology of the Trachea and Central Bronchi. **Seminars in Ultrasound, CT, and MRI**, v. 37, n. 3, p. 177–189, 2016.

SILVA, E. E F. et al. Engenharia tecidual de cartilagem articular com ênfase em odontologia. **Revista da Faculdade de Odontologia - RFO**, v. 20, n. 3, p. 372–379, 2015.

SILVESTRI, A. et al. Biomimetic Materials and Scaffolds for Myocardial Tissue Regeneration. **Macromolecular Bioscience**, v. 13, n. 8, p. 984–1019, 2013.

SINHORETI, M. A. C.; VITTI, R. P.; CORRER-SOBRINHO, L. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras Biomaterials in Dentistry: current view and future perspectives. **Revista da Associacao Paulista de Cirurgioes Dentistas**, v. 67, n. 3, p. 178–86, 2013.

SOUSA, I.; MENDES, A.; BÁRTOLO, P. J. PCL scaffolds with collagen bioactivator for applications in Tissue Engineering. **Procedia Engineering**, v. 59, p. 279–284, 2013.

SPINELLI, G. P. et al. Combined surgery and radiotherapy as curative treatment for tracheal adenoid cystic carcinoma: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 9, p. 1–5, 2019.

SUÁREZ-GONZÁLEZ, D. et al. Controlled nucleation of hydroxyapatite on alginate scaffolds for stem cell-based bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 95A, n. 1, p. 222–234, 2010.

SULTANA, N.; WANG, M. PHBV Tissue Engineering Scaffolds Fabricated via Emulsion Freezing / Freeze-drying : Effects of Processing Parameters. **International Conference on Biomedical Engineering and Technology,** v. 11, p. 29–34, 2011.

TENG, Z. et al. Anisotropic material behaviours of soft tissues in human trachea: An experimental study. **Journal of Biomechanics**, v. 45, n. 9, p. 1717–1723, 2012.

TSAI, M. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Evaluation of biodegradable

elastic scaffolds made of anionic polyurethane for cartilage tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 125, p. 34–44, 2015.

TURK, A. T.; WENIG, B. M. Pitfalls in the Biopsy Diagnosis of Intraoral Minor Salivary Gland Neoplasms: Diagnostic Considerations and Recommended Approach. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 21, n. 1, p. 1–11, 2014.

ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 49, n. 12, p. 832–864, 2011.

VARMA, R. et al. Optimal biomaterials for tracheal epithelial grafts: An in vitro systematic comparative analysis. **Acta Biomaterialia**, v. 81, p. 146–157, 2018.

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, S. et al. Surgical management of congenital tracheal stenosis associated with tracheal bronchus and congenital heart disease. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 49, p. 1201–1206, 2016.

WHITSETT, J. A.; ALENGHAT, T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 1, p. 27–35, 2015.

WILLIAMS, D. F. **The Williams dictionary of biomaterials**. Liverpool - UK: Liverpool University Press, 1999.

WU, H. et al. Multicomponent Reactions for Surface Modification. **Macromolecular Rapid Communication**, v. 1800064, p. 1–10, 2018.

WU, T. et al. Application of a bilayer tubular scaffold based on electrospun poly(L-lactide-co-caprolactone)/collagen fibers and yarns for tracheal tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 1, p. 139–150, 2017.

XIA, D. et al. Tissue-engineered trachea from a 3D-printed scaffold enhances whole-segment tracheal repair in a goat model. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 13, p. 694–703, 2019.

YAMAMOTO, K. et al. Meta-Analysis of Therapeutic Procedures for Acquired Subglottic Stenosis in Adults. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 91, n. 6, p. 1747–1753, 2011.

YILMAZ, E. N.; ZEUGOLIS, D. I. Electrospun Polymers in Cartilage Engineering — State of Play. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1–17, 2020.

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.

ZANG, M. et al. Decellularized Tracheal Matrix Scaffold for Tracheal Tissue Engineering: In Vivo Host Response. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 132, n. 4, p. 549–559, 2013.

ZHAO, Y.; SUN, Z. Effects of gelatin-polyphenol and gelatin–genipin cross-linking on the structure of gelatin hydrogels. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 3, p. 2822–2832, 2018.

ZHOU, C. et al. Silk Fibroin: Structural Implications of a Remarkable Amino Acid Sequence. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 122, n. March, p. 119–122, 2001.

ZHU, J.; MARCHANT, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. **Expert Review of Medical Devices**, v. 8, n. 5, p. 607–626, 2011.

ZIAS, N. et al. Post tracheostomy and post intubation tracheal stenosis : Report of 31 cases and review of the literature. **BCM Pulmonary Medicine**, v. 8, n. 18, p. 1–9, 2008.

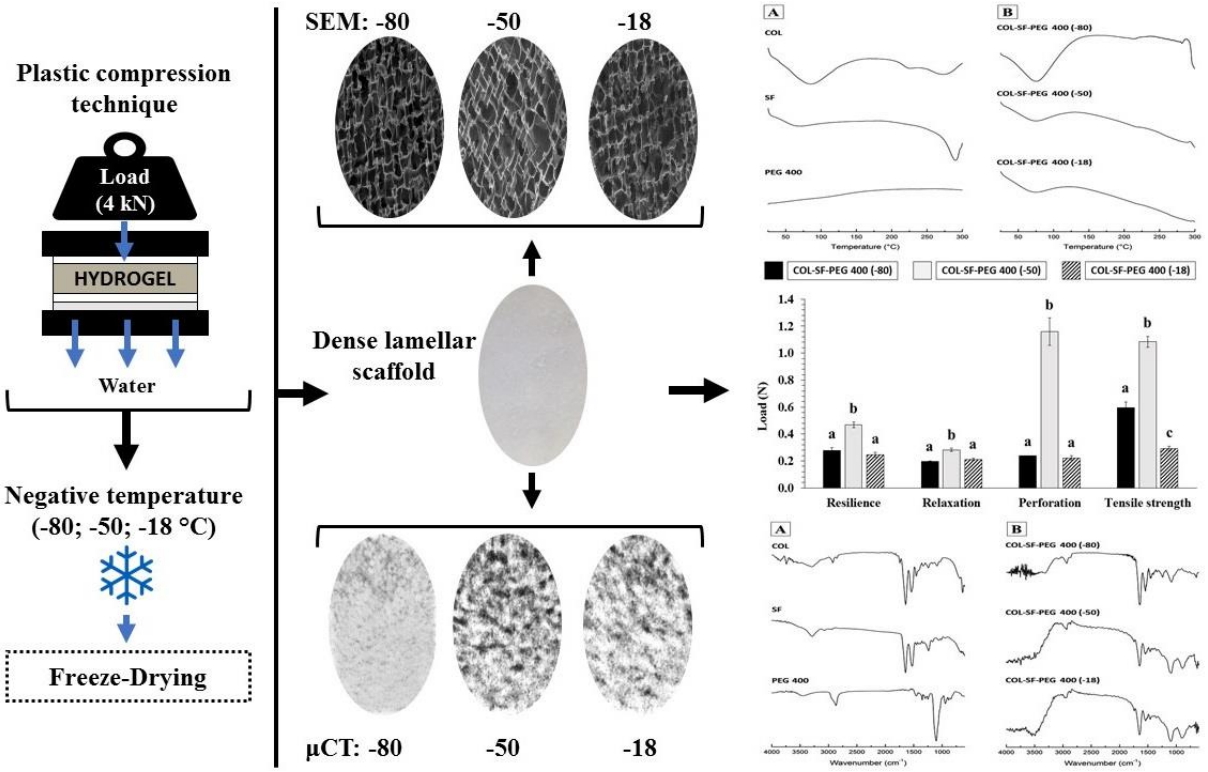
CAPÍTULO II

Dense lamellar scaffold the base of collagen, silk fibroin and polyethylene glycol 400: Evaluation of freezing parameters associated with plastic compression technique.

Abstract: The aim of this study was to investigate the influence of freezing parameters (-80, -50 and -18 °C) associated with the technique of plastic compression and freeze-drying in the development of dense lamellar scaffolding based on collagen (COL), silk fibroin (SF) and polyethylene glycol 400 (PEG 400), as well as to characterize the physicochemical, mechanical and morphological properties. Fourier transform infrared spectroscopy and exploratory differential calorimetry indicated crosslinking exerted by the PEG molecules with the other polymers, causing changes in the structure of the COL, in addition to β-sheet conformations induced by lyophilization in the SF structure. Morphological analyzes showed changes in pore size, interconnectivity and volume. The freezing significantly modulated the anisotropic degree, obtaining anisotropic (-18 °C), partially anisotropic (-50 °C) and isotropic (-80 °C) scaffolds. The scaffolds showed similar swelling values after 120 hours, however, a lower rate of biodesintegration was confirmed by the scaffold COL-SF-PEG 400 (-80). The freezing rate also changed the mechanical properties, showing greater resistance to the scaffold COL-SF-PEG 400 (-50), except for elasticity. Considering the results of this study, the different freezing rates were able to modulate scaffolds with unique characteristics and of interest for potential tissue engineering applications, with emphasis on obtaining anisotropic or isotropic structures.

Keywords: Plastic compression; freeze-drying; dense lamellar scaffold; freezing; collagen.

Graphical Abstract



1. INTRODUCTION

The application of natural and synthetic biomaterials has been extensively investigated in tissue engineering, a multidisciplinary field that evolves together with the science of biomaterials and biomedicine, with the purpose of promoting healing and ideally the regeneration of tissue structures, reestablishing the relationships functional, mechanical and physiological properties quickly and self-reconstructively (GUIMARÃES *et al*., 2016; VÁZQUEZ; MARTÍNEZ, 2019).

For this, tissue engineering develops protocols such as the technological processing of biocompatible materials to obtain scaffold, commonly defined as a porous, temporary and biodegradable three-dimensional (3D) matrix capable of mimicking the characteristics of the extracellular matrix (ECM), providing an adequate microenvironment for adhesion, proliferation and cell orientation, thus assisting in the formation of new tissue (DA SILVA *et al*., 2020; GHAFARI *et al*., 2019).

The choice of the most suitable biomaterials for the manufacture of scaffolds must meet some requirements, in order to minimize possible negative effects on the organism. In addition, the chemical composition must induce chemotaxis (a process in which the orientation of cells towards a chemical stimulus changes), stimulate cell proliferation and coordinate the synthesis of ECM (GUIMARÃES *et al*., 2016).

Among the various biomaterials for the development of scaffolds, COL has been increasingly used as a natural substrate for cells in several biomedical applications, as it is the most prevalent biomolecule in ECM, being present in bones, tendons, cartilages, veins, skin, teeth, muscles and the horny layer of the eyes (RADHAKRISHNAN *et al*., 2020; SILVA; PENNA, 2012). Its main characteristics include favorable fibrous structure, excellent biocompatibility, biodegradability, hydrophilicity and providing a biomimetic environment for cell growth (MOHSENI *et al*., 2017).

Together with COL, SF and PEG biomaterials have also been investigated as candidates for applications in tissue engineering. In this case, it has been reported that the mechanical strength and resistance to degradation of the COL structure are increased by the combination with SF. Due to its prominent characteristics, such as excellent environmental stability, biocompatibility, biodegradability and adjustable mechanical properties (FENG *et al*., 2019; MÉNDEZ; CANO; ARIAS, 2016).

PEG is a linear synthetic homopolymer formed from ethylene glycol, presenting excellent water solubility, biodegradability and non-toxic. Because it has a terminal

hydroxyl group (OH) in its structure, PEG can be readily modified by functional groups, which justifies its use as a plasticizer, surfactant, or colloidal stabilize (CHANG *et al*., 2017; CÔRTES *et al*., 2013; SANTOS *et al*., 2009). When incorporated into COL for the technological processing of hydrogels, the matrix acquires other properties that favor cell adhesion, growth and proliferation (CHAN *et al*., 2012).

In addition to the characteristics of biomaterials, the success of a device related to obtaining and applying scaffolds depends directly on the manufacturing method used, combined with a deep knowledge of the anatomy, morphology, histology and physiology of the tissue or organ to be regenerated (KHORSHIDI *et al*., 2015).

However, a standard production method for generating complex 3D structures with controlled microarchitecture remains a major challenge. The freeze-drying technique (or lyophilization) is used in methods to create bioactive scaffolds with porous microarchitecture and normally used only to generate structures with flat 3D geometries (BROUGHAM *et al*., 2017). Another potential technique is plastic compression, which consists of one-dimensional compression, where highly hydrated polymeric gels collapse against the rigid and porous support, forming a relatively dense gel layer (lamella) on the support. Thus, at the microstructural level, the highly hydrated gel abruptly transitions to a dense layer, resulting in a multilayer model (ALVES *et al*., 2018; SERPOOSHAN *et al*., 2013). Thus, the combination of techniques appears as a promising alternative for obtaining acellular scaffolds based on hydrogel and with controlled porous microarchitecture.

The objectives of this study were to evaluate the effects of freezing parameters (-80, -50 and -18 °C) after applying plastic compression of collagen-based hydrogels, silk fibroin and polyethylene glycol 400. Followed by the lyophilization technique to obtain dense lamellar scaffold, as well as to evaluate and characterize the mechanical, morphological properties, swelling capacity and *in vitro* biodesintegration rate.

2 MATERIALS E METHODS

2.1 Materials

The collagen powder, extracted from bovine hides, were supplied by NovaProm Food Ingredients Ltda. (São Paulo, Brazil), purified water (18.2 MΩ. cm^{-1}), polyethylene glycol 400 (Dinâmica. São Paulo, Brazil) and silk fibroin from *Bombyx mori* (the cocoons of the silkworm was used to extract the silk fibroin). The other reagents were of pharmaceutical grade.

2.2 Methods

2.2.1 Extraction of Fibroin silk

The process of extracting the *Bombyx mori* silk fibroin was prepared adapted from Komatsu *et al*., (2017). Briefly, the silkworm cocoons were cut into small pieces and added in aqueous Na_2CO_3 solution (0.5 wt %) and kept at 120 °C for 15 minutes in an autoclave (80 Kps). In this process, the extraction of sericin occurs from the cocoons, and subsequently, the silk fibroin was completely washed with purified water to extract the residues of the sericin and dried in an oven at 50 °C for 24 hours. The degummed silk fibroin was dissolved in 1 L of a ternary solution of $CaCl_2.2H_2O/CH_3CH_2OH/H_2O$ (mole ratio 1: 2: 6) at 85 °C, this dispersion was filtered and dialyzed on a cellulose membrane with a molecular weight limit of 14,000 Da, for 3 days on a magnetic stirrer (Quimis scientific devices, 241.2, São Paulo, Brazil) to produce the fibroin solution. The final concentration of fibroin was about 2 to 3% by weight, which was determined by weighing the remaining solid after drying.

2.2.2 Preparation of the COL-SF-PEG 400 hydrogel

The hydrogel formulation was prepared based on a dispersion of COL in purified water (18.2 MΩ. cm^{-1}). The hydrodispersible polymers SF and PEG 400 were dispersed in the aqueous solution of COL, following a percentage ratio of 5: 1: 1.25 (w/w/w). The polymeric mixture was stirred until complete homogenization. Thereafter, the final formulation pH was adjusted to 10, using a 2M NaOH solution. The dispersion obtained was stored in cylindrical plastic containers (internal diameter = 21 mm and height = 11 mm) and incubated at 10 ± 2 °C for 24 hours for polymerization.

2.2.3 Preparation of dense lamellar scaffold by plastic compression technique

The dense lamellar scaffold was obtained by the plastic compression technique of the COL-SF-PEG 400 hydrogel, using a hydraulic press (Shimadzu, SSP - 10th. Kyoto, Japan), according to the technique described by our group in a previously published article (ALVES *et al*., 2018) with changes in the freezing temperature of the matrices. The hydrogel was placed between layers of nylon mesh (50 µm) and metal mesh, applying a compression tension with a load of 4 kN applied for 10 min in order to remove water and produce a dense biomaterial with improved biological and mechanical properties. After hydrogel compression, the polymeric matrix obtained was frozen at determined temperatures of -80, -50 and -18 °C for 24 hours and later

lyophilized (Liofilizador - L101, Liotop, São Paulo, Brazil). Obtaining three distinct dense lamellar scaffolds.

2.2.4 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The FTIR spectra were obtained by LabSolutions software IR s.v.2.10 (Shimadzu, IRAffinity-1, Kyoto, Japan). The stretches of the chemical bonds of the main functional groups of each molecule making up the sample were determined by an attenuated total reflectance (ATR) over the range between 4000 and 600 cm^{-1} at 4 cm^{-1} resolutions, averaging 128 scans. The scaffold samples were carefully manipulated and put on the ATR-8200HA support before each analyze.

2.2.5 Differential scanning calorimetry (DSC)

The thermic events were obtained using DSC (Thermal Analyzer TA 60WS, DSC-60, Shimadzu, Kyoto, Japan). A sample of 2 mg was packed in a hermetically crimped aluminum pan, and heated under dry nitrogen purged at 50 $mL.min^{-1}$. The samples were from 25 to 300 °C at a rate of 10 $°C/min^{-1}$. In the tests, the components, the lyophilized scaffolds, and hydrated scaffolds were characterized.

2.2.6 Scanning electron microscopy (SEM)

SEM photographs were obtained using a scanning electron microscope (JSM-IT200, JEOL, Tokyo, Japan) with an accelerating electrical voltage of 15 kV and beam current of 100 pA. All scaffold samples were affixed to an aluminum sample holder using double-sided carbon adhesive tape, and the scaffolds were electrically conducted with a thin layer of gold per metallizer (DII-29010SCTR Smart Coater, JEOL, Tokyo, Japan), spraying for 4 minutes at 3 mA.

2.2.7 Computed microtomography (μCT)

The pore morphometric characteristics, pore size, interconnectivity, porosity (%) and degree of anisotropy of the scaffolds were determined by computed microtomography (μCT). The image of the scaffolds was captured by X-Ray microtomography (Brucker-micro CT - SkyScan 1174, Kontich, Belgium) with a high-resolution scanner, with 28 mM pixel and 1.7s integration time. The X-ray source was 34 keV of energy and 790 mA of current. The X-ray was filtered through an Al filter. The projections were acquired in a 180º range with an angular step of 1º rotation. 3D virtual models, representative of various regions of the scaffolds were created,

visualized and recorded. The data were treated mathematically by the CT Analyzer v.1.13.5 software (REBELO *et al*., 2016).

2.2.8 Mechanical properties

Texture profile analysis (TPA) was performed to measure the mechanical properties (elasticity, resilience, relaxation, drilling, and tensile strength) of the scaffolds using a texture analyzer (Stable Micro Systems - TA-XT Plus, Surrey, UK) in the analyses were performed using a load cell of 5 Kg. For the tests, the scaffolds were hydrated in water for 1 hour and used with an area of 6 cm^2. Test velocity was defined for rate of 2 $mm.s^{-1}$ for drilling and tensile strength test and 0.5 $mm.s^{-1}$ for elastic modulus, resilience and relaxation test. In all tests, a force of 0.098 N was used. (n = 3).

2.2.9 Swelling efficiency

The swelling efficiency study follows the method described by Alves *et al*. (2019) with modifications in the incubation time and diameter of the scaffolds. The scaffold was cut into a square format (1 cm^2), weighed and then immersed in 3 mL of PBS pH 7.4 (phosphate buffered saline) at 37 ± 1 °C for up to 120 hours. As described at different times (24, 48, 72, 96 and 120 hours), the scaffold was removed and different measures were taken to assess the ability to retain PBS liquid. The first measurement aimed to assess the ability of the scaffold structure as a whole (i.e., the material itself in together with the pore system) to absorb PBS. For this, at each moment, the samples were removed from the liquid, shaken gently, and weighed without dripping (Wwd). The second measurement was carried out after pressing and "drying" the same scaffold embedded between sheets of filter paper to remove the PBS stuck in its porous structure (Wwp). In this way, the swelling capacity of the scaffold material itself was determined. The scaffold was then dried at 37 ± 1 °C until it reached constant weight (Wd). The percentage of liquid uptake, in both cases, was calculated as shown (Equation 1):

$$Fluid\ uptake\ of\ scaffold\ (\%) = \left(\frac{Ww - Wd}{Wd}\right) \times 100 \qquad (1)$$

Where Ww represents Wwd or Wwp, and Wd is a dry scaffold. Each sample was measured in triplicate.

2.2.10 *In vitro* biodesintegration study

The *in vitro* biodesintegration study follows the method described by Alves *et al*. (2019) with modifications in the incubation time and diameter of the scaffolds. The blends were hydrated in PBS pH 7.4 (phosphate buffered saline) at 37 ± 1 °C to assess their degree of desintegration. The blends were cut into a square shape (1 cm^2), weighed before the desintegration study (Wd') and then immersed in 3 ml PBS at 37 ± 1 °C for 120 hours. At different times (24, 48, 72, 96 and 120 hours), they were removed, washed in a large volume of deionized water to remove buffer salts and dried at 37 ± 1 °C until a constant mass was reached. Finally, the samples were weighed (Wa) and the weight loss percentage was calculated as follows (Equation 2):

$$Weight\ loss\ (\%) = 100 \times \left(\frac{Wd' - Wa}{Wd'}\right) \quad (2)$$

The pH value of the PBS was measured at each time point using a pH-meter (Tecnal, TE-5, Piracicaba, Brazil). Each sample was measured in triplicate.

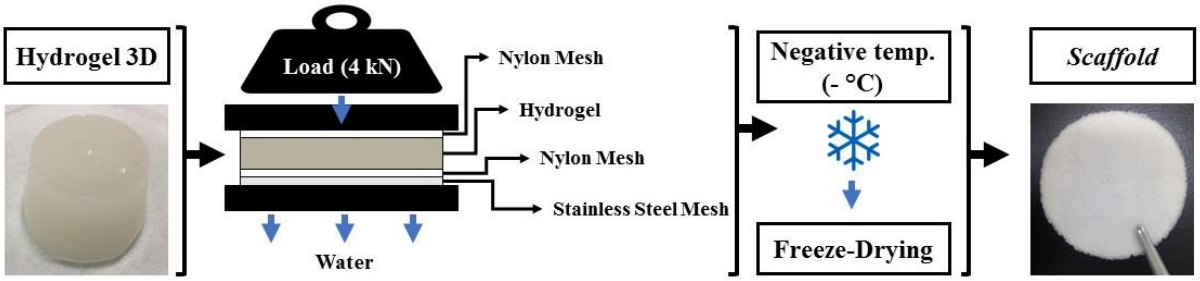
2.2.11 Statistical analysis

The main results were presented with their standard deviation. The statistical significance of the difference in the parameters was determined using ANOVA followed by the Tukey test. When p value of < 0.05 the difference of results was considered statistically significant.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The polymeric dispersion of COL-SF-PEG 400 after the incubation period generated a three-dimensional, homogeneous hydrogel, showing resistance to manipulation and white coloring, as observed in Figure 1. The hydrogels were subjected to plastic compression and directed to freezing at specific temperatures (-80, -50, and -18 °C), obtained in three groups of samples.

Figure 1. Graphical representation of obtaining dense lamellar scaffold using the plastic compression technique.



The compression process causes the overlapping of the lamellae, in addition to the partial removal of the water used as a solvent, it is removed to aid in the formation of channels between the lamellae. However, the percentage of residual water still present in the formulations, during freezing causes the reorganization of the polymer chains by the movement and growth of the ice crystals, which are solidifying, resulting in the conditioning of the polymer chains in the matrix. This process provides the scaffold with a unique porous architecture, in which the degree of porosity is almost a replica of the solvent crystallography (ABBAS *et al*., 2020; BROUGHAM *et al*., 2017). Then, the lyophilization process eliminates the ice crystals formed in the matrix structure. The mesoscale analysis of the scaffold obtained by the plastic compression technique (Figure 1), showing a stable and uniform physics, indicating that the technique used was efficient to obtain the scaffolds.

3.1 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

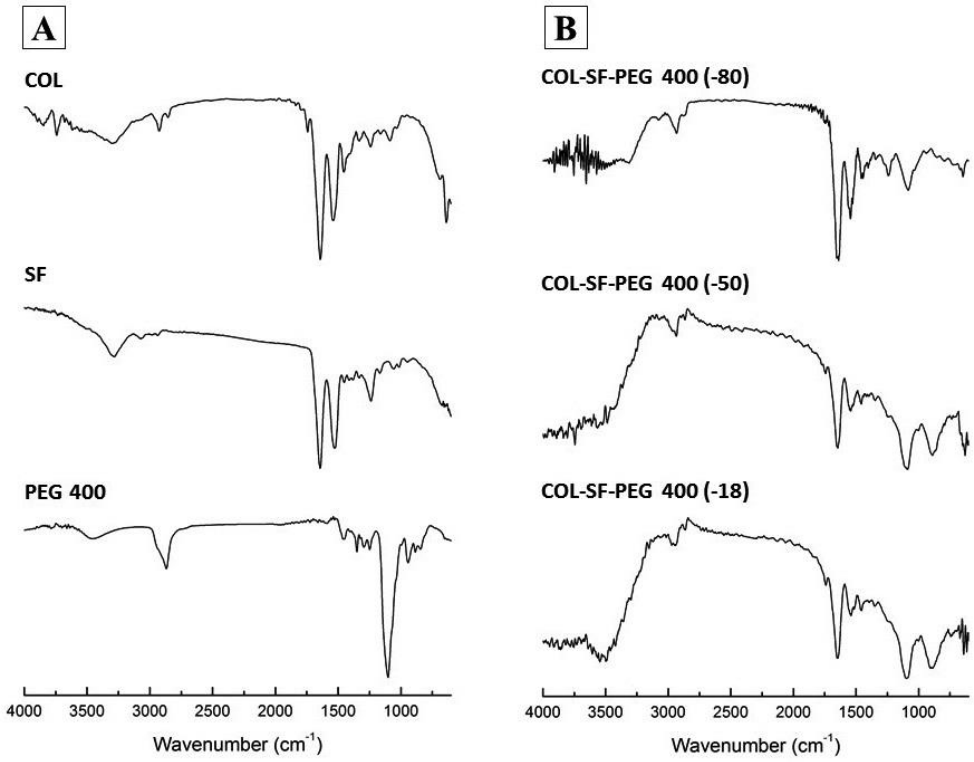
The results of the infrared spectra of the characteristic groups of the raw materials used and of the scaffold formulations are shown in Figure 2 (A-B). The possible chemical interactions were evaluated between the polymers. The COL is a protein basically composed of the amino acids glycine, hydroxyproline, and proline. In this way, the characteristic peaks of the protein in 1242 cm^{-1} typical of amide III can be observed, referring to the C–N stretch and the N–H deformation, 1537 cm^{-1} typical of the amide II, attributed to the vibrations in the plane of the N–H bond and the C–N stretch, the peak in 1648 cm^{-1} typical of amide I, referring to carbonyl elongation C=O and in 3302 cm^{-1} correspondings to the OH group (SLIMANE; SADOK, 2018).

The chemical structure of the SF was evidenced with peaks at 1238 cm^{-1} which corresponds to amide III, which is associated with the N–C stretch, 1527 cm^{-1} referring to amide II, which originates from the N–H deformation, conformation characteristics

of silk I (α-helix and random coil), in 1643 cm^{-1} corresponds to amide I, with the elongation of group C=O and 1527 cm^{-1} (amide II), corresponding to the structural conformation of silk II (β-sheets), finally at 3284 cm^{-1} assigned to the OH group (ALVES; ARANHA; CHAUD, 2018; PANICO; PALADINI; POLLINI, 2018).

In the PEG 400 spectrum, characteristic peaks can be observed in the 1103 cm^{-1} regions corresponding to the C–O–C group, 2868 cm^{-1} attributed to the CH_2 group elongation and 3452 cm^{-1} referring to the OH group (PEREIRA *et al*., 2016).

Figure 2. FTIR spectra of components (A) and scaffolds (B). Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C).



With the incorporation of SF and PEG to form scaffolds [COL-SF-PEG 400 (-80), COL-SF-PEG 400 (-50) and COL-SF-PEG 400 (-18)] based on COL (Figure 2-B), it was possible to observe similar peaks of COL, together with other groups characteristic of raw materials. The observed peaks correspond to the amides I, II, and III of the COL and SF, in relation to the PEG the C–O–C group was observed. However, the peaks are presented with slight displacements and partial or total overlaps, which indicate chemical interactions between the components.

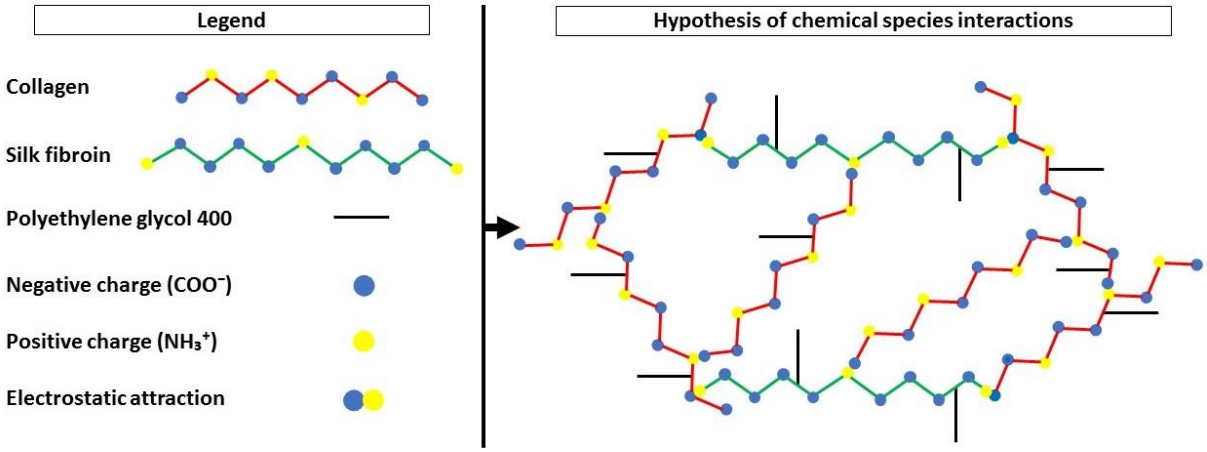
Another observed fact was the appearance of a distinct peak at 1236 cm^{-1} in the formulation COL-SF-PEG 400 (-80), in relation to the formulations COL-SF-PEG 400 (-50) and COL-SF-PEG 400 (-18) a distinct peak was observed in the region of 889

cm^{-1} and 885 cm^{-1}, respectively. The appearance of a new peak in the FTIR spectrum suggests the origin of another chemical group in the molecular structure, a fact that can be attributed to the temperature gradient used in the manufacture of each scaffold, imposed during the nucleation and growth phase of the ice crystals.

These changes observed in the transmittance intensities related to the amides of the scaffolds, indicate that these groups are involved in the crosslinking reaction. According to Radhakrishnan *et al*. (2020) the main chemical structures responsible for the crosslinking of COL are the amine and carboxylic groups.

In this case, the molecular structure of COL and also SF favor chemical interactions due to the reaction pH (pH 10) for the production of scaffolds, due to the amphoteric characteristic, influencing the structure of the molecule and changing the surface charge of proteins (ACHILLI; MANTOVANI, 2010; YAN *et al*., 2019). Based on the isoelectric point of these components, the SF presented between pH 3.6–5.1 (HAWLEY; JOHNSON, 1930), whereas the COL isoelectric point presented between pH 7–8 (LEÓN-LÓPEZ *et al*., 2019). The correction of the reaction pH above the isoelectric point of the proteins causes the prevalence of negative charges. As shown in figure 3.

Figura 3. Hypothesis of interactions between the chemical species of dense lamellar scaffolds.



With the prevalence of charges of each protein, which may result in interactions by electrostatic attraction with the carboxylic group (COO^-) and the amino group (NH_3^+) between COL–COL, COL–SF, and SF–SF, in addition to the performance of PEG 400 molecules as a plasticizing agent establishing hydrogen bonds.

3.2 Differential scanning calorimetry (DSC)

Differential scanning calorimetry (DSC) was performed to characterize the thermal events of each component and to evaluate the effect of the incorporation of SF and PEG on the thermal stability of the scaffolds. Thermograms are shown in Figure 4 (A-C).

The COL thermogram also showed three thermal events, the first at 85.74 °C (onset: 39.75 °C and end set: 124.75 °C) with ΔH = -203.80 J/g, this event is related to water loss absorbed in the fibers, due to the increase in temperature that promotes the breaking of cross-links that stabilize the native structure of the protein, causing denaturation (T_d) (TONHI; PLEPIS, 2002), the second thermal event is attributed to a glass transition (T_g) with specific C_P equivalent to 226.85 °C (onset: 217.41 °C and end set: 231.98 °C), observed from the displacement of the baseline (ALVES *et al*., 2018), the third event was observed at 272.64 °C (onset: 253.73 °C and end set: 290.72 °C) with ΔH = -27.02 J/g, suggesting the thermal decomposition of the protein.

Two thermal events were observed in the SF, the first at 69.08 °C (onset: 44.40 °C and end set: 88.90 °C) with ΔH = -58.36 J/g, attributed to water evaporation, while the second event was observed in 290.89 °C (onset: 273.18 °C and end set: 300 °C) with ΔH = -154.84 J/g, is assigned for thermal decomposition of the material (PHAM; SAELIM; TIYABOONCHAI, 2018).

The PEG 400 did not present a thermal event in the temperature range (25 to 300 °C) evaluated. However, in a study by Bertasi *et al*. (2015) an endothermic peak was observed for PEG 400 related to polymer melting at about 5 °C, after this temperature, no other events were recorded.

Figure 4. DSC thermograms curves of the components (A), scaffolds (B) and hydrated scaffolds (C). Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C).

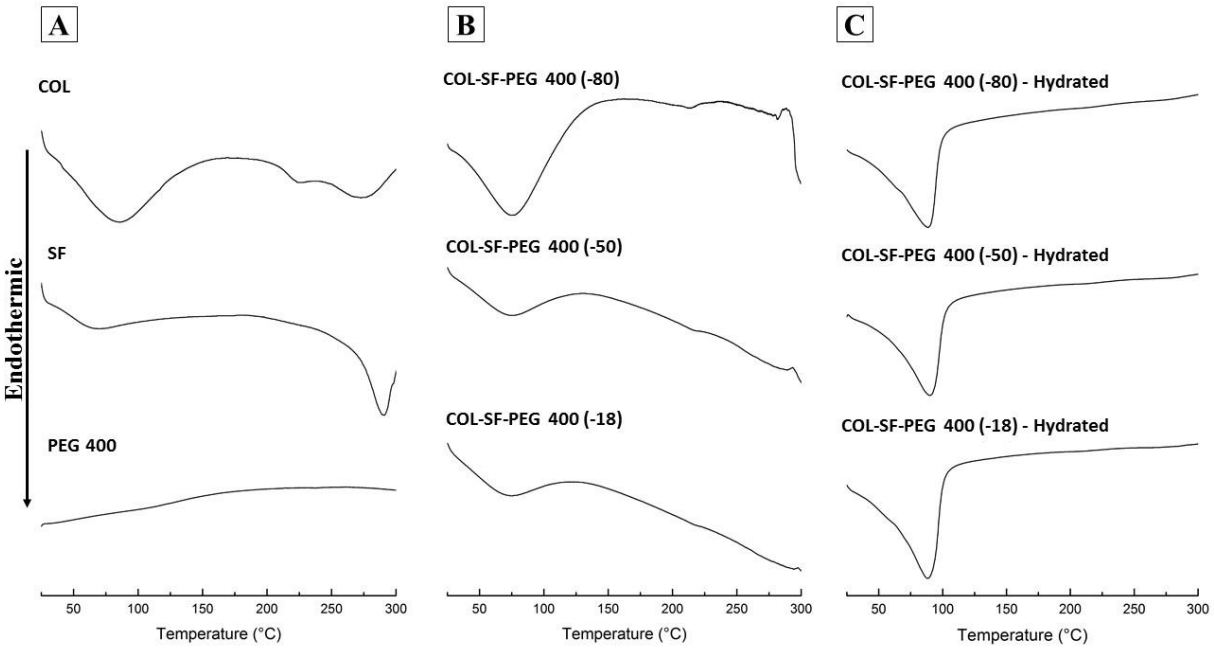


Figure 4 (B-C) shows the thermogram of the scaffolding. Through calorimetric analysis, it was possible to measure the T_d and the enthalpy of the scaffolds, a measure that corresponds to the crosslinking density present in the formulation. The numerical results of the DSC are shown in Table 1.

Table 1. Temperature denaturation (T_d) and enthalpies (ΔH) of dense lamellar scaffolds. Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C).

	T_d (°C)	**Onset (°C)**	**End set (°C)**	**ΔH (J/g)**
COL-SF-PEG 400 (-80)	75.31	40.26	102.04	-163.13
COL-SF-PEG 400 (-50)	75.24	43.69	109.90	-153.65
COL-SF-PEG 400 (-18)	74.28	43.96	107.13	-129.61
COL-SF-PEG 400 (-80) – Hydrated	88.52	56.96	98.08	-948.15
COL-SF-PEG 400 (-50) – Hydrated	90.07	65.94	100.95	-917.72
COL-SF-PEG 400 (-18) – Hydrated	88.25	63.04	100.03	-1040.00

The COL-SF-PEG 400 (-80) scaffold showed a T_d of 75.31 °C with an enthalpy of -163.13 J/g, while COL-SF-PEG 400 (-50) showed the same at 75,24 °C and -153.65 J/g. In the COL-SF-PEG 400 (-18) scaffold, T_d and the change in enthalpy occurred at 74.28 °C and -129.61 J/g. Compared to COL alone, a reduction in T_d and enthalpy was

observed in all formulations, regardless of the freezing temperature used for processing the scaffolds. This result states that the incorporation of SF and PEG 400 caused a reduction in COL values, for T_d around 10.80 °C ± 0.58 and enthalpy around 55 ± 17.28 J/g. In addition, a reduction in T_g (226 °C) is observed in the scaffold thermograms, associated with a transition from the helix to the coil, indicating the extent of the crosslinking (ALVES *et al*., 2019). This is because the triple helix present in the COL structure is held together by hydrogen bonds and the crosslinking stabilizes the helical structure, allowing the formation of intra and intermolecular networks (BIGI *et al.*, 2002; GOVINDARAJAN *et al.*, 2017).

Thus, the changes evidenced in T_d, enthalpy and T_g, reaffirm the results presented by FTIR, indicating a new structural rearrangement of COL with SF through electrostatic attraction between the functional chemical groups. In addition, the plasticizing action exerted by the PEG 400 molecules occurs because the COL and SF chains are not interconnected by strong covalent primary forces, which allows their free sliding over each other (CANEVAROLO JR, 2002), even in the face of the formation of an immiscible blend between the polymers, the control of the electrostatic attraction exerted by the PEG 400 in the sliding of the chains favors the balance of the system.

In order to better understand the physical-chemical behavior of the scaffolds for in vivo application, the samples were hydrated and also characterized by thermal DSC testing (Figure 4-C and Table 1).

Comparing the thermoanalytical curves of the scaffolds before and after hydration, it was possible to observe that the peaks of the hydrated samples are better defined than those observed in the initial samples (lyophilized). In addition, the thermal event of T_g (226 °C) was not observed, showing a reduction in T_g and C_P due to increased water activity in the scaffolding structure.

In the thermoanalytic curves of the scaffolds obtained at freezing temperatures of -80, -50 and -18 °C, the T_d values were recorded at an average of 74.94 °C ± 0.58 (Table 1). However, after hydration, the scaffolds had an increase in T_d values of 14.00 °C ± 0.81, another considerable increase was observed in the enthalpy values. The greatest variation in enthalpy after hydration was recorded in the scaffold obtained at -18 °C (ΔH -129.61 → ΔH -1040.00), followed by the scaffold at -80 °C (ΔH -163.13 → Δ H -948.15) and scaffolding - 50 °C (ΔH -153.65 → ΔH -917.72), respectively.

These results show the influence of the water activity contained in the hydrated scaffolds, exercised by means of adsorption in the three-dimensional and porous structure of the scaffolds.

3.3 Scanning electron microscopy (SEM)

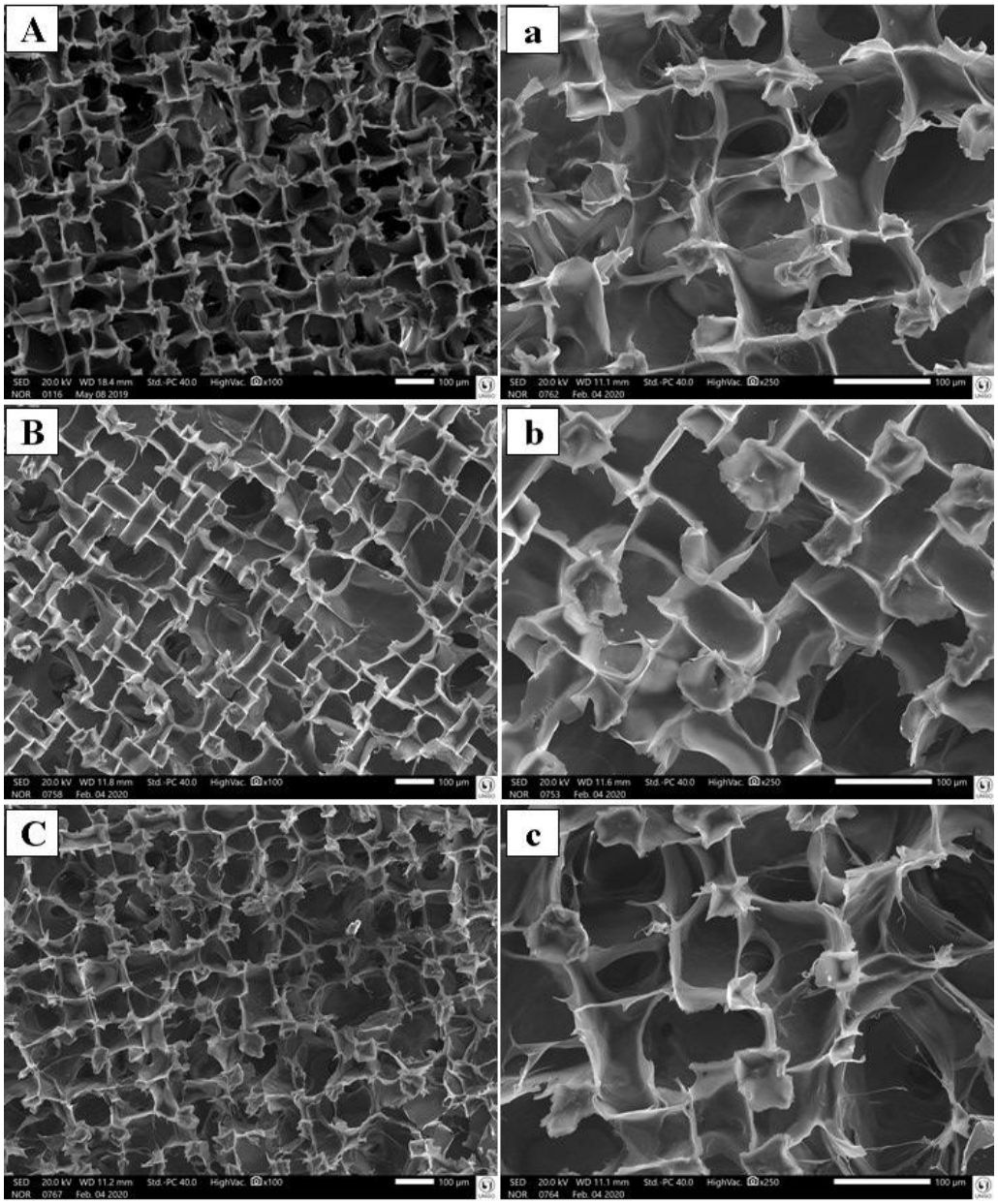
One of the important parameters in the characterization of scaffolds is their morphological nature, evaluating their surface and internal porosity, interconnectivity, and pore size (FARIA; MARTIN; ALVES, 2017).

Figure 5 shows the morphological evaluation of scaffolds manufactured in different temperature gradients, imposed during the nucleation phase, and the growth of ice crystals in polymeric dispersions. Through SEM analysis it was possible to observe that the scaffolds have a regular surface structure, affirming a homogeneous dispersion of the hydrogel even after the plastic compression process.

SEM micrographs also confirmed the formation of pores with rectangular geometry, distributed over the surface structure of the scaffolds, indicating that the lyophilization process was efficient in removing the ice crystals by reducing the pressure of the chamber to induce sublimation, leading to the formation of the porous structure (DAVIDENKO et al., 2012).

The characteristics of the surface structure of a biomimetic material or device is a crucial factor, directly influencing the behavior of cells, aiding their adhesion (BERNER *et al*., 2014).

Figure 5. SEM of the scaffolds COL-SF-PEG 400 (-80) (A-a), COL-SF-PEG 400 (-50) (B-b) and COL-SF-PEG 400 (-18) (C-c). Magnification of A-C is 100x, and a-c is 250x.



In our study, the morphology of the upper face of the scaffolds showed highly porous microstructures in all evaluated magnifications, the micrographs of COL-SF-PEG 400 (-80) (Figure 5 A-a) showed pores with size distributions between 69.8 - 97.3 µm. For COL-SF-PEG 400 (-50) (Figure 5 B-b) pore distributions with sizes between 73.7 - 121.8 µm were presented, in the scaffold COL-SF-PEG 400 (-18) (Figure 5 C-c) distributions were presented of pores with sizes between 84.3 - 134 µm.

In view of the influence of temperature gradients on the freezing of scaffolds, it was possible to verify changes in the formation and size of pores, caused by the difference in heat transfer rates during the process of growth of ice crystals, since the

reduction in temperature gradient causes a general low entropy in the scaffold structure, which leads to rapid self-assembly of the crystals at more negative temperatures, resulting in pores with smaller and more uniform diameters (DAVIDENKO et al., 2012; PAWELEC et al., 2014).

In this respect, the ability to modulate the pore diameter is an important factor, as pores with adequate sizes are essential for the growth of new tissue, because nutrients, oxygen, and residues must be able to diffuse through the pores and can be transported from and for cells (MA *et al*., 2014).

According to Ikada (2006), the ideal pore size for tissue engineering applications is in the range between 100-500 µm. However, it has been reported in the literature that the pore size for the growth of chondrocytes applied in the repair of cartilaginous tissue is between 70-120 µm (GRIFFON et al., 2006).

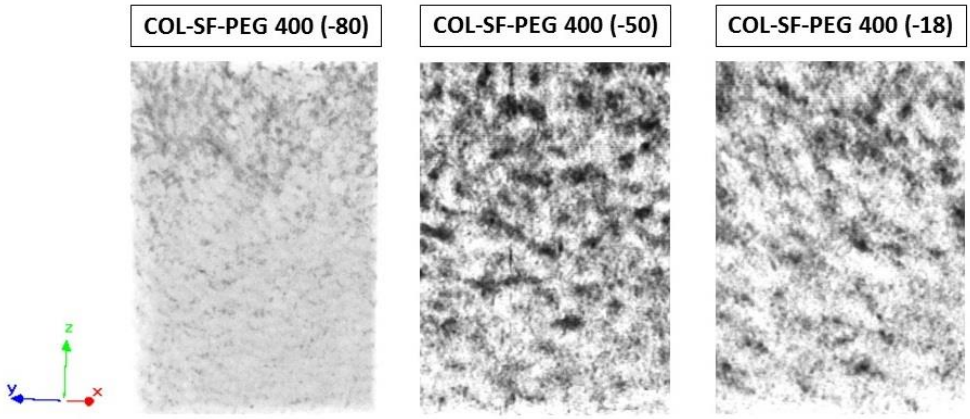
Zeng *et al.* (2014) concluded that pore diameters between 80-120 µm were capable of better growth and ECM synthesis. In another study, carried out by Jonnalagadda; Rivero; Dertien (2015) four scaffolds with pore sizes of 19, 38, 54, and 117 µm were manufactured. Bovine chondrocytes were used for in vitro culture, demonstrating that in addition to cell adhesion and proliferation, the formation of MEC occurred with the secretion of glycosaminoglycans (GAG) in the scaffolds, with greater expression in the pore structure with 117 µm than in relation to the other diameters evaluated.

These results confirm that the pore size obtained in the structure of the dense lamellar scaffolds developed in this study is viable for adhesion, proliferation, and formation of ECM of the cartilaginous tissue.

3.4 Computed microtomography (µCT)

The 3D morphometric analysis by µCT presented in Figure 6 (A-C) reaffirmed the previous results, observed by SEM, in addition to the porous surface structure, the scaffolds showed the formation of a multidirectional porous structure, confirming pore interconnectivity of 60.83%, 62.62% and 66.76% for the COL-SF-PEG 400 (-80), COL-SF-PEG 400 (-50) and COL-SF-PEG 400 (-18) scaffolds, respectively (Table 2). One of the main reasons why pore interconnectivity is important, why cells depend on these pathways in their permeability and orientation by structure, which by mimicking the environment of the native ECM helps in cell proliferation (BERNER *et al*., 2014; MA *et al*., 2014).

Figure 6. Morphological characteristic of dense lamellar scaffolds evaluated by µCT. Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C).



The evaluation also made it possible to measure the volume of open pores and the percentage of closed pores (Table 2). These characteristics showed variations between the scaffolds, evidencing the influence of the freezing temperature, observing greater variation when comparing the extremes -80 and -18 °C, with a pore volume of 12.97 and 1.61 mm^{-3}, and percentage of closed pores of 0.19 and 0.11%, respectively. The COL-FS-PEG 400 (-50) scaffold presented an open pore volume of 2.31 mm^{-3} and a closed pore percentage of 0.13%. The results obtained by SEM and µCT showed differences in each formulation, these characteristics (size, volume, and interconnectivity of pores) can affect the mechanical properties of the scaffolds, which is a decisive factor when they are implanted in load-bearing areas (JIA *et al*., 2013).

Table 3. Morphometric data of dense lamellar scaffolds. Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C).

	COL-SF-PEG 400 (-80)	**COL-SF-PEG 400 (-50)**	**COL-SF-PEG 400 (-18)**
Total VOI volume (mm^{-1})	21,33	3,69	2,41
Pore interconnectivity (%)	60.83	62.62	66.76
Volume of open pores (mm^{-3})	12.97	2.31	1.61
Open porosity (%)	60.75	62.57	66.72
Closed porosity (%)	0.19	0.13	0.11
Degree of anisotropy	0.40	0.68	0.92

Another characteristic evaluated by µCT is the anisotropic degree of the scaffolds, this degree can vary from 0 (completely isotropic structure) to 1 (completely anisotropic structure) (SILVA *et al*., 2014). The anisotropic degree of the tissue and, therefore, of the scaffolds, is a parameter of great importance, since the organization

of ECM fibers within the tissues can vary from an isotropic structure (randomly aligned, uniform binder availability) to an anisotropic structure (fiber alignment, directional amplification of binder density) (KONAR *et al*., 2020).

In a study by Asuncion; Goh; Toh (2016), in addition to freezing temperatures (-20, -30 and -80 °C), the obtaining of scaffolds by unidirectional freezing was investigated, and it was observed that variations in freezing parameters changed the structures of the scaffolds, influencing the achievement of isotropic or anisotropic structures.

In our study it was also possible to obtain different values of anisotropic degree of the scaffolds through the difference in a temperature gradient, however, applying a multidirectional freeze. The COL-SF-PEG 400 (-80), COL-SF-PEG 400 (-50) and COL-SF-PEG 400 (-18) scaffolds showed values of 0.40, 0.68, and 0.92 respectively, indicating that the temperature is an important parameter in the modulation of this characteristic, resulting in isotropic (-80 °C), partially anisotropic (-50 °C) and anisotropic (-18 °C) scaffolds.

3.5 Mechanical properties

From a biomechanical point of view, suitable mechanical properties for a scaffold to be used in tissue engineering applications are critical factors for success and should mimic the specific characteristics of native tissue. In this way, a balance between the morphological and mechanical properties of the scaffolds is necessary to suit the final application.

The freeze-drying technique allows not only to model natural and synthetic materials in specific geometries with a porous architecture but also to adapt their structural and biological properties (BROUGHAM *et al*., 2017).

Figure 7 and Figure 8 show the results of the mechanical properties of the COL-SF-PEG 400 (-80), COL-SF-PEG 400 (-50), and COL-SF-PEG 400 (-18) scaffolds obtained by plastic compression, using different freezing ranges. Through the analysis of the results obtained in Young's module, it was possible to verify large variations in the elasticity values of the scaffolds ($p < 0.05$), with two extremes being observed in view of the freezing temperatures used. The COL-SF-PEG 400 (-18) scaffold showed high stiffness (10969.86 ± 756.54 Pa), while the stiffness presented by COL-SF-PEG 400 (-80) was 4399.60 ± 214.66 Pa.

Figure 7. Mechanical properties of elasticity (Young's modulus) of dense lamellar scaffolds. Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C). Equal letters indicate that there is no significant difference between the mean values ($p > 0.05$). (n = 3).

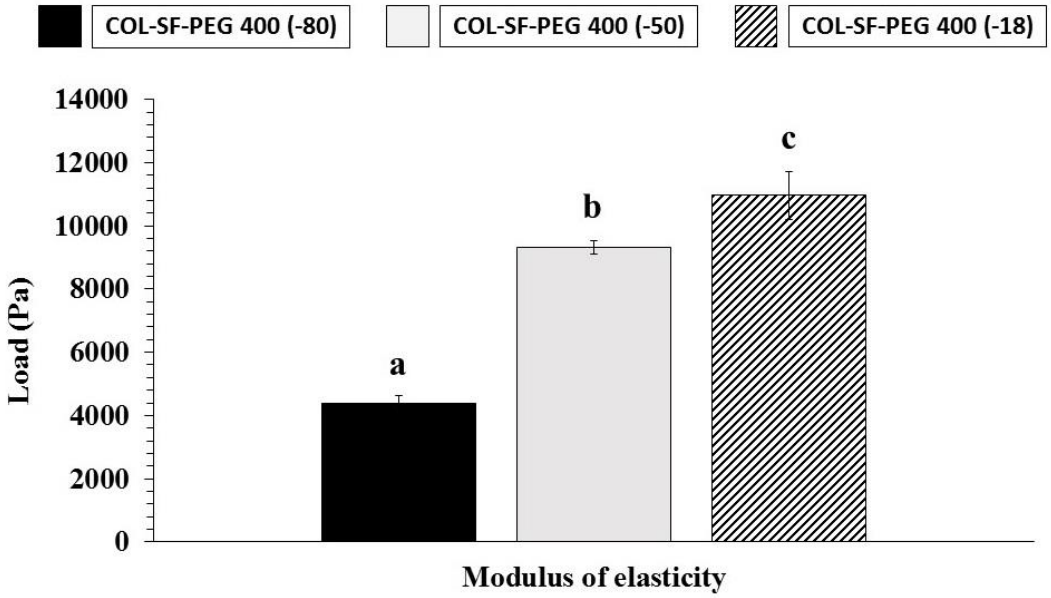
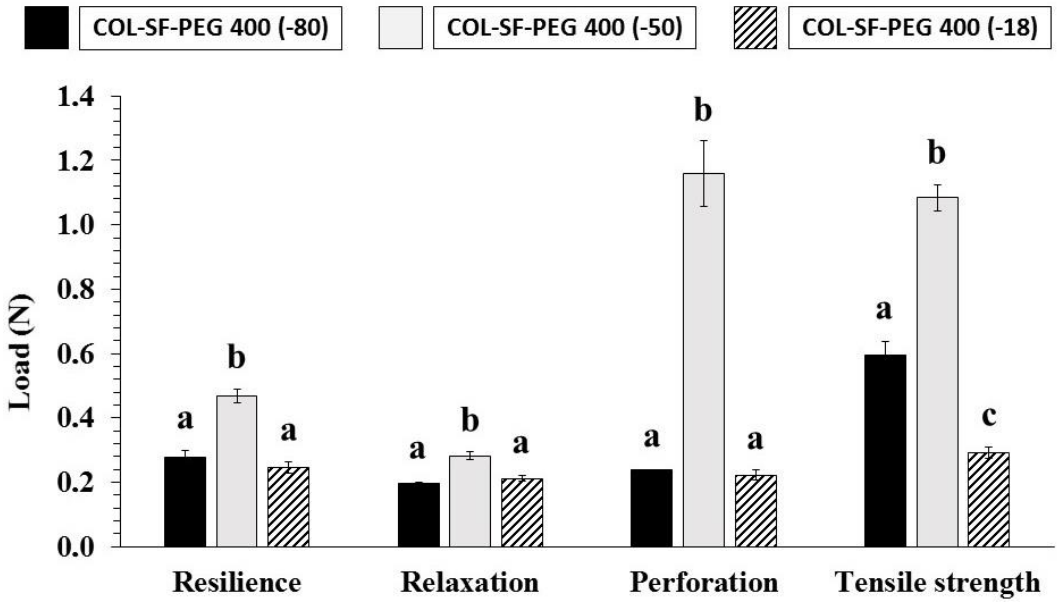


Figure 8 shows the results of the resilience, relaxation, drilling, and tensile strength tests of the scaffolds. In these tests, the COL-SF-PEG 400 (-50) scaffold showed better results ($p < 0.05$). While the COL-SF-PEG 400 (-80) and COL-SF-PEG 400 (-18) scaffolds showed similar values ($p > 0.05$) in the tests of resilience, relaxation, drilling, the only exception was the tensile strength, where COL-SF-PEG 400 (-80) presented the highest resistance value ($p < 0.05$).

Figure 8. Mechanical properties of dense lamellar scaffolds. Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C). Equal letters (for the same analysis) indicate that there is no significant difference between the mean values ($p > 0.05$). (n = 3).



The mechanical properties were altered due to the specific freezing temperature for each scaffold, each freezing condition promotes great impacts on the material structure. When frozen at extremely low temperatures they result in the rapid formation of ice cores and the growth of small ice crystals. However, when the freezing process is carried out at higher temperatures (-20 °C), the nucleation of the ice is slow and the cores tend to grow larger ice crystals (QIAN; ZHANG, 2011). Because the size, porosity, and interconnectivity of the pores resulting from the crystallography of ice in each scaffold (Figure 5, Figure 6**,** and Table 2) are highly related to their mechanical properties (O'BRIEN, 2011).

Another characteristic that can influence the mechanical properties of scaffolds is the anisotropic degree, due to the conditioning of the polymeric structure during the formation of ice crystals. The highest values in the properties of resilience, relaxation, perforation and tensile strength were presented by the scaffold obtained with a freezing rate of -50 °C, presenting an anisotropic degree with organization of 0.68.

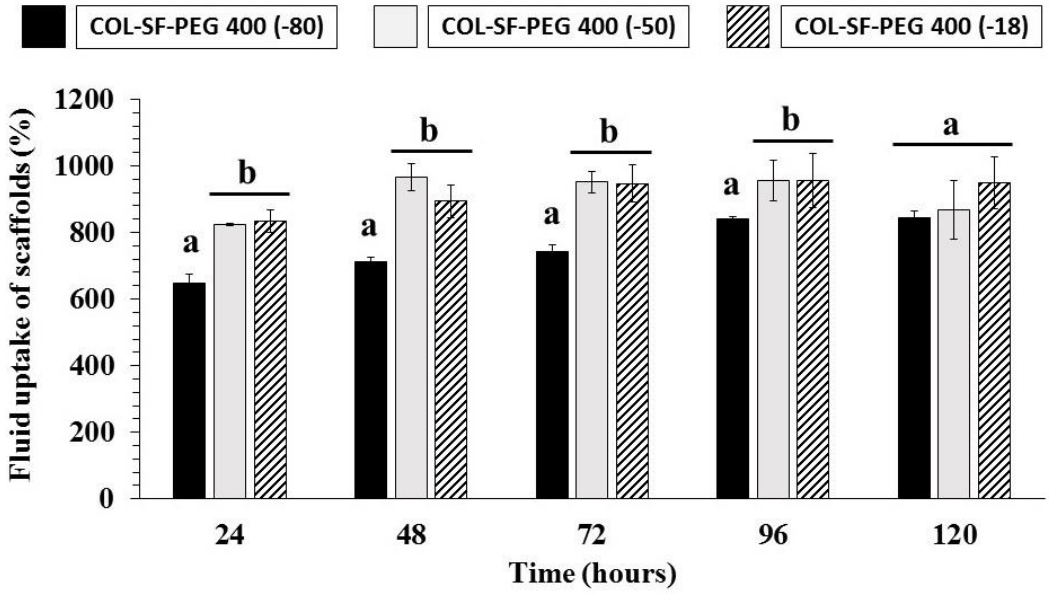
When a scaffold has intrinsic porosity (nanopores) it allows the diffusion of biological fluids, however, its size is not large enough to allow cellular migration to the matrix. Although a macroporous scaffold allows cell proliferation and growth within the matrix, it can result in reduced mechanical properties (SHAN *et al*., 2019).

3.6 Swelling efficiency

The swelling profile is an important parameter to evaluate the properties of scaffolds in potential terms for applications in tissue engineering. Because scaffolds will come into close contact with blood and other body fluids when they are used. Thus, an adequate swelling profile may allow, in addition to the absorption of body fluids, the transfer of signaling molecules and cellular nutrients into the scaffold matrix (HE *et al*., 2018; TAN *et al*., 2020).

The swelling capacity (%) of the COL-SF-PEG 400 (-80), COL-SF-PEG 400 (-50) and COL-SF-PEG 400 (-18) scaffolds in PBS (pH 7.4 at 37 °C) was obtained for 120 hours, as shown in Figure 9 and Figure 10. The Figure 9 shows the swelling profiles related to the fluid retained both throughout the scaffold structure (matrix + pores), while Figure 10 shows the swelling profiles by the scaffold material itself (matrix).

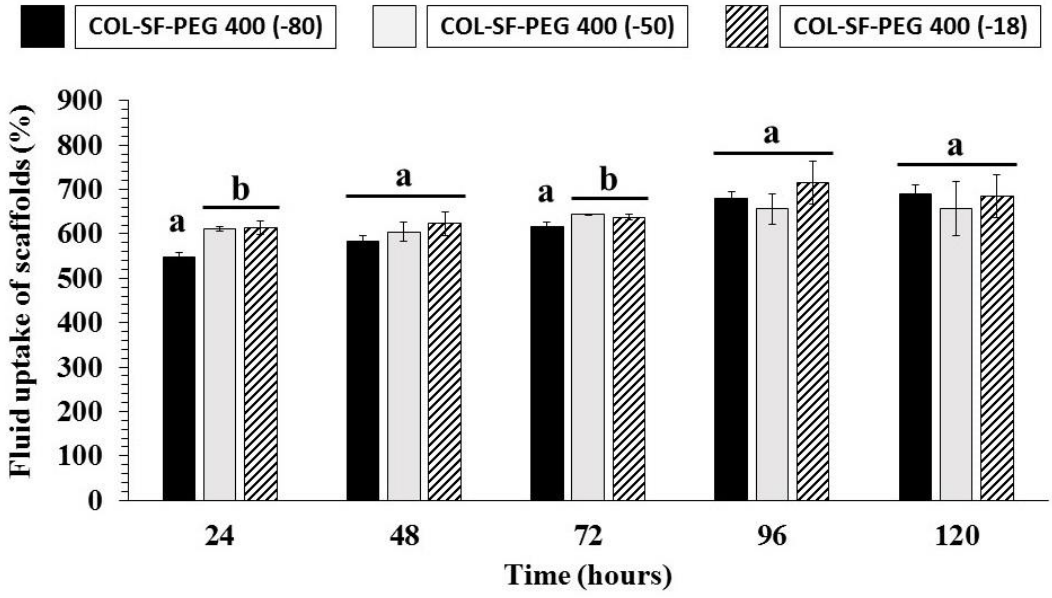
Figure 9. Fluid uptake of dense lamellar scaffolds (%) fluid retained by the whole scaffold structure in PBS (pH 7.4 at 37 °C). Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C). Equal letters indicate that there is no significant difference between the mean values ($p > 0.05$). (n = 3).



By analyzing the profiles of the scaffolds (matrix + pores) it was possible to verify that the capture of PBS in the formulation COL-SF-PEG 400 (-80) was a gradual process over time, this result is highly linked to each structure porous obtained by scaffolds due to the variation of the freezing temperature in the formation of ice crystallography. However, after 120 hours of immersion in PBS, the values did not show statistically significant differences ($p > 0.05$).

Figure 10 shows the PBS uptake values by the scaffolds, indicating that greater amounts of absorbed fluid are in the scaffolds' own material (matrix), reaffirming the influence of the porous structure. However, after 96 hours of immersion, statistically different values were no longer shown ($p > 0.05$).

Figure 10. Fluid uptake of dense lamellar scaffolds (%) by the scaffold material itself in PBS (pH 7.4 at 37 °C). Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400. Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C). Equal letters (for the same analysis) indicate that there is no significant difference between the mean values ($p > 0.05$). (n = 3).



For the scaffold itself, it is likely that the hydrophilic nature of the components influences the amount of PBS absorbed by the scaffold matrix. However, a factor that can reduce the hydrophilic nature of the components, is the crosslinking process, since the terminal groups (amino groups and carboxylic acids) involved in the water connection are consumed during the crosslinking process (GROVER; CAMERON; BEST, 2012).

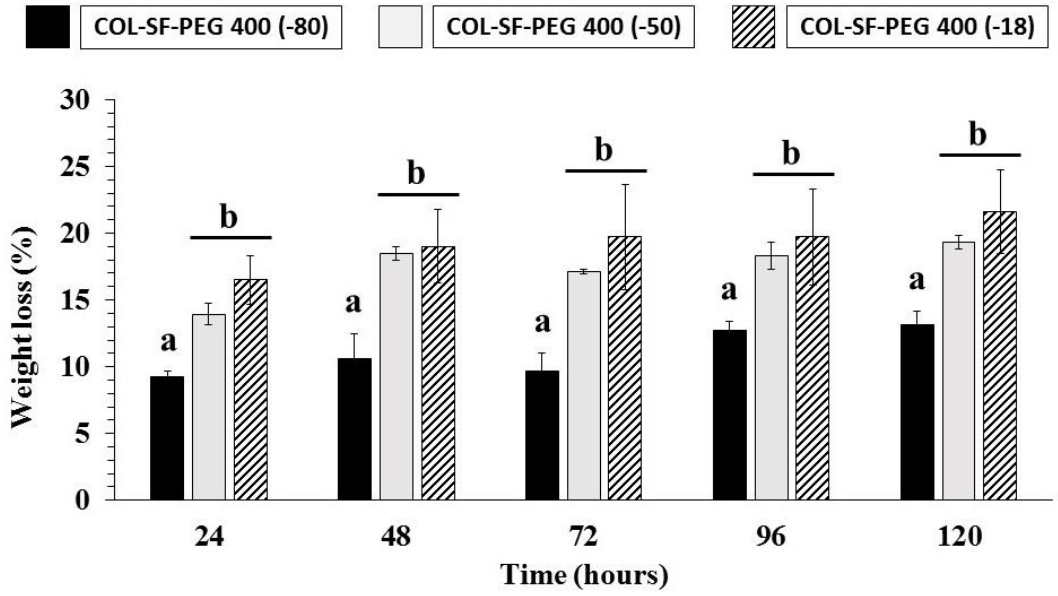
3.7 *In vitro* biodesintegration study

The biodesintegration rate of the scaffolds is correlated with the surface and internal geometric and morphological structure, as well as the hydrophilic characteristics of the materials. For scaffold application, it is recommended that the structure starts to degrade when the tissue of interest starts to regenerate and it is preferable that the scaffold maintains the porous constitution of the matrix, even if the scaffold mass is reduced during the process (UTOMO *et al*., 2019).

The *in vitro* biodesintegration study of the COL-SF-PEG 400 (-80), COL-SF-PEG 400 (-50) and COL-SF-PEG 400 (-18) scaffolds in PBS (pH 7.4 at 37 °C) was obtained for 120 hours, as shown in Figure 11.

The analysis of the results showed that the mass loss profiles (%) of all scaffolds based on COL-SF-PEG 400 exhibit increasing biodesintegration as a function of the study time. The COL-SF-PEG 400 (-50) and COL-SF-PEG 400 (-18) scaffold showed a similar biodesintegration profile throughout the study ($p > 0.05$). Whereas the COL-SF-PEG 400 (-80) scaffold presented lower values of mass loss during 120 hours when compared with the other scaffolds ($p < 0.05$).

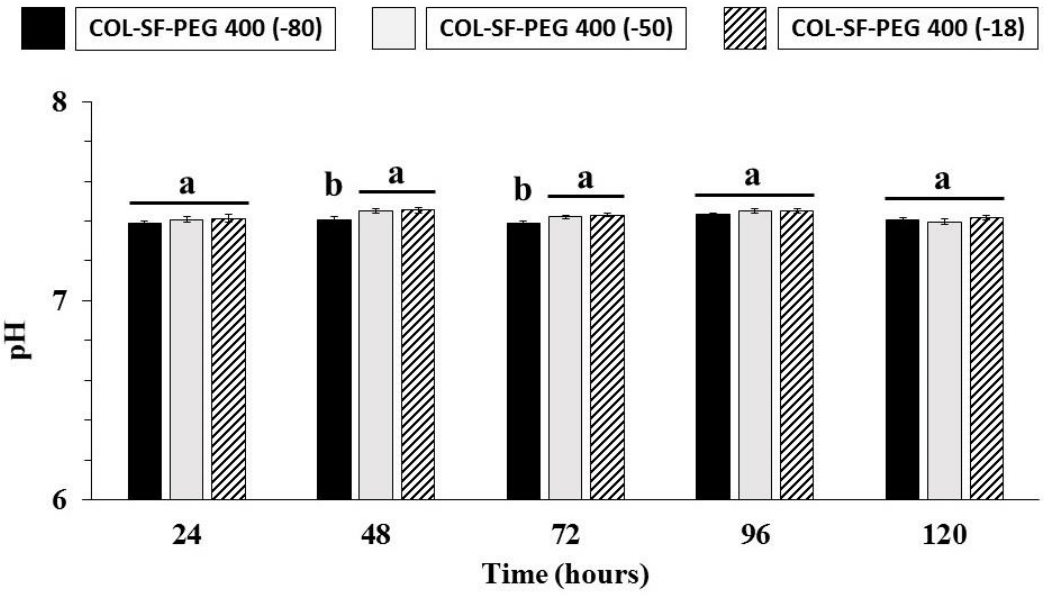
Figure 11. Weight loss (%) of dense lamellar scaffolds in PBS (pH 7.4 at 37 °C). Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C). Equal letters indicate that there is no significant difference between the mean values ($p > 0.05$). (n = 3).



The basic composition of these scaffolds favors better biodesintegration results, due to the crosslinking exerted by the PEG 400 molecules since an effective crosslinking is an important point in the control of the biodesintegration time (JIA *et al*., 2013). In addition, the incorporation of SF combined with the freeze-drying process results in the allowed conformational transition from α-helix and random coil to highly stable β-sheet structures (ALVES; ARANHA; CHAUD, 2018), these changes are considered responsible for excellent physical properties from the SF and one more determining factor for the biodesintegration of scaffolds (ASUNCION; GOH; TOH, 2016).

During the in vitro biodesintegration study with the scaffolds, the hydrolytic degradation did not cause a large variation in the pH value (Figure 12), which was maintained in a range of 7.39 and 7.45 over 120 hours of study.

Figure 12. pH of dense lamellar scaffolds in PBS at 37 °C. Collagen (COL); Silk fibroin (SF) and Polyethylene glycol 400 (PEG 400). Freezing temperatures (-80, -50 and -18 °C). Equal letters indicate that there is no significant difference between the mean values ($p > 0.05$). (n = 3).



Thus, by studying the biodesintegration of the scaffolds, it was possible to verify the influence of the chemical and morphological characteristics of the matrix, obtained by the variables in the freezing parameters of the formulations, indicating that the scaffolds with smaller pores and low anisotropic degree showed lower values of loss of weight. However, regardless of the parameters studied, both scaffolds did not show sudden changes in pH, an important result, since in tissue regeneration processes, the acid-base balance is essential for the remodeling process (MOLDERO *et al*., 2020). These confirmed changes are extremely important, added to the biodesintegration rates, as it is necessary to ensure that the scaffold's biodesintegration is compatible with the time of formation of new tissues. When the rate of desintegration is very slow, tissue formation will be obstructed. However, if the rate of desintegration is very fast, the mechanical stability of the scaffold and the developing tissue will be compromised (ZULKIFLI *et al*., 2014).

4 CONCLUSION

The plastic compression technique is efficient to produce the dense lamellar scaffold, associated with the experimental freezing conditions for the application of freeze-drying were shown to be able to modulate the morphological characteristics, swelling capacity, biodesintegration rate and the mechanical properties of the scaffolds. The characterization of FTIR shows chemical interactions between polymers, the use of PEG 400 in the formulation acts as a plasticizer. In addition to the allowed conformational transition of the α-helix and the random coil for β-sheet structures. The analysis of DSC thermograms reaffirmed the occurrence of chemical interactions, promoting a new structural conformation of the protein, resulting in changes in the denaturation temperature. The images captured by μCT and SEM show that the scaffolds have a porous surface structure, with pore interconnectivity, however, the freezing temperatures modulate the anisotropic degree, resulting in anisotropic (-18 °C), partially anisotropic (-50 °C) and isotropic (-80 °C) scaffolds. The effect of the freezing temperature changed the swelling capacity and the rate of biodesintegration, as well as the mechanical properties of resilience, relaxation, perforation, tensile strength and elasticity (Young's modulus), higher values, were evident for the scaffold COL-SF-PEG 400 (-50), except for elasticity. Considering the results obtained in this study, we confirm that the freezing parameters associated with plastic compression and freeze-drying techniques are capable of significantly modulating the morphological, intumescent, biodesintegrable and mechanical properties of dense lamellar scaffolds based on collagen, silk fibroin and polyethylene glycol 400, resulting in scaffolds with characteristics of interest for potential applications in tissue engineering, highlighting the conformation of anisotropic and isotropic structures.

5 References

ACHILLI, M.; MANTOVANI, D. Tailoring Mechanical Properties of Collagen-Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering: The Effects of pH, Temperature and Ionic Strength on Gelation. **Polymers,** v. 2, p. 664–680, 2010.

ABBAS, Y. et al. Generation of a three-dimensional collagen scaffold-based model of the human endometrium. **Interface Focus - The Royal Society Publishing**, v. 10, n. 20190079, p. 1–11, 2020.

ALVES, T. F. R. et al. Dense Lamellar Scaffold as Biomimetic Materials for Reverse Engineering of Myocardial Tissue: Preparation, Characterization and Physiomechanical Properties. **Journal of Material Science & Engineering**, v. 07, n. 05, p. 1–9, 2018.

ALVES, T. F. R.; ARANHA, N.; CHAUD, M. V. Mechanical stress and thermal treatments induced alpha-helix to beta-sheet transition in Silk Fibroin films. **International Journal of Drug Reseach and Technology**, v. 8, n. 3, p. 149–157, 2018.

ASUNCION, M. C. T.; GOH, J. C.; TOH, S. Anisotropic silk fi broin /gelatin scaffolds from unidirectional freezing. **Materials Science & Engineering C**, v. 67, p. 646–656, 2016.

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.

BERTASI, F. et al. Electrochimica Acta Single-Ion-Conducting Nanocomposite Polymer Electrolytes for Lithium Batteries Based on Lithiated-Fluorinated-Iron Oxide and Poly (ethylene glycol) 400. **Electrochimica Acta**, p. 1–11, 2015.

BIGI, A. et al. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**, v. 23, p. 4827–4832, 2002.

BROUGHAM, C. M. et al. Freeze-Drying as a Novel Biofabrication Method for Achieving a Controlled Microarchitecture within Large, Complex Natural Biomaterial Scaffolds. **Advanced Healthcare Materials**, v. 6, n. 1700598, p. 1–7, 2017.

CANEVAROLO JR, S. V. **Ciência dos Polímeros - Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 3º Edição ed. São Paulo: Artliber editora, 2002.

CHAN, B. K. et al. Robust and Semi-Interpenetrating Hydrogels from Poly (ethylene glycol) and Collagen for Elastomeric Tissue Scaffolds. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, n. 11, p. 1490–1501, 2012.

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.

CÔRTES, 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.

DA SILVA, K. et al. 3D Printing of Extracellular Matrix (ECM)-Mimicking Scaffold: A Critical Review of the Current ECM Materials. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, p. 1–27, 2020.

DAVIDENKO, N. et al. Biomimetic collagen scaffolds with anisotropic pore architecture. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 2, p. 667–676, 2012.

FARIA, P. C. DE; MARTIN, A. A.; ALVES, N. P. Caracterização no Infravermelho (IV) e Eletrônica de superfície (MEV) de membranas assimétricas à base de Poli (acrilonitrila-co-acetato de vinila). **Revista Matéria**, v. 22, n. 01, p. 1–12, 2017.

FENG, X. et al. Influence of pore architectures of silk fibroin/collagen composite scaffolds on the regeneration of osteochondral defects in vivo †. **Journal of Materials Chemistry B**, p. 1–15, 2019.

GHAFARI, R. et al. Fabrication and characterization of novel bilayer scaffold from nanocellulose based aerogel for skin tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 796–803, 2019.

GOVINDARAJAN, D. et al. Fabrication of Hybrid Collagen Aerogels Reinforced with Wheat Grass Bioactives as Instructive Scaffolds for Collagen Turnover and Angiogenesis for Wound Healing Applications. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 20, p. 16939–16950, 2017.

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

GRIFFON, D. J. et al. Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 313–320, 2006.

GUIMARÃES, F. B. A. P. et al. Síntese sol-gel de scaffolds porosos de vidro bioativo com adição de agente porogênico. **Cerâmica**, v. 62, p. 328–337, 2016.

HAWLEY, T. G.; JOHNSON, T. B. The Isoelectric Point of Silk Fibroin. **Industrial and Engineering Chemistry,** v. 22, n. 3, p. 297–299, 1930.

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

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of The Royal Society Interface**, n. 3, p. 589–601, 2006.

JONNALAGADDA, J. B.; RIVERO, I. V.; DERTIEN, J. S. In vitro chondrocyte

behavior on porous biodegradable poly (e-caprolactone)/polyglycolic acid scaffolds for articular chondrocyte adhesion and proliferation. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 26, n. 7, p. 401–419, 2015.

JIA, L. et al. Human-like collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds for the culture of chondrocytes. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 727–734, 2013.

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, out. 2015.

KOMATSU, D. 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.

KONAR, S. et al. Collagen-I/silk-fibroin biocomposite exhibits microscalar confinement of cells and induces anisotropic morphology and migration of embedded fibroblasts. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 108, n. 5, p. 2368–2377, 2020.

LEÓN-LÓPEZ, A. et al. Hydrolyzed Collagen – Sources and Applications. **Molecules,** v. 24, n. 22, p. 1–16, 2019.

MA, X. et al. A novel chitosan-collagen-based hydrogel for use as a dermal filler: initial in vitro and in vivo investigations. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, p. 2749–2763, 2014.

MÉNDEZ, L. C.; CANO, J. R.; ARIAS, D. G. Evaluación de la fibroína de seda como biomaterial de soporte para el crecimiento de células mesenquimales estromales de pulpa dental. **Revista de Ciências Médicas**, v. 3, n. 1, p. 5–13, 2016.

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.

MOLDERO, I. L. et al. Probing the pH Microenvironment of Mesenchymal Stromal Cell Cultures on Additive-Manufactured Scaffolds. **Small**, v. 2002258, p. 1–8, 2020.

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

PANICO, A.; PALADINI, F.; POLLINI, M. Development of regenerative and flexible fibroin-based wound dressings. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, p. 1–12, 2018.

PAWELEC, K. M. et al. Understanding anisotropy and architecture in ice-templated biopolymer scaffolds. **Materials Science & Engineering C**, v. 37, p. 141–147, 2014.

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.

PHAM, D. T.; SAELIM, N.; TIYABOONCHAI, W. Crosslinked fibroin nanoparticles using EDC or PEI for drug delivery: physicochemical properties, crystallinity and structure. **Journal of Materials Science**, v. 53, n. 20, p. 14087–14103, 2018.

QIAN, L.; ZHANG, H. Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials †. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 86, n. 2, p. 172–184, 2011.

RADHAKRISHNAN, S. et al. Collagen Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Review. In: **Processes and Phenomena on the Boundary Between Biogenic and Abiogenic Nature.** Springer Nature Switzerland. p. 3–22, 2020.

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.

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.

SERPOOSHAN, V. et al. Biomaterials The effect of bioengineered acellular collagen patch on cardiac remodeling and ventricular function post myocardial infarction. **Biomaterials**, p. 1–8, 2013.

SHAN, Y. et al. Hybrid cellulose nanocrystal/alginate/gelan scaffold with improved mechanical properties and guided wound healing. **Journal the Royal Society of Chemistry**, v. 9, p. 22966–22979, 2019.

SILVA, A. M. H. DA et al. Two and three-dimensional morphometric analysis of trabecular bone using X-ray microtomography (µCT). **Brazilian Journal of Biomedical Engineering**, v. 30, p. 93–101, 2014.

SILVA, T. F. DA; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais Chemical characteristics and functional properties of collagen. **Artigo Original/Original Article Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530–9, 2012.

SLIMANE, E. BEN; SADOK, S. Collagen from cartilaginous fish by-products for a potential application in bioactive film composite. **Marine Drugs**, v. 16, n. 6, p. 1–19, 2018.

TAN, H. et al. Electrospun cellulose acetate butyrate/polyethylene glycol (CAB/PEG) composite nano fi bers: A potential scaffold for tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 188, n. June 2019, p. 110713, 2020.

TONHI, E.; PLEPIS, A. M. DE G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Quimica Nova**, v. 25, n. 6, p. 943–948, 2002.

UTOMO, D. N. et al. Physicobiochemical Characteristics and Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (hBM-MSCs) in Biodegradable Porous Sponge Bovine Cartilage Scaffold. **Hindawi Internacional Journal of Biomaterials**, n. ID 8356872, p. 1–11, 2019.

VÁZQUEZ, J. J.; MARTÍNEZ, E. S. M. Collagen and elastin scaffold by electrospinning for skin tissue engineering applications. **Journal of Material Research**, p. 1–9, 2019.

YAN, S. et al. Directed assembly of robust and biocompatible silk fibroin/hyaluronic acid composite hydrogels. **Composites Part B,** v. 176, p. 107204, 2019.

ZENG, L. et al. Effect of microcavitary alginate hydrogel with different pore sizes on chondrocyte culture for cartilage tissue engineering. **Materials Science & Engineering C**, v. 34, p. 168–175, 2014.

ZULKIFLI, F. H. et al. In vitro degradation study of novel HEC/PVA/collagen nanofibrous scaffold for skin tissue engineering applications. **Polymer Degradation and Stability**, v. 110, p. 473–481, 2014.

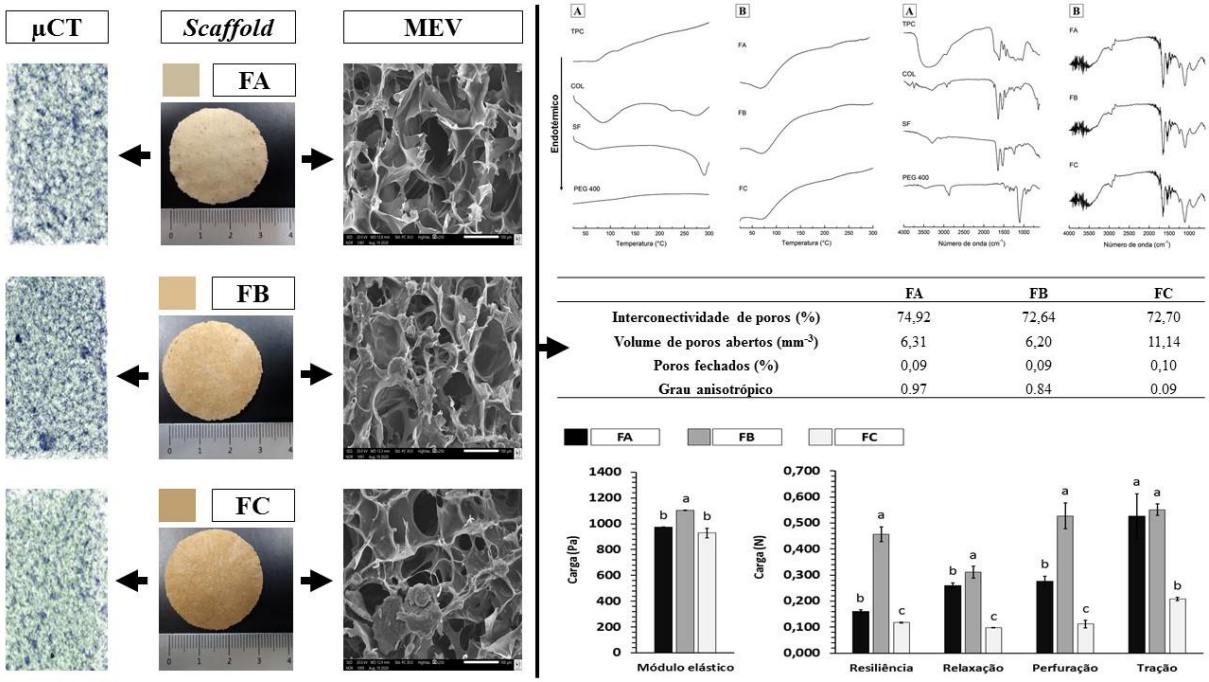
CAPÍTULO III

***Scaffolds* lamelar denso como material biomimético para engenharia de tecido traqueal: Efeito da adição de compostos fenólicos totais extraídos das folhas de *Psidium guajava* Linn.**

Resumo: O objetivo deste estudo foi desenvolver um *scaffold* lamelar denso como material biomimético para a regeneração do tecido traqueal após ressecção cirúrgica de tumor. Para gerar uma estrutura lamelar densa, foi utilizado a técnica de compressão plástica. Os compostos fenólicos totais (TPC) obtidos de *Psidium guajava* Linn. foram aplicados como potencial agente reticulante em mistura polimérica a base de colágeno (COL), fibroína de seda (SF) e polietilenoglicol 400 (PEG 400). A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e a calorimetria diferencial exploratória indicaram interações químicas entre os polímeros, com o TPC atuando como agente reticulante no COL e SF, promovendo alterações na estrutura do *scaffold*. As análises morfológicas mostraram que os *scaffolds* possuem porosidade, interconectividade e estrutura de superfície porosa com geometria semelhante a giroide. A análise do grau anisotrópico resultou em estruturas anisotrópicas (FA e FB) e estrutura isotrópica (FC). Nas propriedades mecânicas foi evidenciado maiores resistências para a formulação FB. A adição de percentuais de TPC não resultou em diferença significativa ($p > 0,05$) de capacidade de intumescimento e taxa de biodesintegração. Considerando os resultados obtidos, podemos confirmar que os percentuais de TPC aplicados foram capazes de modular as propriedades dos *scaffolds*, principalmente morfológicas, morfométricas e mecânicas. Assim, este estudo pode fornecer uma maneira de melhorar a regeneração das principais estruturas traqueias após remoção cirúrgica de tumor.

Palavras-chave: Traqueia, câncer de traqueia, compostos fenólicos totais, *scaffold* lamelar denso, compressão plástica.

Resumo gráfico.



	FA	FB	FC
Interconectividade de poros (%)	74,92	72,64	72,70
Volume de poros abertos (mm^{-3})	6,31	6,20	11,14
Poros fechados (%)	0,09	0,09	0,10
Grau anisotrópico	0.97	0.84	0.09

1 INTRODUÇÃO

A traqueia é um órgão que compõem a porção condutora do trato respiratório, desempenhando múltiplas funções, como conduzir, filtrar, aquecer e umidificar o ar para as trocas gasosas do ambiente externo para os pulmões (KNANEH-MONEM *et al*., 2019). Este órgão é constituído por uma estrutura tubular oca resistente, porém flexível, apresentando uma geometria complexa, consistindo de epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, tecido conjuntivo, músculo liso e anéis de cartilagem em forma de C (CROWLEY; BIRCHALL; SEIFALIAN, 2014; MOUSSA; HASSAN, 2015).

O fluxo de ar nas vias aéreas podem ser obstruído por doenças, como estenose, câncer, anomalias congênitas ou traumas (HOFFMAN *et al*., 2015). Dentre estas doenças relacionadas a traqueia, os tumores são raros e representam uma pequena proporção de neoplasias do trato respiratório, compreendendo cerca de 2% das neoplasias das vias respiratórias (BOTS *et al*., 2019; CHARLTON; PITKIN, 2015).

Contudo, mesmo representando uma doença com incidência baixa, o câncer de traqueia possui uma opção potencial de tratamento quando o tumor está localizado (BEHRINGER; KÖNEMANN; HECKER, 2014). Esta opção consiste na ressecção traqueal completa com anastomose término-terminal, sendo indicado como a melhor opção de tratamento de tumores traqueias quando existe tecido saudável suficiente para permitir a justaposição, apresentando maiores resultados em termos de sobrevida global (SPINELLI *et al*., 2019).

Devido a sua raridade e associados aos sintomas que são frequentemente inespecíficos, o diagnóstico de pacientes com câncer de traqueia, infelizmente, pode demorar de 2 meses a 2 anos. Como resultado, os pacientes podem apresentar uma doença não passível de ressecção e, consequentemente, uma redução na taxa de sobrevida dos pacientes (HOFFMAN *et al*., 2015).

A reparação de grandes defeitos traqueais continua sendo um problema cirúrgico desafiador. Desta forma, abordagens alternativas para reabilitação anatômica e funcional da traqueia têm sido bastante investigadas pela engenharia de tecido e a medicina regenerativa (KALATHUR; BAIGUERA; MACCHIARINI, 2010; KOJIMA; VACANTI, 2014).

Deste modo, a engenharia de tecido traqueal tem como objetivo promover a cura e a regeneração das estruturas teciduais da traqueal de modo ideal, restabelecendo as funções mecânicas e fisiológicas por meio dos princípios e técnicas

da engenharia de tecidos (DHASMANA; SINGH; RAWAL, 2020), não medindo esforços para projetar protocolos alternativos devido à falta de opções terapêuticas disponíveis para os pacientes com doenças traqueias graves (BUTLER *et al*., 2017).

Os objetivos deste estudo foram desenvolver *scaffolds* lamelares densos obtidos pela técnica de compressão plástica de hidrogéis a base de colágeno, fibroína de seda, polietilenoglicol 400 e compostos fenólicos totais extraído das folhas de goiabeira (*Psidium guajava* Linn.), bem como avaliar e caracterizar as propriedades mecânicas, morfológicas, capacidade de intumescimento e taxa de biodesintegração *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O pó de colágeno extraído dos couros bovinos foi fornecido pela NovaProm Food Ingredients Ltda. (São Paulo, Brasil). Polietilenoglicol 400 (Dinâmica. São Paulo, Brasil), Casulos de *Bombyx mori* (os casulos do bicho-da-seda foram utilizados para extrair a fibroína de seda), compostos fenólicos totais (o extrato das folhas de goiabeira (*Psidium guajava* Linn.) foi utilizado para obtenção dos compostos fenólicos) e água ultrapura (18.2 $M\Omega.cm^{-1}$). Os outros reagentes eram de grau farmacêutico.

2.2 Métodos

2.2.1 Extração de Fibroína da seda (SF)

Como descrito no item 2.2.1 do Capítulo II.

2.2.2 Extração de compostos fenólicos totais (TPC)

Como descrito no item 2.3 do Anexo 2.

2.2.3 Preparação do hidrogel COL-SF-PEG 400 com adição de TPC

A formulação de hidrogel foi preparada com base em uma dispersão de COL em água purificada. Os polímeros hidrodispersíveis SF e PEG 400 foram dispersos na solução aquosa de COL, em seguida foram adicionados percentuais de TPC como descrito na Tabela 1. A mistura polimérica foi agitada até completa homogeneização. Posteriormente, o pH final da formulação foi ajustado para 10, utilizando solução de NaOH 2M. A dispersão obtida foi armazenada em recipientes de plástico cilíndricos

(diâmetro interno = 21 mm e altura = 11 mm) e incubada a 10 ± 2 °C por 24 horas para polimerização.

Tabela 1. Composição das formulações para preparação dos *scaffolds* baseados em hidrogel.

Componentes (% em massa)	Formulações		
	FA	FB	FC
Colágeno (COL)	5	5	5
Fibroína de seda (SF)	1	1	1
Polietilenoglicol (PEG 400)	1,25	1,25	1,25
Compostos fenólicos totais (TPC)	0,1	0,3	0,5
Água ultrapura qsp.	92,65	92,45	92,25
Total	100	100	100

Fonte: Elaboração própria.

2.2.4 Preparação do *scaffolds* lamelar utilizando técnica de compressão plástica

Os *scaffolds* foram obtidos pela técnica de compressão plástica do hidrogel (FA, FB e FC), utilizando uma prensa hidráulica (Shimadzu, SSP-10th. Kyoto, Japão) de acordo com técnica descrita pelo grupo pesquisa em artigo publicado anteriormente (ALVES *et al*., 2018) com temperatura de congelamento à -50 °C. O hidrogel foi colocado entre camadas de malha de nylon (50 µm) e malha metálica, aplicando uma tensão de compressão com uma carga de 4 kN aplicada por 10 minutos, a fim de remover a água e produzir um biomaterial denso com melhores propriedades biológicas e mecânicas. Após a compressão do hidrogel, a matriz polimérica obtida foi congelada à -50 °C (UFR30, Liotop, São Paulo, Brasil) por 24 horas e posteriormente liofilizada (Liofilizador – L101, Liotop, São Paulo, Brasil).

2.2.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Como descrito no item 2.2.4 do Capítulo II.

2.2.6 Determinação do potencial zeta dos compostos fenólicos totais (TPC)

Para o ensaio do potencial zeta (BrookHaven – NanoBrook-90 Plus, Nova Iorque, Estados Unidos) dos TPC, o equipamento foi ajustado para o comprimento de onda de 635 nm e ângulo fixo de 90°. As amostras foram preparadas solubilizando os TPC em água ultrapura, obtendo soluções nas concentrações de 0,1, 0,2 e 0,5% (m/v). Após solubilização, o pH das amostras foram determinados para obtenção de dois grupos (inicial e final), sendo que no grupo final o pH foi ajustado para 10, utilizando solução de NaOH 2M. O ensaio foi realizado em célula eletroforética e analisadas à

25 °C em triplicata. O resultado da estabilidade termodinâmica do potencial zeta foi expresso em milivolt (mV).

2.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Como descrito no item 2.2.5 do Capítulo II.

2.2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Como descrito no item 2.2.6 do Capítulo II.

2.2.9 Microtomografia computadorizada (μCT)

Como descrito no item 2.2.7 do Capítulo II.

2.2.10 Propriedades mecânicas

Como descrito no item 2.2.8 do Capítulo II.

2.2.11 Eficiência de intumescimento

Como descrito no item 2.2.9 do Capítulo II.

2.2.12 Estudo de biodesintegração *in vitro*

Como descrito no item 2.2.10 do Capítulo II.

2.2.13 Análise estatística

Como descrito no item 2.2.11 do Capítulo II.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

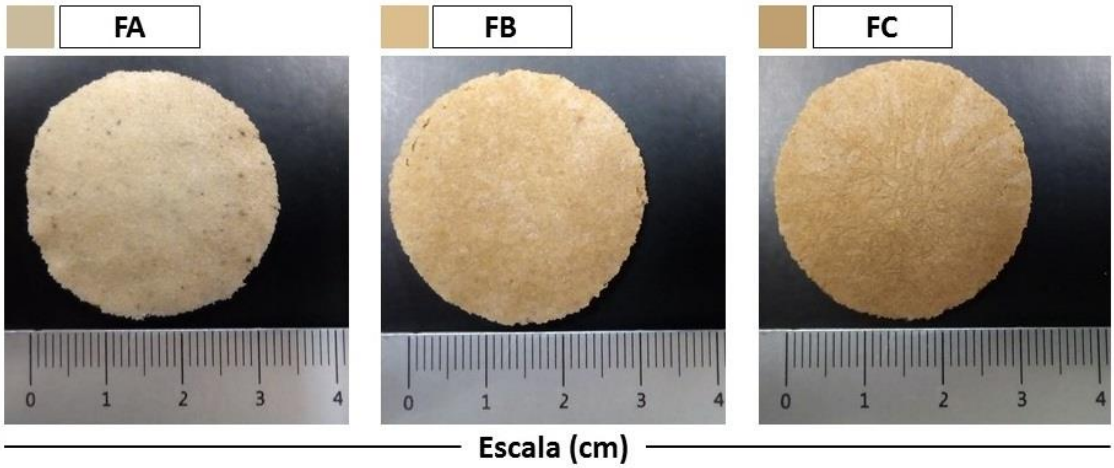
3.1 Caracterização macroscópica do *scaffold* lamelar denso

As dispersões poliméricas de COL, SF, PEG 400 e com variações de TPC (0,1, 0,3 e 0,5%) após o período de incubação geraram hidrogéis tridimensionais, homogêneos e com ótima resistência a manipulação. Em seguida, os hidrogéis foram submetidos a compressão plástica e direcionados ao congelamento. A compressão causa a remoção parcial de água, entretanto, a porção de água residual nas formulações desempenha um importante papel na formação dos poros, devido ao processo de congelamento, os polímeros são rejeitados pela movimentação e crescimento dos cristais de gelo, que estão se formando, causando o acondicionamento da matriz ao redor. Com a liofilização das formulações os cristais de gelo são eliminados por sublimação. Este processo fornece aos *scaffolds* uma

arquitetura porosa única, em que o grau de porosidade está altamente ligado a cristalografia exercida pelo solvente (BROUGHAM *et al*., 2017).

A Figura 1 apresenta os *scaffolds* FA, FB e FC obtidos após a liofilização, ambas as formulações apresentaram aspectos macroscópicos positivos, como integridade e resistência a manipulação. Com adição de variações de TPC foi possível observar um aumento na tonalidade dos *scaffolds*.

Figura 7. Aspectos macroscópicos dos *scaffolds* lamelares densos



Nota: FA: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,1%); FB: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,3%) e FC: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,5%).
Fonte: Elaboração própria.

Os *scaffolds* tiveram as dimensões aferidas utilizando paquímetro de inox (LEE TOOLS-682626. São Paulo, Brasil) com aferição de 0,02 mm. As formulações apresentaram espessura de 0,27 ± 0,03 cm, raio de 1,72 e área equivalente a ~9,3 cm^2.

3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A análise dos espectros de infravermelho dos componentes e dos *scaffolds* são apresentados na Figura 2. O FTIR é uma técnica que permite identificar substâncias orgânicas e minerais por meio dos grupos funcionais presentes nas moléculas, bem como caracterizar e indicar possíveis interações químicas entre substâncias (misturas) (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2000).

No espectro do extrato das folhas de goiabeira foram observados os picos característicos dos compostos fenólicos (TPC) nas regiões em 3383 cm^{-1} atribuído ao grupo OH, em 2931 cm^{-1} a vibração assimétrica das estruturas de alongamento alifático. Nas regiões em 1616 cm^{-1} e 1517 cm^{-1} são atribuídos respectivamente as

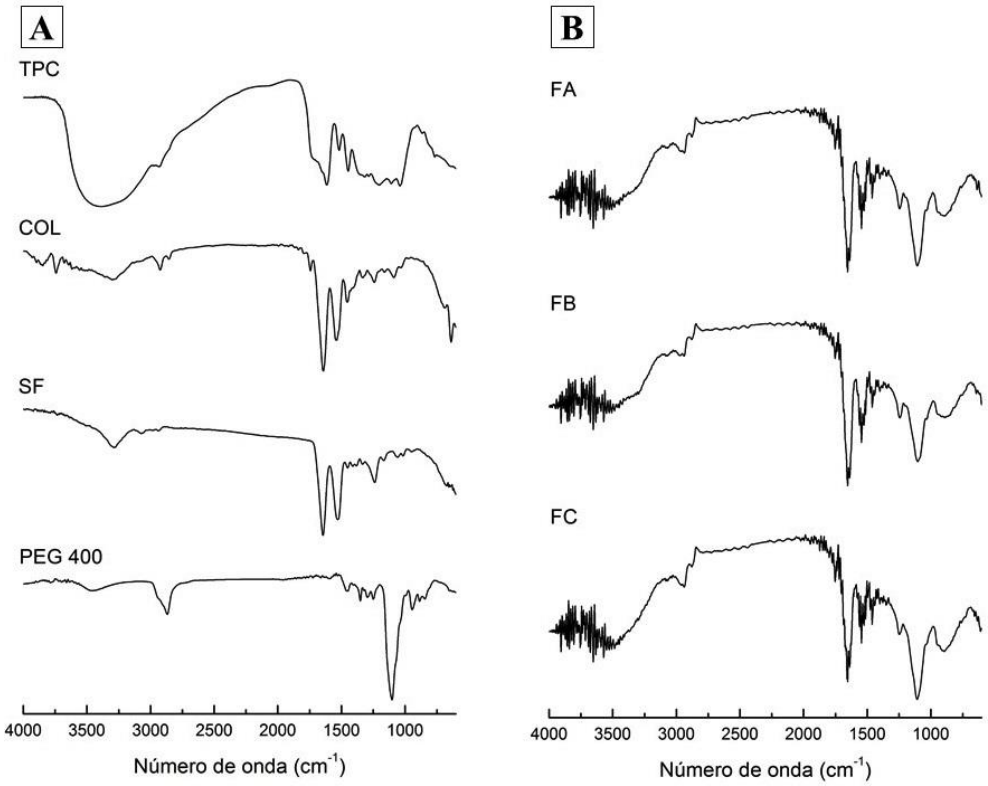
bandas de alongamento do grupo CH e C=C, típicos de moléculas aromáticas. O pico em 1446 cm^{-1} correspondente a flexão antissimétrica no plano CH_3. Os picos nas regiões em 1201 cm^{-1}, 1109 cm^{-1} e 1039 cm^{-1} são correspondentes as vibrações de alongamento C–O. Por fim, o pico em 765 cm^{-1} atribuído a conformações fora do plano em CH (CASCANT *et al*., 2016; WANG *et al*., 2018; ZHAO *et al*., 2015).

O COL é a proteína mais presente no organismo humano, composta basicamente pelos aminoácidos glicina, prolina e a hidroxiprolina. Os picos de transmitância característicos do COL foram observados nas regiões em 1242 cm^{-1} típico da amida III, referente ao alongamento C–N e deformação N–H, 1537 cm^{-1} típicas da amida II, atribuída às vibrações no plano da ligação N–H e ao estiramento C–N, e o pico em 1648 cm^{-1} típico da amida I, referente ao alongamento de carbonila C=O e, por fim, o pico na região em 3302 cm^{-1} referente ao grupo hidroxila (OH) (ALVES *et al*., 2018; SLIMANE; SADOK, 2018).

O espectro do SF apresentou picos característicos nas regiões em 1238 cm^{-1} referente à amida III, associada ao trecho N–C, em 1527 cm^{-1} referente à amida II, originária da deformação N–H, conformação estrutural característica da Seda I. O pico em 1643 cm^{-1} referente a amida I, com o alongamento do grupo carbonila (C=O) e amida II (1527 cm^{-1}), correspondendo à conformação estrutural da Seda II. Por fim na região em 3284 cm^{-1} referente ao grupo OH (ALVES; ARANHA; CHAUD, 2018; PANICO; PALADINI; POLLINI, 2018).

Os picos característicos do PEG 400 foram observados nas regiões de 1103 cm^{-1} referente ao grupo C–O–C, 2868 cm^{-1} atribuído ao alongamento do grupo CH_2 e 3452 cm^{-1} referente ao grupo OH (PEREIRA *et al*., 2016).

Figura 2. Espectros FTIR dos componentes (A) e *scaffolds* lamelares densos (B).



Nota: Colágeno (COL); Fibroína de seda (SF); Polietilenoglicol 400 (PEG 400) e Compostos fenólicos totais (TPC). FA: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,1%); FB: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,3%) e FC: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,5%).
Fonte: Elaboração própria.

Nos espectros apresentados para os *scaffolds* fabricados por meio da mistura dos polímeros COL, SF, PEG 400 e TPC foi possível observar a permanência de alguns picos característicos de cada componente, porém, os picos foram registrados com leves deslocamentos e algumas sobreposições. Em relação ao COL e SF foi possível observar a prevalência dos grupos amida (I, II e III), no entanto, ocorreu a sobreposição. Dos picos característicos do PEG 400 foi observado a prevalência dos grupos C–O–C e CH_2. Já em relação ao TPC não foi observado a predominância de picos característicos. De acordo com os resultados apresentados pelos espectros foi confirmado interações químicas entre os componentes dos *scaffolds*.

As alterações observadas nos espectros de transmitância, sobretudo pela ausência de grupos funcionais OH e as evidências de deslocamento e redução de intensidade dos grupos amidas nos *scaffolds*, indicam que os grupos estão envolvidos na reticulação do COL, ocorrendo pelo domínio das ligações de hidrogênio para formar bases de Schiff (ALVES *et al*., 2019). Segundo Radhakrishnan *et al*. (2020) os

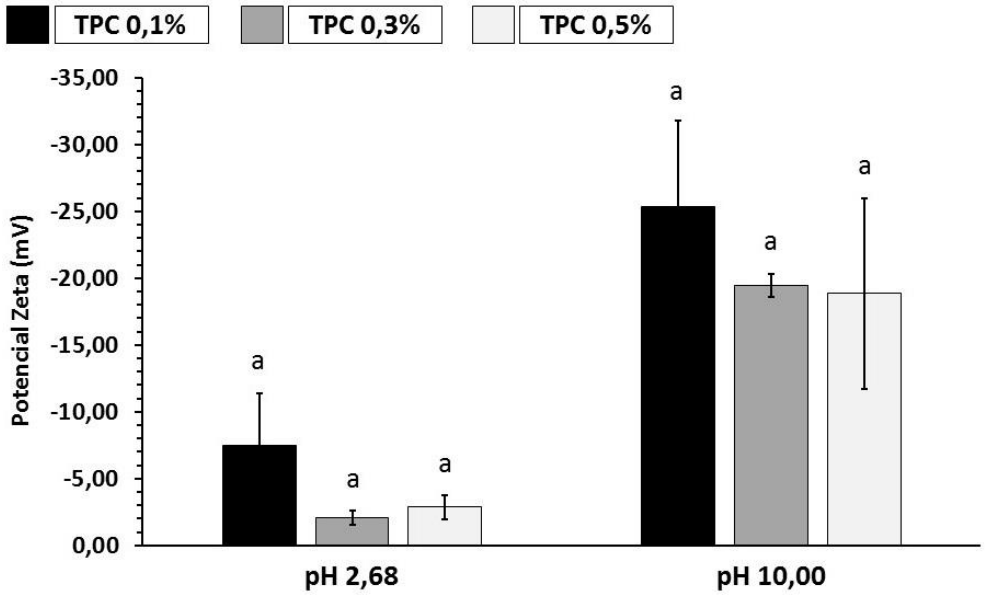
principais responsáveis pela reação de reticulação do COL são os grupos funcionais amina e carboxílico.

Além da reticulação do COL, também é possível que ocorra a reticulação com a estrutura da SF, contudo, devido a aplicação de um reticulador natural o processo de reação é demorado, ocorrendo principalmente por meio da lisina e arginina presentes na estrutura da proteína. Estes aminoácidos representam um baixo percentual na composição total da SF, cerca de 0,6% em moles para cada um (KIM; PARK, 2016; SILVA *et al*., 2008).

3.3 Determinação do potencial zeta dos compostos fenólicos totais (TPC)

A análise do potencial zeta das soluções aquosas de TPCs foram obtidos em dois momentos, no pH de extração (2,68) e no pH para preparação das blendas poliméricas (10,00) e os resultados são apresentados na Figura 3. O potencial zeta é uma medida que permite determinar a carga de superfície das partículas e s erve também como indicativo de estabilidade termodinâmica dos sistemas dispersos (RIZWAN *et al*., 2007; STANISÇUASKI *et al*., 2003).

Figura 3. Medidas de potencial zeta das soluções de compostos fenólicos totais (TPC) no pH 2,68 e pH 10,00.



Nota: Compostos fenólicos totais à 0,1% (TPC 0,1%); compostos fenólicos totais à 0,3% (TPC 0,3%) e compostos fenólicos totais à 0,5% (TPC 0,5%) (n = 3).
Fonte: Elaboração própria

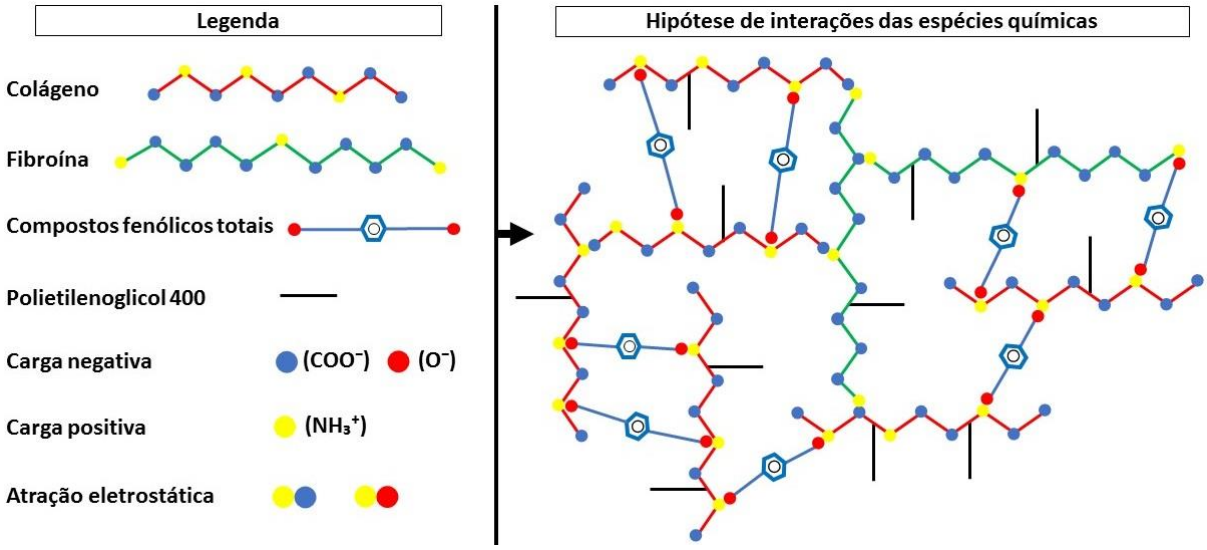
Os valores da carga de superfície dos TPCs em solução aquosa foram obtidos, de modo geral, apresentaram um potencial zeta negativo. Como podemos observar no gráfico, o potencial zeta se manteve negativo independente da faixa de pH. Em pH

de extração (2,68), as cargas de superfície apresentaram valores de potencial zeta menos negativos -7,51 ± 3,88 mV (TPC 0,1%), -2,06 ± 0,56 mV (TPC 0,3%) e -2,87 ± 0,88 mV (TPC 0,5%), após a correção para o pH reacional (10,00), os valores ficaram mais negativos -25,34 ± 6,42 mV (TPC 0,1%), -19,46 ± 0,85 mV (TPC 0,3%) e -18,86 ± 7,14 mV (TPC 0,5%).

Os valores de carga de superfície apresentados pelos TPCs são muito importantes, visto que, a estrutura molecular do COL e da SF consistem da junção de aminoácidos, com prevalência de grupos terminais e laterais ácido (COOH) e básico (NH_2), o que confere a estas proteínas a característica anfotérica. Desta maneira, fatores como pH do meio reacional, temperatura e força iônica irão influenciar na estrutura da molécula, podendo apresentar prevalências com carga negativa (COO^-) ou positiva (NH_3^+) (ACHILLI; MANTOVANI, 2010; YAN *et al*., 2019).

A Figura 4 apresenta hipótese de interações químicas entre os componentes das formulações de *scaffolds* lamelares densos utilizando TPCs como agente de reticulação.

Figura 4. Hipótese de interações entre as espécies químicas dos *scaffolds* lamelares densos



Fonte: Elaboração própria.

As alterações observadas nas representações moleculares do COL e SF na Figura 4 foram fundamentadas com base no ponto isoelétrico destes componentes, sendo que o ponto isoelétrico da SF apresentado no pH entre 3,6 – 5.1 (HAWLEY; JOHNSON, 1930), já o ponto isoelétrico do COL é apresentado no pH entre 7 – 8 (LEÓN-LÓPEZ *et al*., 2019). Com a correção do pH reacional para 10, acima do ponto isoelétrico das proteínas, ocorre a prevalência de cargas negativas na estrutura dos

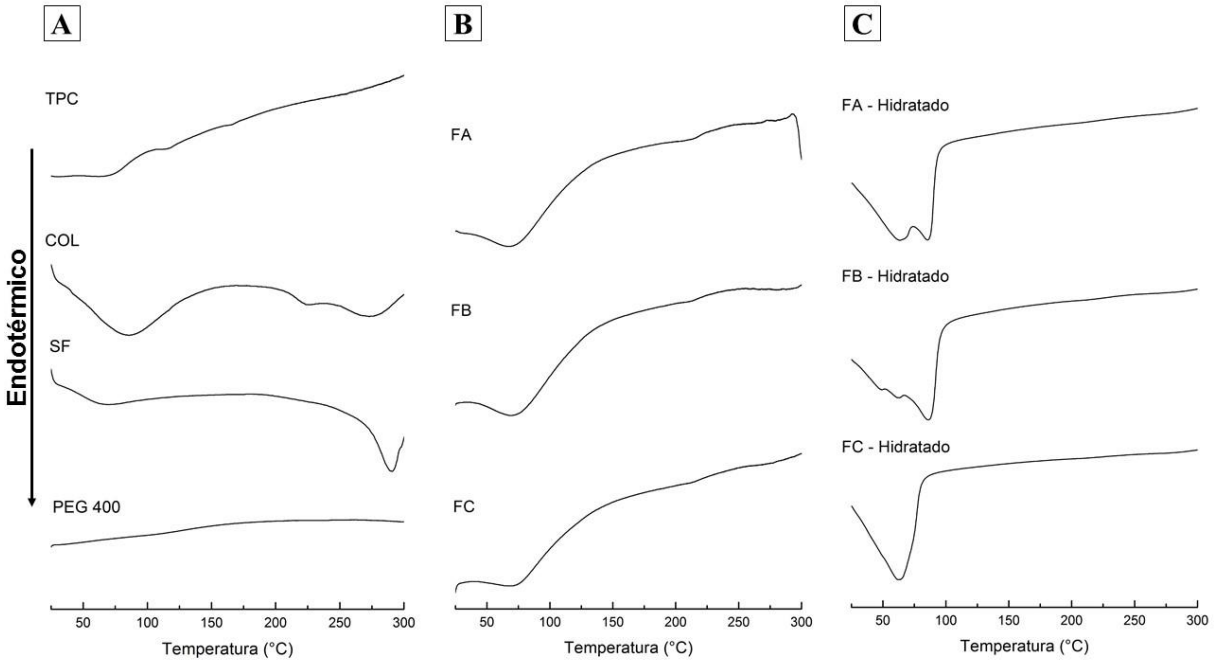
aminoácidos. Desta forma, as interações por atração eletrostática podem ocorrer entre os grupos carboxílico (COO^-) e os grupos amino (NH_3^+) existentes em COL e SF, além da reticulação exercida pelos TPCs (O^-) com os grupos amino (NH_3^+) existentes em ambas as proteínas. Em relação as moléculas de PEG 400 na formulação, estas atuam como agente plastificante entre as cadeias do COL e SF, que não são interligadas por forças primárias covalentes fortes, o que permite seu livre deslizamento uma sobre as outras (CANEVAROLO JR, 2002).

Os espectros de FTIR junto aos valores mensurados no potencial zeta corroboram para o entendimento das interações químicas entre os componentes na formulação dos *scaffolds*, principalmente na atuação dos TPCs como potencial agente de reticulação de proteínas.

3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial é uma ferramenta termodinâmica para avaliação direta da energia térmica absorvida (endotérmico) ou liberada (exotérmico), na qual a diferença de energia (fluxo de calor) entre uma amostra e um material referência (branco) é mensurado em função do aumento ou redução da temperatura por meio de um calorímetro diferencial. A análise calorimétrica é aplicada principalmente para monitorar mudanças na fase de transição de substâncias puras ou misturas (BERNAL *et al*., 2002; PRIVALOV *et al*., 1995). As curvas termoanalíticas de DSC das matérias-primas utilizadas e das formulações dos *scaffolds* são apresentados na Figura 5.

Figura 5. Curvas termoanalíticas de DSC dos componentes (A), *scaffolds* lamelares densos (B) e *scaffolds* lamelares densos hidratados (C).



Nota: Colágeno (COL); Fibroína de seda (SF); Polietilenoglicol 400 (PEG 400) e Compostos fenólicos totais (TPC). FA: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,1%); FB: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,3%) e FC: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,5%).
Fonte: Elaboração própria.

A análise calorimétrica realizada para o COL apresentou três eventos térmicos distintos, o primeiro evento térmico foi registrado em 85,74 °C com *onset:* 39,75 °C – *end set:* 124,75 °C, além de um ΔH = -203,80 J/g. Este evento está relacionado com a perda de água absorvidas nas fibras da proteína, com o aumento da temperatura promovendo a quebra das ligações cruzadas que estabilizam a estrutura nativa, causando a sua desnaturação (ONEM *et al*., 2017). O segundo evento térmico apresentado foi atribuído a uma transição vítrea (T_g) caracterizada a partir do deslocamento da linha base, com capacidade calorífica (C_P) equivalente a 226,85 °C (*onset:* 217,41 °C – *end set:* 231,98 °C) (ALVES *et al*., 2018), por fim, o terceiro evento térmico foi observado em 272,64 °C com *onset:* 253,73 °C – *end set:* 300 °C e com ΔH = -27,02 J/g, sugerindo uma reação de decomposição térmica da proteína.

Na curva termoanalítica da SF foi possível observar dois eventos térmicos distintos, o primeiro foi registrado em 69,08 °C com *onset:* 44,40 °C – *end set:* 88,90 °C e com ΔH = -58,36 J/g, este evento térmico foi atribuído a evaporação da água, enquanto que o segundo foi atribuído para uma reação de decomposição térmica do material, com evento térmico registrado em 290,89 °C com *onset:* 273,18 °C – *end set:* 300 °C e com ΔH = -154.84 J/g (PHAM; SAELIM; TIYABOONCHAI, 2018).

Para o PEG 400 não foi possível registrar eventos térmicos na faixa de temperatura avaliada (25 – 300 °C). Contudo, segundo estudo realizado por Bertasi *et al*. (2015) foi registrado um evento térmico para o PEG 400 em cerca de 5 °C, o qual relaciona-se ao ponto de fusão do polímero, além deste, não houve registro de outros eventos com o aumento da temperatura (150 °C).

Por meio da análise calorimétrica foi possível medir a temperatura de desnaturação (T_d) e a entalpia dos *scaffolds* contendo percentuais de compostos fenólicos, a medida de T_d corresponde a densidade de reticulação ocorrida em cada formulação. A Figura 5-B apresenta as curvas analíticas dos *scaffolds* e os resultados numéricos do DSC são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Temperatura de desnaturação (T_d) e entalpia (ΔH) dos *scaffolds* (FA, FB e FC).

	T_d (°C)	***Onset* (°C)**	***End set* (°C)**	**ΔH (J/g)**
FA	67,28	46,08	109,88	-187,65
FB	69,13	40,89	115,49	-166,07
FC	67,62	39,63	110,21	-155,02

Nota: FA: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,1%); FB: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,3%) e FC: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,5%).
Fonte: Elaboração própria.

Nas curvas termoanalíticas dos *scaffolds* lamelares densos foram registrados valores de T_d semelhantes nas formulações FA e FC, apresentando o evento térmico em 67,28 °C e 67,62 °C, respectivamente. Contudo, foi evidenciado uma variação de entalpia de -32,63 J/g entre as formulações (FA > FC). Na formulação FB foi registrado uma T_d de 69,13 °C, evidenciando um leve aumento na temperatura (1,68 °C ± 0,24), correspondente a densidade de reticulação. Em comparação com FA e FC, foi observado uma entalpia de -166,07 para FB, este valor é intermediário em relação aos demais (FA > FB > FC).

Em comparação com os valores apresentados pelo COL de forma isolada, foi observada redução da T_d e da entalpia em todas as formulações, independente do percentual de compostos fenólicos totais aplicados para o processamento de cada *scaffold*. Este resultado afirma que a incorporação dos componentes causou alterações nos valores apresentados pelo COL, reduzindo a T_d para 17,73 °C ± 0,98 e a entalpia de 34,22 ± 16,60 J/g.

Além disso, a análise calorimétrica dos *scaffolds* apresentou uma redução expressiva da T_g em 226 °C, evento associado a transição da hélice da proteína para

a bolbina, indicando a extensão da reticulação (ALVES *et al*., 2019). Este evento ocorre por que a tripla hélice presente na estrutura do COL é mantida por ligações de hidrogênio e o processo de reticulação estabiliza a estrutura helicoidal, permitindo a formação de redes intra e intermoleculares (BIGI *et al*., 2002; GOVINDARAJAN *et al*., 2017). Devido as interações ocorridas entre os componentes, também foi possível observar alterações na reação de decomposição térmica dos materiais.

Desta forma, as alterações evidenciadas nas temperaturas de T_d, entalpia, na C_P da T_g (226 °C) e reação de decomposição, reafirmam os resultados apresentados pelo FTIR, indicando a formação de um novo rearranjo na estrutura do COL com a SF, por meio da ação reticulante exercida pelos compostos fenólicos totais e pelas moléculas de PEG 400 com ação plastificante, mesmo diante da formação de uma blenda imiscível entre os polímeros, o controle da atração eletrostática pelo PEG 400 no deslizamento das cadeias favorece o equilíbrio do sistema.

Buscando uma melhor compreensão do comportamento físico-químico dos *scaffolds* para aplicação *in vivo*, as amostras foram hidratadas e também caracterizadas por ensaio térmico de DSC (Figura 5-C).

Comparando as curvas termoanalíticas dos *scaffolds* antes e após a hidratação foi possível observar alterações expressivas nos picos das amostras hidratadas. Onde FA – Hidratado apresentou junção de dois eventos térmicos entre 31,98 °C (onset) – 91,95 °C (end set), o primeiro pico registrado em 63,58 °C e o segundo em 85,55 °C. Em FB foi observado junção de três eventos térmicos entre 29,76 °C (onset) – 93,93 °C (end set), o primeiro pico registrado em 49,13 °C, o segundo em 62,39 °C e o terceiro em 86,11 °C. Já em FC foi observado apenas um evento térmico bem definido, com pico em 62,27 °C (onset: 29,98 °C – end set: 79,61 °C). Além disso, não foi observado o evento térmico de T_g (226 °C) em nenhuma das amostras hidratadas, o que confirma a redução na C_P da T_g devido ao aumento da atividade de água nos *scaffolds*.

Nos termogramas apresentados pelos *scaffolds* obtidos com adição de 0,1%, 0,3% e 0,5% de TPC foram registrados valores de T_d em média de 68,01 °C ± 0,98 (Tabela 2). Contudo, após hidratação os *scaffolds* tiveram redução nos valores de T_d de 5,26 °C ± 1,52.

Este resultado demonstra a influência da atividade de água contida nos *scaffolds* hidratados, fazendo um contraponto com os resultados evidenciados nos *scaffolds* sem a presença do TPC (Figura 4, Tabela 2 do capítulo III), onde foram

observados um aumento de 14,00 °C ± 0,81 na T_d, indicando a necessidade de maior energia para remoção da água adsorvida. Assim, a incorporação dos TPC reduziu a atividade de água, além disso, sugeriu interações com as estruturas fenólicas presentes nos *scaffolds*, o que fundamenta a formação dos demais eventos térmicos observados nas amostras FA e FB.

3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As características morfológicas dos *scaffolds* lamelares densos FA, FB e FD foram investigadas por MEV e são apresentados na Figura 6. A técnica baseada no uso de um gradiente de temperatura envolve o congelamento de uma solução ou suspensão polimérica à base de água e a subsequente remoção dos cristais de gelo formados por meio da sublimação (liofilização) (ASUNCION; GOH; TOH, 2016). Em nosso estudo, a morfologia da face superior dos *scaffolds* mostraram microestruturas altamente porosas em todas as ampliações avaliadas.

O diâmetro dos poros dos *scaffolds* estimados a partir das micrografias MEV apresentaram distribuição de tamanhos entre 46,19 – 129,70 µm na formulação FA (Figura 6 A1-2). Para a formulação FB (Figura 6 B1-2) foram apresentadas distribuições de poros com tamanhos entre 31,56 – 84,53 µm, já na formulação FC (Figura 6 C1-2) foram apresentados tamanho de poros entre 41,54 – 106,00 µm.

De acordo com Griffon et al. (2006) o tamanho de poros adequado para o crescimento de condrócitos aplicado no reparo do tecido cartilaginoso está entre 70-120 µm. Em estudo realizado por Stenhamre et al. (2011) foram desenvolvidos scaffolds com diferentes tamanhos de poros, <150 µm, 150-300 µm e 300-500 µm e foram semeados com condrócitos e submetidos à indução condrogênica in vitro. Durante a cultura celular, no scaffold com diâmetro de poros <150 µm não foram vistos poros vazios, os condrócitos preencheram os poros e produziram uma matriz extracelular extensa.

Em outro estudo Nava et al. (2016) prepararam scaffolds com 3 geometrias distintas, a primeira com diâmetro de poro variando entre 50-100 µm (média= 75 µm), a segunda com diâmetro de poros entre 100-150 µm (média= 125 µm) e a terceira entre 150-200 µm (média= 175 µm). Os resultados mostram que a combinação de poros menores do scaffold é mais efetivo no que diz respeito à promoção da condrogênese.

Estes resultados confirmam que o tamanho dos poros obtidos na estrutura dos scaffolds lamelares densos desenvolvidos neste estudo são viáveis para aplicações na engenharia de tecido cartilaginoso.

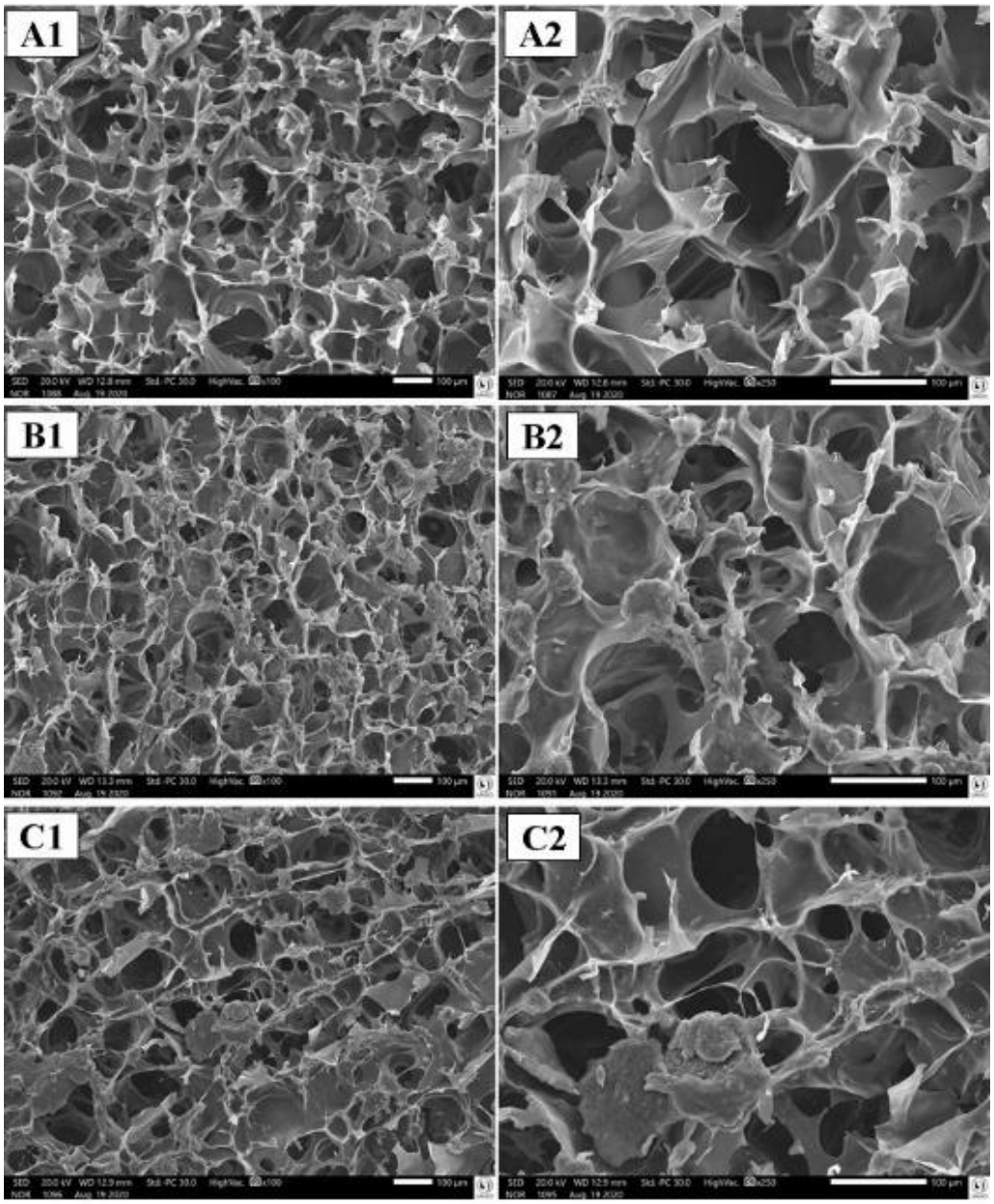
Outro ponto importante observado nas micrografias dos scaffolds estão relacionados a estrutura 3D. Sugerindo que o processo de reticulação exercido pela incorporação dos compostos fenólicos totais associado a técnica de compressão plástica e o gradiente de temperatura aplicado durante a fase de nucleação e subsequente sublimação por liofilização, resultou na formação de estrutura 3D com geometria semelhante a giroide.

A geometria giroide foi descoberta em 1970 por Alan Schoen, sendo descrita como uma topologia de superfície que obedece aos requisitos de uma superfície mínima triplamente periódica que não se auto intercepta nem continha quaisquer linhas retas (SCHOEN, 1970, 2012).

Em estudo desenvolvido por Olivares et al. (2009), duas morfologias distintas de scaffolds foram comparadas, estrutura giroide e hexagonal. Segundo os resultados da pesquisa é possível obter uma estrutura giroide com melhor semeadura celular e transporte dos nutrientes do que em estruturas hexagonais. No entanto, as estruturas giroides induzem estímulos mecânicos menos homogêneos na superfície do scaffold do que para as estruturas hexagonais.

Seguindo a relação de estrutura e contanto com as células, Downing *et al*. (2020) aponta que giroide foi indentificada como uma topologia celular adequada para aplicações de engenharia, particularmente em sua forma de rede sólida, para aplicações biomédicas, oferecendo benefícios adicionais de uma superfície contínua que divide o espaço e fornece grande área de superfície para transferência de calor ou fixação de células.

Figura 6. MEV dos *scaffolds* lamelares densos FA (A1-2), FB (B1-2) e FC (C1-2).



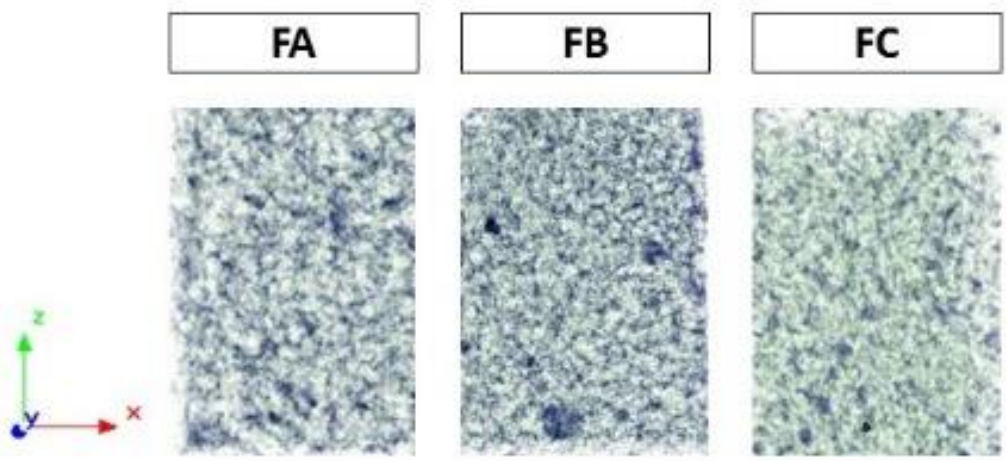
Nota: FA: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,1%); FB: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,3%) e FC: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,5%).
Fonte: Elaboração própria.

As caracterizações obtidas pelo MEV colaboram com a relação entre a estrutura de superfície e o tamanho dos poros. Com o ensaio de µCT é possível verificar os parâmetros de porosidade, interconectividade, volume de poros e grau anisotrópico. Estas características morfológicas dos *scaffolds* são um fator crucial, influenciando diretamente no comportamento das células, auxiliando na adesão, proliferação, diferenciação e orientação celular (BERNER *et al*., 2014; MITSUISHI *et al*., 2013).

3.6 Microtomografia computadorizada (µCT)

As características morfométricas 3D dos *scaffolds* lamelares densos FA, FB e FC foram obtidos por µCT, e são apresentadas na Figura 7. Os resultados morfométricos reafirmaram as características morfológicas evidenciadas pelo MEV (Figura 6), afirmando por meio do contraste de densidade dos *scaffolds* as singularidades de cada estrutura porosa. Além destas características, o ensaio realizado por µCT é capaz de mensurar valores referentes a estrutura 3D dos *scaffolds*, como interconectividade, volume de poros abertos, porcentagem de poros fechados e o grau anisotrópico (Tabela 3).

Figura 7. Características morfológicas dos *scaffolds* lamelares densos avaliados por µCT.



Nota: FA: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,1%); FB: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,3%) e FC: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,5%).
Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 3 apresenta as características morfológicas dos *scaffolds* lamelares densos. Além da estrutura de superfície porosa, os *scaffolds* mostraram a formação de uma matriz com interconectividade dos poros, confirmando maior percentual para a formulação FA (74,92%). A análise também possibilitou mensurar o volume de poros abertos e o percentual de poros fechados. A incorporação dos TPC nas formulações não resultou em variações expressivas quanto ao percentual de poros fechado (0,09 – 0,10%). Contudo, quando comparado ao volume de poros abertos, foi evidenciado maior volume (11,14 mm^{-3}) para a formulação FC, obtida pela incorporação de 0,5% de TPC na mistura polimérica.

Estes parâmetros desempenham um papel crucial, pois as células dependem da interconectividade e volume de poros abertos para permeação de nutrientes e

oxigenação, bem como para orientação e, consequentemente, proliferação por toda estrutura do *scaffold* (MA *et al*., 2014).

Tabela 3. Dados morfométricos dos *scaffolds* lamelares densos.

	FA	FB	FC
Total VOI volume	8.42	8.54	15,33
Interconectividade entre poros (%)	74,92	72,64	72,70
Volume de poros abertos (mm^{-3})	6,31	6,20	11,14
Poros abertos (%)	74,90	72,61	72,67
Poros fechados (%)	0,09	0,09	0,10
Grau anisotrópico	0,97	0,84	0,09

Nota: FA: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,1%); FB: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,3%) e FC: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,5%).
Fonte: Elaboração própria.

Por fim, o grau anisotrópico foi avaliado, uma vez que é um indicador de como será orientada a formação do novo tecido na estrutura dos *scaffolds*. O grau é mensurado entre 0 e 1, onde 0 corresponde a uma estrutura totalmente isotrópica, enquanto 1 corresponde a uma estrutura completamente anisotrópica (SILVA *et al*., 2014). Visto que a organização apresentada pelas fibras da MEC dentro dos tecidos podem variar de anisotrópica (alinhamento da fibra, amplificação direcional da densidade do ligante) a isotrópica (alinhada de forma aleatória, disponibilidade de ligante uniforme) (KONAR *et al*., 2020).

Os valores expressos pelo grau anisotrópico dos *scaffolds* lamelares densos evidenciaram que a incorporação de TPC nas misturas poliméricas COL-SF-PEG 400 com os percentuais de 0,1% (FA) e 0,3% (FB), resultaram em estrutura anisotrópicas com valores de 0,97 (FA) e 0,84 (FB), sendo observado uma pequena redução do grau com o aumento do percentual de TPC.

Quando foi incorporado o percentual de 0,5% de TPC, a estrutura do *scaffold* apresentou uma redução significativamente expressiva no grau anisotrópico, resultando em uma estrutura isotrópica (0,09). As características topográficas em nano e microescala foram reconhecidos como os principais reguladores do crescimento, migração e fenótipo celular. Para a engenharia de tecidos, uma arquitetura completamente biomimética tem como objetivo imitar o alto grau de organização espacial da MEC e dos componentes da membrana basal (MARGOLIS; POLYAK; COHEN, 2018).

No entanto, os componentes formadores da estrutura traqueal, como mucosa, submucosa, adventícia, cartilagem e músculo liso, apresentam uma ampla complexidade. O que vem atraindo grande interesse científico, a fim de elucidar a respeito de alguns aspectos do comportamento do material (isotrópico vs. anisotrópico) (SAFSHEKAN *et al*., 2016).

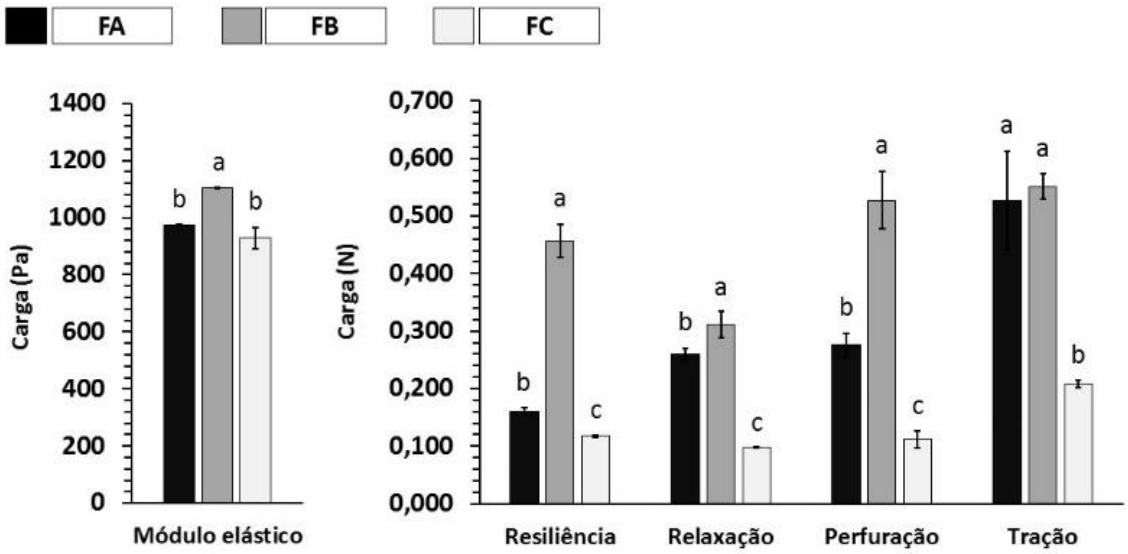
Segundo estudo realizado por Teng *et al*. (2012) as estruturas traqueias da camada mucosa e submucosa apresentam resultados de alongamento e estiramento com comportamento anisotrópicos. No entanto, outras estruturas da traqueia demostraram características opostas. Segundo Safshekan *et al*. (2016) os três principais componentes traqueias, como cartilagem, músculo liso e tecido conjuntivo apresentaram comportamento isotrópicos.

Diante disso, as características apresentadas pelos *scaffolds* lamelares densos com percentuais de TPC indicam um potencial tanto para recuperação de estruturas isotrópicas (FC), quanto para estruturas anisotrópicas (FA e FB). No entanto, visando aplicação na engenharia de tecido traqueal para recuperação tecidual devido a remoção cirúrgica de tumor, o comportamento isotrópico apresentado por FC é mais indicado.

3.7 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas representam um importante conjunto de características para o sucesso na aplicação de um *scaffold*. Uma vez que a estrutura precisa suportar as tensões exercidas durante a implantação cirúrgica do dispositivo, bem como manter o microambiente necessário para o crescimento celular (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008; O'BRIEN, 2011). Na Figura 8 são apresentados os resultados das propriedades mecânicas dos *scaffolds* FA, FB e FC para os ensaios de módulo elástico (módulo Young), resiliência, relaxação, perfuração e resistência a tração.

Figura 8. Propriedades mecânicas dos *scaffolds* lamelares densos.



Nota: FA: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,1%); FB: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,3%) e FC: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,5%). Letras iguais (para a mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre os valores médios ($p > 0,05$). ($n = 3$).
Fonte: Elaboração própria.

O módulo elástico ou módulo de Young é referente a propriedade mecânica que mede a rigidez de um determinado material. O módulo de Young é obtido pela razão entre a tensão aplicada no material e a deformação associada a tensão aplicada (ELKATATNY *et al*., 2017). A análise dos resultados evidenciou que os *scaffolds* FA (974,09 ± 79,00 Pa) e FC (927,97 ± 38,66 Pa) apresentaram valores estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$), entre as três formulações, a FB apresentou maior rigidez (1103,29 ± 38,04 Pa).

A análise dos resultados obtidos nos ensaios de resiliência, relaxação, perfuração e resistência a tração (Figura 8) mostraram que houve mudanças em ambos os *scaffolds* devido a adição de percentuais de TPC, resultando em valores nominais superiores em relação as formulações FB > FA > FC e por meio da análise estatística foi possível confirmar que FC apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) nestes ensaios. A única semelhança foi encontrada entre os *scaffolds* FA (0,527 ± 0,086 N) e FB (0,551 ± 0,021 N) no ensaio de resistência a tração.

Estes resultados demostram a influência da orientação da estrutura porosa (grau anisotrópico) nos *scaffolds*, confirmando diferenças expressivas para a formulação FC (isotrópica) nas propriedades mecânicas, exceto no módulo elástico.

Para o *scaffold* ter sucesso na recuperação tecidual, vários fatores devem ser considerados, como morfologia de superfície, tamanho dos poros, propriedades mecânicas versus porosidade e biodesintegração adequada. Contudo, destes fatores,

a importância das propriedades mecânicas no crescimento celular é particularmente óbvia em aplicações de engenharia de tecidos como ossos, cartilagens, vasos sanguíneos, tendões e músculos (KIM, 2008).

O câncer traqueal, mesmo representando uma doença rara, possui uma opção terapêutica curativa quando o tumor está localizado (BEHRINGER; KÖNEMANN; HECKER, 2014). Desta forma, a ressecção cirúrgica completa do tumor representa a melhor opção de tratamento, com maiores resultados em termos de sobrevida global (SPINELLI *et al*., 2019).

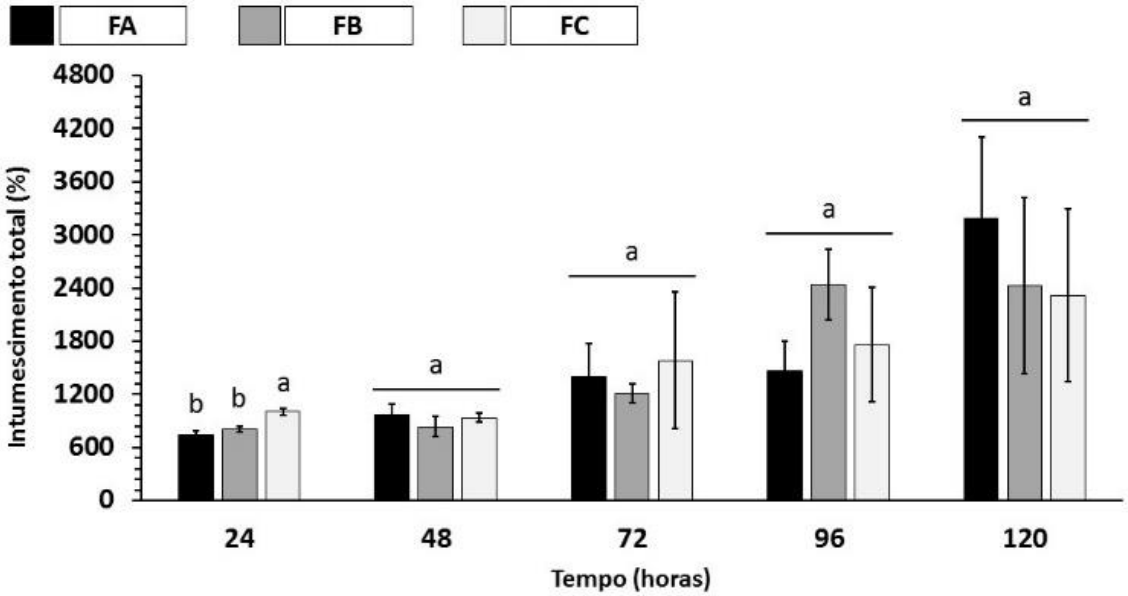
Portanto, é interessante do ponto de vista da aplicação, que as propriedades mecânicas dos *scaffolds* lamelares densos possam desempenhar uma função física semelhante a estrutura da traqueia, e assim, guiando a recuperação do tecido nativo após remoção do tumor.

3.8 Eficiência de intumescimento.

Para potenciais aplicações em engenharia de tecidos, o perfil de intumescimento é um parâmetro chave para avaliar o comportamento das propriedades dos *scaffolds*. Visto que estes dispositivos estarão em contato íntimo com sangue e outros fluidos corporais quando forem aplicados. Desta forma, um perfil de intumescimento adequado pode permitir, além da absorção de fluidos corporais, a transferência de moléculas de sinalização, oxigenação e nutrientes para a matriz dos *scaffolds* (HE *et al*., 2018; TAN *et al*., 2020).

Desta forma, o perfil de intumescimento dos *scaffolds* foram avaliados em solução tampão (PBS pH 7,4 a 37 °C). Na Figura 9 são apresentadas as características de intumescimento relacionadas ao fluido absorvido e retido por toda a estrutura do *scaffold* (matriz + poros), enquanto que na Figura 10 são apresentadas as características do intumescimento pelo próprio material do *scaffold* (matriz).

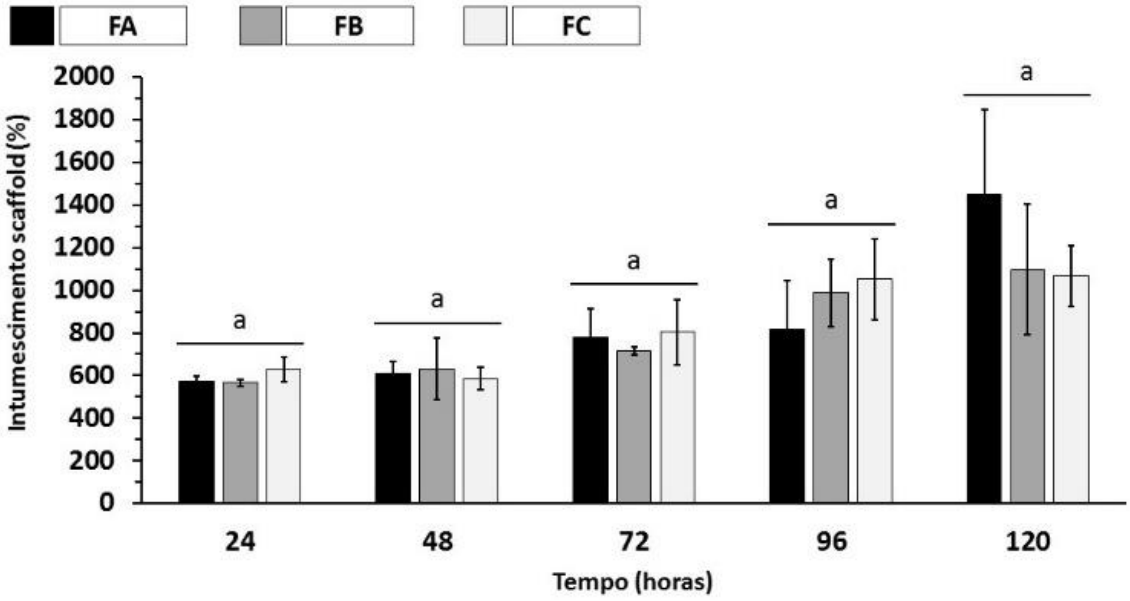
Figura 9. Absorção de fluido dos *scaffolds* lamelares densos (%), fluido retido por toda a estrutura do *scaffold* em PBS (pH 7,4 a 37 °C).



Nota: FA: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,1%); FB: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,3%) e FC: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,5%). Letras iguais (para a mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre os valores médios ($p > 0,05$). ($n = 3$).
Fonte: Elaboração própria.

A análise dos resultados de intumescimento total do *scaffold* (matriz + poros) evidenciou que no período de 24 horas de imersão em PBS, a formulação FC apresentou maior percentual de intumescimento (1005,41 ± 36,57 %), enquanto que as formulações FA (742,87 ± 40,10 %) e FB (802,47 ± 32,33 %), apesar dos valores nominais distintos, não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Durante os períodos do estudo, foi possível verificar aumento nos valores de intumescimento dos *scaffolds*, contudo, os resultados registrados entre 72 – 120 horas não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), independente do percentual de TPC utilizado nos *scaffolds*.

Figura 10. Absorção de fluido dos *scaffolds* lamelares densos (%) pelo próprio material dos *scaffolds* em PBS (pH 7,4 a 37 °C).



Nota: FA: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,1%); FB: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,3%) e FC: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,5%). Letras iguais (para a mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre os valores médios ($p > 0,05$). (n = 3).
Fonte: Elaboração própria.

Em relação ao intumescimento do material polimérico dos *scaffolds* (Figura 9) também foi observado aumento gradual nos valores de intumescimento, contudo, apesar dos valores nominais distintos registrados em cada período do estudo (24 – 120 horas), não foi apresentado diferença estatística significativa entre as formulações ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos nos ensaios, tanto por toda a estrutura do *scaffold* (matriz + poros), quanto pelo próprio material do *scaffold* (matriz) colaboram para mimetizar o possível comportamento *in vivo*. Apesar dos percentuais de TPC aplicado em cada formulação e também a orientação isotrópica confirmada em FC (Tabela 3), os valores de intumescimento registrados foram estatisticamente semelhantes a FA e FC (anisotrópicas).

Mensurar o intumescimento é desejável em aplicações para engenharia de tecidos e biomédicas, pois a absorção de fluidos pode inicialmente levar a um aumento no tamanho dos poros e na porosidade dos *scaffolds*, refletindo na expansão da área de contato interna para infusão e fixação celular (KO *et al*., 2019).

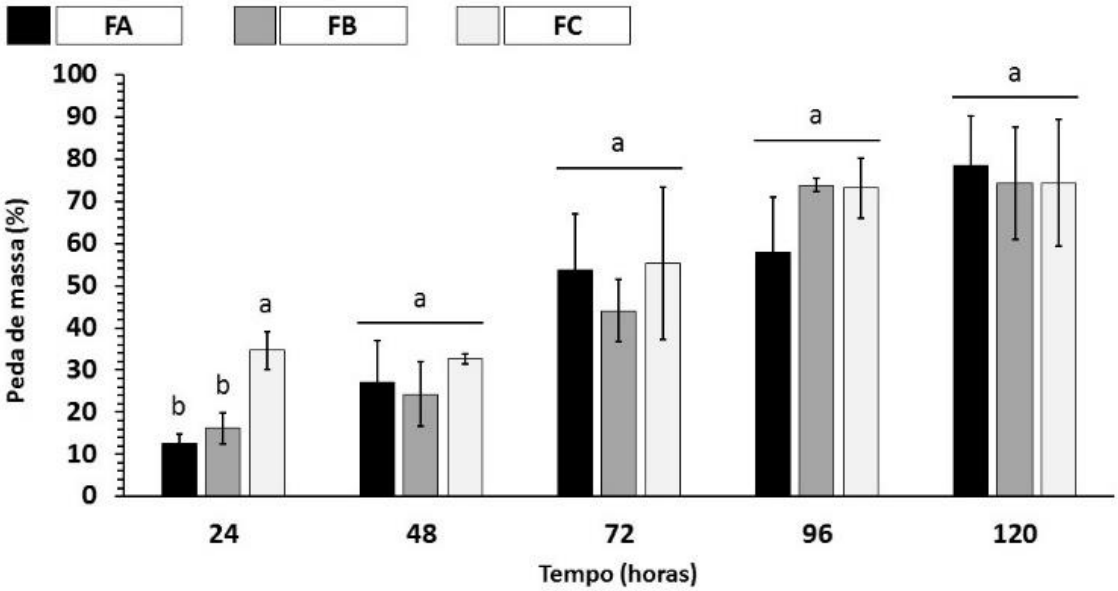
3.9 Estudo de biodesintegração *in vitro*

A Figura 11 mostra a relação de desintegração dos *scaffolds* em função do tempo. Mensurar a taxa de biodesintegração dos *scaffolds* é um fator crucial, pois

influenciam diretamente a integridade da estrutura do dispositivo ao longo do tempo, bem como a regeneração e/ou remodelação realizada pelas células nativas *in vivo*. Neste sentido, um método bastante aplicado para simular preliminarmente a taxa de biodesintegração dos *scaffolds* é a incubação em solução tampão (PBS pH 7,4 a 37 °C).

A análise dos resultados mostrou que a taxa de perda de massa (%) das formulações FA e FB foram semelhantes ao longo de todo o estudo ($p > 0,05$). Já a formulação FC apresentou maior valor de perda de massa em 24 horas ($p < 0,05$), no entanto, após este período não foi observado diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) quando comparado aos demais *scaffolds*.

Figura 11. Perda de massa (%) dos *scaffolds* lamelares densos em PBS (pH 7,4 a 37 °C).



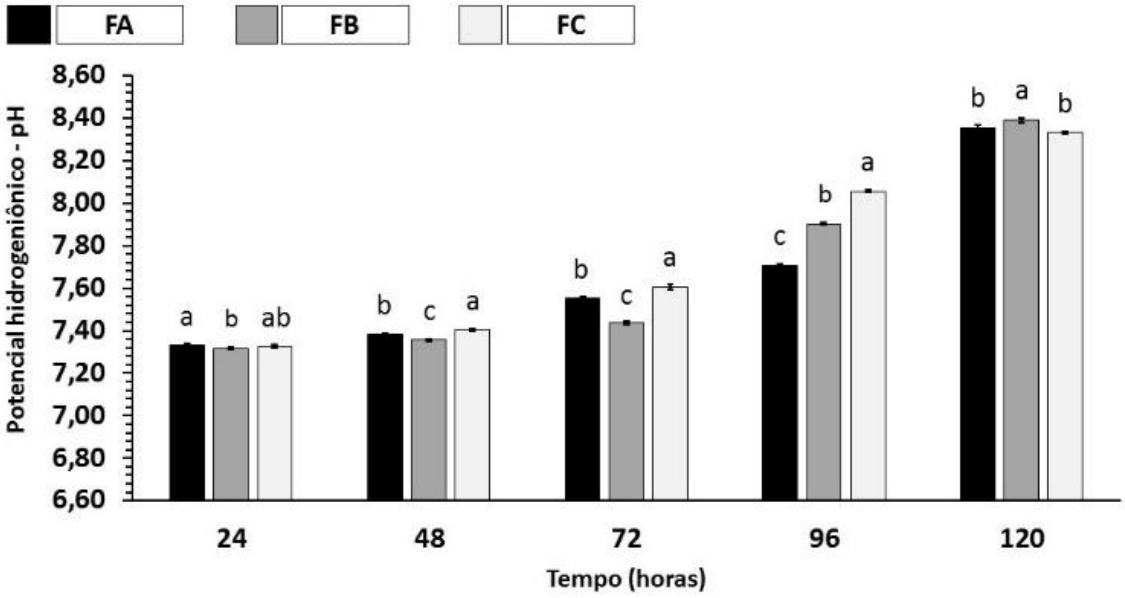
Nota: FA: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,1%); FB: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,3%) e FC: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,5%). Letras iguais (para a mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre os valores médios ($p > 0,05$). ($n = 3$).
Fonte: Elaboração própria.

Assim como observado na avaliação do perfil de intumescimento dos *scaffolds* (Figura 9 e 10), os percentuais de TPC aplicados, bem como a orientação da estrutura (isotrópica ou anisotrópica) não influenciou na taxa de desintegração das formulações, apresentando valores estatisticamente semelhantes após o período de 48 horas ($p > 0,05$). Desta forma, os resultados obtidos indicam que a biodesintegração ocorreu exclusivamente devido a cisão das longas cadeias moleculares dos polímeros que o compõem, esta cisão é causada por reações químicas, principalmente por reações hidrolíticas, resultando em baixa massa molecular e perda de massa dos polímeros

(SHI *et al*., 2017). É importante ressaltar que o (s) produto (s) da biodesintegração dos *scaffolds* devem ser não tóxicos e facilmente absorvidos ou excretados por vias metabólicas (SULTANA; WANG, 2011).

A Figura 12 mostra os valores de pH registrados durante o estudo de biodesintegração *in vitro*. Durante o estudo, a geração de produtos da biodesintegração por meio das reações hidrolíticas, causou desequilíbrio no pH do PBS, registrando aumentos expressivos na escala de pH a partir de 72 horas do estudo.

Figura 12. pH dos *scaffolds* lamelares densos em PBS a 37 °C.



Nota: FA: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,1%); FB: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,3%) e FC: *scaffold* a base de COL-SF-PEG 400-TPC (0,5%). Letras iguais (para a mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre os valores médios ($p > 0,05$). ($n = 3$).
Fonte: Elaboração própria.

As formulações dos *scaffolds* apresentaram uma faixa de pH entre 7,33 – 8,36 (FA), 7,32 – 8,39 (FB) e 7,33 – 8,33 (FC) ao longo de 120 horas do estudo, evidenciando uma variação na escala de pH ≥ 1,00. Devido, em especial, a presença dos compostos fenólicos totais nos *scaffolds*, pois suas estruturas químicas foram se desintegrando com o decorrer do tempo de estudo e gerando fragmentos com características básicas, resultando na alcalinização do meio de incubação.

Mensurar o efeito dos produtos gerados durante o processo de biodesintegração sobre o pH é de grande importância, visto que nos processos de regeneração tecidual, o equilíbrio ácido-básico é essencial para o processo de remodelação (MOLDERO *et al*., 2020). Segundo Wu *et al*. (2007), o pH extracelular afeta diretamente o metabolismo energético e a síntese da MEC produzida pelos

condrócitos. Desta forma, são necessárias mais investigações, com o objetivo de mensurar o comportamento dos condrócitos *in vitro* nas condições apresentadas pelos *scaffolds*, uma vez que o aumento do pH foi verificado de forma gradual.

4 CONCLUSÃO

A técnica de compressão plástica é eficiente para produzir *scaffold* lamelar denso a base de colágeno, fibroína de seda, polietilenoglicol 400 e compostos fenólicos totais. A adição de percentuais de TPC foi capaz de modular as características morfológicas, dados morfométricos e propriedades mecânicas dos *scaffolds*. Os espectros de FTIR mostram interações químicas entre os polímeros, a aplicação de TPC como agente reticulante, exercendo ligações iônicas entre os grupos funcionais amina e carboxílico do COL. Além disso, mesmo que em menor quantidade, também foi possível a reticulação da SF. Bem como a transição conformacional permitida da α-hélice e da bobina aleatória para estrutura de folha-β. A análise de DSC reafirmou a ocorrência de interações químicas, promovendo uma nova conformação estrutural. As imagens captadas por µCT e SEM mostraram que os *scaffolds* possuem porosidade, interconectividade e estrutura de superfície porosa com geometria semelhante a giroide. Porém, o grau anisotrópico foi modulado de acordo com o percentual de TPC aplicado, apresentando estrutura anisotrópica (FA e FB) e isotrópica (FC). O efeito do TPC na capacidade de intumescimento e taxa de biodesintegração apresentaram semelhanças entre as formulações. Nas propriedades mecânicas foi confirmado maiores resistências para FB (0,3% de TPC) e menores resistências para FC (0,5% de TPC). Portanto, com os resultados obtidos podemos confirmar que os percentuais de compostos fenólicos totais aplicados foram capazes de modular as propriedades dos *scaffolds*, principalmente morfológicas, dados morfométricos e mecânicos. Resultando em *scaffolds* lamelares densos com características de interesse para aplicação na engenharia de tecido traqueal. Assim, este estudo pode fornecer uma maneira de melhorar a regeneração das principais estruturas traqueias (cartilagem, músculo liso e tecido conjuntivo) após remoção cirúrgica de tumor.

5 Referências

ACHILLI, M.; MANTOVANI, D. Tailoring Mechanical Properties of Collagen-Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering: The Effects of pH, Temperature and Ionic Strength on Gelation. **Polymers,** v. 2, p. 664–680, 2010.

ALVES, T. et al. Dense Lamellar Scaffold as Biomimetic Materials for Reverse Engineering of Myocardial Tissue: Preparation, Characterization and Physiomechanical Properties. **Journal of Material Science & Engineering**, v. 07, n. 05, p. 1–9, 2018.

ALVES, T. et al. Dense lamellar scaffold, biomimetically inspired, for reverse cardiac remodeling: Effect of proanthocyanidins and glutaraldehyde. **Journal of Dispersion Science and Technology**, p. 1–14, 2019.

ALVES, T. F. R.; ARANHA, N.; CHAUD, M. V. Mechanical stress and thermal treatments induced alpha-helix to beta-sheet transition in Silk Fibroin films. **International Journal of Drug Research and Technology**, v. 8, n. 3, p. 149–157, 2018.

ASUNCION, M. C. T.; GOH, J. C.; TOH, S. Anisotropic silk fibroin/gelatin scaffolds from unidirectional freezing. **Materials Science & Engineering C**, v. 67, p. 646–656, 2016.

BEHRINGER, D.; KÖNEMANN, S.; HECKER, E. Treatment Approaches to Primary Tracheal Cancer. **Thoracic Surgery Clinics of NA**, v. 24, n. 1, p. 73–76, 2014.

BERNAL, C. et al. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849–855, 2002.

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.

BERTASI, F. et al. Electrochimica Acta Single-Ion-Conducting Nanocomposite Polymer Electrolytes for Lithium Batteries Based on Lithiated-Fluorinated-Iron Oxide and Poly (ethylene glycol) 400. **Electrochimica Acta**, p. 1–11, 2015.

BIGI, A. et al. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**, v. 23, p. 4827–4832, 2002.

BOTS, E. M. T. et al. Respirology Case Reports Syncope due to tracheal adenoid cystic carcinoma. **Official Case Reports Journal of the Asian Pacific Society of Respirology**, v. 7, n. 7, p. 3–5, 2019.

BROUGHAM, C. M. et al. Freeze-Drying as a Novel Biofabrication Method for Achieving a Controlled Microarchitecture within Large, Complex Natural Biomaterial Scaffolds. **Advanced Healthcare Materials**, v. 1700598, p. 1–7, 2017.

BUTLER, C. R. et al. Biomaterials Vacuum-assisted decellularization: an accelerated protocol to generate tissue-engineered human tracheal scaffolds. **Biomaterials**, v. 124, p. 95–105, 2017.

CANEVAROLO JR, S. V. **Ciência dos Polímeros - Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 3º Edição ed. São Paulo: Artliber editora, 2002.

CASCANT, M. M. et al. Talanta Determination of total phenolic compounds in compost by infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 153, p. 360–365, 2016.

CHARLTON, P.; PITKIN, L. Airway compromise due to adenoid cystic carcinoma obstructing the distal trachea: a review of current management and clinical trials. **BMJ Case Reports**, p. 1–4, 2015.

CROWLEY, C.; BIRCHALL, M.; SEIFALIAN, A. M. Trachea transplantation: from laboratory to patient. **Jounal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 357–367, 2014.

DHASMANA, A.; SINGH, A.; RAWAL, S. Biomedical grafts for tracheal tissue repairing and regeneration “Tracheal tissue engineering: an overview”. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, p. 1–36, 2020.

DOWNING, D. et al. Increased efficiency Gyroid structures by tailored material distribution. **Materials & Design**, p. 109096, 2020.

ELKATATNY, S. et al. Development of a new correlation to determine the static Young ’ s modulus. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 8, n. 1, p. 17–30, 2017.

GOVINDARAJAN, D. et al. Fabrication of Hybrid Collagen Aerogels Reinforced with Wheat Grass Bioactives as Instructive Scaffolds for Collagen Turnover and Angiogenesis for Wound Healing Applications. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 20, p. 16939–16950, 2017.

GRIFFON, D. J. et al. Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 313–320, 2006.

HAWLEY, T. G.; JOHNSON, T. B. The Isoelectric Point of Silk Fibroin. **Industrial and Engineering Chemistry,** v. 22, n. 3, p. 297–299, 1930.

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

HOFFMAN, B. et al. Biomechanical and Biochemical Characterization of Porcine Tracheal Cartilage. **The Laryngoscope**, v. 126, n. 10, p. E325–E331, 2015.

KALATHUR, M.; BAIGUERA, S.; MACCHIARINI, P. Translating tissue-engineered tracheal replacement from bench to bedside. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 4185–4196, 2010.

KIM, G. H. Electrospun PCL nanofibers with anisotropic mechanical properties as a biomedical scaffold. **Biomedical Materials**, v. 3, n. 2, p. 025010, 2008.

KIM, M. H.; PARK, W. H. Chemically cross-linked silk fibroin hydrogel with enhanced elastic properties, biodegradability, and biocompatibility. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 2967–2978, 2016.

KNANEH-MONEM, H. et al. Differential epithelial growth in tissue-engineered larynx and trachea generated from postnatal and fetal progenitor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 510, n. 2, p. 205–210, 2019.

KO, S. W. et al. Analysis of Drug Release Behavior Utilizing the Swelling Characteristics of Cellulosic Nanofibers. **Polymers**, v. 11, n. 1376, p. 1–8, 2019.

KOJIMA, K.; VACANTI, C. A. Tissue engineering in the trachea. **Anatomical Record**, v. 297, n. 1, p. 44–50, 2014.

KONAR, S. et al. Collagen-I/silk-fibroin biocomposite exhibits microscalar confinement of cells and induces anisotropic morphology and migration of embedded fibroblasts. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 108, n. 5, p. 2368–2377, 2020.

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.

LEÓN-LÓPEZ, A. et al. Hydrolyzed Collagen – Sources and Applications. **Molecules,** v. 24, n. 22, p. 1–16, 2019.

MA, X. et al. A novel chitosan-collagen-based hydrogel for use as a dermal filler: initial in vitro and in vivo investigations. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, p. 2749–2763, 2014.

MARGOLIS, G.; POLYAK, B.; COHEN, S. Magnetic Induction of Multiscale Anisotropy in Macroporous Alginate Scaffolds. **Nano Letters**, v. 18, n. 11, p. 7314–7322, 2018.

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

MOLDERO, I. L. et al. Probing the pH Microenvironment of Mesenchymal Stromal Cell Cultures on Additive-Manufactured Scaffolds. **Small**, v. 2002258, p. 1–8, 2020.

MOUSSA, E. A.; HASSAN, S. A. Histology and Scanning Electron Microscopy of the Lower Respiratory Tract in the Adult Red Fox (Vulpes vulpes). **International Journal of Morphology**, v. 33, n. 1, p. 267–274, 2015.

NAVA, M. M. et al. The effect of scaffold pore size in cartilage tissue engineering. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 14, n. 3, p. 223–229, 2016.

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

OLIVARES, A. L. et al. Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 6142–6149, 2009.

ONEM, E. et al. Comparison of different tanning agents on the stabilization of collagen via differential scanning calorimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 129, n. 1, p. 615–622, 2017.

PANICO, A.; PALADINI, F.; POLLINI, M. Development of regenerative and flexible fibroin-based wound dressings. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, p. 1–12, 2018.

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.

PHAM, D. T.; SAELIM, N.; TIYABOONCHAI, W. Crosslinked fibroin nanoparticles using EDC or PEI for drug delivery: physicochemical properties, crystallinity and structure. **Journal of Materials Science**, v. 53, n. 20, p. 14087–14103, 2018.

PRIVALOV, G. et al. Precise Scanning Calorimeter for Studying Thermal Properties of Biological Macromolecules in Dilute Solution. **Analytical Biochemistry**, v. 85, p. 79–85, 1995.

RADHAKRISHNAN, S. et al. Collagen Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Review. In: **Processes and Phenomena on the Boundary Between Biogenic and Abiogenic Nature.** Springer Nature Switzerland. p. 3–22, 2020.

RIZWAN, S. B. et al. Characterisation of bicontinuous cubic liquid crystalline systems of phytantriol and water using cryo field emission scanning electron microscopy (cryo FESEM). v. 38, p. 478–485, 2007.

SAFSHEKAN, F. et al. Mechanical Characterization and Constitutive Modeling of Human Trachea: Age and Gender Dependecy. **Materials**, v. 9, n. 456, p. 1–13, 2016.

SCHOEN, A. H. **Infinite Periodic Minimal Surfaces Without Self-Intersections**. Nasa Technical Note (Nasa TN D-5541), 1970.

SCHOEN, A. H. Reflections concerning triply-periodic minimal surfaces. **Interface Focus**, v. 2, n. 5, p. 658–668, 2012.

SHI, Q. et al. Effect of rehabilitation exercise durations on the dynamic bone repair process by coupling polymer scaffold degradation and bone formation. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, p. 1–13, 2017.

SILVA, A. M. H. DA et al. Two and three-dimensional morphometric analysis of trabecular bone using X-ray microtomography (μCT). **Brazilian Journal of Biomedical Engineering**, v. 30, p. 93–101, 2014.

SILVA, S. S. et al. Genipin-Modified Silk-Fibroin Nanometric Nets. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, n. 8, p. 766–774, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 6ª ed. New York, NY: John Wiley & Sons, Incorporated, 2000.

SLIMANE, E. BEN; SADOK, S. Collagen from cartilaginous fish by-products for a potential application in bioactive film composite. **Marine Drugs**, v. 16, n. 6, p. 1–19, 2018.

SPINELLI, G. P. et al. Combined surgery and radiotherapy as curative treatment for tracheal adenoid cystic carcinoma: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 9, p. 1–5, 2019.

STANISÇUASKI, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova,** v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

STENHAMRE, H. et al. Influence of pore size on the redifferentiation potential of human articular chondrocytes in poly (urethane urea) scaffolds. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 5, p. 578–588, 2011.

SULTANA, N.; WANG, M. PHBV Tissue Engineering Scaffolds Fabricated via Emulsion Freezing / Freeze-drying : Effects of Processing Parameters. **International Conference on Biomedical Engineering and Technology,** v. 11, p. 29–34, 2011.

TAN, H. et al. Electrospun cellulose acetate butyrate/polyethylene glycol (CAB/PEG) composite nano fi bers: A potential scaffold for tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 188, n. June 2019, p. 110713, 2020.

TENG, Z. et al. Anisotropic material behaviours of soft tissues in human trachea: An experimental study. **Journal of Biomechanics**, v. 45, n. 9, p. 1717–1723, 2012.

WANG, L. et al. Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from Psidium guajava L . leaf aqueous extracts. **Materials Science & Engineering C**, v. 86, p. 1–8, 2018.

WU, M. et al. Effect of Extracellular pH on Matrix Synthesis by Chondrocytes in 3D Agarose Gel. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 2, p. 430–434, 2007.

YAN, S. et al. Directed assembly of robust and biocompatible silk fibroin/hyaluronic acid composite hydrogels. **Composites Part B,** v. 176, p. 107204, 2019.

ZHAO, X. et al. Effect of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activity of red grape pomace powders. **Powder Technology**, v. 286, p. 838–844, 2015.

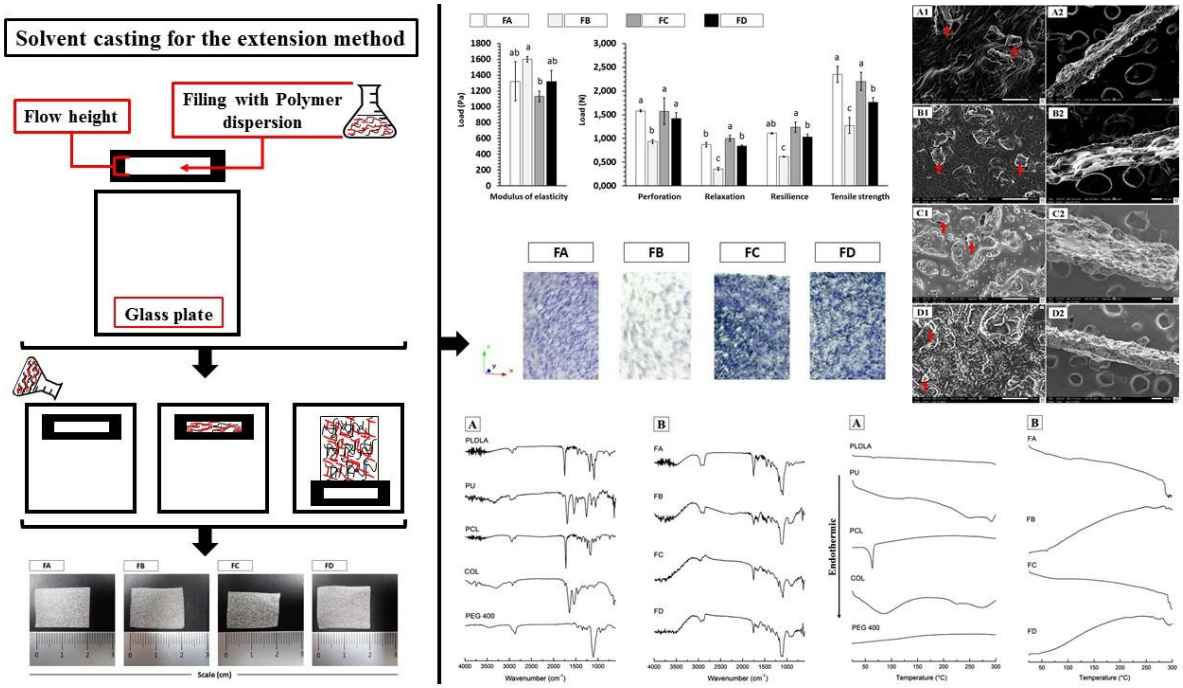
CAPÍTULO IV

***Scaffold* Laminado como Material Biomimético para Engenharia de Tecido Traqueal: Preparação, caracterização e propriedades mecânicas.**

Resumo: O objetivo deste estudo foi desenvolver um *scaffold* laminado como material biomimético para a regeneração do tecido traqueal estenosado. Para gerar estrutura laminada com polímeros foi utilizado a técnica de *solvent casting* associado ao método de extensão. O colágeno aplicado como agente porogênico em misturas poliméricas de poli (L-co-D, L ácido láctico), policaprolactona, poliuretano diol solução e polietilenoglicol 400 foram utilizados para obter dispositivos tridimensionais com porosidade formada *in situ*. Para caracterização dos *scaffolds* foram avaliadas as propriedades mecânicas, físico-químicas, estruturas morfológicas, dados morfométricos, além da eficiência de intumescimento e taxa de biodesintegração. Interações químicas e um novo rearranjo molecular foram confirmadas entre os polímeros dos *scaffolds*, promovendo misturas miscíveis. O efeito do volume de solvente aplicado modificou as estruturas morfológicas, bem como as propriedades mecânicas, mas não modificou o módulo elástico. As interações poliméricas e modificações contribuíram para a formação de dispositivos mais hidrofílicos e com biodesintegração sustentada. Considerando a estrutura anisotrópica, e as propriedades mecânicas, eficiência de intumescimento e taxa de biodesintegração, este estudo pode fornecer uma maneira de melhorar a remodelação da camada mucosa e submucosa da traqueia para tentativa de estabilização em quadros de estenose não cirúrgicas.

Palavras-chave: Traqueia, estenose traqueal, *scaffold* laminado, *solvente casting*, polímeros sintéticos.

Resumo gráfico.



1. INTRODUCÃO

A estenose traqueal é uma doença geralmente causada por fatores congênitos, traumas, inflamações e neoplasias malignas dentro da via aérea (JING *et al*., 2018). A causa mais comum corresponde a complicações após processo de intubação prolongado, o aumento deste procedimento por meio da intubação orotraqueal, nasotraqueal ou tubos de traqueostomia, tem ocasionado lesões significativas na região laringe-traqueia, com diversos graus e por vezes de difícil tratamento (AVELAR *et al*., 2011; FILHO; MACHADO; JANISZEWSKI, 2005).

Devido aos avanços das técnicas cirúrgicas a ressecção traqueal se tornou o tratamento de escolha para a maioria das estenoses, principalmente aquelas de tamanho médio, proporcionando excelente alívio a longo prazo, no entanto, se o intervalo da lesão for superior a 50% (acima de 6 cm) em adultos ou mais de 30% em crianças, esta condição aumenta a tensão, causando grave lesão anastomótica pós-operatória (CATANEO *et al*., 2018; WANG *et al*., 2016; YAMAMOTO *et al*., 2011). Nessas circunstâncias, a substituição da traqueia é uma abordagem possível. Contudo a disponibilidade de material para transplante é limitada, seja pela falta de doadores, o que dificulta encontrar um doador compatível ou por imunossupressão pós-transplante. Muitas estratégias para substituição da traqueia têm sido testadas e avaliadas (MAUGHAN *et al*., 2017).

Os homoenxertos ou traqueias cadavéricas tornaram-se menos imunogênicas após processamento químico, este tipo de material foi utilizado como *patch* para ampliar e preservar a parede posterior existente da traqueia, mas os resultados clínicos não são conclusivos e sua função a longo prazo ainda é imprevisível (CHANG *et al*., 2014). A descelularização de traqueia e o xenotransplante, são outras possibilidades, onde as células são removidas mecanicamente ou quimicamente, criando um *scaffold* hipoteticamente funcional e não halogênico (TCHOUKALOVA *et al*., 2018; YEON *et al*., 2018).

O objetivo final da tecnologia de regeneração da traqueia para gerar um tecido novo ou substituir um tecido e/ou órgão malformado ou lesionado por doenças ou traumas mecânicos é uma alternativa viável ao transplante. Pesquisas com células tronco e hormônios de crescimento que suportam a proliferação e a diferenciação celular é racionalmente mais aceitável *scaffolds* sem células. No entanto, os nichos celulares que circundam o tecido lesionados tem sido explorado e os resultados são mais efetivos quando se cria um microambiente capaz de atrair as células

circunvizinhas e que concorra favoravelmente para o crescimento e proliferação (WEIGEL; SCHINKEL; LENDLEIN, 2006). *Scaffolds* sintéticos criados de blendas poliméricas tem sido aplicado clinicamente, entretanto o material ideal para uso neste contexto ainda permanece um desafio (MAUGHAN *et al*., 2017).

A engenharia de tecido traqueal é uma das tendências de medicina regenerativa, com o uso de *scaffolds* capazes de mimetizar a matriz para fixação e crescimento celular e subsequente formação do tecido *in vivo* ou *in vitro*. Este método é considerado uma alternativa potencial para o tratamento de estenose traqueal (GILEVICH *et al*., 2018). *Scaffolds* fabricados com biomateriais tem temporariamente substituído a matriz extracelular (MEC) e servido como substrato e suporte de fixação celular. Estes biomateriais podem ser de origem natural como colágeno, fibroína de seda, ácido hialurônico, celulose, quitosana, alginato (BHAT; KUMAR, 2013).

Os polímeros e copolímeros sintéticos biocompatíveis e biodegradáveis também tem sido investigado, por exemplo policaprolactona, polietilenoglicol, poliuretano, ácido láctico e seus copolímeros (FERREIRA; MOUSAVI, 2018). Tantos os materiais de origem biológica ou obtidos de biossíntese como os sintéticos, reúnem as propriedades e os requisitos necessários para um dispositivo capaz de estimular a regeneração tecidual. Assim, as blendas de biomateriais sintéticos e naturais racionalmente projetadas favorecem a regeneração tecidual. A escolha do melhor material depende de um conhecimento profundo da anatomia, morfologia, histologia e fisiologia do órgão a ser regenerado (KHORSHIDI *et al*., 2015).

As propriedades intrínsecas do material tais como a mecânica, térmica, adesividade e solubilidade são importantes para formar um *scaffold* compatível com as propriedades de qualidade da MEC e que atenda as demandas do sítio de aplicação. Os requisitos básicos para um *scaffold* são a morfologia tridimensional, o tamanho e a interconectividade dos poros que garante a fixação e crescimento celular, o fluxo de nutrientes e remoção de impurezas metabólicas (CUI *et al*., 2012).

Os objetivos deste estudo foram desenvolver e avaliar *scaffolds* laminados obtidos pela técnica de *solvent casting* em misturas poliméricas de poli (L-co-D, L ácido láctico), policaprolactona, poliuretano diol solução e polietilenoglicol 400, sendo o colágeno aplicado como agente porogênico *in situ*. Além disso, avaliar o efeito do volume de solvente aplicado à técnica para obtenção das misturas poliméricas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

O pó de colágeno extraído de peles bovinas foi fornecido por Nova Prom Food Ingredients Ltda (Brasil), PURASORB® PLDL 7038 - 70/30 copolímero L-lactídeo/ D, L-lactídeo (Corbion, Holanda), Policaprolactona (Sigma-Aldrich, EUA), Poliuretano diol solução de 88 em massa % em H2O (Sigma-Aldrich, EUA), Polietilenoglicol 400 (Dinâmica, Brasil), Cloreto de metileno (Synth, Brasil). Os demais reagentes foram de qualidade farmacêutica.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação dos *scaffolds* laminados (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL

O processamento dos *scaffolds* laminados (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL (1: 2: 2 m/m/m) foram realizados pela técnica de *solvent casting* seguindo duas etapas: (I) preparação de mistura polimérica PLDLA-PCL ou PLDLA-PU (67: 33), (II) adição do PEG 400 e COL como agente porogênico hidrodispersível para formação *in situ* de poros. Resumidamente, o PLDLA e PCL ou PU foram solubilizados em diclorometano (DCM) obtendo soluções à 8 ou 5% (m/v) e vertidas para obter uma mistura polimérica PLDLA-PCL ou PLDLA-PU (67: 33). Após a dissolução destes polímeros foi adicionado o PEG 400, seguido do COL, sob agitação constante (Agitador magnético, Fisatom – Mod. 753A, São Paulo, Brasil) utilizando barra magnética revestida em teflon (5x15 mm, cod. 190.211) até completa homogeneização. A dispersão polimérica foi transferida para o extensor com 19 cm^3, previamente calibrado para vazão de 0.25 $mL.s^{-1}$. A formulação foi estendida sobre uma placa de vidro, previamente desengordurada. A secagem foi realizada a temperatura de 23 ± 2 °C, em ambiente ventilado, protegido de impurezas do ar e a remoção do solvente foi controlada por gravimetria. Neste estudo foram obtidas quatro formulações distintas (FA-FD) que variam de acordo com a presença dos polímeros PCL e PU, bem como a quantidade de solvente utilizado (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das formulações para a preparação dos *scaffolds* laminados.

Componentes	Formulações			
	FA	FB	FC	FD
Diclorometano	12,5 mL	20 mL	12,5 mL	20 mL
Poli (L-co-D, L ácido láctico)	0,67 g	0,67 g	0,67 g	0,67 g
Policaprolactona	0,33 g	0,33 g	-	-
Poliuretano diol solução	-	-	0,33 g	0,33 g
Polietilenoglicol 400	2 g	2 g	2 g	2 g
Colágeno	2 g	2 g	2 g	2 g

Fonte: Elaboração própria.

2.2.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Como descrito no item 2.2.4 do Capítulo II.

2.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Como descrito no item 2.2.5 do Capítulo II.

2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Como descrito no item 2.2.6 do Capítulo II.

2.2.5 Microtomografia computadorizada (μCT)

Como descrito no item 2.2.7 do Capítulo II.

2.2.6 Propriedades mecânicas

A análise de perfil de textura (TPA) foi realizada para medir as propriedades mecânicas [elasticidade (módulo de Young), relaxação, resiliência, perfuração e resistência a tração] dos *scaffolds*, utilizando um analisador de textura (Stable Micro Systems – TA-XT Plus, Surrrey, Reino Unido) com carga de 5 Kg. Para os ensaios de elasticidade relaxação, resiliência e perfuração foram utilizados amostras com área de 4 cm^2 e para o ensaio de resistência a tração foram utilizados amostras com área de 6 cm^2. A velocidade do teste foi definida para uma taxa de 2 $mm.s^{-1}$ para perfuração e resistência a tração e 0,05 $mm.s^{-1}$ para relaxação, resiliência e elasticidade. Para todos os testes foram utilizados uma força de 0,098 N. (n = 3).

2.2.7 Eficiência de intumescimento

Como descrito no item 2.2.9 do Capítulo II.

2.2.8 Estudo de biodesintegração *in vitro*

Como descrito no item 2.2.10 do Capítulo II.

2.2.9 Análise estatística

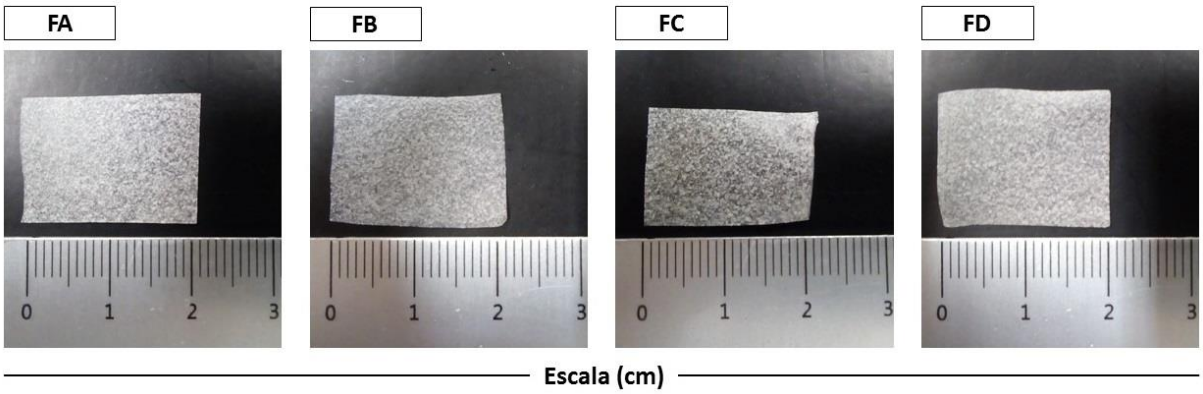
Como descrito no item 2.2.11 do Capítulo II.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização macroscópica dos *scaffolds* laminados

Os *scaffolds* laminados após evaporação do solvente foram removidos da placa de vidro e analisados macroscopicamente. Como apresentado na Figura 1, os *scaffolds* apresentaram aspectos positivos, atendendo aos requisitos de integridade, homogeneidade, ausência de bolhas de ar e resistência a manipulação. As formulações foram recortadas e apresentadas com dimensões de 1,5 x 2 cm, sendo registrado variações nas espessuras de 0,03 cm para FA e FC e de 0,025 cm para FB e FD.

Figura 1. Aspectos macroscópicos dos *scaffolds* laminados.



Nota: (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL - solvente (FA); (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL + solvente (FB); (PLDLA-PU)-PEG 400-COL - solvente (FC) e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL + solvente (FD).
Fonte: Elaboração própria.

Na análise macroscópica também foi possível verificar em todas as formulações a dispersão homogênea dos grânulos de colágeno. A utilização desta proteína nos *scaffolds* tem por função, além da formação de poros *in situ*, atuar como substrato natural para as células. No organismo humano, o colágeno é a proteína mais abundante e desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade biológica e estrutural da MEC, que proporciona suporte físico aos tecidos (MOHSENI *et al*., 2017; SADEGHI-AVALSHAHR *et al*., 2017).

3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise por FTIR é aplicada para obter um espectro de infravermelho com medida de absorbância ou transmitância das energias emitidas pelos níveis

vibracionais presentes na estrutura molecular dos materiais. Os resultados obtidos são utilizados para identificação de possíveis interações ou incompatibilidades na estrutura química devido à interação das moléculas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). Os espectros de infravermelho das matérias-primas utilizadas e das formulações dos *scaffolds* são apresentados na Figura 2.

Os picos de transmitância característicos do PLDLA foram observados nas regiões entre 2995-2931 cm^{-1} correspondente a deformação axial simétrica (CH_2) e assimétrica (CH_3), respectivamente. O pico em 1751 cm^{-1} é típico de poliésteres, o qual corresponde a deformação axial do grupo C=O. Nas regiões em 1448 cm^{-1} e 1365 cm^{-1} são observados picos correspondentes a deformação angular das ligações CH no grupamento CH_3. Já os picos 1269 cm^{-1} e 1087 cm^{-1} correspondem ao alongamento de =C–O. Em 1184 cm^{-1} atribuído a ligação C–C e por fim o pico em 736 cm^{-1} relacionado ao grupo CH (AMARAL *et al*., 2019; LEAL *et al*., 2019).

A análise espectral do PCL apresentou picos característicos em 1047 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} correspondentes ao alongamento C–O–C, já o pico de alongamento C–O foi observado em 1168 cm^{-1}. Os picos localizados nas regiões 1365 cm^{-1} e 1419 cm^{-1} são atribuídas as vibrações características de flexão de $–CH_2$. Em 1724 cm^{-1} correspondente ao alongamento C=O e por fim foram observados os modos de alongamento do grupo $–CH_2$ assimétrico e simétrico nos picos em 2866 cm^{-1} e 2945 cm^{-1}, respectivamente (SHARIF *et al*., 2018).

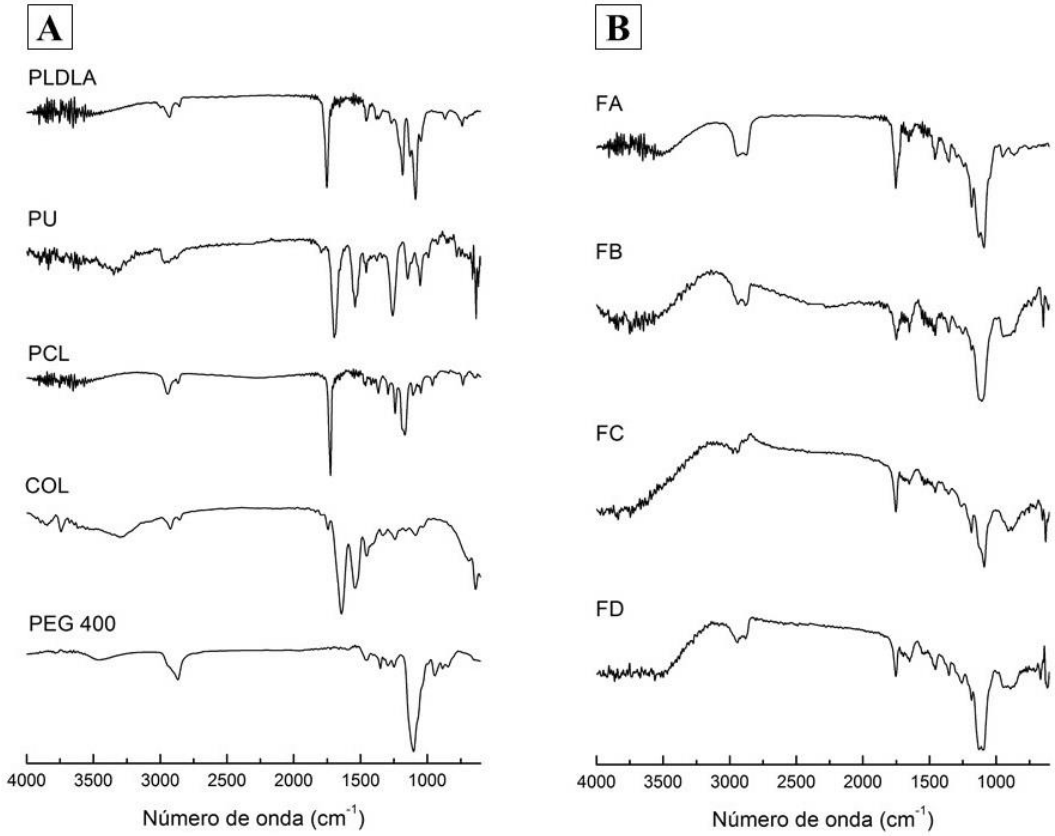
Na análise do PEG podem ser observados os picos característicos nas regiões 1103 cm^{-1} correspondente ao estiramento harmônico do grupo C–O–C, em 2868 cm^{-1} atribuído ao alongamento de grupo CH_2, já o pico em 3452 cm^{-1} referente ao grupo hidroxila (OH) terminal da cadeia do PEG associada por ligações de hidrogênio (PEREIRA *et al*., 2016).

O COL apresentou picos característicos em 1242 cm^{-1} típico da amida III, consistindo em componentes de alongamento C–N e deformação N–H. O pico em 1537 cm^{-1} típico da amida II, atribuído as vibrações no plano da ligação N–H e ao estiramento C–N. Em 1648 cm^{-1} correspondente a absorção típica da amida I, referente ao alongamento da carbonila (C=O) e o pico em 3302 cm^{-1} correspondente ao grupo OH (ALVES *et al*., 2018; SLIMANE; SADOK, 2018).

No espectro do PU podem ser observados os picos característicos nas regiões 779 cm^{-1}, 1053 cm^{-1} e 1259 cm^{-1} indicam o alongamento C–O correspondente aos grupos alcoólicos. Em 1539 cm^{-1} referente a vibração de flexão N–H (amida II), a

vibração de alongamento do grupo C=O foi identificado por pico duplo entre 1741-1660 cm^{-1}. Os picos localizados em 2935 cm^{-1} e 2877 cm^{-1} correspondem as absorções assimétrica e simétrica do grupo CH_2, respectivamente. Por fim, em 3348 cm^{-1} atribuído ao alongamento do NH (JAGANATHAN *et al*., 2017; SODEIFIAN *et al*., 2019; TANG; GAO, 2017).

Figura 2. Espectros FTIR dos componentes (A) e *scaffolds* laminados (B).



Nota: Poli (L-co-D, L ácido láctico) (PLDLA); Poliuretano diol solução (PU); Policaprolactona (PCL); Colágeno (COL) e Polietilenoglicol 400 (PEG 400). (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL - solvente (FA); (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL + solvente (FB); (PLDLA-PU)-PEG 400-COL - solvente (FC) e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL + solvente (FD).
Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados apresentados pelo ensaio de FTIR, os *scaffolds* laminados obtidos apresentaram alterações nos espectros quando comparados aos polímeros puros (Figura 2-A), evidenciando leves deslocamentos, redução de intensidade, sobreposição e ausência de picos característicos.

Nos *scaffolds* FA e FB (Figura 2-B) foi possível observar um aumento na intensidade dos picos nas regiões 2941 cm^{-1} – 2875 cm^{-1} correspondente ao grupo CH_2 simétrico e assimétrico, respectivamente. Este aumento da intensidade é reflexo da sobreposição destes grupos presentes no PLDLA e PCL. Outra sobreposição foi

observada para o grupo C=O (FA: 1753 cm^{-1}; FB: 1749 cm^{-1}), contudo, evidenciando uma redução de intensidade em comparação aos componentes puros, este acontecimento é mais expressivo em FB. Na região entre 1230 cm^{-1} – 1004 cm^{-1} foi observado uma junção de picos, sugerindo uma sequência referente ao grupo C–O–C presente no PCL e PEG 400. Além disso, não foi possível identificar o pico referente ao grupo OH do PEG 400. Já em relação ao COL, também não foi possível identificar o grupo OH, bem como o grupo referente a amida II, sendo observado os picos característicos da amida I e III.

Nos *scaffolds* FC e FD (Figura 2-B) foi possível observar a presença dos picos nas regiões 2939 cm^{-1} – 2881 cm^{-1} correspondente ao grupo CH_2 simétrico e assimétrico presentes no PLDLA e PU, respectivamente. Estes picos foram observados com maior evidencia em FD. O pico referente ao grupo C=O foi registrado em 1753 cm^{-1}, apresentando uma sobreposição do grupo presente em PLDLA e PU. Na região entre 1172 cm^{-1} – 1008 cm^{-1} foi observado um pico duplo sugerindo uma junção do grupo C–O–C do PEG 400 e o grupo C–O do PU. Em relação ao grupo OH presente no PEG 400 e COL, não foi possível identificar nos espectros, bem como o grupo amida II presente no COL e PU, contudo, foram observados os picos característicos de amida I e III.

Diante das alterações apresentadas nos espectros dos *scaffolds*, estes resultados confirmam interações químicas entre os componentes das formulações, evidenciando interações principalmente entre os grupos funcionais OH presentes no PEG 400 e COL com o grupo funcional C=O do PLDLA-PCL e PLDLA-PU, ocasionando a reorganização da estrutura química espacial.

3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise térmica por DSC é aplicada para caracterização de materiais ou produtos com avaliação direta da energia térmica absorvida, onde ocorrem em faixas de temperaturas determinadas, gerando termogramas capazes de evidenciar alterações na forma cristalina, entalpia de fusão, variações na capacidade calorífica, temperatura micelar crítica, bem como reticulação e temperaturas de degradação (COOPER *et al*., 2001). Os termogramas de DSC das matérias-primas utilizadas, das formulações dos *scaffolds* e dos *scaffolds* hidratados são apresentados na Figura 3.

A análise calorimétrica realizada para o PLDLA resultou em apenas um evento térmico de transição vítrea (T_g) pronunciado a partir do deslocamento da linha base

com variação calorífica entre 56,63 °C (*onset*) – 62,90 °C (*end set*) e capacidade calorífera (C_P) equivalente a 59,58 °C, caracterizando o polímero como amorfo. Em estudo realizado por Salmoria *et al*. (2018) também foi confirmado o evento térmico de T_g do PLDLA com C_P a 59 °C.

O PCL apresentou um único evento térmico, sendo registrado em 63,57 °C referente a fusão do polímero com faixa de fusão entre 58,28 °C (*onset*) – 66,09 °C (*end set*) e com ΔH = -62,17 J/g. O evento térmico registrado está em acordo com estudo realizado por Gopinath *et al*. (2019).

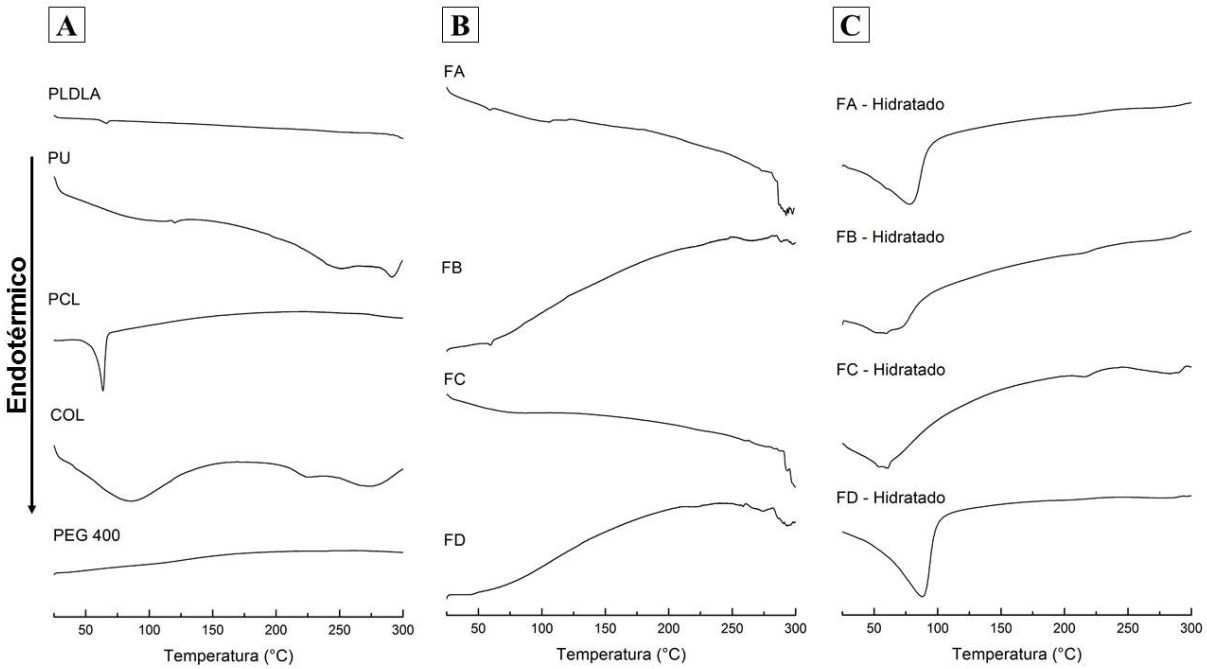
Para o PEG 400 não foi registrado eventos térmicos na faixa de temperatura aplicada na análise (25 – 300 °C). Contudo, em estudo realizado por Bertasi *et al*. (2015) foi registrado um pico endotérmico de fusão para o PEG 400 em cerca de 5 °C, após este evento térmico, também não houve registros de outros. Neste estudo a análise de DSC foi aplicada com uma faixa de temperatura entre -130 e 150 °C.

Já na curva termoanalítica apresentada pelo COL foram registrados três eventos térmicos distintos, o primeiro evento com pico endotérmico em 85,74 °C (*onset:* 39,75 °C – *end set:* 124,75 °C) com ΔH = -203,80 J/g. Evento térmico referente a perda de água absorvida nas fibras (evaporação), com o aumento da temperatura ocorre a quebra de ligações cruzadas na proteína, responsáveis por estabilizar a estrutura nativa, e assim causando a desnaturação (ONEM *et al*., 2017). O segundo evento térmico foi observado a partir do deslocamento da linha base, caracterizando uma T_g com C_P equivalente a 226,85 °C (*onset:* 217,41 °C – *end set:* 231,98 °C) (ALVES et al., 2018), por fim, o terceiro evento com pico endotérmico em 272,64 °C (*onset:* 253,73 °C – *end set:* 300 °C) com ΔH = -27,02 J/g, sugerindo uma reação de decomposição térmica da proteína.

No termograma do PU (uretano: 37%) foi possível registrar um decaimento da linha base seguido pela formação de um pico endotérmico em 119,95 °C (*onset:* 117,16 °C – *end set:* 124,68 °C) com ΔH = -0,71 J/g. O decaimento da linha base foi relacionada a porção aquosa da solução (88% em massa de H_2O) devido à perda de água por evaporação. Já para o evento térmico em 119,95 °C foi relacionado aos segmentos rígidos do polímero. Além dos segmentos rígidos, o PU também pode apresentar segmentos flexíveis em sua estrutura, correspondendo a um evento térmico de T_g em temperaturas negativas, desta forma, devido a faixa de temperatura da análise (25 – 300 °C), não é possível o registro. Contudo, segundo estudo realizado por Jiménez et al. (2016) esta T_g é registrada em -55 °C, devido à natureza amorfa do

polímero, o que permite maior mobilidade à sua estrutura (segmento flexível). No decorrer da análise, com o aumento da temperatura foram registrados dois eventos térmicos em 250,51 °C (*onset:* 238,22 °C – *end set:* 259.76 °C) e 290,82 °C (*onset:* 285,29 °C – *end set:* 299,66 °C) sugerindo reações de decomposição do segmentos rígidos e flexíveis que formam o polímero.

Figura 3. Curvas termoanalíticas de DSC dos componentes (A), *scaffolds* laminados (B) e *scaffolds* laminados hidratados (C).



Nota: Poli (L-co-D, L ácido láctico) (PLDLA); Poliuretano diol solução (PU); Policaprolactona (PCL); Colágeno (COL) e Polietilenoglicol 400 (PEG 400). (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL - solvente (FA); (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL + solvente (FB); (PLDLA-PU)-PEG 400-COL - solvente (FC) e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL + solvente (FD).
Fonte: Elaboração própria.

Os resultados dos termogramas dos *scaffolds* FA, FB, FC e FD são mostrados na Figura 3-B. Para os *scaffolds* FA e FB foram registrados apenas um evento térmico, indicando uma faixa de fusão em 59,23 °C (*onset:* 56,73 °C – *end set:* 58,98 °C) com ΔH = -1,02 J/g para FA e uma faixa de fusão em 59,65 °C (*onset:* 57 °C – *end set:* 61,99 °C) com ΔH = -1.20 J/g para FB, respectivamente. Em relação a faixa de fusão apresentada pelo PCL puro, houve um leve deslocamento para temperaturas mais elevadas, no entanto, as alterações mais evidentes estão relacionadas ao ΔH, apresentando uma redução significativa, indicando um novo rearranjo estrutural molecular de menor cristalinidade. Exceto este, não foi observado outros eventos térmicos relacionados aos demais componentes, indicando a formação de uma mistura miscível entre os polímeros PLDLA, PCL, PEG 400 e COL. Já nos

termogramas apresentados pelos *scaffolds* FC e FD não foram observados eventos térmicos na faixa de temperatura analisada, desta forma, é indicativo de que estas formulações apresentam uma estrutura amorfa, além da formação de uma mistura miscível entre os polímeros PLDLA, PU, PEG 400 e COL.

Buscando uma melhor compreensão do comportamento físico-químico dos *scaffolds* laminados para aplicação *in vivo*, as formulações foram hidratadas e também submetidas ao ensaio térmico de DSC (Figura 3-C).

Correlacionando os termogramas obtidos pelos *scaffolds* laminados antes e após a hidratação foi possível observar alterações expressivas nos eventos térmicos das formulações. Em decorrência da hidratação ocorreu uma maior atividade de água nos *scaffolds*, onde outros eventos térmicos foram registrados, tendo destaque para eventos térmicos de temperatura de desnaturação (T_d) relacionados ao COL presente nas formulações.

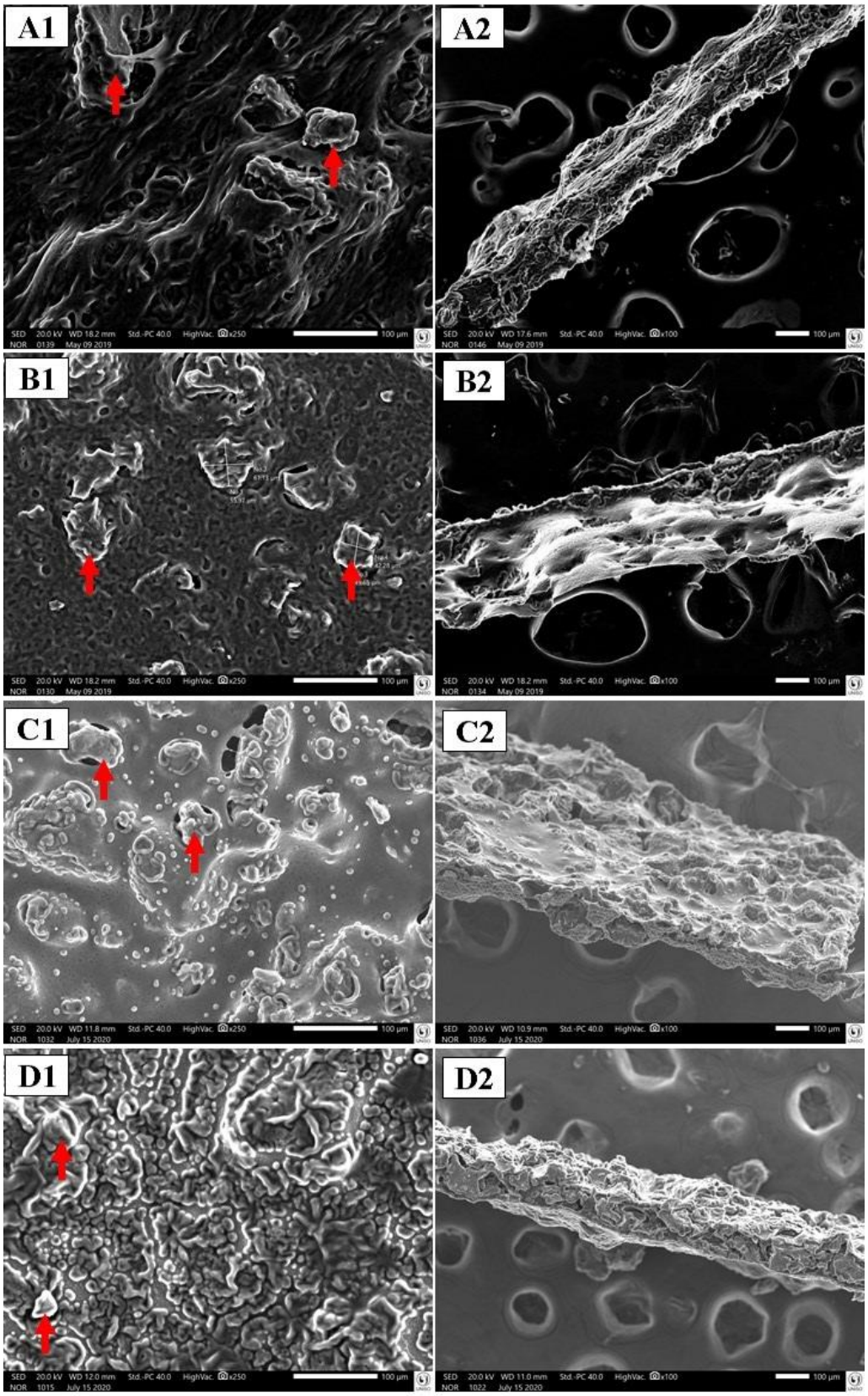
Por meio dos resultados apresentados nos espectros de FTIR (Figura 2) associado aos termogramas do DSC, foi possível confirmar a ocorrência de interações químicas entre os polímeros, resultando na formação de *scaffolds* poliméricos miscíveis. Após hidratação dos *scaffolds* foi confirmado o potencial de atividade de água dos grânulos de COL nas formulações, fato importante para função de agente porogênico *in situ*.

3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As características morfológicas dos *scaffolds* laminados FA, FB, FC e FD foram realizados por MEV e são apresentados na Figura 4. A estrutura de superfície de um material ou dispositivo biomimético é um fator crucial para o reparo tecidual, podendo influenciar diretamente o comportamento das células, por meio da morfologia e da química exercida na superfície para a adesão inicial das células e subsequente proliferação para a formação do tecido (BERNER *et al*., 2014).

Em todas as micrografias das formulações dos *scaffolds* foi possível observar a presença de grânulos de COL superfície e sua incorporação na matriz dos *scaffolds*, reafirmando a potencial aplicação da proteína como agente porogênico hidrodispersível para formação de poros *in situ*.

Figura 4. MEV dos *scaffolds* laminados FA (A1-2), FB (B1-2), FC (C1-2) e FD (D1-2).



Nota: (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL - solvente (FA); (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL + solvente (FB); (PLDLA-PU)-PEG 400-COL - solvente (FC) e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL + solvente (FD). As setas indicam a presença de grânulos de COL na estrutura.
Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 4 A (1–2) e B (1–2) referentes as formulações FA e FB, respectivamente, foi observado uma dispersão homogênea entre o PLDLA, PCL e PEG 400 para formação de uma matriz polimérica com incorporação e dispersão heterogênea de grânulos de COL, resultando em uma superfície irregular dos *scaffolds*, bem evidente na face lateral. A quantidade de solvente utilizado nas formulações também influenciou na morfologia, sendo observado uma estrutura de fibras mais consistentes em FA.

Para as formulações FC e FD apresentadas na Figura 4 C (1–2) e D (1–2) também foi possível observar a formação de uma matriz polimérica com incorporação e dispersão heterogênea de grânulos de COL. No entanto, com a presença do PU na mistura polimérica foi observado uma superfície de textura rugosa, sendo mais expressivo na formulação FD (Figura 4 D-1), sugerindo que a mistura polimérica com o PU devido a sua porção aquosa (88% em massa de H_2O) junto ao volume maior de CH_2Cl_2 como solvente ocorreu uma incompatibilidade, podendo a porção aquosa interagir melhor com o COL e o solvente orgânico promover a integridade estrutural dos demais polímeros do *scaffold* durante o processo de evaporação, resultando em interações na superfície.

Em estudo realizado por TSAI et al. (2006) a adesão celular, proliferação e expressão gênica de condrócitos suíno foram avaliados em vários polímeros sintéticos (PLLA; PDLA; PLGA e PCL). Os resultados indicaram que o PDLLA e PLGA apresentaram melhor adesão celular e maior estímulo a expressão de genes específicos de condrócitos em uma extensão maior do que o PLLA e PCL. No entanto, os dados relatados foram em filmes poliméricos e não em scaffolds.

Por meio dos resultados descritos anteriormente também podemos apontam que os copolímeros obtidos pela isomeria do poli (ácido láctico) podem apresentar características distintas em relação as células.

No entanto, as alterações morfológicas apresentadas pelas misturas poliméricas desenvolvidas em nosso estudo, por meio do processamento aplicado para obtenção dos *scaffolds* é um resultado potencial, visto que o PCL puro devido a sua hidrofobicidade intrínseca e baixa taxa de intumescimento dificulta a adesão e proliferação das células (GANDOLFI *et al*., 2019), dessa forma, superando essa limitação.

Outra maneira de superar as limitações é a combinação de biomateriais para obtenção dos scaffolds. Em estudo realizado por HE et al. (2010) desenvolveu um

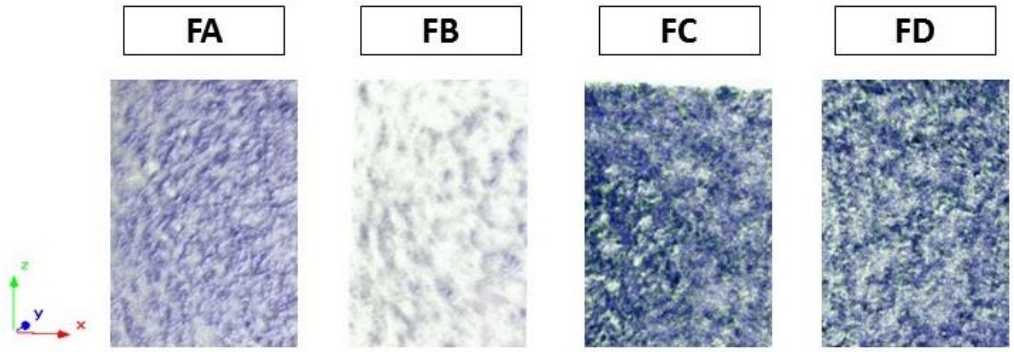
scaffold hibrido com PLLA e colágeno, onde o polímero sintético proporcionou maior resistência mecânica a estrutura e o polímero natural proporcionou a adesão e distribuição das células. Como resultado, o tecido cartilaginoso foi regenerado com sucesso quando os condrócitos foram cultivados no scaffold hibrido.

Por fim, as alterações morfológicas evidenciadas pelo MEV na superfície dos *scaffolds* podem influenciar na característica hidrofóbica ou hidrofílica do material, tanto pela química da superfície, quanto pela rugosidade apresentada. Caso a superfície dos *scaffolds* seja muito hidrofóbica, as proteínas mediadoras da adesão celular serão absorvidas de forma desnaturada, resultando na conformação inadequada para a interação com os receptores de fixação celular (GUO; ZHU; LOH, 2017; SOUZA *et al*., 2019).

3.5 Microtomografia computadorizada (µCT)

As características morfológicas e os dados morfométricos 3D dos *scaffolds* laminados FA, FB, FC e FB foram obtidas por µCT, e são apresentadas na Figura 5 e na Tabela 2. Este ensaio reafirmou os resultados morfológicos apresentados pelo MEV (Figura 4), evidenciando no contraste de densidade a estrutura de superfície irregular em todas as formulações e a rugosidade apresentada em FC e FD. Além destas características, o ensaio por µCT é capaz de mensurar valores referentes a estrutura porosa dos *scaffolds*, como interconectividade, volume de poros aberto, porcentagem de poros fechados e o grau de anisotropia (Tabela 2).

Figura 5. Características morfológicas dos *scaffolds* laminados avaliados por µCT.



Nota: (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL - solvente (FA); (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL + solvente (FB); (PLDLA-PU)-PEG 400-COL - solvente (FC) e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL + solvente (FD).
Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 2 apresenta os dados morfométricos dos *scaffolds* laminados. A análise dos resultados evidenciou que as formulações obtidas com maior volume de

solvente (FB e FD) obtiveram uma maior interconectividade de poros, sendo superiores a 60%. Enquanto as formulações FA e FC obtidas com menor volume de solvente obtiveram uma interconectividade de poros inferiores, com valores de 46,86% e 40,70%, respectivamente. Estes resultados podem ser atribuídos ao maior relaxamento das cadeias poliméricas pelo solvente durante a obtenção das misturas e, consequentemente, a reorganização das cadeias poliméricas pela técnica de evaporação de solvente.

Embora não tenha sido verificada a presença de poros na superfície dos *scaffolds* laminados nos ensaios por MEV, a análise dos resultados de µCT quantificou a porosidade do material. Estes resultados estão em acordo com estudo realizado por Duarte; Motta; Duek (2016) que incorporaram a Poli (caprolactona triol) com o polímero PLDLA, ocasionando uma maior mobilidade nas cadeias poliméricas que, por sua vez, na tentativa de reorganizar, permitiu a formação de uma nova condição, gerando pequenos espaços na estrutura, caracterizados como poros.

Tabela 2. Dados morfométricos dos *scaffolds* laminados.

	FA	**FB**	**FC**	**FD**
Total VOI volume	2,34	2,62	0,84	1,62
Interconectividade entre poros (%)	46,86	62,62	40,70	65,55
Volume de poros abertos (mm^{-3})	1,09	1,63	0,34	1,06
Poros abertos (%)	46,64	62,49	40,24	65,29
Poros fechados (%)	0,39	0,35	0,76	0,73
Grau anisotrópico	0,74	0,69	0,94	0,94

Nota: (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL - solvente (FA); (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL + solvente (FB); (PLDLA-PU)-PEG 400-COL - solvente (FC) e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL + solvente (FD).
Fonte: Elaboração própria.

Em relação a incorporação dos polímeros PCL e PU foi possível observar que a aplicação do PU resultou em estruturas com maior percentual de poros fechados (FC: 0,76%; FD: 0,73%), assim como o grau de anisotropia (FC: 0,94; FD: 0,94). O resultado expresso pelo grau de anisotropia é importante, pois indica como será orientada a formação do novo tecido na estrutura dos *scaffolds*. Os valores podem variar entre 0 e 1, onde 0 representa uma estrutura totalmente isotrópica, enquanto 1 representa uma estrutura completamente anisotrópica (SILVA *et al*., 2014).

Devido à complexidade dos componentes estruturais da traqueia, como mucosa, submucosa, adventícia, cartilagem e músculo liso, tem atraído grande interesse científico, buscando por ensaios analíticos detalhados e a modelagem do

órgão. Para elucidar a respeito de alguns aspectos do comportamento do material, como exemplo, a isotropia vs. anisotropia. Ou seja, a capacidade de exibir as mesmas ou diferentes propriedades mecânicas em diferentes direções, respectivamente (SAFSHEKAN *et al*., 2016).

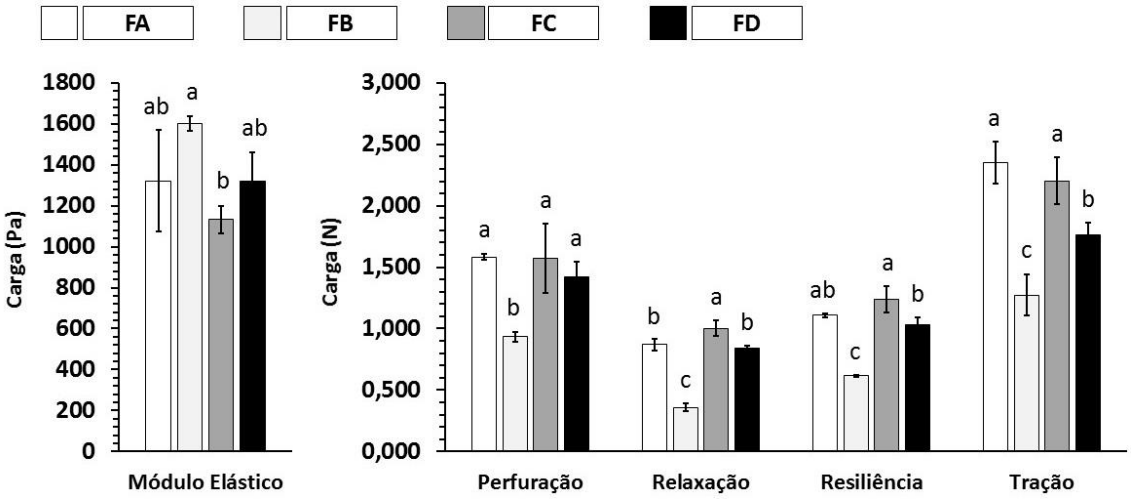
Segundo Safshekan *et al*. (2016), os três principais componentes traqueais (cartilagem, músculo liso e tecido conjuntivo) possuem características isotrópicas. No entanto, diferentes tecidos moles da traqueia foram relatados com características anisotrópicas, de acordo com estudo realizado por Teng *et al*. (2012) as estruturas traqueias da camada mucosa e submucosa apresentaram resultados de alongamento e estiramento característicos de materiais com comportamento anisotrópicos.

Desta forma, as características apresentadas pelos *scaffolds* laminados indicam uma potencial aplicação na engenharia de tecido traqueal, visando a recuperação das estruturas traqueais da camada mucosa e submucosa.

3.6 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos materiais são determinadas por meio de uma força de deformação ou na aplicação de uma tensão. Estes ensaios tem por característica serem destrutivos, uma vez que sua finalidade é avaliar as propriedades limites do material (CASSU; FELISBERTI, 2005). Na Figura 6 são apresentados os resultados das propriedades mecânicas dos *scaffolds* FA, FB, FC e FD para os ensaios de módulo elástico (módulo Young), perfuração, relaxação, resiliência e resistência a tração.

Figura 6. Propriedades mecânicas dos *scaffolds* laminados.



Nota: (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL - solvente (FA); (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL + solvente (FB); (PLDLA-PU)-PEG 400-COL - solvente (FC) e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL + solvente (FD). Letras iguais

(para a mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre os valores médios ($p > 0,05$). ($n = 3$).
Fonte: Elaboração própria.

O módulo elástico ou módulo de Young é um ensaio mecânico que indica a rigidez apresentada pelo material, e quanto maior os valores do módulo, mais rígido é o material. A análise dos resultados do módulo elásticos dos *scaffolds* demostrou que a aplicação de um volume maior de solvente na preparação das formulações resultou em maior rigidez dos *scaffolds* (FB > FA e FD > FC), no entanto, estes não apresentaram diferença estatísticas significativa ($p > 0,05$). A única diferença estatística observada está entre as formulações FB e FC ($p < 0,05$).

A análise dos resultados apresentados nos ensaios de perfuração, relaxação, resiliência e resistência a tração (Figura 6) mostraram que houve mudanças em ambos os *scaffolds* devido ao volume de solvente aplicado na técnica de obtenção, resultando em valores nominais superiores em relação as formulações FA > FB e FC > FD e por meio da análise estatística foi possível confirmar que ocorreram diferenças estatísticas significativas nestes ensaios ($p < 0,05$), sendo a única exceção verificada entre as formulações FC e FD no ensaio de perfuração ($p > 0,05$).

Em relação a incorporação dos polímeros PCL e PU foram observados valores semelhantes ($p > 0,05$) entre as formulações FA e FB nos ensaios de perfuração, resiliência e resistência a tração, com exceção ao ensaio de relaxação ($p < 0,05$). Enquanto, que a incorporação dos polímeros PCL e PU em formulações com maiores volumes de solvente resultou em valores mais expressivos para FD em todos os ensaios em comparação a FB ($p < 0,05$).

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* laminados irão desempenhar um papel fundamental na manutenção da estrutura física da traqueia para o tratamento da estenose. Pois a traqueia é mantida por uma estrutura composta por anéis cartilaginosos em forma de C, responsáveis por fornecer rigidez para manter o lúmen acessível ao fluxo de ar (SIDDIQI *et al*., 2017). Portanto, é interessante do ponto de vista de aplicação, pois, para ser utilizado como *scaffold* laminado, precisa ser flexível e altamente resistente a tensões quando o propósito clínico é evitar o processo de reestenose e, consequentemente, o reparo tecidual da traqueia.

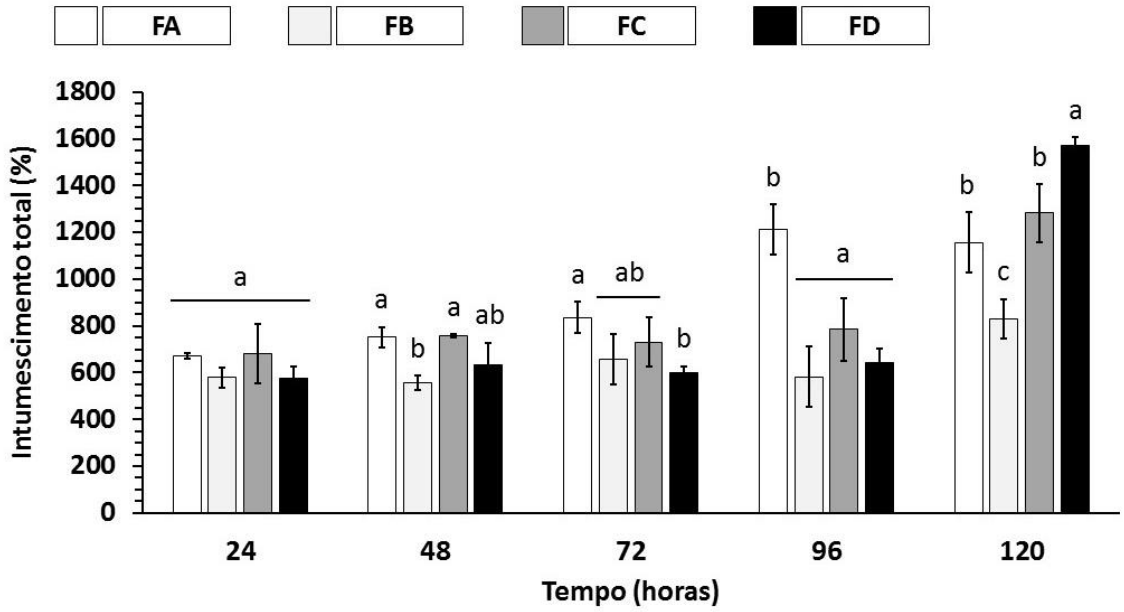
3.7 Eficiência de intumescimento

A capacidade de intumescimento (%) das formulações de *scaffolds* FA, FB, FC e FD foram obtidos em PBS (pH 7,4), conforme mostrado na Figura 7 e Figura 8. A

penetração do solvente nos *scaffolds* levam ao intumescimento gradual em função do tempo de imersão, que está envolvido com a difusão das moléculas do solvente por meio da matriz polimérica, e o grau máximo de intumescimento é alcançado devido a capacidade de relaxamento local dos segmentos poliméricos (RIBEIRO, 2017).

Na Figura 7 são apresentadas as características de intumescimento relacionadas ao fluido absorvido e retido por toda a estrutura dos *scaffolds* (matriz + poros), enquanto a Figura 8 são as características de intumescimento pelo próprio material dos *scaffolds* (matriz).

Figura 7. Absorção de fluido dos *scaffolds* laminados (%), fluido retido por toda a estrutura do *scaffold* em PBS (pH 7,4 a 37 °C).

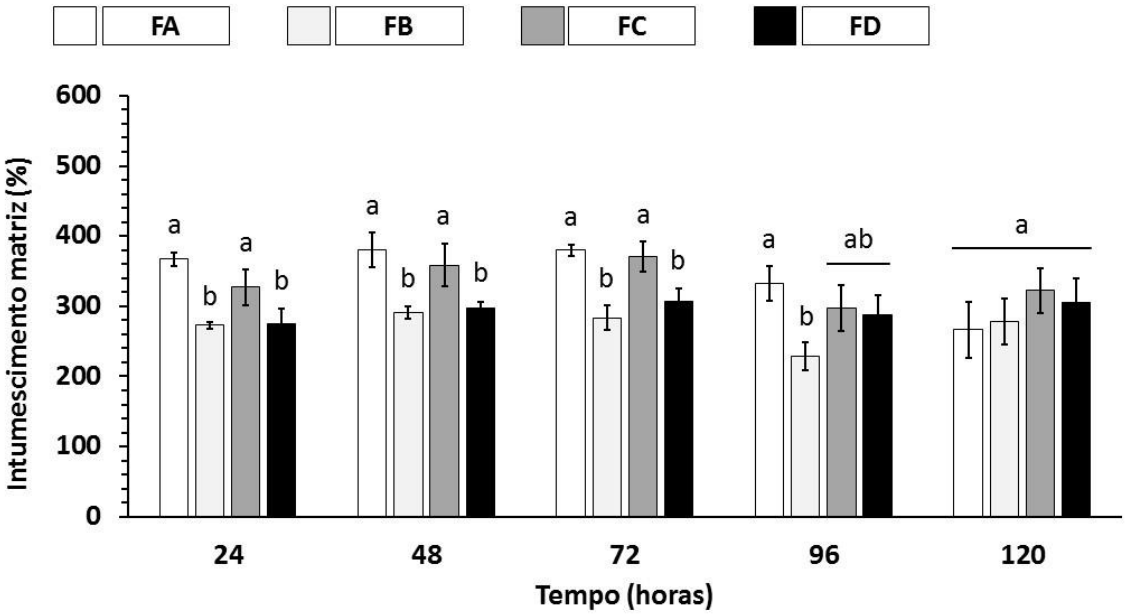


Nota: (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL - solvente (FA); (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL + solvente (FB); (PLDLA-PU)-PEG 400-COL - solvente (FC) e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL + solvente (FD). Letras iguais (para a mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre os valores médios ($p > 0,05$). ($n = 3$).
Fonte: Elaboração própria.

A análise dos resultados de intumescimento total da estrutura dos *scaffolds* laminados (Figura 7) evidenciou que no período de 24 horas de imersão em PBS, as formulações FA, FB, FC e FD apesar dos valores nominais distintos não foram apresentadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$), contudo os valores mais expressivos foram apresentados pelas formulações obtidas utilizando menor volume de solvente, com exceção da formulação FD após 120 horas. Também foi possível observar aumento gradativo da capacidade de intumescimento com o decorrer do tempo nos ensaios, com maior absorção de PBS para FD (1571,41 ± 36,41 %),

seguido por FC (1282,66 ± 126 %), FA (1156,59 ± 128,89 %) e FB (830,72 ± 83,96 %).

Figura 8. Absorção de fluido dos *scaffolds* laminados (%) pelo próprio material dos *scaffolds* em PBS (pH 7,4 a 37 °C).



Nota: (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL - solvente (FA); (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL + solvente (FB); (PLDLA-PU)-PEG 400-COL - solvente (FC) e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL + solvente (FD). Letras iguais (para a mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre os valores médios ($p > 0,05$). ($n = 3$).
Fonte: Elaboração própria.

No intumescimento do material polimérico dos *scaffolds* (Figura 8) também foram observadas melhores absorções de PBS pelas formulações obtidas com menor volume de solvente (FA e FC), contudo, no decorrer do tempo do ensaio, após 120 horas de imersão os valores registrados foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos nos ensaios de intumescimento, tanto por toda a estrutura dos *scaffolds* (matriz + poros), quanto pelo próprio material dos *scaffolds* (matriz) correlacionam e confirmam a importância da morfologia apresentada pelas formulações nos ensaios de MEV e µCT. Estas características possibilitam maior biocompatibilidade com a MEC do tecido adjacente, demostrando que substratos moderadamente hidrofílicos favorecem a adsorção e penetração dos nutrientes e através da interconectividade dos poros para a circulação pela matriz porosa dos *scaffolds*, influenciando na adesão, diferenciação e proliferação celular (BACAKOVA *et al*., 2011).

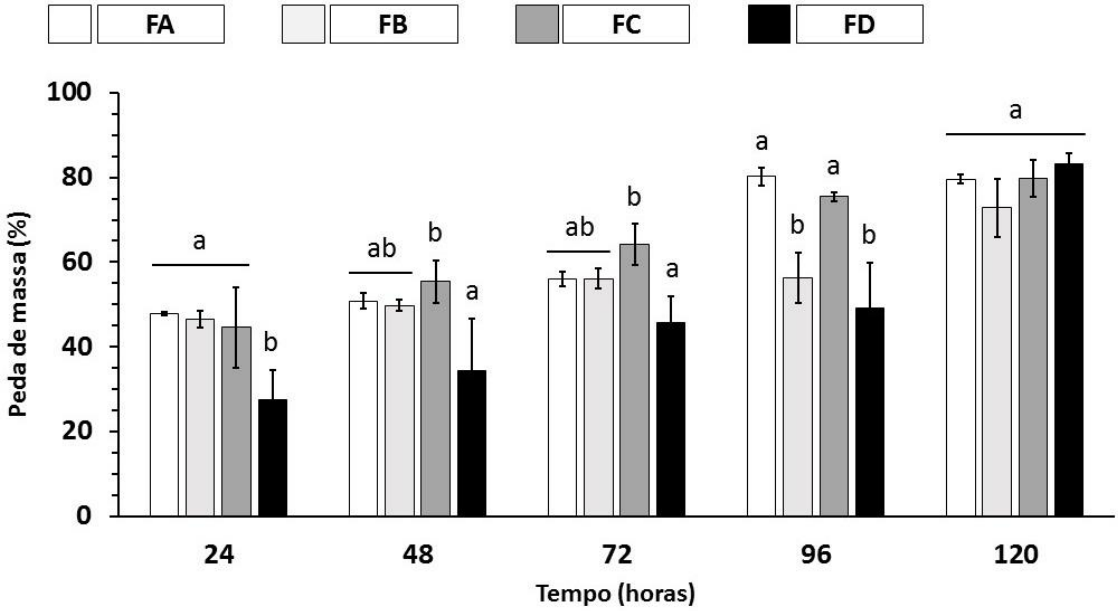
3.8 Estudo de biodesintegração *in vitro*

O ensaio de biodesintegração do *scaffold* é uma caracterização muito importante para aplicações na engenharia de tecidos, por que a taxa de biodesintegração do material influencia a integridade estrutural do implante ao longo do tempo, bem como a remodelação realizada pelas célula (MADHAVAN *et al*., 2017). Uma vez que a taxa de biodesintegração deve ser semelhante ao tempo de regeneração e/ou remodelamento para auxiliar a formação estrutural e funcional do novo tecido (CAMPOS *et al*., 2020).

Neste sentido, a velocidade e o mecanismo de biodesintegração devem ser devidamente investigados. Um método utilizado para simular preliminarmente a taxa de biodesintegração dos *scaffolds* é a incubação em diferentes meios, por exemplo, o PBS – pH 7,4.

Os resultados de biodesintegração obtidos pelos *scaffolds* são apresentados na Figura 9. Nos *scaffolds* laminados fabricados com a incorporação do polímero PCL (FA e FB) foi observado taxas de biodesintegração semelhantes ($p > 0,05$), independente do volume de solvente utilizado, com exceção ao período de 96 horas do ensaio. Enquanto que os *scaffolds* laminados fabricados com PU (FC e FD) apresentaram diferentes taxas de biodesintegração ($p < 0,05$) em decorrência do volume de solvente utilizado, sendo registrado maiores valores para a formulação FC, contudo, após o período de 120 horas de incubação, foram registrados valores estatisticamente semelhantes entre as formulações ($p > 0,05$).

Figura 9. Perda de massa (%) dos *scaffolds* laminados em PBS (pH 7,4 a 37 °C).

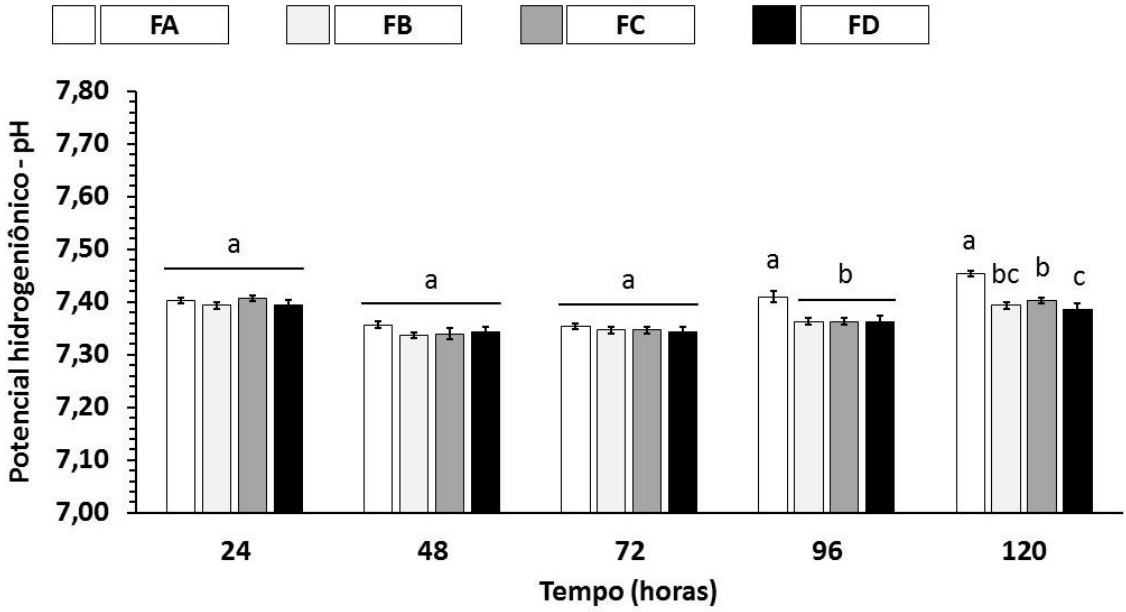


Nota: (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL - solvente (FA); (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL + solvente (FB); (PLDLA-PU)-PEG 400-COL - solvente (FC) e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL + solvente (FD). Letras iguais (para a mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre os valores médios ($p > 0,05$). ($n = 3$).
Fonte: Elaboração própria.

A biodesintegração registrada pelos *scaffolds* laminados apresentaram taxa de 79,60% ± 1,10 (FA), 72,82% ± 6,77 (FB), 79,75% ± 4,35 (FC) e 83,23% ± 2,47 (FD), apensar dos valores nominais distintos, a análise estatística indicou que os resultados são significativamente semelhantes ($p > 0,05$). A biodesintegração das formulações ocorreram devido a dois mecanismos, sendo um deles a liberação gradual dos grânulos de COL da estrutura para o meio de incubação e o segundo devido a cisão das longas cadeias moleculares dos polímeros que compõem as formulações, esta cisão é causada por reações químicas, principalmente por reações hidrolíticas, resultando em baixa massa molecular e perda de massa dos polímeros (SHI *et al*., 2017).

Durante o ensaio de biodesintegração *in vitro* dos *scaffolds* laminados, a geração de produtos por meio da desintegração hidrolítica não causou grandes variações nos valores de pH, como apresentado na Figura 10.

Figura 10. pH dos *scaffolds* laminados em PBS a 37 °C.



Nota: (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL - solvente (FA); (PLDLA-PCL)-PEG 400-COL + solvente (FB); (PLDLA-PU)-PEG 400-COL - solvente (FC) e (PLDLA-PU)-PEG 400-COL + solvente (FD). Letras iguais (para a mesma análise) indicam que não há diferença significativa entre os valores médios ($p > 0,05$). ($n = 3$).
Fonte: Elaboração própria.

As formulações dos *scaffolds* laminados apresentaram uma faixa de pH entre 7,35 – 7,45 (FA), 7,34 – 7,39 (FB), 7,34 – 7,41 (FC) e 7,34 – 7,39 (FD) ao longo de 120 horas de estudo, evidenciado uma variação na escala de pH de 0,05 à 0,1. Mensurar o efeito do processo de biodesintegração sobre o pH é de grande importância, visto que a engenharia de tecidos busca mimetizar as possíveis reações e condições apresentadas *in vivo*. O pH extracelular desempenha um papel crucial para a restauração tecidual, pois afeta diretamente o metabolismo energético e a síntese da MEC produzida pelos condrócitos (WU *et al*., 2007). Desta forma, um dispositivo biomimético que não resulte em alterações bruscas no pH extracelular durante o processo de biodesintegração é preferível.

4. CONCLUSÃO

A escolha do biomaterial e a condição experimental pela técnica de *solvent casting* foi eficiente para fabricar *scaffolds* laminados com misturas poliméricas e agente porogênico hidrodispersível para formação *in situ* para garantir o desempenho biomimético. A caracterização por FTIR mostrou interações químicas entre os componentes, ocorrendo ligações de hidrogênio por meio do grupo funcional OH presente no PEG 400 e COL com o grupo funcional C=O dos polímeros PLDLA, PCL

e PU. O ensaio por DSC reafirmou a ocorrência de interações químicas, promovendo a formação de misturas miscíveis e com rearranjo estrutural amorfo para as formulações FC e FD [(PLDLA-PU)-PEG 400-COL], enquanto que as formulações FA e FB [(PLDLA-PCL)-PEG 400-COL] ocasionou rearranjo estrutural com indícios cristalinos. As análises morfológicas e os dados morfométricos realizados por µCT e MEV mostraram que os *scaffolds* possuem estrutura de superfície irregular, além de rugosidades nas formulações FC e FD. O rearranjo espacial das cadeias poliméricas formulações permitiu a formação de espaços (poros) com interconectividade e uma estrutura anisotrópica. O volume do solvente modificou as propriedades mecânicas como perfuração, relaxação, resiliência e resistência a tração, mas não modificou significativamente o modulo elástico. Os resultados de eficiência de intumescimento e taxa de biodesintegração sugerem que os *scaffolds* tem potencial para adsorção, penetração e circulação dos nutrientes, bem como suporte para adesão, diferenciação e proliferação celular. Portanto, os *scaffolds* laminados podem ser um modelo biomimético ideal para aplicações na engenharia de tecido. Considerando a estrutura morfológica, dados morfométricos, grau anisotrópico, propriedades mecânicas, eficiência de intumescimento e taxa de biodesintegração, este estudo pode fornecer uma maneira de melhorar a remodelação da camada mucosa e submucosa da traqueia para tentativa de estabilização em quadros de estenose não cirúrgicas

5 Referências

ALVES, T. et al. Dense lamellar scaffold, biomimetically inspired, for reverse cardiac remodeling: Effect of proanthocyanidins and glutaraldehyde. **Journal of Dispersion Science and Technology**, p. 1–14, 2019.

ALVES, T. F. R. et al. Dense Lamellar Scaffold as Biomimetic Materials for Reverse Engineering of Myocardial Tissue: Preparation, Characterization and Physiomechanical Properties. **Journal of Material Science & Engineering**, v. 07, n. 05, p. 1–9, 2018.

AMARAL, V. A. et al. The effect of efflux bomb and the transmural potential difference in the permeation of azidothymidine across the small intestine of the rat. **Science Publishing Group - SPG BioMed**, v. 1, n. 2, p. 1–17, 2019.

AVELAR, L. M. G. et al. Estenose traqueal – complicação tardia após intubação e traqueostomia. **Rev. Med. Minas Gerais**, v. 21, n. 4, p. 124–126, 2011.

BACAKOVA, L. et al. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 739–767, 2011.

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.

BERTASI, F. et al. Electrochimica Acta Single-Ion-Conducting Nanocomposite Polymer Electrolytes for Lithium Batteries Based on Lithiated-Fluorinated-Iron Oxide and Poly (ethylene glycol) 400. **Electrochimica Acta**, p. 1–11, 2015.

BHAT, S.; KUMAR, A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. **Biomatter**, v. 3, n. 3, p. e24717-1-e24717-12, 2013.

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

CASSU, S. N.; FELISBERTI, M. I. Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas. **Quimica Nova**, v. 28, n. 2, p. 255–263, 2005.

CATANEO, D. C. et al. Mitomicina C no tratamento endoscópico de estenose traqueal: estudo prospectivo de coorte. **Sociedade Brasileira de Pneumonologia e Tisiologia**, v. 44, n. 6, p. 1–5, 2018.

CHANG, J. W. et al. Tissue-engineered tracheal reconstruction using three-dimensionally printed artificial tracheal graft: Preliminary report. **Artificial Organs**, v. 38, n. 6, 2014.

COOPER, A. et al. Heat does not come in different colours: entropy**.**enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation

calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. **Biophysical Chemistry**, v. 93, p. 215–230, 2001.

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.

DUARTE, M. A. T.; MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Caracterização de pinos da blenda poli (L-co-D,L ácido láctico)/poli (caprolactona triol) (PLDLA/ PCL-T) e análise das propriedade mecânicas dos pinos durante degradação in vitro. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 26, n. 2, p. 185–191, 2016.

FERREIRA, M. S. V.; MOUSAVI, S. H. Nanofiber technology in the ex vivo expansion of cord blood-derived hematopoietic stem cells. **Nanomedicine**, v. 14, n. 5, p. 1707–1718, 2018.

FILHO, A. A. C.; MACHADO, F. S.; JANISZEWSKI, M. Estenose de Traquéia após Intubação Prolongada*. **RBTI - Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 17, n. 1, p. 40–43, 2005.

GANDOLFI, M. G. et al. Highly porous polycaprolactone scaffolds doped with calcium silicate and dicalcium phosphate dihydrate designed for bone regeneration. **Materials Science & Engineering C**, v. 102, p. 341–361, 2019.

GILEVICH, I. V et al. In Vivo Experimental Study of Biological Compatibility of Tissue Engineered Tracheal Construct in Laboratory Primates. **Bulletin of Experimental Biology and Madicine - Primatology**, v. 164, n. 6, p. 770–774, 2018.

GOPINATH, S. et al. One-way thermo-responsive shape memory polymer nanocomposite derived from polycaprolactone and polystyrene-block-polybutadiene-block-polystyrene packed with carbon nanofiber. **Materials Today Communications**, v. 22, p. 100802, 2019.

GUO, S.; ZHU, X.; LOH, X. J. Controlling cell adhesion using layer-by-layer approaches for biomedical applications. **Materials Science & Engineering C**, v. 70, p. 1163–1175, 2017.

HE, X. et al. A Novel Cylinder-Type Poly (L-Lactic Acid)– Collagen Hybrid Sponge for Cartilage Tissue Engineering. **Tissue Engineering: Part C**, v. 16, n. 3, p. 329–338, 2010.

JAGANATHAN, S. K. et al. Engineered electrospun polyurethane and castor oil nanocomposite scaffolds for cardiovascular applications. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 18, p. 10673–10685, 2017.

JIMÉNEZ, M. A. G. et al. Compatibilidade de Poliuretano Modificado y Poliácido Acrílico en una Red Polimérica Interpenetrada. **Revista Iberoamericana de polímeros**, v. 17, n. 3, p. 122–128, 2016.

JING, H. et al. Restoring tracheal defects in a rabbit model with tissue engineered patches based on TGF- β 3- encapsulating electrospun poly (l-lactic acid-co- ε -caprolactone)/ collagen scaffolds. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2018.

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, out. 2015.

LEAL, C. V. et al. Characterization and in vitro evaluation of electrospun aligned-fiber membranes of poly (L-co-D, L-lactic acid). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 47657, p. 1–9, 2019.

MADHAVAN, K. et al. Development of an electrospun biomimetic polyurea scaffold suitable for vascular grafting. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, p. 1–13, 2017.

MAUGHAN, E. F. et al. A comparison of tracheal scaffold strategies for pediatric transplantation in a rabbit model. **Laryngoscope**, v. 127, n. 12, p. E449–E457, 2017.

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, n. May, p. 1–8, 2017.

ONEM, E. et al. Comparison of different tanning agents on the stabilization of collagen via differential scanning calorimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 129, n. 1, p. 615–622, 2017.

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.

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.

RIBEIRO, M. H. L. Emerging Technologies of Hydrogels in Bioactive Compounds Delivery. In: PURI, M. (Ed.). . **Food Bioactives - Extraction and Biotechnology Applications**. Springer. p. 227–263, 2017.

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. 0–1, 2017.

SAFSHEKAN, F. et al. Mechanical Characterization and Constitutive Modeling of Human Trachea: Age and Gender Dependecy. **Materials**, v. 9, n. 456, p. 1–13, 2016.

SALMORIA, G. V et al. Properties of injection-molded poly (L-co-D, L-lactic acid) using different melt temperatures and stress concentrator in the specimen geometry.

The International Journal of Advanced Manufacturing Technology, p. 1–7, 2018.

SHARIF, F. et al. Bioresorbable Antibacterial PCL-PLA-nHA Composite Membranes for Oral and Maxillofacial Defects. **Polymer Composites**, v. 40, n. 4, p. 1564–1575, 2018.

SHI, Q. et al. Effect of rehabilitation exercise durations on the dynamic bone repair process by coupling polymer scaffold degradation and bone formation. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, p. 1–13, 2017.

SIDDIQI, S. et al. Tissue Engineering of the Trachea: What is the Hold-up? **MOJ Cell Science & Report**, v. 4, n. 1, p. 1–5, 2017.

SILVA, A. M. H. DA et al. Two and three-dimensional morphometric analysis of trabecular bone using X-ray microtomography (μCT). **Brazilian Journal of Biomedical Engineering**, v. 30, p. 93–101, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. [Stectrometric indentification of organic Compounds, 7th ed.].** 7ª ed. Rio de Janeiro-RJ: LTC, 2006.

SLIMANE, E. BEN; SADOK, S. Collagen from cartilaginous fish by-products for a potential application in bioactive film composite. **Marine Drugs**, v. 16, n. 6, p. 1–19, 2018.

SODEIFIAN, G. et al. Polyurethane-SAPO-34 mixed matrix membrane for CO2/CH4 and CO2/N2 separation. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 2, p. 322–334, 2019.

SOUZA, F. C. B. DE et al. Comparative study on complexes formed by chitosan and different polyanions: Potential of chitosan-pectin biomaterials as scaffolds in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 178–189, 2019.

TANG, Q.; GAO, K. Structure analysis of polyether-based thermoplastic polyurethane elastomers by FTIR, 1H NMR and 13C NMR. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 27, n. 7, p. 569–574, 2017.

TCHOUKALOVA, Y. D. et al. Tracheal decellularization using a combination of chemical, physical and bioreactor methods. **The International Jounal of Artificial Organs**, v. 41, n. 2, p. 100–107, 2018.

TENG, Z. et al. Anisotropic material behaviours of soft tissues in human trachea: An experimental study. **Journal of Biomechanics**, v. 45, n. 9, p. 1717–1723, 2012.

TSAI, W.-B. et al. The effects of types of degradable polymers on porcine chondrocyte adhesion, proliferation and gene expression. **Jornal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 4, p. 337–343, 2006.

WANG, S. et al. Surgical management of congenital tracheal stenosis associated

with tracheal bronchus and congenital heart disease. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 49, p. 1201–1206, 2016.

WEIGEL, T.; SCHINKEL, G.; LENDLEIN, A. Design and preparation of polymeric scaffolds for tissue engineering. **Expert Rev Med Devices**, v. 3, n. 6, p. 835–851, 2006.

WU, M. et al. Effect of Extracellular pH on Matrix Synthesis by Chondrocytes in 3D Agarose Gel. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 2, p. 430–434, 2007.

YAMAMOTO, K. et al. Meta-Analysis of Therapeutic Procedures for Acquired Subglottic Stenosis in Adults. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 91, n. 6, p. 1747–1753, 2011.

YEON, J. et al. Comparison of tracheal reconstruction with allograft , fresh xenograft and artificial trachea scaffold in a rabbit model. **Journal of Artificial Organs**, p. 1–7, 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A concepção deste projeto de pesquisa possibilitou o desenvolvimento de *scaffolds* laminados e lamelares densos, compostos de polímeros naturais e sintéticos, para aplicação em engenharia de tecido traqueal.
- As folhas de goiabeira (*Psidium guajava* Linn.) foram uma fonte potencial para extração de compostos fenólicos totais para aplicação como agente de reticulação de proteínas, principalmente o colágeno.
- Os parâmetros de congelamento (-80, -50 e -18 °C) associados às técnicas de compressão plástica e liofilização são capazes de modular de forma expressiva as características dos *scaffolds* lamelares densos.
- Os resultados de propriedades mecânicas, físico-químicas, morfológicas e morfométricas indicam que os *scaffolds* lamelares densos contendo percentuais de compostos fenólicos totais, como agente de reticulação, apresentaram potencial para aplicação na recuperação das estruturas do tecido traqueal após remoção cirúrgica de tumores.
- Os *scaffolds* laminados contendo poli (L-co-D, L ácido láctico), colágeno, polietilenoglicol 400, policaprolactona e poliuretano diol solução apresentaram estrutura anisotrópica potencial para o remodelamento da camada mucosa e submucosa da traqueia para estabilização em quadros de estenose traqueal não cirúrgicas.
- Esta pesquisa colabora para o avanço do conhecimento no campo da ciência dos biomateriais e biomédicas, bem como a interdisciplinaridade das ciências específicas, as quais integram os conhecimentos da engenharia de tecidos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar a capacidade antioxidante dos scaffolds lamelares densos e laminados.
- Determinar a massa molecular dos polímeros naturais pelo índice de refração (Abbemat Multiware – Anton Paar) seguido por medição da dispersão de luz dinâmica (DLS) e dispersão de luz estática (SLS), (Litesizer 500 – Anton Paar). Assim, buscar uma melhor compreensão da fenomenologia das interações químicas realizadas, bem como, a estequiometria da reação e o comportamento dos *scaffolds*.
- Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade e a viabilidade celular dos *scaffolds* lamelares densos e laminados.
- Avaliar, *in vitro*, a fixação e proliferação dos condrócitos na estrutura dos *scaffolds* lamelares densos e laminados medindo a diferença de densidade e volume dos poros utilizando microtomografia computadorizada.
- Avaliar, *in vitro*, se a taxa de biodesintegração dos *scaffolds* são compatíveis a taxa de crescimento celular.
- Avaliar, *in vivo*, a eficácia dos *scaffolds* lamelares densos e laminados na regeneração do tecido cartilaginoso hialino, bem como, o mecanismo de ação de estresse oxidativo.

Anexo 1 - Orientações para apresentação de dissertações/teses do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba

As dissertações/teses do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba (PPGCF-Uniso) poderão ser apresentadas em dois formatos: o tradicional ou em formato de artigo(s) científico(s).

Os trabalhos de investigação que possam resultar em patentes poderão ser apresentados na forma convencional, a critério do grupo de pesquisadores envolvidos, reservadas as particularidades exigidas em relação ao sigilo.

O formato tradicional segue o padrão descrito nas normas do “Manual para normalização de trabalhos acadêmicos” da Universidade de Sorocaba.

As dissertações entregues no formato de artigo científico têm como exigência a publicação ou, no mínimo, a submissão prévia de pelo menos um artigo em revista científica com classificação mínima Qualis/Capes B2 (de acordo com a categorização da WebQualis mais recente, na data do envio/publicação) e podem ser inseridos no idioma e na formatação estabelecida pelo(s) respectivo(s) periódico(s). Os demais artigos podem não ter sido submetidos ainda.

As teses entregues no formato de artigo científico têm como exigência a publicação ou, no mínimo, a submissão prévia de pelo menos dois artigos em revista científica com classificação mínima Qualis/Capes B2 (de acordo com a categorização da WebQualis mais recente, na data do envio/publicação) e podem ser inseridos no idioma e na formatação estabelecida pelo(s) respectivo(s) periódico(s). Os demais artigos podem não ter sido submetidos ainda.

Para aclarar membros da banca que desconhecem esta versão alternativa da dissertação/tese recomenda-se anexar este documento no final das versões encaminhadas aos membros da banca. A dissertação/tese no formato de artigo(s) científico(s) deverá possuir os elementos apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Elementos para a construção da dissertação no formato de artigo(s) científico(s).

Elementos pré-textuais	*1. Folha de rosto*
	2. Errata (Opcional)
	3. Folha de aprovação
	4. Dedicatória (Opcional)
	5. Agradecimentos (Opcional)
	6. Epígrafe (Opcional)
	7. Resumo na língua vernácula
	8. Resumo em inglês (Abstract)
	9. Lista de abreviaturas e siglas; lista de tabelas e lista de símbolos (Opcionais). Estas listas não devem conter informações apresentadas nos artigos científico.
	10. Sumário
Elementos textuais	*11. Introdução ou apresentação:* trata-se da parte inicial do texto com formulação clara e simples do tema investigado, constando a delimitação do assunto tratado, sua relevância e justificativa.
	12. Revisão de literatura: quando a revisão de literatura for concebida como artigo de revisão, este item deverá ser incluído no item resultado(s).
	13. Objetivos: geral e específico
	14. Material e Métodos (opcional). Quando parte dos resultados não for apresentada no formato de artigo, este item deverá ser incluído após os objetivos específicos. Quando o autor quiser apresentar o(s) método(s) de forma mais detalhada do que no artigo, este item pode também ser apresentado em separado.
	15. Resultados (pode ser apresentado no formato de artigos): deve(m) ser inserida(s) a(s) cópia(s) de artigo(s) derivado(s) da dissertação, previamente publicados, submetidos ou não para publicação em revistas científicas. Sugere-se que cada artigo seja antecedido de uma breve apresentação seguida dos elementos de identificação do artigo (autores, título, revista de publicação, volume, páginas). Os artigos anexados poderão ser apresentados nos formatos exigidos pelas revistas, as quais os artigos foram publicados e/ou submetidos. Parte dos resultados pode ser apresentada em separado dos artigos, quando conveniente.
	16. Discussão (opcional): O autor pode ampliar a discussão dos resultados, quando conveniente.
	17. Conclusão ou Considerações finais: esta parte deverá conter a conclusão do trabalho ou as considerações do autor sobre os resultados alcançados frente aos objetivos propostos.
Elementos pós-textuais	*18. Referências:* Devem seguir as normas do “Manual para normalização de trabalhos acadêmicos” da Universidade de Sorocaba. *Não devem ser inseridas as referências apresentadas nos artigos.*
	19. Apêndices (Opcional)
	20. Anexos (Opcional)

Anexo 2. Phenolic Compounds from *Psidium guajava* (Linn.) Leaves: Effect of the Extraction-Assisted Method Upon Total Phenolics and Antioxidant Activity

Biointerface Research in Applied Chemistry
Platinum Open Access Journal (ISSN: 2069-5837)

Article
Volume 11, Issue 2, 2021, 9346 - 9357
https://doi.org/10.33263/BRIAC112.93469357

Phenolic Compounds from *Psidium guajava* (Linn.) Leaves: Effect of the Extraction-Assisted Method Upon Total Phenolics Content and Antioxidant Activity

Venâncio Alves Amaral [1], Thais Francine Ribeiro Alves [1], Juliana Ferreira de Souza [1], Fernando Batain [1], Kessi Marie de Moura Crescencio [1], Victória Soares Soeiro [1], Cecília Torqueti de Barros [1], Marco Vinícius Chaud [1*]

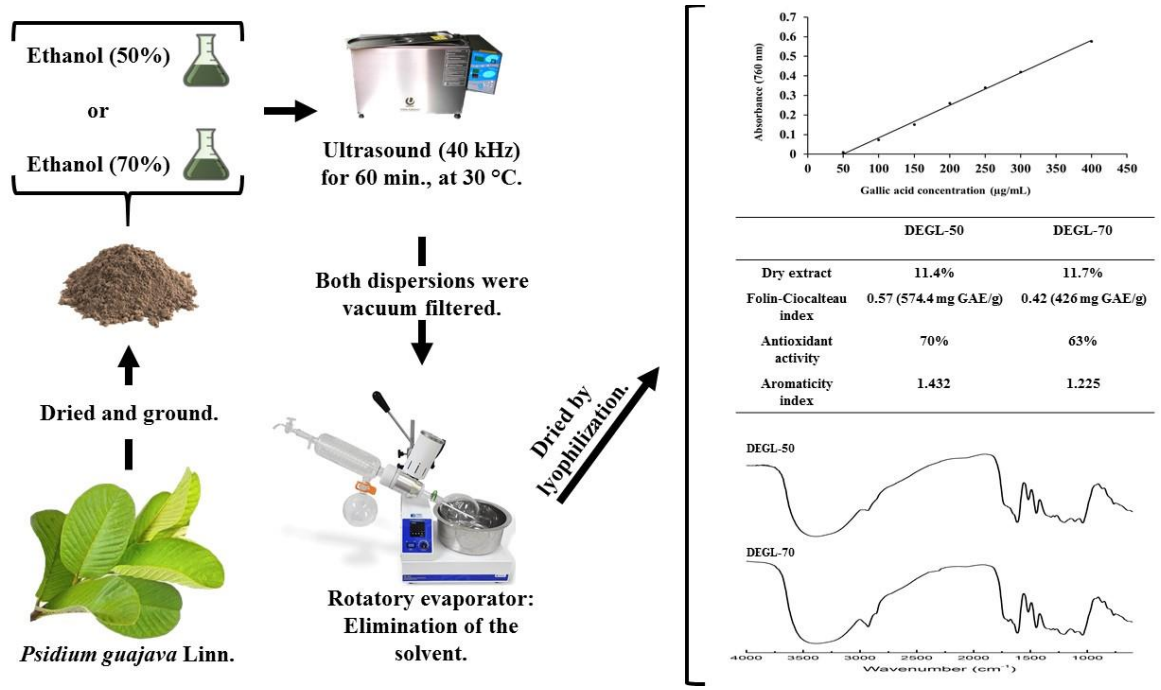
[1] Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology, University of Sorocaba – UNISO, University City Campus, Raposo Tavares, Vila Artura, ZC: 18023-000, Sorocaba, São Paulo, Brazil
* Correspondence: marco.chaud@prof.uniso.br;

Scopus Author ID 8845188500
Received: 15.08.2020; Revised: 8.09.2020; Accepted: 9.09.2020; Published: 11.09.2020

Abstract: The aim of this study was to investigate the influence of the extraction method on the dry extract yield of guava leaves, correlating the total phenolic content (TPC) with the antioxidant activity. The dry extracts were obtained from hydroethanolic (50 and 70%) extract using the ultrasound-assisted method. Folin-Ciocalteau reagent was used to determine the content of TPC. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) *in vitro* assay was used to determine the ability to scavenge free radicals. The results analyses demonstrated that the ultrasound-assisted method produced a higher yield in both dry extracts (11%), in contrast to the conventional method. The 50% hydroethanolic solvent was more efficient in the extraction of bioactive compounds. Both extracts showed a positive correlation of phenolic content with antioxidant activity. The FTIR spectrograms showed changes in the chemical groups, as well as determining the aromaticity index of the extracts, indicating a higher aromatic prevalence to the solvent 50%, although it presented simpler phenolic structures. In conclusion, the results provide an important basis for the use of phenolic compounds extracted from guava leaves, not only due to the antioxidant activity exerted, however, for potential use as a crosslinking agent of sulfated and non-sulfated glycosaminoglycan (GAG).

Keywords: *Psidium guajava* Linn.; hydroethanolic solvent; ultrasound-assisted; phenolic compounds; antioxidant activity; aromaticity index.

Graphical Abstract



	DEGL-50	DEGL-70
Dry extract	11.4%	11.7%
Folin-Ciocalteau index	0.57 (574.4 mg GAE/g)	0.42 (426 mg GAE/g)
Antioxidant activity	70%	63%
Aromaticity index	1.432	1.225

1 INTRODUCTION

Psidium guajava (guava) is a plant that can reach 8 to 10 meters in height, it is belong to the phylum Magnoliophyta, class Magnoliopsida, and family Myrtaceae. The guava is found in many tropical and subtropical regions (SHRUTHI *et al*., 2013; YUSUF; OCHEJE, 2019).

Different parts of this plant are widely used worldwide, either as food or in traditional medicine (DASWANI; GHOLKAR; BIRDI, 2017). Given its use in health practices, *in vitro* and *in vivo* pharmacological research has been widely used to demonstrate the potential effect of guava leaf extracts in helping to treat a variety of highly prevalent diseases, investigating the use of extracts by traditional medicine in cases such as diabetes mellitus, cardiovascular diseases, cancer, diarrhea, bacterial infection, and antiparasitic (DÍAZ-DE-CERIO *et al*., 2017; MADUBUONU *et al*., 2020). The biological activities of guava extracts have been attributed to secondary metabolic compounds, mainly to phenolic compounds (CAMARENA-TELLO *et al*., 2018).

Phenolic compounds represent a wide variety of substances distributed in the plant kingdom and are the most abundant secondary metabolites of plants, with more than 8000 phenolic structures already detected, from simple molecules, such as phenolic acids, to highly polymerized substances, such as tannins (AAM *et al*., 2018). The chemical structure of phenolic compounds is characterized by the presence of one or more aromatic rings attached to at least one hydroxyl radical and/or other functional substitutes, and can also be divided according to the number of phenolic rings and the structures to which they are attached linked, these characteristics confer antioxidant properties to these compounds (D'ARCHIVIO *et al*., 2007).

Antioxidants are defined , as molecules that can slow, inhibit or prevent the oxidation process, eliminating free radicals and decreasing oxidative stress (NASEER *et al*., 2018). Oxidative stress is characterized as an imbalance in which excessive amounts of reactive oxygen and/or nitrogen species (ROS/RNS), such as hydroxyl radical (· OH), superoxide anion (O^{2-}), hydrogen peroxide (H_2O_2) and peroxy-nitrite ($ONOO^-$) exceeds the endogenous capacity, resulting in the oxidation of a variety of biomacromolecules (DAI; MUMPER, 2010; SEO *et al*., 2014).

The antioxidant properties of phenolic compounds can be mediated by three mechanisms: (I) eliminate radical species such as ROS/RNS; (II) suppress the formation of ROS/RNS by inhibiting some enzymes or chelating trace metals involved

in the production of free radicals; and (III) regulate or protect the antioxidant defence (COTELLE, 2001; DAI; MUMPER, 2010).

In addition to the antioxidant activity expressed by phenolic compounds, due to their high compatibility with free radicals, these compounds have potential use in the chemical cross-linking process, due to their structure composed of hydroxyl groups and other functional groups, such as carboxyl and sulphated groups, being able to effectively perform intermolecular interactions with proteins and glycosaminoglycans (ZHAO; SUN, 2018), like collagen, hyaluronan, chondroitin sulphate and ulvan.

Chemical crosslinking is a highly versatile method with good mechanical stability for the manufacture of hydrogels (GHORPADE, 2020), films (CHOI *et al*., 2018) and scaffolds (ALVES *et al*., 2019). Sodium periodate and aldehyde compounds are generally used for this purpose, such as glutaraldehyde and formaldehyde. Al though they are very good crosslinking agents, they are not preferable due to their physiological toxicity (JIMTAISONG; SAEWAN, 2018). Therefore, the search for biocompatible natural compounds has been indicated as an important alternative for use as crosslinking agents.

Phenolic compounds have been extracted using conventional methods, such as maceration, infusion, percolation, countercurrent extraction and Soxhlet. However, these methods have some disadvantages, such as long extraction times, requiring relatively large amounts of plant samples, possible degradation or transformation of bioactive compounds and higher consumption of organic solvent (LI *et al*., 2019; OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013).

In a study carried out by Seo *et al*. (2014) hydroethanolic extracts (50 and 70%) were prepared with guava leaves by the maceration method. To obtain the extract, 100 g of leaves were used in 1.5 L of solvent for 4 days at room temperature. The results of this study confirmed the contents of TPC of 185 mg GAE/g and 150 mg GAE/g for hydroethanolic extracts 50 and 70%, respectively.

In contrast to conventional methods, ultrasound-assisted extraction has been widely requested for applications in the food and pharmaceutical industries, as it presents advantages combined with greater productivity, yield and selectivity of the compounds of interest (ZHANG; ABATZOGLOU, 2020).

Given the importance of the antioxidant activity exerted by the phenolic compounds present in guava leaves and their potential use as a crosslinking agent, this study aimed to investigate the effects of the ultrasound-assisted method to

optimize the extraction of TPC from hydroethanolic extracts. In addition, correlate the TPC with the ability to eliminate free radicals in vitro. We hypothesized that TPC are capable of crosslinking glycosaminoglycans after the partial reaction between GAG and sodium periodate ($NaIO_4$).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

The leaves of the guava plant (Psidium guajava Linn. var. Pomifera) from a the seedling bed were kindly donated by the Division of Parks and Conservation Units of the Secretariat for the Environment (Sorocaba, São Paulo, Brazil), ethanol (Synth, São Paulo, Brazil), hydrochloric acid (Neon, São Paulo, Brazil). Folin-Ciocalteau reagent (Dinâmica, São Paulo, Brazil), sodium carbonate (Dinâmica, São Paulo, Brazil), gallic acid (Dinâmica, São Paulo, Brazil). 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), methanol (Chemco, São Paulo, Brazil). All reagents used was analytical grade.

2.2 Obtaining plant material

The guava leaves were harvested by hand, carefully packed for transport, and on the same day the leaves were handled to remove debris and washed to remove impurities. The leaves were rinse with 70% ethanol to reduce drying time and kept in an oven with forced air circulation (Tecnal, TE-394, São Paulo, Brazil) at 37 °C to constant weight. The dried leaves were ground, and the powder was standardized using a standard sieve (20 mesh, 0.833 mm), and stored in an airtight container until the studies were carried out.

2.3 Extraction of total phenolic content

The ultrasound-assisted extraction was carried out using as solvent hydroethanolic 50% and 70% v/v, acidified with hydrochloric acid (0.5% v/v), and application of ultrasonic wave single frequency (40 kHz). For the extraction, 10 g of standardized guava leaf powder (SGLP) was placed in Erlenmeyer and dispersed in 150 ml of previously acidified ethanol 50% v/v and kept in a ultrasound bath (Unique, USC-3300, São Paulo, Brazil) for 60 min., at 30 °C. The same process was carried out using ethanol 70% v/v previously acidified. Both dispersions were vacuum filtered (Whatman® cotton filter, grade 44: 3 µm) and stored away from light and heat. The

residue retained in the cotton filter was reprocessed using the same extraction conditions already described. The extracts from first and second extraction process were mixes.

The solvent was eliminated using a rotatory evaporator (Tecnal, TE-211, São Paulo, Brazil). The concentrated extract was resuspended in ultrapure water and dried by lyophilization (Liofilizador - L101, Liotop, São Paulo, Brazil). The dry extract of guava leaves from acidified ethanol 50% (DEGL-50) e ethanol 70% (DEGL-70) were stored away from humidity, light and heat.

The mass yield of the dry extracts was calculated according to Eq. (1).

$$Dry\ extract\ yield\ (\%) = \frac{Dry\ extracts\ (g)}{Powder\ guava\ leaves\ (g)}\ x\ 100 \qquad (1)$$

2.4 Determination of total soluble phenolic compounds

The total soluble phenolic content from DEGL-50 and DEGL-70 samples were determined using the Folin-Ciocalteau colorimetric method described by Çam and İçyer (2015) with modifications. The dry extract was solubilized in ultrapure water at a concentration of 1 mg/mL. This solution was filtered through cotton filter, discarding the first 25 mL. The filtrate as the standard solution (SS - 0.001 g/mL). After that, a aliquot of 50 µL the standard solution was collected and transferred to a test tube with 2.5 mL of the Folin-Ciocalteau reagent being added. The mixture was slightly stirred and 2 mL of a solution of anhydrous sodium carbonate (Na2CO3) at 7.5% (w/v) was added. The mixture was incubated for 15 minutes in a thermostatic bath (Brookfield, TC 550, Middleborough, USA) at 50 °C and finally cooled in a freezer at -18 °C for 5 min.

The samples were analyzed in triplicate and the TPC was determined at wavelength of 760 nm in a UV/Vis-spectrophotometer (Femto 800XI, São Paulo, Brazil), using FemtoScan Software. For greater reliability of the assay, a white reagent (ultrapure water) was conducted under the same conditions.

For the quantification of TPC, the research group previously constructed an analytical curve with concentration points between 50 – 400 µg/mL of gallic acid and the results were expressed in mg/g gallic acid equivalent (GAE) of the samples (SOUZA *et al*., 2020).

2.5 *In vitro* antioxidant activity

The antioxidant activity of the TPC in the DEGL-50 and DEGL-70 samples were determined using a solution 50 µL of each dry extract (1 mg/mL) and mixed with 2 mL of 100 µM DPPH (4 mg/100 mL methanol) as free radical. The mixture was placed in the dark at room temperature for 60 minutes. After that, the absorbance of the samples was analyzed in triplicate at 520 nm by UV/Vis-spectrophotometer, using purified water for zero adjustment (KEDARE; SINGH, 2011).

Assessment of the scavenging abilities phenolic content on DPPH expressed as percent inhibition was calculated according to Eq. (2).

$$DPPH\ scavenging\ effect\ (\%) = \frac{Abs1 - Abs2}{Abs1}\ x\ 100 \qquad (2)$$

Where Abs1 represents absorbance of the control at 60 minutes and Abs2 is absorbance of the sample at 60 minutes.

2.6 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The FTIR analysis (Shimadzu, IRAffinity-1, Kyoto, Japan) was used to collect FTIR spectra via LabSolutions Software v.2.10. The KBr discs were prepared using a hydrostatic press, with a mass of 2 mg of sample (dry extract) mixed with 300 mg of KBr. The FTIR spectra were collected between 4000 – 400 cm^{-1}, with a resolution of 4 cm^{-1} and 32 scans.

2.7 Determination of the aromaticity index by FTIR

The aromaticity index provides an estimate of the aromatic characteristic of the analyzed samples, through the ratio between the peak absorption intensity around 1620 cm^{-1}, attributed to the aromatic groups, with the peak absorption n intensity around 2920 cm^{-1}, which represents aliphatic groups (CHEFETZ *et al*., 1996; DICK *et al*., 2006). The absorption intensity values were obtained using FTIR spectra and measured using Labsolutions Software v.2.10. The sample's aromaticity index was calculated according to Eq. (3).

$$Aromaticity\ index\ (AI) = \frac{I1620}{I2920} \qquad (3)$$

Where I-1620 represents the absorption intensity in the wavenumber around 1620 cm^{-1} and I-2920 is the absorption intensity in the wavenumber around 2920 cm^{-1}.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Efficiency of ultrasound-assisted extraction method

For the extraction of TPC from leaves of different species of plant the most used solvents are the water and the organic solvents such as ethanol, methanol chloroform, hexane, ethyl acetate, and acetone. Because of the diversity of available solvents, the choice of the most suitable solvent has become a crucial factor, both to increase the yield in TPC, to improve biological safety, and environmental friendly (CAMARENA-TELLO *et al*., 2018).

The yield of the ultrasound-assisted extraction (UAE) method measured by the dry extract weight after freeze-drying was 11.4% for DEGL-50 and 11.7% for DEGL-70.

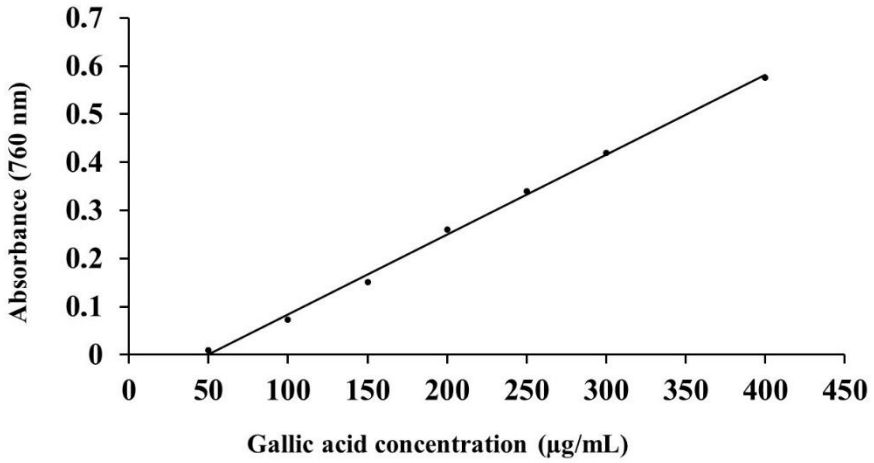
Dry extracts obtained by maceration method in ethanol 50% (LEITE *et al*., 2014) and ethanol 70% (MORAIS-BRAGA *et al*., 2017) was respectively 1.66% (three days of maceration) and 2.75% (four days of maceration). Unlike the methods of extraction by maceration where the time and dielectric constant (Ɛr) of ethanol 50% (Ɛr ~ 52) and 70% (Ɛr ~ 40), at a temperature of 25 °C, influenced the process yield, the UAE method for 60 min at 30 °C, a frequency of 40 kHz have not affected by the solvent Ɛr. The powerfulness of the UAE method compared to maceration, can be explained by the effect of ultrasonic energy through a solvent system containing solid particles. So, the energy in the form of waves generates a perpendicular or parallel force on the liquid surface, that converts the sonic energy into mechanical energy, equivalent to several thousands of atmospheric pressures, which is responsible for breaking the cell wall and dissolving phenolic compounds and another soluble in a specific solvent.

3.2 Determination of total phenolic compounds

Analytical curve was developed to determine TPC (Figure 1). The determination coefficient, designated R2, was observed in the concentration range of 50 – 400 µg/mL. The data from the linear regression analysis for the calibration graph showed a good coefficient of determination was 0.998 and the linear regression equation was $y = 0.0017x - 0.0832$ (SOUZA *et al*., 2020). In these conditions, the analytical validation method by UV/Vis-spectrophotometry to determine the polyphenol content proved that the method was linear, reliable, robust, reproducible, easy to perform and low cost. This methodology complies with the requirements for analytical application and to

guarantee the reliability of the results (ALENCAR FILHO *et al*., 2019; KAMBOJ *et al*., 2015).

Figure 1. Analytical curve to determine total phenols content in dry extract of guava leaf from ethanol 50% (DEGL-50) and ethanol 70% (DEGL-70) samples.



The TPC in the dry extract was estimated spectrophotometrically by the Folin-Ciocalteu reaction (SEMERCI; TUNÇ; OKUR, 2020; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999; ZARDO *et al*., 2017). The Folin-Ciocalteau reagent (FCR) consists of a mixture of phosphomolybdate and phosphotungstate, whose basic principles is a redox reaction with the phenolic compounds available in the sample to form a blue-colored complex that absorbs radiation and allows it to be quantified by visible light spectrophotometry (HUDZ *et al*., 2019; ROSLAN *et al*., 2019).

The FCR works by measuring the amount of analyte needed to inhibit oxidation of the reactive. Although the reaction occurs with other reducing substances that contain, for example, nitrogen such as guanidine and hydroxylamine, carotenoids, amino acids, sugars and ascorbates. Faced with all the limitations, FCR is the more adequate way to use the term Folin-Ciocalteau index, and it had been considered in the present study to estimate the TPC expressed in mg gallic acid.

In this study, the solvent, the time and temperature of the extraction process has designed to decrease the presence of reactive organic acids in the extracts. Although, the highest content of TPC has found in DEGL-50, Folin-Ciocalteau index of 0.57 (574.4 mg GAE/g), while the DEGL-70 sample had a Folin-Ciocalteau index of 0.42 (426 mg GAE/g) in relationship to the dry extracts, it is needed consider that due to the highest water solubility of organic acids its content in DEGL-50 extract may be

more than in DELG-70 extract. The study carried out by Seo *et al*. (2014) TPC content of 185 mg GAE/g and 150 mg GAE/g in extracts prepared by maceration method with ethanol 50% and 70%, respectively. Other reports in the literature confirmed levels of 288.56 mg GAE/g on the dry extract obtained with ethanol 50% (LEITE *et al*., 2014), and on the dry extract obtained with 70%, the TPC of 229.80 mg GAE/g were recorded (COELHO *et al*., 2016).

3.3 *In vitro* antioxidant activity

The formation of free radicals by the body under normal circumstances is inevitable, given that these compounds regulate cell growth, in addition to inhibiting the proliferation of viruses and bacteria (CHEN *et al*., 2016). Oxidative stress can damage the body´s cells, leading to a range of disease due to free radical that affect for example the central nervous system, accelerates the onset of cardiovascular disease, age-related vision decline, disorders autoimmune, inflammatory and cutaneous, degenerative genetic disease. Camarena-Tello *et al*. (2018) report that the consumption of antioxidants significantly decreases the adverse effects caused by the excess of some reactive oxygen and nitrogen species in the human body.

DPPH (α, α-diphenyl-β-picrylhydrazyl) method has been widely applied to estimate antioxidant activity, due to free radical scavenging and because it may be utilized in aqueous and nonpolar organic solvents. Besides, it can be used to examine both lipophilic and hydrophilic antioxidants; it is rapid, inexpensive and simple.

Amongst all the available methods, the DPPH method offers the first approach for evaluating the overall antioxidant potential of an extract or other biological sources (KAPOOR *et al*., 2020; TUAN *et al*., 2016). On mixing DPPH solution with a substance that can donate a hydrogen atom, it gives rise to the reduced form with the loss of violet color with absorption in ethanol solution at around 520 nm (AHMAD *et al*., 2020; KEDARE; SINGH, 2011).

According to Morais-Braga *et al*. (2017) the main phenolic compounds detected in guava leaf extracts are gallic acid, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, epicatechin, rutin, quercetin, kaempferol, and luteolin. These compounds play an important role in antioxidant activity, not only because of their ability to donate hydrogen or electrons but also because of their stable intermediate radicals, preventing the oxidation (SILVA *et al*., 2010).

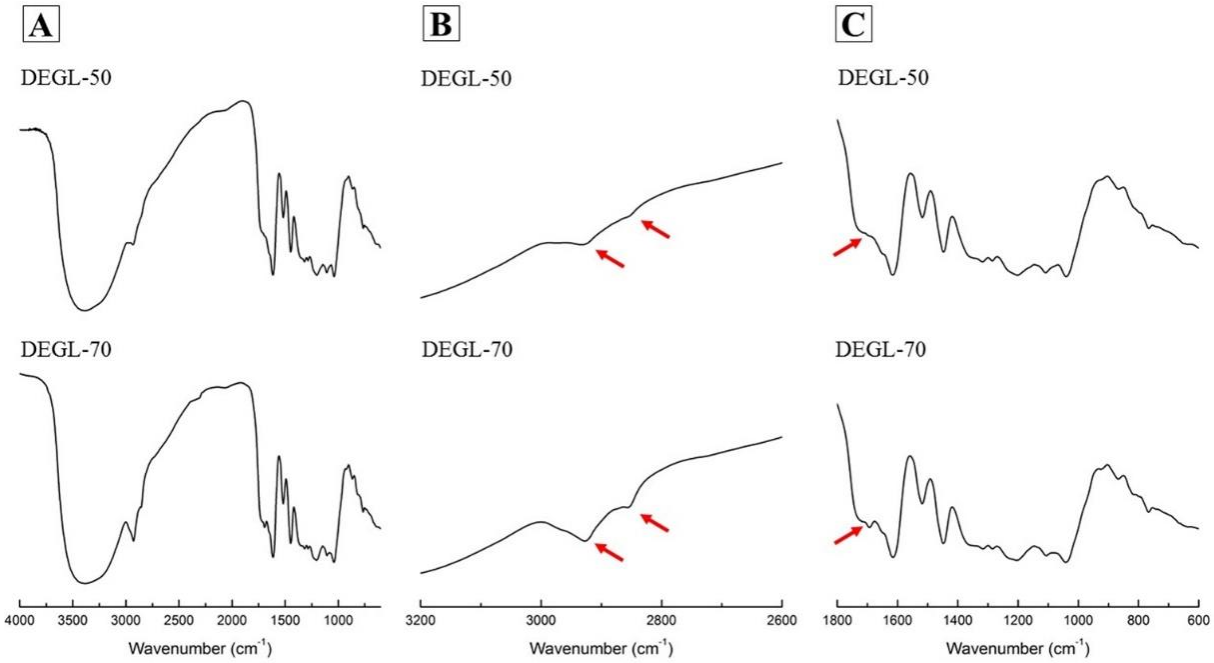
Based on the data obtained from this study, both the extracts were effective free radical inhibitor or scavenger, as well as a primary antioxidant that reacts with free radicals, which may limit free radical damage occurring in the human body. The analysis of results by DPPH method showed that the greatest free radical scavenging was estimated for the DEGL-50 (70 %), while the DEGL-70 sample (63 %). This result show that the extraction process used reached a greatest performance to isolate phenolics compounds, same when compared to another extraction method reported in the literature, including the ultrasound-assisted extraction.

3.4 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The FTIR spectrum of guava leaves and DEGL-50 and DEGL-70 samples were obtained using medium infrared (4000 – 400 cm^{-1}) and are shown in Figure 2 and Table 1. The presence of characteristic peaks was observed in the region of the functional groups (4000 – 1300 cm^{-1}), digital printing region (1300 – 900 cm^{-1}) and in the final region (900 – 400 cm^{-1}) of the spectra (SILVERSTEIN; BASSLER, 1962).

In the DEGL-70 spectrum, characteristic peaks were observed at 3383 cm^{-1} attributed to the hydroxyl stretch (OH) vibration, in the regions at 2927 cm^{-1} and 2856 cm^{-1} they are attributed respectively to asymmetric and symmetric vibration of aliphatic stretching structures. In 1693 cm^{-1} corresponds to the elongation of the carbonyl group (C=O) and in the 1614 cm^{-1}, 1517 cm^{-1} regions are assigned respectively to the CH group and C=C elongation bands, typical of aromatic molecules. The transmittance at 1446 cm^{-1} corresponds to the antisymmetric flexion in the CH_3 plane. The regions at 1203 cm^{-1}, 1107 cm^{-1} and 1041 cm^{-1} correspond to C–O stretching vibrations. Finally, the 767 cm^{-1} region attributed to out-of-plane conformations in CH (CASCANT *et al*., 2016; WANG *et al*., 2018; ZHAO *et al*., 2015).

Figure 2. FTIR spectra of dry extract of guava leaves from ethanol 50% (DEGL-50) and ethanol 70% (DEGL-70) samples (Panel A, Wavenumber: 4000 – 400 cm^{-1}). The arrows on panel B (Wavenumber: 3200 – 2600 cm^{-1}) and C (Wavenumber: 1800 – 600 cm^{-1}) indicate changes between the spectra of the samples.



The structural chemical conformation of the DEGL-50 and DEGL-70 samples recorded by the FTIR spectrum showed similar peaks. However, peak shifts and changes in transmittance intensity have been observed. In the DEGL-50 sample, in addition to the peak displacements, there were significant reductions in peak transmittance intensity in the regions of 2929 cm^{-1}, 2856 cm^{-1} and 1693 cm^{-1} (highlighted with arrows in Figure 2-B and C). The positions and assignments of the detailed peaks are listed in Table 1.

Table 1. Wavenumber assignments of FTIR spectra of dry extract of guava leaves from ethanol 50% (DEGL-50) and ethanol 70% (DEGL-70) samples.

Samples		Attribution
DEGL-50	DEGL-70	
Peak (cm^{-1})		
3383	3383	OH, stretch vibration
2931	2927	CH, asymmetric stretching vibration of aliphatic
-	2856	CH, symmetric stretching vibration of aliphatic
-	1693	C=O, stretching band of carbonyl
1616	1614	Aromatic CH bonds
1517	1517	C=C, stretching bands
1446	1446	Antisymmetric in-plane bending of CH_3
1201	1203	Stretching vibration of C–O
1109	1107	Stretching vibration of C–O
1039	1041	Stretching vibration of C–O
765	767	CH out-of-plane conformations

Through the data recorded by the FTIR, it was possible to verify changes in the spectra of the samples DEGL-50 and DEGL-70, confirming that the proportion of the solvent used in the extraction process influences the diversity of bioactive compounds extracted from guava leaves. The ethanol solvent, when used to extract bioactive substances, favors the extraction of compounds of intermediate polarity, due to its reduced dielectric constant (Ɛr ~ 24.30 at 25 °C) when compared to water (Ɛr ~ 78.36 at 25 °C) (MEDEIROS; KANIS, 2010). The hydroethanolic solvents used in the study promote changes in the Ɛr, resulting in ~ 52 and ~ 40 for the percentages of 50 and 70%, respectively. Both the extractive capacity of phenolic compounds and the expression of antioxidant activity showed a direct correlation with this property. In addition, the observed changes in the spectra (Figure 2-B and C) attributed to the reductions in the asymmetric and symmetric vibration of the CH stretch of the aliphatic group and the C=O carbonyl elongation band, indicating the extraction of compounds with simpler structures for the DEGL-50 extract.

3.5 Determination of the aromaticity index by FTIR

The FTIR technique provides reliable information for identifying the structure of chemical functional groups in complex mixtures, including quantification by

absorbance or transmittance of the analyzed compounds (PERMANYER; REBUFA; KISTER, 2007; SILVERSTEIN; BASSLER, 1962).

The values of the aromaticity index (I1620/I2920) were calculated from the absorbance data presented in the FTIR spectra, obtaining values of 1.432 and 1.225, for samples DEGL-50 and DEGL-70, respectively (Table 2).

Table 2. Aromaticity index of dry extract of guava leaves from ethanol 50% (DEGL-50) and ethanol 70% (DEGL-70) samples.

Samples	Aromatic* and aliphatic# groups (cm^{-1})	Base H (cm^{-1})	Base L (cm^{-1})	Absorption intensity	Aromaticity index (AI)
DEGL-50	1616*	1849	1556	0.596	1.432
	2931#	2958	1921	0.416	
DEGL-70	1614*	1676	1558	0.673	1.225
	2927#	2999	2862	0.549	

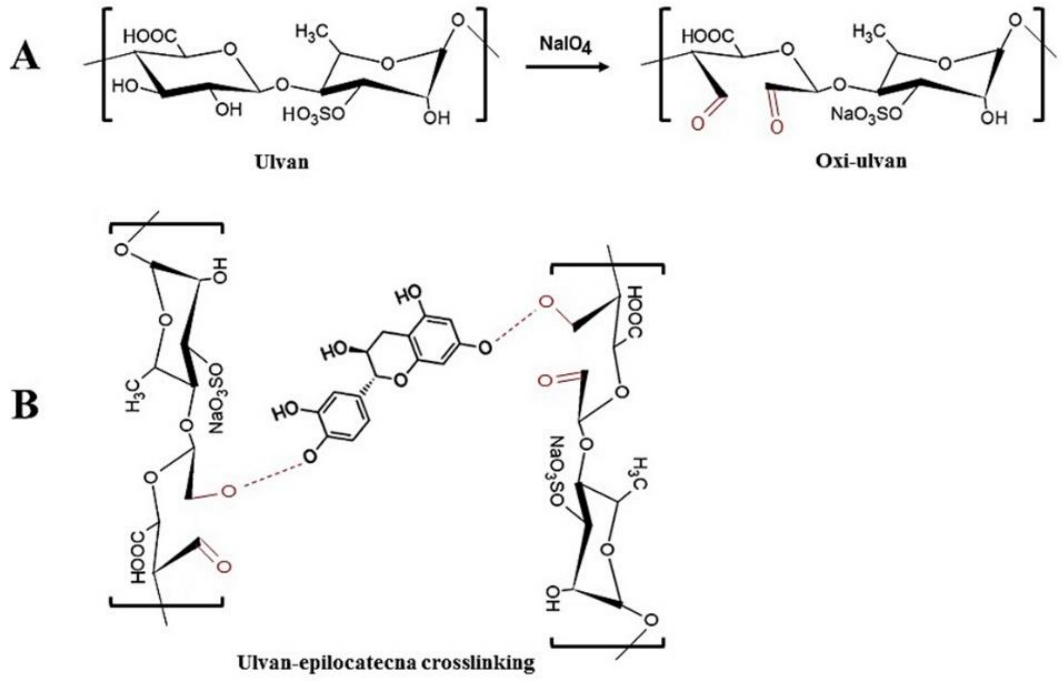
Taking as a reference the index used by Chefetz *et al*. (1996) to estimate the aromatic characteristics present in humic substances of compounds and in the study presented by Dick *et al*. (2006) to estimate the aromatic characteristics present in pedogenic and geological organic matter. The aromatic index equation can also be a useful method for determining total phenolic compounds.

The correlation between the values of total phenolic compounds determined by gallic acid equivalence (GAE) and the aromaticity index determined by FTIR, showed a high correlation, reaffirming that the sample DEGL-50 has the highest phenolic contents.

3.6 Hypothesis of glycosaminoglycans crosslinking by “click chemistry”

Figure 3 shows the oxidative cleavage of glycosidic group of sulphated glycosaminoglycan (ulvan), and crosslinking of phenolic group.

Figure 3. Hypothesis of glycosaminoglycans crosslinking by. A – Cleavage of glycosidic group of the ulvan glucuronic acids; B – “click” reaction of epilocatecna for crosslinking of ulvan molecules.



4 CONCLUSION

The choice of the extraction method and experimental variables to obtain the dry extracts of the leaves of *Psidium guajava* Linn. (var. *Pomifera*) were the most important factors to guarantee a higher yield. The ultrasound-assisted extraction technique, whose main effect in improving the process is attributed to the acoustic cavitations produced in the solvent through the passage of an ultrasonic wave. These cavitations create shear stresses, causing the cell walls to rupture and allowing greater penetration of the solvent into the material matrix. Both hydroethanolic solvents showed a potential capable of obtaining dry extracts in 11% mass. The effect of the solvent dielectric constant had a direct influence on the content of total phenolic compounds, presenting a higher content for the DEGL-50 sample. The phenolic compounds present in both samples showed the ability to donate electrons and hydrogen atoms, with antioxidant activity of 70% and 63% (DEGL-50 > DEGL-70). The FTIR identified the main characteristic peaks of the samples, providing significant data on the chemical structure, determining the aromaticity index, this data set confirmed that the use of hydroethanolic solvent (50%) increases the prevalence of aromatic structures in the extract, however, the extraction results in phenolic compounds with simpler structures. In conclusion, the results above provide a potential basis for the

use of phenolic compounds extracted from guava leaves as crosslinking agents glycosaminoglycans (hyaluronic acid, chondroitin sulphate, ulvan) and proteins (collagen).

5 References

AAM, E. et al. Challenges of Extraction Techniques of Natural Antioxidants and Their Potential Application Opportunities as Anti-Cancer Agents. **Health Science Journal**, v. 12, n. 5, p. 1–25, 2018.

AHMAD, M. et al. Comparison of antioxidant role of methanol, acetone and water extracts of Andrographis paniculata Nees. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 14, n. 8, p. 428–437, 2020.

ALENCAR FILHO, J. M. T. DE et al. Development and validation of an analytical method for quantification of total flavonoids in Alternanthera brasiliana by ultraviolet-visible absorption spectrophotometry. **African Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 30, p. 920–927, 2019.

ALVES, T. et al. Dense lamellar scaffold, biomimetically inspired, for reverse cardiac remodeling: Effect of proanthocyanidins and glutaraldehyde. **Journal of Dispersion Science and Technology**, p. 1–14, 2019.

ÇAM, M.; İÇYER, N. C. Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 1489–1497, 2015.

CAMARENA-TELLO, J. C. et al. Quantification of Phenolic Compounds and In Vitro Radical Scavenging Abilities with Leaf Extracts from Two Varieties of Psidium guajava L . **Antioxidants**, v. 7, n. 34, p. 1–12, 2018.

CASCANT, M. M. et al. Talanta Determination of total phenolic compounds in compost by infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 153, p. 360–365, 2016.

CHEFETZ, B. et al. Chemical and Biological Characterization of Organic Matter during Composting of Municipal Solid Waste. **Journal of Environmental Quality**, v. 25, p. 776–785, 1996.

CHEN, Y. et al. Polysaccharides from Traditional Chinese Medicines: Extraction, Purification, Modification, and Biological Activity. **Molecules**, v. 21, n. 1705, p. 1–23, 2016.

CHOI, I. et al. Effect of oxidized phenolic compounds on cross-linking and properties of biodegradable active packaging film composed of turmeric and gelatin. **LWT - Food Science and Technology**, p. 1–32, 2018.

COELHO, K. D. et al. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade e capacidade antioxidante de uma formulação em gel contendo o extrato das folhas de goiabeira (Psidium guajava L.). **Revista Biomotriz**, v. 10, n. 1, p. 136–155, 2016.

COTELLE, N. Role of Flavonoids in Oxidative Stress. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 6, p. 569–590, 2001.

D’ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist**

Super Sanità, v. 43, n. 4, p. 348–361, 2007.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313–7352, 2010.

DASWANI, P. G.; GHOLKAR, M. S.; BIRDI, T. J. Psidium guajava: A Single Plant for Multiple Health Problems of Rural Indian Population. **Pharmacognosy Reviews**, v. 11, p. 167–174, 2017.

DÍAZ-DE-CERIO, E. et al. Health Effects of Psidium guajava L. Leaves: An Overview of the Last Decade. **International Journal of Molecular Science**, v. 18, n. 897, p. 1–31, 2017.

DICK, D. P. et al. Organic matter in constructed soils from a coal mining area in southern Brazil. **Organic Geochemistry**, v. 37, p. 1537–1545, 2006.

GHORPADE, V. S. Preparation of hydrogels based on natural polymers via chemical reaction and cross-Linking. **Hydrogels Based on Natural Polymers**, p. 91–118, 2020.

HUDZ, N. et al. Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of Salvia sclarea extracts. **Pharmacia**, v. 66, n. 4, p. 209–215, 2019.

JIMTAISONG, A.; SAEWAN, N. Plant-Derived Polyphenols as Potential Cross-Linking Agents for Methylcellulose-Chitosan Biocomposites. **Solid State Phenomena**, v. 283, p. 140–146, 2018.

KAMBOJ, A. et al. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from extracts of Terminalia Bellerica. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 201–215, 2015.

KAPOOR, S. et al. Extraction and characterization of guava seed oil: A novel industrial byproduct. **LWT - Food Science and Technology**, v. 132, p. 109882, 2020.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011.

LEITE, N. F. et al. Composição fenólica e avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de Psidium Guajava L. var. Pyrifera e Psidium Guajava L. var Pomifera. **Caderno de Cultura e Ciência**, v. 13, n. 1, p. 8–15, 2014.

LI, J. et al. Optimization of ultrasound-assisted water extraction of flavonoids from Psidium guajava leaves by response surface analysis. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 1–9, 2019.

MADUBUONU, N. et al. Bio‐inspired iron oxide nanoparticles using Psidium guajava aqueous extract for antibacterial activity. **Applied Physics A - Materials Science &**

Processing, v. 126, n. 1, p. 1–8, 2020.

MEDEIROS, J. DE; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de Mikania glomerata Spreng., Asteraceae, e Passiflora edulis Sims, Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 796–802, 2010.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. Phenolic composition and medicinal usage of Psidium guajava Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence? **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, p. 302–313, 2017.

NASEER, S. et al. The phytochemistry and medicinal value of Psidium guajava (guava). **Clinical Phytoscience**, v. 4, n. 32, p. 1–8, 2018.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 954–970, 2013.

PERMANYER, A.; REBUFA, C.; KISTER, J. Reservoir compartmentalization assessment by using FTIR spectroscopy. **Journal of Petroleum Science & Engineering**, v. 58, p. 464–471, 2007.

ROSLAN, A. S. et al. Effect of Glucose and Ascorbic Acid on Total Phenolic Content Estimation of Green Tea and Commercial Fruit Juices by Using Folin Ciocalteu and Fast Blue BB Assays. **Tropical Agricultural Science**, v. 42, n. 2, p. 545–556, 2019.

SEMERCI, A. B.; TUNÇ, K.; OKUR, İ. Antioxidant activity of the fruits of Pyracantha coccinea using ethanolic extract method. **Food and Health**, v. 6, n. 1, p. 35–40, 2020.

SEO, J. et al. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (Psidium guajava L.) for high antioxidant efficacy. **Food Science & Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 174–180, 2014.

SHRUTHI, S. D. et al. A review on the medicinal plant Psidium Guajava Linn. (Myrtaceae). **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 162–168, 2013.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciência Agrária**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.

SILVERSTEIN, R. W.; BASSLER, G. C. Spectrometric Identification of Organic Compounds. **Journal of Chemical Education**, v. 39, n. 11, p. 546–553, 1962.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.

SOUZA, J. F. DE et al. Polyphenols isolated from pomegranate juice (Punica granatum L.): Evaluation of physical-chemical properties by FTIR and quantification of total polyphenols and anthocyanins content. **Brazilian Journal of Development**,

v. 6, n. 7, p. 45355–45372, 2020.

TUAN, P. M. et al. Extraction and encapsulation of polyphenols from guava leaves. **Annals Food Science and Technology - AFST**, v. 17, n. 1, p. 34–40, 2016.

WANG, L. et al. Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from Psidium guajava L . leaf aqueous extracts. **Materials Science & Engineering C**, v. 86, p. 1–8, 2018.

YUSUF, U. A.; OCHEJE, J. O. TOXICOLOGICAL STUDIES ON THE AQUEOUS LEAF EXTRACT OF Psidium guajava IN ALBINO RATS. **Salem University Journal of Life Sciences**, v. 1, n. 1, p. 70–76, 2019.

ZARDO, I. et al. Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sunflower Seed Cake Using Response Surface Methodology. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1–12, 2017.

ZHANG, Y.; ABATZOGLOU, N. Fundamentals, applications and potentials of ultrasound-assisted drying. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 154, p. 21–46, 2020.

ZHAO, X. et al. Effect of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activity of red grape pomace powders. **Powder Technology**, v. 286, p. 838–844, 2015.

ZHAO, Y.; SUN, Z. Effects of gelatin-polyphenol and gelatin–genipin cross-linking on the structure of gelatin hydrogels. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 3, p. 2822–2832, 2018.

Anexo 3 – Submission Confirmation (Title: Chemical Processing of Poly (L-co-D, L lactic acid)/Polyethylene glycol Blend for Biomedical Device).

Submission Confirmation

Print

Thank you for your revision

Submitted to	Polymers and Polymer Composites
Manuscript ID	PPC-20-0268.R1
Title	Chemical Processing of Poly (L-co-D, L lactic acid)/Polyethylene glycol Blend for Biomedical Device.
Authors	Amaral, Venâncio Souza, Juliana Alves, Thais Batain, Fernando Crescencio, Kessi Barros, Cecilia Baldo, Denicezar Oliveira Junior, Jose Komatsu, Daniel Aranha, Norberto Chaud, Marco
Date Submitted	07-Oct-2020

Author Dashboard