

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOCOMPATIBILIDADE DE COMPÓSITO A BASE DE
COLÁGENO E ÓLEO DA POLPA DE PEQUI
(*Caryocar brasiliense* Camb.)**

Andressa Sabine Rabbers

Orientador: Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani

GOIÂNIA

2016

ANDRESSA SABINE RABBERS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOCOMPATIBILIDADE DE COMPÓSITO A BASE DE
COLÁGENO E ÓLEO DA POLPA DE PEQUI
(*Caryocar brasiliense* Camb.)**

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

Área de concentração:
Patologia, clínica e cirurgia animal

Orientador:
Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani - PPGCA/EVZ
Comitê de Orientação:
Prof. Dr. Rogério Elias Rabelo - PPGCA/EVZ
Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno – PPGCA/EVZ

GOIÂNIA

2016

ANDRESSA SABINE RABBERS

Dissertação defendida e aprovada em 26/02/2016, pela Banca Examinadora
constituída pelos professores:

Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani
(Orientador)

Profa. Dra. Neusa Margarida Paulo

Profa. Dra. Marina Pacheco Miguel

Dedico esse trabalho à minha avó, **Maria Kliewer**,
que sempre foi meu exemplo de perseverança,
força e dedicação!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, pela vida! Pelo seu amor infinito, sua bondade e por sempre colocar em meu caminho pessoas nas quais posso confiar.

Agradeço à minha família, pelo incentivo, amor e por acreditarem que tudo isso, no futuro, valerá a pena. Em especial aos meus pais, Mariane e Roelof, por serem sempre meu alicerce.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani, pelo tempo dedicado a mim, pela confiança e pela paciência em me ensinar a complexidade da Ciência de Biomateriais... Um “mundo”, que até alguns anos atrás, era completamente desconhecido para mim... Obrigada!

Aos meus co-orientadores: Prof. Dr. Rogério Elias Rabelo, agradeço principalmente pela amizade! Por sempre estar presente, independentemente da situação, pela atenção, ajuda, conhecimento transmitido e boa vontade de fazer tudo isso valer a pena. Obrigada por acreditar nos teus alunos e fazer deles pessoas – e não apenas profissionais – melhores! Ao Prof. Dr. Adilson Donizete Damasceno, por sempre encorajar seus alunos numa fase tão importante, mas ao mesmo tempo, frágil.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos, USP, por terem me acolhido tão bem e por terem aberto as portas do laboratório para realização de parte fundamental da minha pesquisa. Agradeço, enormemente, a técnica Dra. Virgínia C. A. Martins, pelos ensinamentos e por ter me acompanhado durante todos os procedimentos, mesmo com diversos afazeres e uma rotina intensa. Agradeço, ainda a Dra. Marília Horn pelos esclarecimentos, pois mesmo a distância teve o cuidado de me explicar da melhor forma, tornando essa ciência tão complexa mais palpável. Obrigada por terem me ajudado a compreender os diferentes testes físicos e químicos, sempre com paciência e atenção.

Agradeço a Profa. Eneida Franco Vêncio por ter me dado “a luz no fundo do túnel” em momento importante da minha pesquisa e por ter disponibilizado o seu laboratório para confecção das lâminas histopatológicas. Ao técnico Erildo, meus sinceros agradecimentos pela disposição e pela experiência.

A Profa. Dra. Liliana Borges de Menezes Leite, pelo auxílio nas análises de colágeno pela coloração de picrossirius e pelo tempo dispendido com discussão acerca de

metodologias. Agradeço imensamente pelas literaturas e trabalhos científicos compartilhados.

Agradeço aos membros do Laboratório de Morfofisiologia da UFG, Regional Jataí, em especial ao Prof. Dr. Santa Rita e a técnica Lília, pelo esforço e atenção que tiveram.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, por tudo que ensinaram. Em especial, a Prof. Dra. Neusa Margarida Paulo, pela disciplina de Biomateriais, que permitiu elucidar diversas dúvidas acerca dessa ciência. Aos meus colegas de Mestrado Bruno César, Bruno Moraes, Lidiana Piveta, Karla Braga por toda motivação nos momentos difíceis e por comemorarem comigo os resultados de cada etapa...

Agradeço de uma forma especial a todos os membros do Setor de Cirurgia de Grandes Animais (SCGA) da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, que me auxiliaram tanto na fase experimental, quanto na elaboração do trabalho escrito. É incrível o trabalho em equipe de vocês! Meu agradecimento especial ao Guilherme Santos, cuja participação foi fundamental para o resultado desse estudo.

Agradeço, ainda, a todos os meus amigos, simplesmente por serem amigos. Obrigada por terem cruzado o meu caminho e contribuído para que eu chegasse até aqui.

“Não tenha medo de pensar diferente dos
outros, tenha medo de pensar igual e descobrir
que todos estão errados!”

Eça de Queiroz

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. BIOMATERIAIS: CONCEITO, CLASSIFICAÇÃO E BIOCAMPATIBILIDADE ..	3
2.1. Colágeno	5
3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE BIOMATERIAIS	8
3.1. Ensaios reológicos	8
3.2. Análises térmicas aplicadas em biomateriais	8
3.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR).....	11
3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	11
4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DE BIOMATERIAIS	12
5. AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE <i>IN VIVO</i> DE BIOMATERIAIS	14
5.1. Inflamação e processo cicatricial	15
5.2. Inflamação aguda X crônica	19
6. ÓLEO DE PEQUI: APLICAÇÕES BIOMÉDICAS EXPERIMENTAIS E UTILIZAÇÃO POPULAR	21
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DO COMPÓSITO A BASE DE COLÁGENO E ÓLEO DE PEQUI (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb) ...	1
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	1
INTRODUÇÃO	2
MATERIAL E MÉTODOS	4

RESULTADOS E DISCUSSÃO	6
CONCLUSÕES	13
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 3 - BIOCOMPATIBILIDADE <i>IN VIVO</i> DE COMPÓSITO A BASE DE COLÁGENO E ÓLEO DE PEQUI (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.).....	1
RESUMO.....	1
ABSTRACT	1
INTRODUÇÃO	2
MATERIAL E MÉTODOS	3
RESULTADOS E DISCUSSÃO	5
CONCLUSÕES	12
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
ANEXOS	17

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1	Esquema representativo da estrutura do colágeno, evidenciando a estrutura primária da molécula (sequência de aminoácidos), a composição do tropocolágeno e sua participação nas microfibrilas, formação de fibras e conseqüentemente do tendão muscular.....	6
FIGURA 2	Curva típica de DSC.....	9
FIGURA 3	Gráficos de programas de análise térmica de materiais.....	10
FIGURA 4	Fases do processo de cicatrização correlacionadas com a presença de células inflamatórias e fibroblastos.....	15
FIGURA 5	Processo de biocolonização de superfície de biomateriais a partir da adsorção específica de proteínas. Nota-se que a interação entre proteínas e biomaterial favorecem a adesão celular.....	17

CAPÍTULO 2

FIGURA 1	Módulos G' e G'' em função da deformação para MC e MCOP.....	7
FIGURA 2	Módulos G' e G'' em função da frequência angular para MC e MCOP.....	8
FIGURA 3	Efeito da taxa de cisalhamento em função da viscosidade para MC e MCOP.....	8
FIGURA 4	Curvas DSC para MC e MCOP. Observa-se que a desnaturação do colágeno ocorreu por volta de 53°C para as duas membranas submetidas ao teste.....	9
FIGURA 5	Gráfico das curvas termogravimétricas para MC e MCOP.....	10
FIGURA 6	Espectros na região do infravermelho para óleo de pequi, MC e MCOP.....	10
FIGURA 7	Fotomicrografias por MEV para as membranas de MC e MCOP em diferentes aumentos.....	11

CAPÍTULO 3

FIGURA 1	Registros fotográficos da interface dos fragmentos coletados em diferentes períodos após implantação no tecido subcutâneo de ratos.....	7
----------	---	---

FIGURA 2	Fotomicrografia de amostras da interface aos 28 dias.....	9
FIGURA 3	Formação de cápsula fibrosa envolvendo o processo inflamatório para MCOP aos 14 dias após implantação.....	11

RESUMO

Perdas teciduais, acometendo humanos e animais, podem ser ocasionadas por traumas ou enfermidades, e sua restituição apresenta-se desafiadora para cirurgiões. Nesse sentido, o emprego de biomateriais tem se apresentado como alternativa promissora e alvo de investigações. É importante que sejam conhecidas, além da estrutura molecular, as características físico-químicas e biológicas do material a ser utilizado, a fim de prever o comportamento na interface implante-tecidos adjacentes. O colágeno tem sido largamente empregado como biomaterial, principalmente pela sua interação favorável com os tecidos do organismo, propiciando biocompatibilidade satisfatória. O óleo de pequi tem despertado o interesse de pesquisadores devido seu potencial como auxiliar na cicatrização. Esse estudo teve como objetivo o desenvolvimento de biomaterial compósito a base de colágeno e óleo de pequi, a fim de verificar possível interação aditiva na ação conjunta dos dois materiais. Após o preparo do biomaterial, que constituiu em colágeno 1,1%, adicionado de gelatina 1%, e óleo de pequi, efetuou-se caracterizações físicas, químicas e biológica. Os resultados foram comparados com a membrana controle a base de colágeno 1,1%, adicionado de gelatina 1%, sem a presença do óleo de pequi. Análises termogravimétricas, espectroscópicas, reológicas e microscópicas visaram investigar possíveis interferências ocasionadas pelo óleo de pequi. Foi verificada a manutenção do arranjo estrutural da tripla hélice do colágeno, fator importante para manutenção das suas propriedades físicas e biológicas. Resultados do ensaio reológico revelaram que a presença do óleo de pequi proporcionou, inicialmente, comportamento viscoso e, com aumento da frequência, gelificação da mistura. Por meio da microscopia eletrônica de varredura, notou-se que óleo de pequi promoveu o aparecimento de vesículas de tamanhos e formatos variados, ausentes na membrana controle. O teste *in vitro* avaliou os possíveis efeitos tóxicos ocasionados pelo biomaterial em relação a fibroblastos da linhagem VERO, provenientes de rim de macaco verde africano e mostrou que a MCOP 25% não apresenta citotoxicidade a esse tipo celular. A biocompatibilidade *in vivo* foi avaliada por meio da implantação de ambos materiais (experimental e controle) no tecido subcutâneo de ratos. Análises histopatológicas da interface realizadas a partir de fragmentos coletados aos três, sete, 14, 21, 28 e 35 dias após implantação revelaram que a adição de óleo de pequi favoreceu a biocompatibilidade do colágeno, visto que houve redução do processo inflamatório e contagem de células gigantes do tipo corpo estranho e otimização do recrutamento de fibroblastos. Consequentemente, houve maior produção de colágeno e favorecimento do processo cicatricial. Apesar de novos estudos serem necessários, envolvendo as diferentes áreas da ciência, é reconhecido que esse biomaterial apresenta potencial para ser utilizado *in vivo*.

Palavras-chave: análise físico-química, avaliação histopatológica, biomaterial, compósito, estudo *in vitro*.

ABSTRACT

Tissue loss, affecting humans and animals, can be caused by trauma or disease, and presents challenging for surgeons. Fragile structures, or the lack of viable tissue for the synthesis are the main hindrance in reconstructive surgery. In this sense, the use of biomaterials, with direct or indirect reparation purpose, has emerged as a promising alternative and investigations target. Through innovative techniques in engineering biomaterials, along with other areas of science, aimed at the development and improvement of various materials for use in living tissue. Physico-chemical and biological characteristics of the material to be used, as well as molecular structure, are important to be known, in order to predict the behavior in the adjacent implant-tissue interface. Collagen has been widely used as biomaterial, mainly because of its favorable interaction with body tissues, resulting in good biocompatibility. Pequi oil has attracted the interest of researchers because of its potential in wound healing. This study aimed to develop a composite of collagen and pequi oil in order to verify possible additive interaction in the joint action of the two materials. After preparation of the biomaterial, which was collagen 1.1%, added gelatina 1%, and pequi oil, physical, chemical and biological characterization where made. The results were compared with the control membrane of collagen 1.1%, added gelatina 1%, without the presence of pequi oil. Thermogravimetric analysis, spectroscopic, rheological and microscopic aimed to investigate possible interference caused by pequi oil. It was found that the structural arrangement of the triple helix collagen persist, which an important factor for maintaining their physical and biological properties. Results of the rheological test showed that the presence of oil pequi provided, initially, viscous behavior, and with increased frequency, gelling of the mixture. By means of scanning electron microscopy, it was noted that pequi oil promoted the appearance of vesicles of varying sizes and shapes, absent in membrane control. *In vitro* test evaluated the possible toxic effects caused by the biomaterial to fibroblastos of VERO line, originating from African green monkey kidney and showed that the MCOP 25% was non-cytotoxic to this cell type. The biocompatibility *in vivo* was assessed by means of the implementation of both materials (experimental and control) in the subcutaneous tissue of rats. Histopathological analysis of the interface made from fragments collected at three, seven, 14, 21, 28 and 35 days after implantation showed that the addition of pequi oil favors the biocompatibility of collagen, since a reduction in the inflammatory process and optimization of recruiting fibroblasts was verified. Consequently, there was increased production of collagen and the healing process was favored.

Keywords: biomaterial, composite, *in vitro* study, histopathology, physical-chemical analysis.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

As perdas teciduais promovidas por causas multifatoriais que acometem humanos e animais, são significativas e apresentam-se, em muitas situações, desafiadoras para os cirurgiões. A restauração de estruturas comprometidas ou mesmo fragilizadas, faz com que o reestabelecimento anatômico da área lesionada por meio de síntese primária apresente-se laborioso, podendo culminar em intercorrências ou mesmo no impedimento da reparação. Desse modo, o emprego de biomateriais, com a finalidade reparatória direta ou indireta, tem se apresentado como alternativa promissora e alvo de investigações.

Apesar de estudos apontarem inúmeros benefícios no emprego de diferentes biomateriais, estes podem induzir respostas inflamatórias e imunológicas diversas, estando o mecanismo diretamente relacionado ao prognóstico do paciente, alvo de seu emprego¹. Assim, estudos envolvendo diferentes áreas do conhecimento, buscam inovações, sejam focadas na escolha do biomaterial a ser empregado, como também na caracterização e preparo dos mesmos, provando assim a importância da multidisciplinaridade para esta finalidade.

A engenharia de biomateriais, por meio de técnicas inovadoras, apresenta-se como importante área do conhecimento, dando respaldo técnico/científico experimental e/ou aplicado, nas diferentes áreas médicas. O objetivo fundamental da engenharia de biomateriais é o desenvolvimento e tratamento de polímeros, metais e cerâmicas com materiais biológicos de maneira a otimizar a implantação de próteses, aprimorando a biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade². Resultado disso é a disponibilização de novos biomateriais em pesquisas aplicadas ou mesmo na rotina médica, minimizando intercorrências e permitindo a restauração morfofuncional de estruturas anatômicas comprometidas³.

Neste âmbito, as diversas técnicas físicas e químicas, permitem o desenvolvimento e a caracterização de materiais, sejam estes de origem natural ou sintética. Paralelamente, técnicas biomédicas são aplicadas para avaliar o comportamento dos materiais na interface com células ou com tecidos do organismo hospedeiro.

Apesar do uso consagrado de alguns biomateriais, é notória a complexidade envolvendo diferentes etapas, uma vez que a escolha do biomaterial, caracterização e preparo apresenta-se laborioso e, muitas vezes, dispendioso. Ressalte-se ainda, que para a escolha do material mais indicado a ser utilizado como biomaterial, é necessário analisar criteriosamente os efeitos do ambiente orgânico sobre o material, como corrosão e degradação, e efeitos do material no organismo hospedeiro⁴. Assim, a fim de prever o comportamento na interface tecido-material, é imprescindível a execução de testes de caracterização físico-química do biomaterial, assim como avaliações *in vitro* e *in vivo*⁵.

2. BIOMATERIAIS: CONCEITO, CLASSIFICAÇÃO E BIOCOMPATIBILIDADE

O termo “biomaterial” é utilizado para materiais destinados à aplicação na interface com sistemas biológicos para tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função orgânica^{1,3,6}. Este tipo de material se diferencia de outros por conter combinações de propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas que tornarão viável sua utilização no organismo hospedeiro. Para tanto, é necessário que garanta biocompatibilidade e, conseqüentemente, evite a ocorrência de resposta inflamatória exacerbada, que pode culminar na rejeição do material pelo organismo⁷.

“Biocompatibilidade”, por sua vez, era caracterizada, inicialmente, pela ausência total de qualquer reação tecidual provocada pela presença do material no organismo hospedeiro, que em tese, deveria ser totalmente inerte. No entanto, ao longo da utilização de materiais como implante, verificou-se que sempre há resposta, podendo ser amena ou danosa. Além disso, em certas aplicações, é necessária alguma forma de interação entre o tecido e o material, a fim de maximizar o efeito do biomaterial, conceito, este, definido como bioatividade⁸.

Estudos apontam que o mesmo material pode se mostrar biocompatível para uma aplicação e incompatível para outra, ou mesmo, apresentar variação entre diferentes pacientes. Contudo, a interação do material com os tecidos circunvizinhos apresenta-se desejável na maioria dos casos, estimulando o crescimento celular, servindo como suporte e influenciando fenômenos físico-químicos^{1,9}. A biocompatibilidade engloba um amplo espectro de características biológicas que só é possível ser definido analisando as várias formas de interação do organismo com o material, dando-se ênfase especial à interface tecido-material¹⁰.

De acordo com o *American National Standard Institute* (ANSI), existem níveis para avaliação da biocompatibilidade, dentre os quais, deve-se, inicialmente, aplicar testes *in vitro*, utilizando-se culturas celulares. Em seguida, o material deve ser testado *in vivo*, em animais de laboratório, como ratos, camundongos e cobaias, avaliando o potencial imunogênico, como testes de irritação dérmica e implantação subcutânea ou intra-óssea. Finalmente, deve ser aplicado no tecido ou órgão a que se destina o material, em outros animais, em seguida em primatas não humanos e, por fim, em seres humanos¹¹.

Diversos fatores devem ser analisados quando da escolha do material para ser utilizado como biomaterial. A biocompatibilidade, biodegradabilidade controlável e ausência de liberação de produtos tóxicos, resistência mecânica apropriada, flexibilidade e capacidade de absorver fluidos corporais, a fim de permitir transporte de nutrientes, são características almeçadas e desafiadoras para o desenvolvimento de biomateriais^{3,12}.

Assim, a habilidade do material em suscitar resposta apropriada do hospedeiro é um dos principais fatores correlacionados com o sucesso da aplicação clínica dos biomateriais^{7,13}. Aliado a isso, o desenvolvimento de biomateriais considerados bioativos vem sendo enfatizado, visto que, além de substituir tecidos lesionados, proporcionam a recuperação tecidual por meio da atuação no metabolismo intra e extracelular, favorecendo a reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento⁴.

Os biomateriais podem ser produzidos a partir de diferentes matérias-primas e são classificados, conforme sua constituição, em metais, cerâmicas e polímeros. Ainda, quando formados por mais de uma substância, são classificados como biomateriais compósitos^{14,15}.

Os materiais poliméricos têm recebido atenção especial devido sua versatilidade, pois apresentam boa biocompatibilidade, flexibilidade, processabilidade e baixo custo. Isso se deve à ampla variedade de arranjos estruturais tridimensionais e composições químicas que diferenciam cada polímero⁷.

Os polímeros são classificados em sintéticos, como polietileno, naturais de origem vegetal, como a celulose e amido, ou de origem animal, como colágeno, ácido hialurônico e quitosana, ou, ainda, em polímeros naturais geneticamente modificados, como polihidroxibutirato e polihidroxivalerato^{7,14,15}. Ambos, sintéticos e naturais, são largamente utilizados para o desenvolvimento de moldes tridimensionais e porosos que servem como arcabouços para proliferação celular³.

De acordo com seu comportamento após sua implantação *in vivo*, os polímeros são classificados, também, em biodegradáveis e não biodegradáveis, sendo influenciado pela sua estrutura química⁹. Os materiais biodegradáveis tem como objetivo substituir tecidos danificados por tempo suficiente para que ocorra reparo natural da área lesionada, de forma que o novo tecido substitua progressivamente o implante⁴.

Em casos específicos, a reabsorção dos materiais biodegradáveis é desejável que depende da dissolução por meio da sua desintegração física em partículas menores que, tratando-se de biomateriais, não deverão apresentar características tóxicas ao organismo hospedeiro⁶. A degradação dos polímeros sintéticos ocorre, geralmente, por hidrólise simples, enquanto os polímeros naturais sofrem principalmente degradação enzimática, como é o caso do colágeno, degradado pela ação da enzima colagenase³.

2.1. Colágeno

O colágeno é um polímero natural bastante conhecido e tem sido largamente utilizado como biomaterial. Devido às suas diversas funções em diferentes tecidos, esse material tem sido utilizado na confecção de dispositivos que atuam como arcabouço para substituir estruturas teciduais lesadas e em sistemas de liberação de fármacos^{12,16}.

Caracteriza-se por ser uma proteína que forma fibras insolúveis resistentes, cuja unidade básica, denominada de tropocolágeno é constituída por três cadeias polipeptídicas helicoidais, sendo duas iguais ($\alpha 1$) e uma diferenciada ($\alpha 2$). A estrutura primária destas unidades é caracterizada pela repetição do triplete glicina, prolina e hidroxiprolina, cujas cadeias são retorcidas em torno de um eixo central de modo que toda glicina permaneça na porção central da tripla hélice, permitindo que os aminoácidos maiores se acomodem nas outras posições¹⁷⁻¹⁹.

O arranjo de tropocolágeno origina fibrilas e fibras e, conseqüentemente, redes que constituem os diversos tecidos¹⁹ (Figura 1).

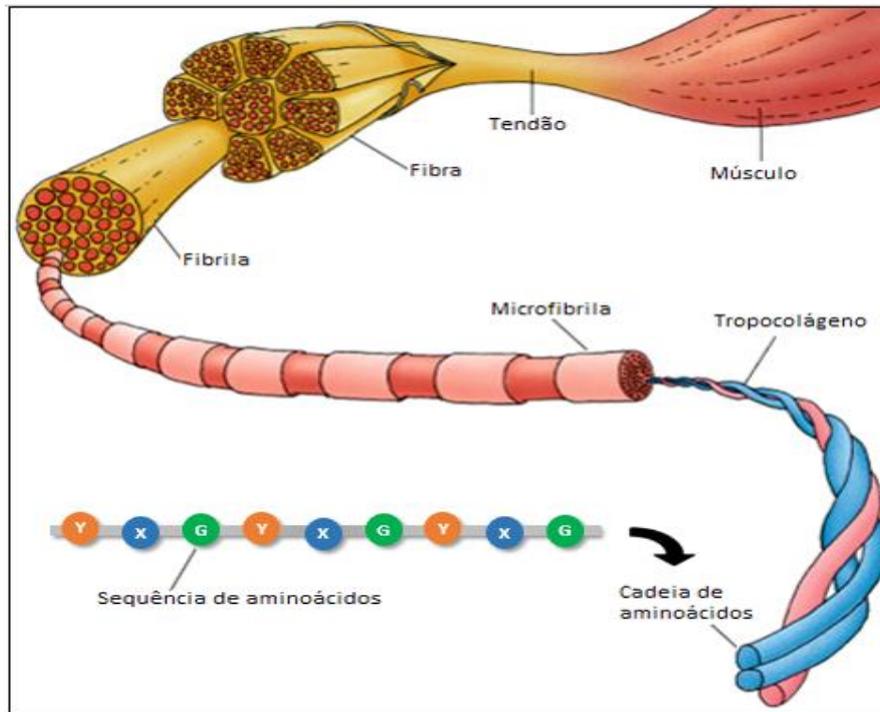


FIGURA 1 - Esquema representativo da estrutura do colágeno, evidenciando a estrutura primária da molécula (sequência de aminoácidos), a composição do tropocolágeno e sua participação nas microfibrilas, formação de fibras e conseqüentemente do tendão muscular. G: glicina, X e Y: demais aminoácidos
 Fonte: adaptado de studyblue.com/notes/note/n/histology-of-connective-tissue-/deck/3549171²⁰

Esse polímero se destaca devido a sua interação com o tecido hospedeiro, visto que representa papel fundamental na formação de tecidos e órgãos e expressão celular. Além disso, é um agente tenso-ativo, possui grande habilidade de penetração em interfaces não gordurosas, baixa antigenicidade e é biodegradável²¹. Quando comparado a outras proteínas, apresenta imunogenicidade consideravelmente baixa. Esse fato é explicado devido à alta estabilidade da região da tripla hélice durante a evolução, ou seja, apresenta baixa variação na sequência de aminoácidos nas diferentes espécies de mamíferos^{22,23}.

A possibilidade de diferentes formas de preparo, incluindo tiras, filmes, esponjas e grânulos, aumenta sua aplicabilidade, sendo utilizado principalmente em feridas cutâneas e osteogênese^{12,21}. Isso se deve em função da sua capacidade hemostática e de provocar quimiotaxia de fibroblastos, favorecendo o processo cicatricial²⁴. Por ser biodegradável, o biomaterial colagênico possui a vantagem de não

exigir nova intervenção cirúrgica para remoção. Dessa forma, as complicações pós-operatórias, assim como o desconforto ocasionado ao paciente, são minimizados²⁵.

O conjunto dessas características, portanto, favorece seu uso como biomaterial e, tem sido largamente utilizado, principalmente sob forma de compósito^{12,16,21}.

3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE BIOMATERIAIS

Apesar do conhecimento da estrutura molecular de alguns materiais, no planejamento e desenvolvimento de biomateriais é necessário que sejam realizadas caracterizações físicas, químicas e biológicas para prever comportamentos na interface material/tecidos adjacentes. A biocompatibilidade, assim como a biodegradabilidade podem ser preditos por meio da avaliação criteriosa das características físico-químicas do material em questão^{6,8}.

No âmbito da Engenharia e Ciências de Materiais, a caracterização descreve os aspectos de composição e estrutura do material, incluindo defeitos, e levando em consideração o contexto de relevância para um processo, produto ou propriedade em particular^{26,27}.

3.1. Ensaio reológicos

Reologia é a ciência dos materiais que estuda o comportamento deformacional e fluxo de matéria, incluindo propriedades elásticas, viscosidade e plasticidade de uma massa submetida a tensões, sem necessidade do conhecimento da forma dos corpos envolvidos. É aplicada a fim de investigar as propriedades dos corpos que sofrem deformação ou escoamento, como sólidos elásticos ou fluidos (líquido ou gás), respectivamente^{28,29}.

A aplicação da reologia na caracterização de biomateriais é importante, pois visa o conhecimento da estrutura molecular, permitindo a compreensão do comportamento estrutural intrínseco da matéria. Infere, ainda, o controle de qualidade e aceitação dos produtos e auxilia no controle do processo industrial de diversas áreas, com destaque para, indústria de alimentos e cosméticos²⁹.

3.2. Análises térmicas aplicadas em biomateriais

As análises térmicas consistem em uma série de técnicas nas quais uma propriedade de um material ou sistema é avaliada em função da temperatura durante um programa de tratamento térmico. Essas técnicas são essenciais na caracterização dos materiais e para o controle dos processos de obtenção de materiais, pois compreende

como os procedimentos térmicos podem interferir na estrutura molecular dos mesmos. Diversas propriedades podem ser avaliadas, mas as principais são as associadas à variação de massa, temperatura, entalpia e dimensões^{1,30}.

O conhecimento acerca da temperatura máxima suportada pelo material se torna ainda mais importante quando houver necessidade de esterilização para posterior implante em organismos vivos³¹.

3.2.1. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Nessa técnica as variações de entalpia são monitoradas em relação a um material de referência termicamente inerte³². A amostra e o material de referência são mantidos à mesma temperatura durante o programa térmico, sendo a diferença de energia necessária para manter as amostras na mesma temperatura controlada. Os eventos térmicos que ocorrem na amostra aparecem, então, como desvios da linha de referência na forma de picos negativos ou positivos, dependendo se energia está sendo fornecida (endotérmico) ou retirada (exotérmico), respectivamente^{1,32} (Figura 2).

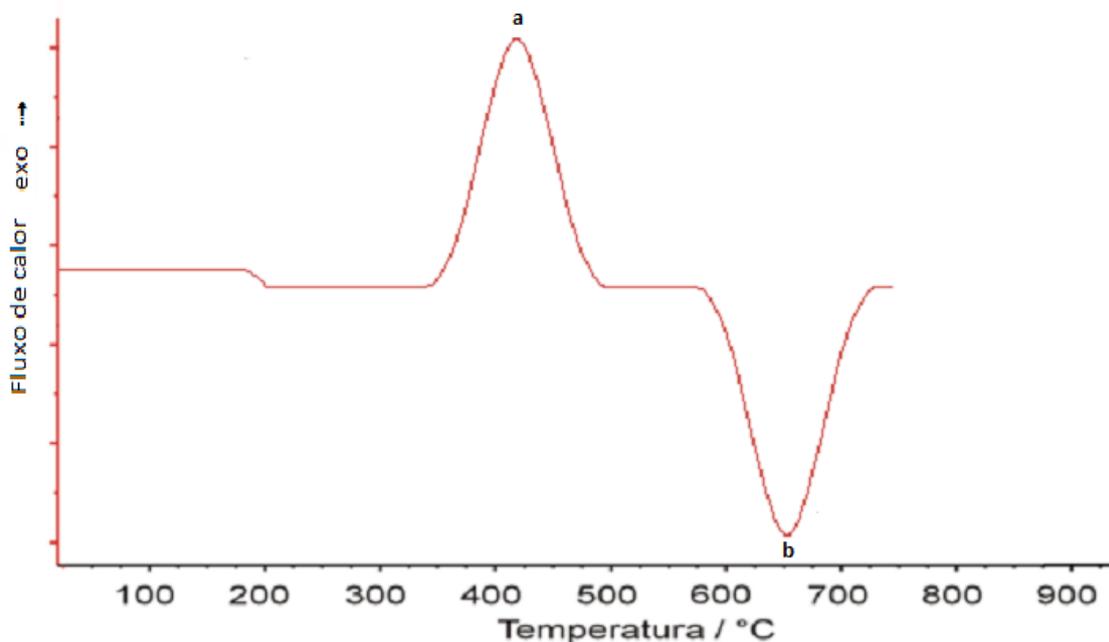


FIGURA 2 – Curva típica de DSC. Em (a), representação de reação exotérmica e em (b), representação de reação endotérmica

Fonte: adaptado de ebah.com.br/content/ABAAABcBsAF/analise-termica-diferencial-dta-calorimetria-diferencial-varredura³³

3.2.2. Termogravimetria (TG)

A termogravimetria é realizada com o intuito de determinar as propriedades térmicas das amostras, como temperatura de transição, ponto de fusão e temperatura de reação³². É acompanhada a variação de massa da amostra em função do aumento de temperatura, de forma linear, e do tempo¹.

Para melhor interpretação de curvas de TG complexas, indica-se a transformação dos resultados para o formato de diferencial (DTG – *Derivative Thermogravimetric*), pois assim é possível evidenciar pequenas variações nas curvas de TG^{1,32}. A curva termogravimétrica corresponde ao gráfico obtido pela perda de massa ou porcentagem de massa em função do tempo ou da temperatura (Figura 3). Essas curvas termogravimétricas são características para cada composto, em decorrência do caráter específico da sequência de reações físico-químicas ou mudanças de estado que ocorrem ao longo de uma faixa definida de temperaturas e às velocidades das reações, que dependem da estrutura molecular. Além disso, temperaturas de início e fim dos picos obtidos pela DTG correspondem ao começo e fim das transformações¹.

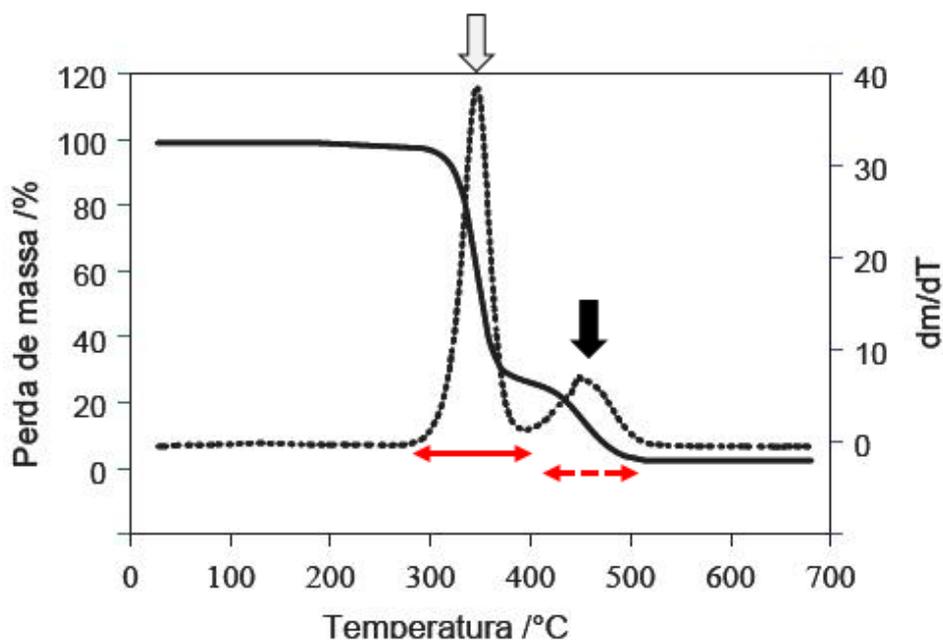


FIGURA 3 – Gráficos de programas de análise térmica de materiais. Apresentam-se duas curvas, sendo a primeira de termogravimetria (TG) (linha contínua) e a segunda de calorimetria exploratória diferencial (DTG) (linha pontilhada). A seta vazia indica o pico correspondente à perda de massa entre 290 e 400°C (seta vermelha contínua). O segundo pico de perda de massa (seta cheia) corresponde ao período de 400 a 510°C (seta vermelha interrompida)

Fonte: chasqueweb.ufrgs.br³⁴

3.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia, estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo esse um dos meios mais eficazes para obter-se informações sobre a estrutura microscópica do material. Quase todas as informações sobre as propriedades físicas do universo são obtidas direta ou indiretamente de seus espectros, principalmente temperaturas, densidades e composições. A interação entre radiações eletromagnéticas e a matéria proporcionam evidências do comportamento microscópico, permitindo compreender e prever propriedades do material estudado²⁶.

3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem como princípio a emissão de um feixe de elétrons por um filamento de tungstênio que incide sobre a amostra e provoca uma série de emissões de sinais relacionados com a interação do feixe incidente e a amostra. Os sinais emitidos encontram-se sob forma de elétrons e fótons que são captados por detectores apropriados, sendo amplificados e processados por um sistema analisador específico para cada tipo de sinal. Dessa forma, é possível a obtenção da imagem ampliada e tridimensional da amostra¹.

Entre as diversas aplicações na bioengenharia de tecidos, a MEV permite visualizar arcabouços porosos de forma adequada, possibilitando a visualização de interconexões entre os poros, visualizar a interface formada entre material e tecido, observar a proliferação endotelial, avaliar a citocompatibilidade de amostras, visualizar a morfologia de superfície previamente e após implantação no sítio receptor, além de permitir a visualização de pequenos defeitos estruturais. Portanto, a realização da MEV apresenta-se como ferramenta inovadora e fundamental na caracterização de biomateriais, permitindo visualizar tanto a morfologia quanto a textura da superfície, fator importante para compreensão do comportamento de interface³.

4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE BIOMATERIAIS

A toxicidade de biomateriais é definida pela capacidade de liberação de substâncias causadoras de danos ou morte celular direta ou indireta, por meio da inibição de vias metabólicas. Portanto, a adoção de métodos que verifiquem possíveis características tóxicas previamente à implantação de biomateriais é imprescindível. A avaliação da citotoxicidade *in vitro* permite obter dados significativos mais facilmente e limitar o número de variáveis experimentais, além de reduzir o período de teste quanto comparado aos testes *in vivo*³⁵. O objetivo é mimetizar as condições biológicas para testar biomateriais simulando, *in vitro*, a implantação nos tecidos do organismo¹¹.

Vários testes para avaliar a toxicidade de biomateriais foram padronizados utilizando cultivos celulares. Segundo a normativa ISO 10993-5, os protocolos para testes *in vitro* compõem-se por métodos de contato direto, indireto e extrato do material em diferentes diluições. A interação com diferentes cultivos celulares permite verificar alterações celulares por diferentes mecanismos, como incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares^{11,35}.

O ensaio colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromide] é um modelo para avaliação *in vitro* simples e eficaz para detecção de células vivas ou em crescimento. A avaliação da viabilidade celular se dá pela conversão do reagente MTT, de cor amarela solúvel em água, num produto violáceo insolúvel em meio aquoso e solúvel em DMSO, denominado formazan. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis presente no experimento. A metabolização do MTT ocorre através das enzimas succinato-desidrogenases presentes nas mitocôndrias das células que permanecem viáveis^{11,36}.

Para o procedimento da técnica, linhagens de células com densidade populacional pré-determinadas são distribuídas em poços de placas de cultivo e aderência. As células não aderidas, após o período de incubação, são removidas por aspiração e o biomaterial é adicionado em forma de pó ou extrato. Todo o sistema é novamente incubado em estufa por 24 a 72 horas e, posteriormente o ensaio de viabilidade celular pelo MTT é quantificado determinando-se a densidade óptica com auxílio de um leitor de ELISA¹.

A utilização de células diferenciadas em estudos *in vitro* é importante, visto que são representativas dos tecidos que circundam o sítio de implantação, sem a interferência dos efeitos provocados pelo organismo. Com o uso de cultura de fibroblastos, por exemplo, é possível obter informações sobre a citocompatibilidade quanto à adesão, viabilidade, proliferação, propriedades celulares e estado da membrana¹. Além disso, o uso de células de linhagens permanentes é recomendado, visando a padronização dos ensaios^{11,37}.

5. AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE *IN VIVO* DE BIOMATERIAIS

Apesar de todos os esforços na busca de métodos alternativos ao uso de animais para experimentação, os testes *in vivo* ainda apresentam importância para determinar a segurança da aplicação de biomateriais, desde que executados respeitando os preceitos e normas vigentes para experimentação animal¹¹.

A implantação de todo material em tecidos vivos sempre será seguida por processo inflamatório, visto que rupturas vasculares e teciduais são inevitáveis durante o procedimento cirúrgico. A injúria e, subsequentemente, a perturbação dos mecanismos homeostáticos irão desencadear a cascata celular responsável pelo processo cicatricial¹³. O processo inflamatório é fundamental para restabelecimento do paciente. É por meio dele que todos os tecidos vivos reagem contra as agressões, incluindo o ato cirúrgico de implantação e interação do organismo com o biomaterial¹. O tipo, intensidade e duração dessa resposta inflamatória dependem das características físico-químicas de cada biomaterial. Portanto, o grau de sucesso na implantação de biomateriais pode ser associado, entre outros fatores, à severidade do processo inflamatório desencadeado^{7,9}.

Os efeitos locais devem ser avaliados por meio da resposta tecidual causada pela amostra teste em comparação à resposta ocasionada pela amostra controle, cuja biocompatibilidade e aceitabilidade clínica se encontram estabelecidas. O objetivo do teste *in vivo* é caracterizar o processo e evolução da resposta tecidual após implantação do biomaterial, incluindo integração final e biodegradação do mesmo³⁷. Ressalte-se que a resposta ao biomaterial é, geralmente, tempo-dependente e não dose-dependente⁹.

A avaliação histopatológica do tecido adjacente ao material implantado é o método mais comumente utilizado para determinar a biocompatibilidade *in vivo*, tendo como base a aparência morfológica das reações inflamatórias ocorridas naquele local¹³. Portanto, o conhecimento dos processos comuns à inflamação e reparação tecidual, decorrentes da implantação do biomaterial é imprescindível, visto que o desenvolvimento e resolução do processo inflamatório são responsáveis pelo grau de sucesso do procedimento, que pode ser visualizado por vários aspectos, tais como a fixação do biomaterial no local de implantação, duração do processo inflamatório, tipo celular, morfologia e vascularização do tecido formado adjacente ao biomaterial, biofuncionalidade do biomaterial e do tecido formado na interface^{1,38}.

5.1. Inflamação e processo cicatricial

A cicatrização é um mecanismo fisiopatológico no qual o tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado a fim de promover o restabelecimento tecidual. O processo consiste em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos, envolvendo componentes da matriz extracelular, células residentes, leucócitos e mediadores de natureza lipídica e proteica¹³. Esse processo é dividido didaticamente em três fases (Figura 4), que não ocorrem isoladamente: fase inflamatória, fase proliferativa ou fibroblástica e deposição de matriz extracelular e, finalmente, fase de remodelamento tecidual^{40,42}.

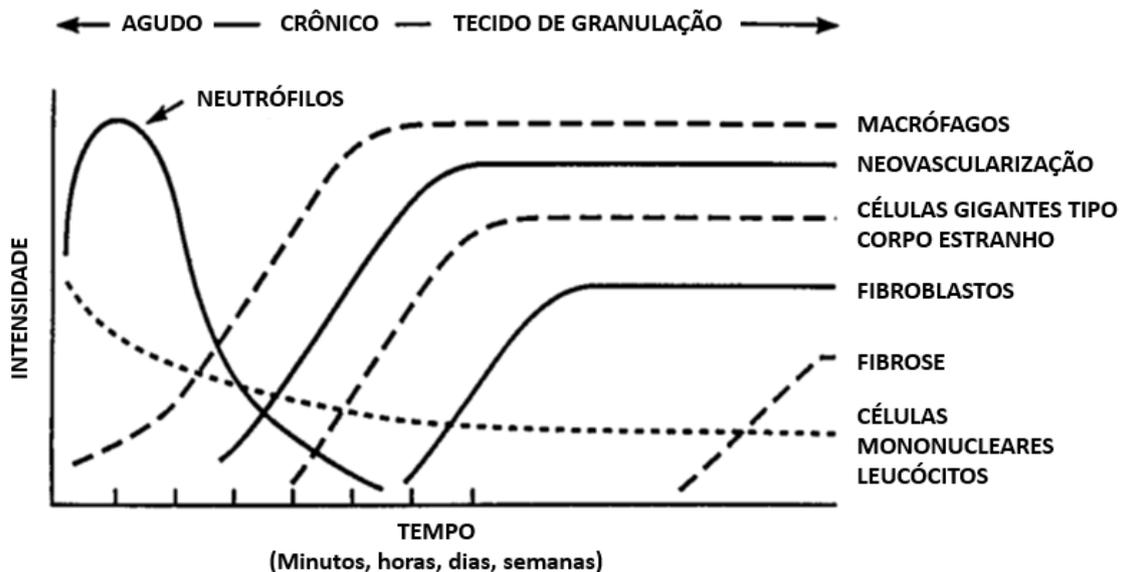


FIGURA 4 – Fases do processo de cicatrização correlacionadas com a presença de células inflamatórias e fibroblastos
Fonte: Anderson (2001)¹³

5.1.1. Fase inflamatória

A fase inflamatória consiste no mecanismo de defesa, no qual ocorre migração e ativação de células sanguíneas, liberação de líquidos e resposta sistêmica afim de dominar, minimizar, enclausurar, neutralizar, destruir e eliminar a causa inicial da lesão celular e induzir a reparação³⁹. Essa fase tem início imediatamente após a lesão com duração de cerca de 48 a 72 horas e o aparecimento dos sinais clássicos da inflamação, como dor, calor, rubor e tumefação, são característicos^{40,41}.

Imediatamente após a injúria tecidual e/ou presença do biomaterial, alterações no fluxo vascular e permeabilidade ocorrem^{13,40,41}. A vasodilatação ocorre decorrente de mediadores químicos liberados por plaquetas e mastócitos e, dessa forma, a quimiotaxia de leucócitos, principalmente neutrófilos e monócitos/macrófagos, é favorecida^{40,42}.

A injúria a tecidos vascularizados leva ao desenvolvimento imediato de matriz provisória, ou coágulo, que consiste em fibrina, produzida a partir da ativação da cascata de coagulação, e produtos inflamatórios, liberados pelo sistema complemento, plaquetas ativadas, células inflamatórias e endoteliais. Os componentes da matriz, ou liberados por ela, são importantes para o início do processo de reparação, pois favorecem o recrutamento de células inflamatórias e fibroblastos por meio da liberação de diversos fatores de crescimento e quimiotáticos. Além disso, a estrutura tridimensional da rede de fibrina funciona como substrato para adesão e migração celular. Portanto, a matriz provisória é responsável tanto por fornecer componentes estruturais quanto bioquímicos para o processo de reparação tecidual¹³.

Ao tratar-se de biomateriais, sabe-se que, ao formar a interface tecido-material, rapidamente ocorrerá a adsorção de proteínas plasmáticas na superfície do material, ainda antes da interação com as células de defesa do hospedeiro^{1,43}. A estrutura primária das proteínas é definida pela sequência de aminoácidos que podem ser ácidos, básicos, hidrófilos ou hidrófobos. De acordo com essa característica é estabelecida a reatividade e possível afinidade química entre proteínas e superfície. Já as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias, definidas por aspectos conformacionais, garantem a especificidade e funcionalidade dessas moléculas¹.

A adsorção não específica pode ocasionar a quebra estrutural das moléculas proteicas e perda da função ou obstrução do sítio ativo, sendo reconhecida como agente estranho. Nesses casos, é provocada uma resposta do organismo cuja função é a eliminação do material ou separação por meio da formação de uma cápsula fibrosa. Por outro lado, quando a adsorção ocorre de forma específica, tais superfícies são potencialmente reconhecidas como parte do organismo. Assim, podem interagir com as entidades celulares que viabilizam a fixação do implante e regeneração do tecido lesado adjacente ao biomaterial, já que as células aderidas tem capacidade de proliferação¹ (Figura 5). Portanto, a presença das proteínas adsorvidas modula a resposta inflamatória e, conseqüentemente, a cicatrização⁴³.

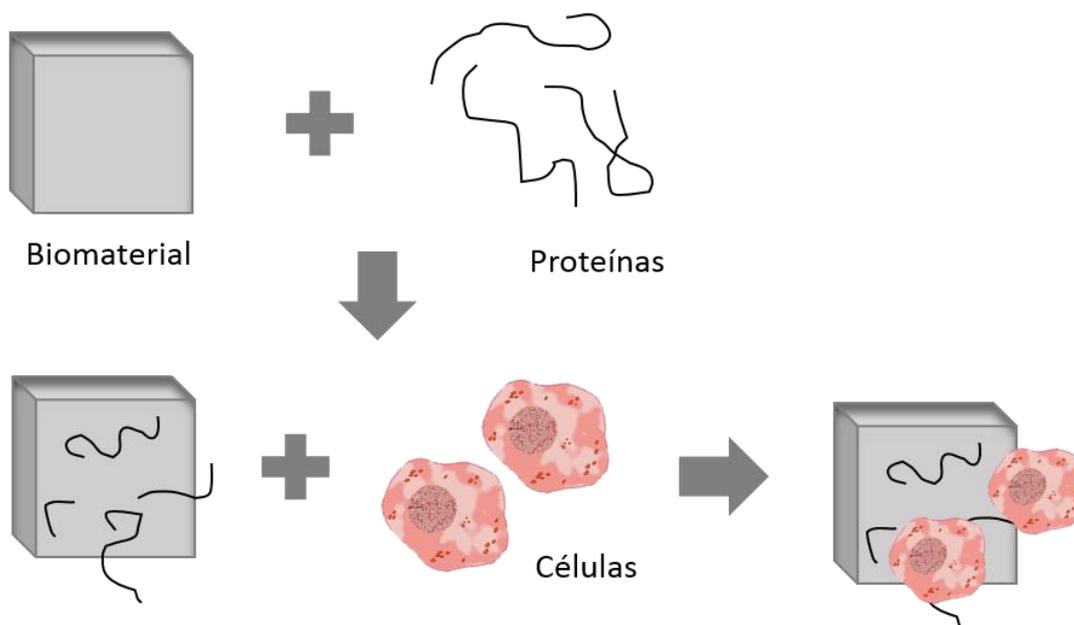


FIGURA 5 - Processo de biocolonização de superfície de biomateriais a partir da adsorção específica de proteínas. Nota-se que a interação entre proteínas e biomaterial favorecem a adesão celular.

Fonte: adaptado de Oréfice et al. (2006)¹

Os neutrófilos oriundos da circulação são as primeiras células a alcançarem a região, sendo os tipos celulares predominantes entre o primeiro e segundo dia após implantação. Sua função principal é a tentativa de eliminação do corpo estranho pela fagocitose, porém essa ação é frustrada devido ao tamanho do material^{42,44}.

A progressão dos eventos inflamatórios e rejeição de corpo estranho requer o extravasamento e migração de monócitos/macrófagos para o local do implante. Para isso, a interação sangue-biomaterial, as plaquetas e o coágulo liberam mediadores químicos, tais como fator de transformação de crescimento (TGFs), leucotrienos e interleucinas. Adicionalmente, a degranulação de mastócitos libera histamina e favorece a permeabilidade dos vasos e, assim, maior migração celular. Os macrófagos, células apresentadoras de antígenos para o reconhecimento inicial e remoção de células senescentes, providenciam uma linha frontal de defesa contra antígenos⁴⁵. Esses iniciam a tentativa de fagocitose do agente irritante, porém não são capazes de engolfar o objeto de tamanho muito superior. Apesar disso, interagem com a superfície do biomaterial e liberam componentes intracelulares reativos, como proteases e radicais livres, que favorecem a degradação do material^{1,43}.

5.1.2. Fase proliferativa

Com a presença de macrófagos e liberação dos mediadores químicos, a migração de fibroblastos é intensificada, dando início a fase proliferativa, cuja duração é de 12 a 14 dias⁴⁰. Os fibroblastos produzem as fibras colágenas que substituirão a matriz extracelular por tecido conjuntivo, processo denominado fibroplasia. Paralelamente, ocorre a neovascularização, essencial para garantir a troca gasosa e nutrição das células metabolicamente ativas, sendo extremamente essencial para eficiência do processo de fibroplasia^{40,44}.

A partir do estabelecimento da angiogênese e fibroplasia, inicia-se a formação do tecido de granulação, cujo aspecto é frágil e sangra com facilidade. Este tecido é caracterizado pela presença de macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados suportados pela matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágenos tipos I e II⁴⁰.

Durante a fixação dos fibroblastos e seu amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança a sua eficiência máxima. Isto ocorre devido à mudança de fenótipo dos fibroblastos das margens da ferida para miofibroblastos que fazem a união célula a célula e auxiliam no processo de cicatrização da ferida. Além disso, as células basais próximas a região da ferida, ao perderem a interação com as células adjacentes, são ativadas, adquirem propriedades mitóticas e proliferam em direção ao centro da lesão, processo denominado de reepitelização. Finalmente, o leito da ferida encontra-se totalmente preenchido pelo tecido de granulação que, lentamente, é enriquecido com mais fibras colágenas, dando aspecto de cicatriz^{40,44}.

A capacidade de proliferação celular, específicas para cada tecido ou órgão, determina o tipo de resolução após a injúria, ou seja, cicatrização ou regeneração tecidual. A regeneração consiste na restituição da arquitetura tecidual pré-existente e ocorre nos casos ausentes de necrose ou perda estrutural da membrana basal. Caso contrário, ocorre crescimento de tecido de granulação para o interior da ferida e o processo de cicatrização com formação de tecido fibroso é desencadeado. Quando há implantação de material, principalmente em tecidos vascularizados, ocorre, em geral, processo de cicatrização, cujo desenvolvimento de tecido fibroso conduz a formação de cápsula na interface material-tecido¹³.

5.1.3. Fase de remodelamento tecidual

A fase de remodelamento, que pode durar meses ou anos, corresponde ao período de reorganização do colágeno e aumento da resistência da cicatriz. Etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno, cuja deposição inicial ocorre de maneira aleatória, resultam na conformação mais regular da cicatriz. A regeneração dos anexos cutâneos, como folículos pilosos e glândulas ocorre de forma limitada e, devido a deficiente regeneração dos melanócitos, a coloração da cicatriz permanece pálida⁴⁰.

Os linfócitos, que não são somente efetores imunes, mas também produtores de fatores de crescimento, aparecem em maior abundância durante esse período, sendo atraídos em quantidades semelhantes aos monócitos. É possível ocorrer, ainda, o aparecimento de eosinófilos, possivelmente relacionado à produção de fatores de crescimento⁴⁰.

Respostas mais duradouras e intensas à presença do biomaterial podem levar ao quadro de inflamação crônica e formação de granulomas, havendo um aumento no número de anticorpos e leucócitos, além da formação das células gigantes, envolvendo o antígeno e deixando-o imobilizado. Toxicidade, formação física do material e sua movimentação após implantação são fatores ligados a ocorrência de inflamações crônicas¹.

5.2. Inflamação aguda X crônica

A resposta inflamatória divide-se, basicamente, em dois tipos, aguda e crônica, sendo que em geral atuam como início, continuação e finalização do restabelecimento da condição normal do tecido. Enquanto a inflamação aguda caracteriza-se pelo início rápido, ocorrendo logo após a injúria tecidual, e rápida finalização, a inflamação crônica se estende por semanas a meses, exibindo atuação simultânea de mecanismos de destruição e reparo tecidual^{39,41}.

Fenômenos vasculares exsudativos predominam na inflamação aguda, como hiperemia ativa patológica, edema e infiltrado de polimorfonucleares (PMN), principalmente neutrófilos. Já na inflamação crônica há predomínio de fenômenos

proliferativos, tais como proliferação de fibroblastos e angioblastos, e infiltração de células mononucleares, principalmente de linfócitos, plasmócitos e macrófagos¹.

Alguns casos de inflamação crônica tendem a formar granulomas que se caracterizam pela formação de estruturas nodulares com arquitetura bem definida (do latim, *granulo* = forma de grão + *oma* = tumor ou aumento de volume). Sua formação ocorre devido à reação de macrófagos aos agentes inanimados e inertes (agentes inflamatórios não-imunogênicos nos casos de granulomas de baixo *turnover* ou tipo corpo estranho) ou biológicos de baixa virulência e grande resistência (agentes inflamatórios imunogênicos nos casos de granulomas de alto *turnover* ou imunogranulomas). O granuloma completo (do tipo tuberculóide, de alto *turnover*) também é passível de ocorrer^{1,41}.

A reação inflamatória nos casos em que há reconhecimento do implante como corpo estranho é composta por células gigantes do tipo corpo estranho e tecido de granulação, caracterizado pela presença de macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados. No entanto, se o material for mais biocompatível e apresentar adequada interação com os tecidos na interface, a resposta tende a ser mínima. Nesses casos, ocorre rápida reabsorção após apoptose das células inflamatórias e, em geral, há formação apenas uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso de espessura variável^{1,41,43}.

No entanto, a simples análise da resposta inflamatória aguda progredindo para resposta crônica pode ser ilusória quando se trata da avaliação da biocompatibilidade de materiais. O desenvolvimento de tecido de granulação é, classicamente, associado a resposta inflamatória crônica, porém, devido a exclusiva interação tecido-material, é recomendado a diferenciação de reação de corpo estranho^{13,38}.

6. ÓLEO DE PEQUI: APLICAÇÕES BIOMÉDICAS EXPERIMENTAIS E UTILIZAÇÃO POPULAR

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), pertencente à família *Caryocaraceae*, é uma das espécies oleaginosas de maior incidência no centro-oeste brasileiro e apresenta grande interesse econômico. O consumo e comercialização do seu fruto, pequi, *in natura* e de seus derivados apresenta significativa importância cultural e socioeconômica regional. O seu óleo tem aplicações em diversas áreas, incluindo medicina, produção de cosméticos e indústria petroquímica⁷.

Na medicina popular, o óleo da polpa do pequi tem sido usado para tratamento de queimaduras, gripe e doenças pulmonares^{7,46,47}. Estudos revelaram atividade antifúngica do óleo, efeito redutor dos processos inflamatórios e na pressão arterial, ação quimioterápica e propriedades antitumorais^{7,48,49}. Além disso, apresenta atividade antioxidante devido à presença de diversos carotenoides e compostos fenólicos^{49,50}.

O alto teor de ácidos graxos insaturados, como oleico e palmítico, no óleo de pequi favorece sua utilização terapêutica como auxiliar do processo de cicatrização. Esses ácidos graxos insaturados atuam como mediadores pró-inflamatórios, estimulando a produção de fatores de crescimento, promovendo a fibroplasia e neovascularização, além de apresentar efeito bactericida^{40,51}. Além do mais, sua composição confere características únicas e valiosas de cristalização e derretimento, essenciais para utilização como biomaterial, com ponto de fusão próximo à 37°C⁵².

A procura de novas matérias-primas para o desenvolvimento e aprimoramento de biomateriais cada vez mais eficazes e biocompatíveis tem sido uma constante por parte dos pesquisadores. No entanto, a dificuldade de encontrar dados na literatura científica acerca da atividade biológica do pequi e potenciais toxicidades, reforça a necessidade de estudos a fim de estabelecer sua utilização segura⁵³.

REFERÊNCIAS

1. Oréfice RL, Pereira MM, Mansur MS. Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006:538.
2. Pires ALR, BIERHALZ ACK, MORAES AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. Quim. Nova. 2015;38(7):957-971.
3. Oliveira LSA, Oliveira CS, Machado APL, Rosa FP. Biomateriais como aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. R Ci Méd Biol. 2010; 9(1):37-44.
4. Pereira APV, Vasconcelos WL, Oréfice RL. Novos biomateriais: híbridos orgânicos-inorgânicos bioativos. Polímeros: Ciência e Tecnologia. 1999; 104-109.
5. Narayan RJ. The next generation of biomaterial development. Phil. Trans. R. Soc. A. 2016;368:1831-1837.
6. Dalapícula SS, Vidigal GM, Conz MB, Cardoso ES. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas: uma revisão crítica. Implant News. 2006, 3(5):487-491.
7. Santos GG, Marinho SMOC, Miguel FB. Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso. Rev Ciênc Méd Biol. 2013; 12(3):367-373.
8. Yaneva-Deliverska M, Deliversky J, Lyapina M. Biocompatibility of medical devices - legal regulations in the european union. J IMAB. 2015; 21(1):705-708.
9. Nyska A, Schiffenbauer YS, Brami CT, Maronpot RR, Ramot Y. Histopathology of biodegradable polymers: challenges in interpretation and the use of a novel compact MRI for biocompatibility. Polym Adv Technol. 2014; 24:461-467.
10. Williams DF. Definitions in biomaterials. Amsterdã: Elsevier, 1987:72.
11. Sehnem DP, Nenamor L, Jesus LS, Valentim RM, Souza ETG, Zambuzzi WF, Takamori ER. Métodos alternativos para avaliação da citotoxicidade de biomateriais. Revista Rede de Cuidados em Saúde. 2012; 6(2):1-12.

12. Kahn R, Kahn MH. Use of collagen as a biomaterial: na update. *J Indian Soc Periodontol.* 2013; 17:539-542.
13. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Ver Mater Res.* 2001; 31:81-110.
14. Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, Amling M. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials.* 2004; 25:3963-3972.
15. Park JB, Lakes RS. *Biomaterials science and engineering.* Nova Iorque: Springer, 2007:561.
16. Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: development of a novel biomaterials and applications. *Pediatric Research.* 2008; 63(5):492-496.
17. Tonhi E, Plepis AMG. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. *Química Nova.* 2002;25(6):943-948.
18. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens: structure, function and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Review.* 2003; 55:1531-1546.
19. Stamov DR, Pompe T. Structure and function of ECM-inspired composite collagen type I scaffolds. *Soft Matter.* 2012;8:10200-10212.
20. Disponível em: www.studyblue.com/notes/note/n/histology-of-connective-tissue-/deck/3549171. Acesso: 21/01/2015.
21. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics.* 2001; 221(1-2).
22. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2004; 71(2):343-354.
23. Gorgieva S, Kokol, V. Collagen – vs. gelatin-based biomaterials and their biocompatibility: review and perspectives. *Biomaterials Applications for Nanomedicine.* 2011; 17-53.

24. Bunyaratavej P, Wang H-L. Collagen membranes: a review. *J Periodontol.* 2001; 72(2):215-229.
25. Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-hansen E, Solheim E, Praetorius F. Guided tissue regeneration using degradable and nondegradable membranes in rabbits. *Clin Oral Implant Res.* 1993;4(4)172-6.
26. Paiva DL, Lampman GN, Kriz GS, Vyvyan KJ. *Introdução à Espectroscopia.* São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716p.
27. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.* 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012:506.
28. Marques J, Freitas JA, Costa MMM. *Materiais de construção. Reologia.* Curitiba: UFPR, 2007:32.
29. Freire IS. *Reologia escoamento e deformação da matéria.* Brasília: CDT/UnB, 2012:23.
30. Gabriel LP. *Caracterização de poliuretano a base de açaí formulado para construção de dispositivos biomédicos. [Dissertação].* Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1012. 108p.
31. Vulcani VAS. *Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona. [Dissertação].* São Carlos: Universidade de São Paulo, 2004. 77p.
32. Denari GB, Cavalheiro ETG. *Princípios e aplicações de análise térmica.* São Carlos: IQCS/USP, 2012:48.
33. Disponível em: www.ebah.com.br/content/ABAAABcBsAF/analise-termica-diferencial-dta-calorimetria-diferencial-varredura. Acesso: 07/12/2015.
34. Disponível em: www.chasqueweb.ufrgs.br. Acesso: 11/01/2016.
35. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research.* 2003;6(3):317-320.

36. Faria MHG, Pessoa CO, Moraes MO. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* e da toxicidade aguda *in vivo* de extratos da *Phyllanthus amarus*. Pesquisa Médica. 2004;2(7):26-29.
37. ISO 10993. Biological evaluation of medical devices. Part 6: Test for local effects after implantation, 2007.
38. Boaventura JMC, Roberto AR, Becci ACO, Ribeiro BCI, Oliveira MRB, MF Andrade. Importância da biocompatibilidade de novos materiais: revisão para o cimento de ionômero de vidro. Rev. Odontol. 2012; 24(1):42-50.
39. Paulo LF, Antunes A, Caetano MD, Schultz TN, Camacho DP, Consolaro RB. Inflamação: história, tipos e causas. Uningá Review. 2010;1:56-63.
40. Hatanaka E, Curi R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. Rev Bras Farm. 2007;88(2):53-58.
41. Cheville NF. Introdução à patologia veterinária. 3.ed. Brueri: Manole, 2009:462.
42. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. Arq Bras Cir Dig. 2007;20(1):51-58.
43. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. Seminars in Immunology. 2008;20:86-100.
44. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. RBCF. 2005;41(1):27-51.
45. Gordon S, Perry VH, Robinowitz S, Chung LP, Rosen H. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. J Cell Science. 1988; 9:1-26.
46. Vieira RF, Martins MVM. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. Ver Bras Pl Med. 2000;3(1):13-36.
47. Batista JS, Silva AE, Rodrigues CMF, Costa KMFM, Oliveira AF, Paiva ES, Nunes FVA, OLINDA RG. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. Arq. Inst. Biol., v.3, p.441-447, 2010.

48. Horn MM, Martins VCA, Plepis AMG. Development and rheological evaluation of chitosan:pequi oil gels. In: World Forum on Advanced Materials, 22. África do Sul, 2014.
49. Colombo NBR, Rangel MP, Martins V, Hage M, Gelain DP, Barbeiro DF, Grisolia CK, Parra ER, Capelozzi VL. *Caryocar brasiliense camb* protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(9):852-862.
50. Lima A, Silva AMO, Trindade RA, Torres RP, Mancini-Filho J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). *Rev Bras Frutic.* 2007;29(3):695-698.
51. Rogério JB, Santos MCS, Antoniassi R, Faria-Machado AF, Bizzo HR, Junqueira NTV. Variação da composição dos ácidos graxos dos óleos de polpa e amêndoa de pequi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, GORDURAS E BIODISEL, 8. Salvador, 2012. p.275-276.
52. Castanheira LS. Extração de óleo da polpa de pequi utilizando prensa mecânica. [Monografia] Universidade Católica de Goiás. Goiânia, 2005, 72p.
53. Almeida AC, Sobrinho EM, Pinho L, Souza PNS, Martins ER, Duarte ER, Santos HO, Brandi IV, Cangussu AS, Costa JPR. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Cienc Rural.* 2010; 39:1-4.

1 **CAPÍTULO 2 - Caracterização físico-química e avaliação da citotoxicidade *in vitro***
2 **de biomembrana a base de colágeno e óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb)**

3
4 Physicochemical characterization and *in vitro* cytotoxicity evaluation of the
5 biomembrane of collagen and pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb)
6

7 **RESUMO**

8 O colágeno tem sido utilizado como biomaterial em diversas preparações e formatos. O
9 óleo de pequi se mostra como uma alternativa promissora em virtude de seu potencial
10 como auxiliar na cicatrização, necessitando assim, investigações adicionais. Com base
11 nisso, preparou-se um biomaterial a partir de colágeno 1,1%, adicionado de gelatina 1%,
12 misturado com óleo de pequi, constituindo a membrana experimental. A membrana
13 controle consistiu em colágeno 1,1%, adicionado de gelatina 1%. Caracterizações
14 físico-químicas foram realizadas nos dois biomateriais, visando investigar possíveis
15 interferências ocasionadas pela adição do óleo de pequi. Análises termogravimétricas e
16 espectroscópicas mostraram que houve manutenção da hélice tripla do colágeno após a
17 adição do óleo de pequi. O ensaio reológico revelou que a presença do óleo de pequi
18 proporcionou, inicialmente, comportamento viscoso e, com aumento da frequência,
19 gelificação da mistura. Por meio da microscopia eletrônica de varredura verificou-se
20 presença de vesículas de tamanhos e formatos variados na membrana experimental. A
21 avaliação da biocompatibilidade *in vitro* por meio da análise colorimétrica de MTT
22 mostrou que a membrana experimental a 25% não se apresentou citotóxica à
23 fibroblastos da linhagem VERO de rim de macaco verde africano.

24 **Palavras-chave:** biomaterial, espectroscopia por infravermelho, microscopia eletrônica
25 por varredura, reologia.
26

27 **ABSTRACT**

28 Collagen has been used as a biomaterial in various preparations and formats. The pequi
29 oil appears as a promising alternative because of its potential as an aid in healing, thus
30 requiring additional investigations. The biomaterial was prepared from 1.1% collagen,
31 added 1% gelatin, mixed with pequi oil constituting the experimental membrane. The
32 membrane control consisted of 1.1% collagen, added 1% gelatin. Physical and chemical
33 characterizations were performed on both materials, in order to investigate possible

34 interference caused by the addition of pequi oil. Thermogravimetric analysis (TG and
35 DSC) and spectroscopic (IF-TR) showed maintenance of the triple helix of the collagen
36 after addition of pequi oil. The rheology test revealed that oil pequi provided, initially,
37 viscous behavior and, with increased frequency, gelling of the mixture. Under scanning
38 electron microscopy it was found the presence of vesicles in diferente sizes and formats
39 in the experimental membrane. The *in vitro* biocompatibility evaluation by colorimetric
40 MTT analysis showed that the experimental membranes 25% did not show cytotoxic to
41 fibroblasts from VERO line of African green monkey kidney.

42 **Key words:** biomaterial, infrared spectroscopy, electron microscopy scanning,
43 rheology.

44

45

INTRODUÇÃO

46 O termo biomaterial pode ser utilizado para toda substância de origem natural ou
47 sintética, destinada à aplicação na interface com sistemas biológicos para tratar,
48 aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função orgânica. Para tal, é importante
49 que o material seja biocompatível, provocando mínima reação tecidual ao organismo
50 hospedeiro. Nesse contexto, a pesquisa de novos materiais ou fontes de matéria-prima é
51 imprescindível para desenvolvimento e aprimoramento de biomateriais (Oréfice et al.,
52 2006; Oliveira et al., 2010).

53 O colágeno tem sido largamente utilizado como biomaterial devido a características
54 distintas, sendo a mais importante o modo de interação com os tecidos do organismo.
55 Isso está associado, principalmente, à baixa resposta imunológica, baixa toxicidade e
56 habilidade de promover o crescimento celular. O seu uso vem aumentando
57 consideravelmente como suporte biodegradável na área da engenharia de tecidos,
58 especialmente na forma de membrana (Lee *et al.*, 2001; Cen *et al.*, 2008; Khan e Khan,
59 2013).

60 O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), fruto do cerrado brasileiro, tem sido associado a
61 diversas propriedades medicinais, dentre essas, ação benéfica sobre a cicatrização,
62 estando esse fato relacionado ao alto teor de ácidos graxos. Essas substâncias atuam
63 como mediadores pró-inflamatórios, estimulando a produção de fatores de crescimento,
64 promovendo a fibroplasia e neovascularização no tecido. Acrescente-se ainda, que essa
65 composição confere propriedades valiosas de cristalização e derretimento, essenciais

66 para confecção de biomateriais (Hatanaka e Curi, 2007; Deus, 2008; Batista *et al.*, 2010;
67 Rogero *et al.*, 2012).

68 No planejamento e desenvolvimento de biomateriais é necessário que se conheça, além
69 da estrutura molecular, as características físico-químicas e biológicas do material a ser
70 utilizado, permitindo assim, prever o comportamento na interface implante e tecidos
71 adjacentes. Especificamente para polímeros naturais, como o colágeno, é interessante
72 avaliar o comportamento térmico, a fim de compreender os mecanismos envolvidos nas
73 alterações de massa, transições de fase, dentre outros aspectos, no intuito de demonstrar
74 condições ideais de obtenção, esterilização e aplicações nos tecidos. A espectroscopia,
75 também se apresenta como importante método de avaliação de um biomaterial, uma vez
76 que, por meio de absorção no infravermelho, é possível analisar o efeito da interação da
77 radiação eletromagnética com o material, fornecendo informações sobre a estrutura e
78 comportamento microscópico da matéria (Oréfice *et al.*, 2006; Paiva *et al.*, 2012
79 Silverstein *et al.*, 2012).

80 A microscopia eletrônica de varredura (MEV), também tem sido empregada em
81 diversos estudos científicos, permitindo avaliar morfológicamente a microestrutura
82 granular, além de oferecer diferentes percepções dos relevos superficiais e das
83 profundidades da imagem. Esta ferramenta, aliada à caracterização reológica, tem
84 possibilitado estabelecer correlação entre as observações macroscópicas, como
85 mudanças nas viscosidades, com a estrutura microscópica dos materiais estudados
86 (Marques Filho *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010).

87 A realização de testes *in vitro* corresponde à primeira fase de avaliação de
88 biocompatibilidade de biomateriais, permitindo analisar interações biológicas do
89 material com linhagens celulares específicas, sem a necessidade do uso de animais. Os
90 testes de citotoxicidade avaliam os efeitos tóxicos do biomaterial ocasionados,
91 principalmente, pela inibição de vias metabólicas, morte celular, alterações na
92 permeabilidade da membrana celular ou inibição enzimática (Rogero *et al.*, 2003;
93 Oréfice *et al.*, 2006; ISO 10993, 2007; Vulcani *et al.*, 2012).

94 Este estudo objetivou obter a membrana à base de colágeno e óleo de pequi e investigar
95 possíveis interferências ocasionadas pela adição do óleo de pequi por meio de testes de
96 caracterização físico-químicos. Adicionalmente, avaliou-se a biocompatibilidade *in*
97 *vitro* por meio do ensaio colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

98 difeniltetrazólio bromide] utilizando fibroblastos da linhagem VERO, provenientes de
99 rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

100

101

MATÉRIAL E MÉTODOS

102 A pesquisa foi realizada na Universidade Federal de Goiás (UFG) - Regional Jataí em
103 parceria com a Universidade de São Paulo (USP) - São Carlos. Todos os procedimentos
104 de experimentação foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de
105 Animais, Pró Reitoria de Pesquisa e Inovação da UFG (CEUA-PRPI-UFG), protocolo
106 nº 058/2014.

107 O preparo do biomaterial foi realizado no Laboratório de Biomateriais do Instituto de
108 Química de São Carlos - USP, São Carlos. O colágeno utilizado no preparo do
109 biomaterial foi obtido a partir de tendões de bovinos adultos, coletados em frigorífico
110 inspecionado. Estes foram lavados com solução salina 0,9% e água destilada e
111 colocados em solução alcalina, contendo sais e hidróxidos de metais alcalinos e
112 alcalinos terrosos, por 96 h a 25°C. Sequencialmente, foram colocados em solução
113 contendo sulfatos e cloretos de sódio, potássio e cálcio, durante seis horas, e lavados em
114 solução de ácido bórico (3%), água desionizada, seguida por solução de EDTA 0,3% e
115 água desionizada. O colágeno foi extraído com solução de ácido acético (pH 3,5)
116 (Goissis *et al.*, 1994; Lacerda *et al.*, 1998). A concentração de 1,1% foi determinada por
117 liofilização (modelo Dryer Modulyo, Edwards). Já o óleo da polpa de pequi foi obtido
118 da Comunidade da Central Cerrado no Estado de Minas Gerais e utilizado sem qualquer
119 processamento.

120 Com o intuito de melhorar a homogeneização da mistura do óleo de pequi à estrutura
121 fibrilar do colágeno, optou-se pelo emprego da gelatina 1%. Apesar de não se encontrar
122 na literatura científica consultada informações que respaldassem essa decisão, estudo
123 piloto realizado pelo referido laboratório, evidenciou facilidade em misturar os
124 componentes na presença dessa gelatina. A solução de gelatina 1% foi preparada
125 utilizando gelatina SIGMA®, tipo A, solubilizada em ácido acético (pH 3,5) sob
126 agitação por 30 min a 60°C. As membranas foram, então, preparadas a partir da mistura
127 colágeno/gelatina na proporção 1:1 com a adição de 0,5mL da solução X para cada 10g
128 da mistura, preparada de duas formas: X1 - 1,5mL de solução de ácido acético pH 3,5 +
129 1,5mL de acetona (membrana controle - MC); e X2 - 1,5mL de óleo de pequi + 1,5mL

130 de acetona (membrana experimental - MCOP). Após desaeração e *casting*, as
131 membranas foram neutralizadas e deixadas sob fluxo de ar por dez dias.

132 Os ensaios de reologia oscilatória dos géis foram efetuados em reômetro AR – 1000N
133 de deformação controlada com geometria cone placa de 20 mm 2°, com *gap* de 69 µm.
134 Os ensaios de oscilação foram feitos a 25°C, $\nu=1,0\text{Hz}$ e variação na tensão de oscilação
135 de 0,05 a 1000Pa, para determinação da região viscoelástica. Os módulos elástico (G') e
136 viscoso (G'') foram obtidos em função frequência angular de 0,1 a 100 rad/s, com
137 deformação de 0,5%. As medidas de fluxo foram feitas com variação na taxa de
138 cisalhamento entre 0,1 a 1000/s e $T = 25^\circ\text{C}$.

139 As curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram obtidas em
140 equipamento TA Instruments, modelo DSC 2010 calibrado com padrão de índio. A
141 razão de aquecimento foi de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, na faixa de aquecimento de 25 a 120°C , em
142 atmosfera de nitrogênio. Foram utilizadas massas de 20mg, em suportes herméticos de
143 alumínio. As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas utilizando amostras de
144 10mg, em atmosfera de ar sintético com variação de temperatura de 25 a 800°C e razão
145 de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ em equipamento TGA Q50 (TGA Instruments).

146 Para espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR), o óleo foi gotejado em
147 pastilha de silício e as amostras de MC e MCOP foram analisadas na forma de filmes
148 após diluição das emulsões em solução de ácido acético pH 3,5, na proporção de 1:2. A
149 análise foi feita em um intervalo entre 400 a 4000/cm, com 32 *scans* e resolução de
150 4/cm utilizando espectrofotômetro de FT-IR Shimadzu IR Affinity - 1.

151 As fotomicrografias foram obtidas em equipamento LEO 440 (LEO Electron
152 Microscopy Ltda), com detector Oxford (Oxford Instruments Inc.) com amostras de MC
153 e MCOP de 0,5x0,5cm, recobertas por camada de ouro, para se observar a morfologia
154 das membranas.

155 Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura Celular e
156 Fotossensibilizadores do Instituto de Química da USP, São Carlos. As membranas
157 foram cortadas com cerca de um centímetro quadrado de área superficial e esterilizadas
158 em óxido de etileno. Todas manipulações foram feitas em capela de fluxo laminar. Para
159 cada tipo de membrana (MC e MCOP) adicionou-se meio de cultura na proporção de
160 cinco membranas para cada mililitro de meio ISCOVE com 10% de soro fetal bovino
161 (SFB). Depois de submersas, as membranas foram deixadas em repouso, em estufa a
162 37°C , por 13 dias.

163 Para os ensaios *in vitro* utilizaram-se fibroblastos da linhagem celular VERO (ATCC
164 CCL-81), de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), cultivados em
165 garrafas de polipropileno contendo meio de cultura Dulbecco modificado por ISCOVE
166 suplementado com 10% de SFB e 0,1% v/v de antibióticos, penicilina 10.000 UI mL⁻¹ e
167 estreptomicina 10 mg mL⁻¹. Para determinação da viabilidade celular, utilizou-se o
168 método da contagem em câmara de Neubauer e o teste da exclusão do corante, obtendo-
169 se 95% de células viáveis (Freshney, 2010).

170 As células foram colocadas em placa de 96 poços contendo meio de cultura, na
171 concentração de 1×10^5 células mL⁻¹. Para isso, foram distribuídos 100µL da suspensão
172 celular por poços da placa de cultura estéril. Incubou-se por 24 h em estufa, a 37°C e
173 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi retirado por aspiração e adicionou-se
174 o extrato de cada amostra nas concentrações de 100%, 50% e 25%, em quadruplicata.
175 Além disso, para controle negativo e positivo de células, foi utilizado extrato preparado
176 com papel filtro esterilizado e extrato preparado com luvas de látex, respectivamente.
177 As placas foram, então, incubadas em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C. Após 24 h
178 removeram-se os extratos por aspiração e os poços foram lavados com 200µL de
179 tampão PBS. Em seguida, adicionou-se 200µL de meio aos poços e as placas foram
180 incubadas por 24 h em estufa, a 37 °C e 5% de CO₂. A seguir, foram acrescentados
181 50µL de solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] a
182 1mg mL⁻¹ e as placas foram novamente incubadas por três horas.

183 Após a incubação com MTT, o sobrenadante foi removido por aspiração e 50µL de
184 etanol P.A. foram adicionados para diluir os cristais formados. Em seguida, as células
185 foram tratadas com 150µL de uma solução de álcool isopropílico/PBS na proporção 1:1,
186 sendo as densidades óticas lidas em leitor de ELISA (Biotek, Synergy HT) a 570nm
187 para posterior determinação do índice de sobrevivência

188 Para os dados obtidos foram feitos os cálculos de desvio padrão e o utilizou-se o Teste
189 Q de Dixon com 95% de confiança para avaliar os possíveis pontos anômalos (Petrie e
190 Watson, 2009).

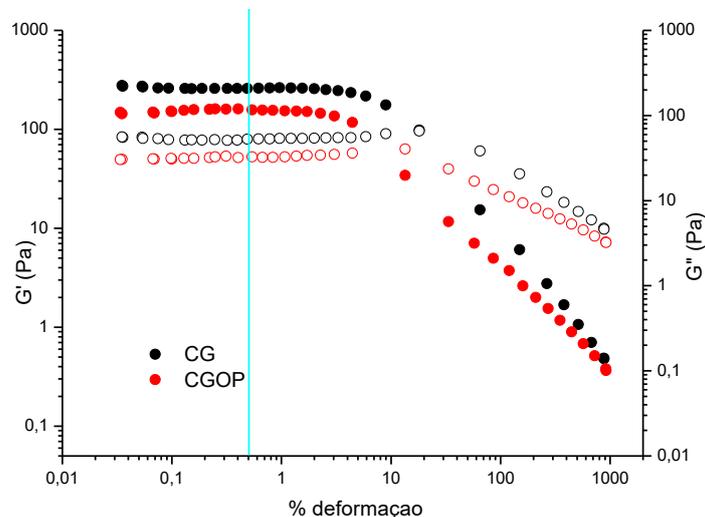
191

192

RESULTADOS E DISCUSSÃO

193 Para os ensaios reológicos das misturas foi, primeiramente, determinada a região
194 viscoelástica pela varredura dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da

195 porcentagem de deformação (Figura 1), sendo determinado dentro da região linear o
 196 valor de deformação de 0,5%, que foi utilizado para a medida de variação de frequência.
 197



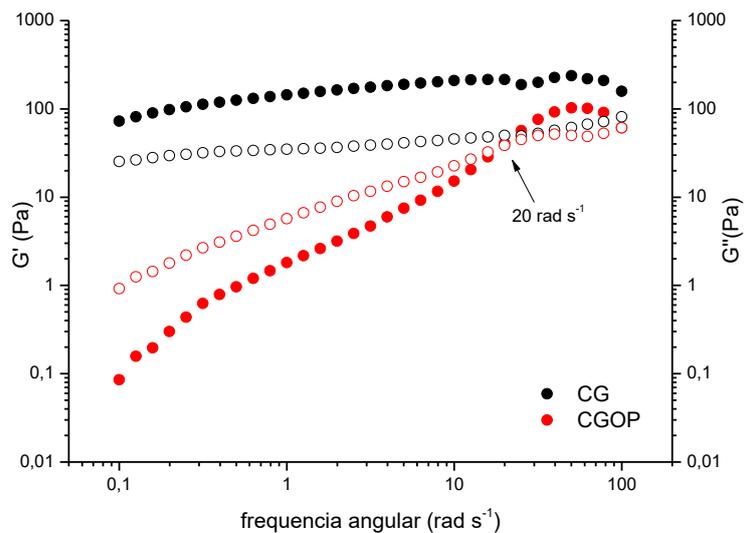
198

199 Figura 1. Módulos G' e G'' em função da deformação para MC e MCOP

200

201 A Figura 2 mostra G' e G'' em função da frequência, na temperatura de 25°C, para as
 202 misturas. Pode-se observar que ambos os módulos aumentaram com o aumento da
 203 frequência. Para a MC tem-se $G' > G''$ em toda a varredura de frequência estudada.
 204 Para a MCOP tem-se inicialmente $G'' > G'$, indicando um comportamento viscoso, mas
 205 com o aumento de frequência observou-se inversão dos módulos, indicando uma
 206 gelificação da mistura, que ocorreu em $\omega=20,0$ rad/s. Em trabalho similar, em que foi
 207 utilizado colágeno obtido em tempo de tratamento alcalino menor (72h) e concentração
 208 de óleo menor, obteve-se um ponto de gelificação em $\omega=10$ rad/s para amostras de
 209 colágeno e óleo de pequi (Fernandes *et al.*, 2013). Portanto, pode-se observar que no
 210 presente trabalho tem-se maior efeito do óleo no sistema colágeno/gelatina.

211



212

213 Figura 2. Módulos G' e G'' em função da frequência angular para MC e MCOP

214

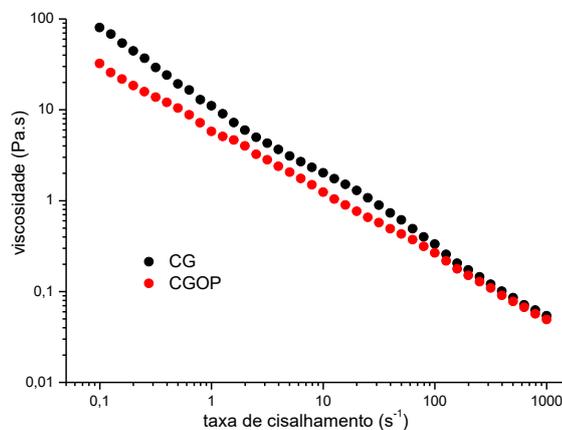
215 As misturas foram caracterizadas por ensaios de fluxo, como mostrado na Figura 3.

216 Observou-se que ambas misturas apresentam comportamento pseudoplástico com

217 viscosidades menores para MCOP, ou seja, o óleo de pequi diminui a viscosidade do

218 material. Contudo, a taxas de cisalhamento superiores a 160/s não se observou mais o

219 efeito do óleo.



220

221 Figura 3. Efeito da taxa de cisalhamento em função da viscosidade para MC (preto) e MCOP (vermelho)

222

223 As curvas DSC (Figura 4) permitiram determinar a temperatura de desnaturação (T_d) do

224 colágeno presente nos filmes. Por meio dessa análise foi possível medir a estabilidade

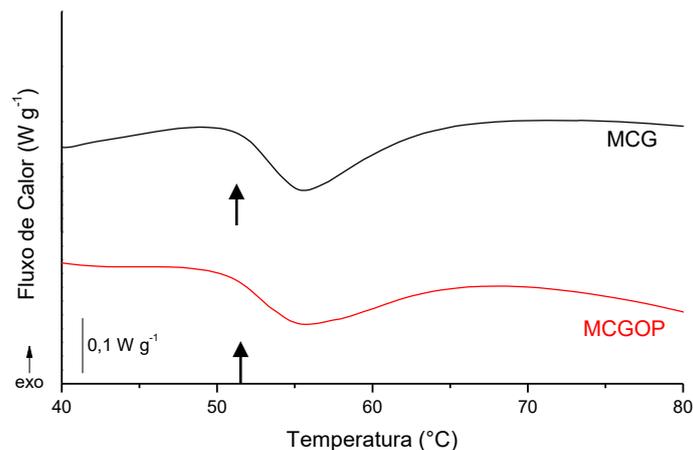
225 da hélice tripla do colágeno, relativas à sua transição para gelatina que, no gráfico,

226 aparece de forma descontínua na linha base, sendo proporcional à diferença na

227 capacidade de calor antes e após a desnaturação. Os valores encontrados foram

228 próximos ao referencial de desnaturação do colágeno, correspondendo a 53,2 e 53,0°C

229 para MC e MCOP, respectivamente. Dessa forma, a presença do óleo de pequi não
 230 modifica a estrutura de hélice tripla do colágeno, fator imprescindível para manutenção
 231 de suas características físicas e biológicas (E'gues *et al.*, 2008; Vulcani *et al.*, 2008).



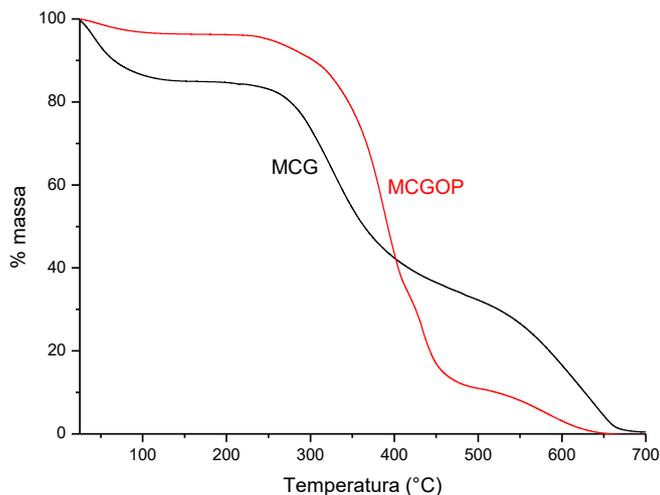
232

233 Figura 4. Curvas DSC para MC e MCOP. Observa-se que a desnaturalização do colágeno ocorreu por volta
 234 de 53°C para as duas membranas submetidas ao teste (setas)

235

236 As curvas TG (Figura 5) apresentaram perda de massa ocorrendo em três etapas: o
 237 primeiro refere-se à água presente (25-200°C), o segundo, à degradação térmica das
 238 cadeias poliméricas (200-500°C) e o terceiro, (500-700°C), a carbonização do material
 239 degradado. Esses resultados são similares aos encontrados por outros pesquisadores
 240 (Tonhi e Plepis, 2002; Gil, 2013). Dessa forma é possível observar que a adição de óleo
 241 de pequi não alterou a estabilidade térmica do colágeno. A maior diferença observada
 242 foi em relação ao conteúdo de água presente nas membranas. A MCOP apresentou 3,7%
 243 de água presente, enquanto a MC, 15%. Isso, possivelmente, pode ser explicado pelo
 244 caráter hidrofóbico apresentado por substâncias oleosas, incluindo o óleo de pequi,
 245 conforme descrição de McMurry (2011). Assim, pode-se inferir que a adição de óleo de
 246 pequi tenha desfavorecido a absorção de moléculas de água pelo biomaterial, quando
 247 em comparação à MC.

248

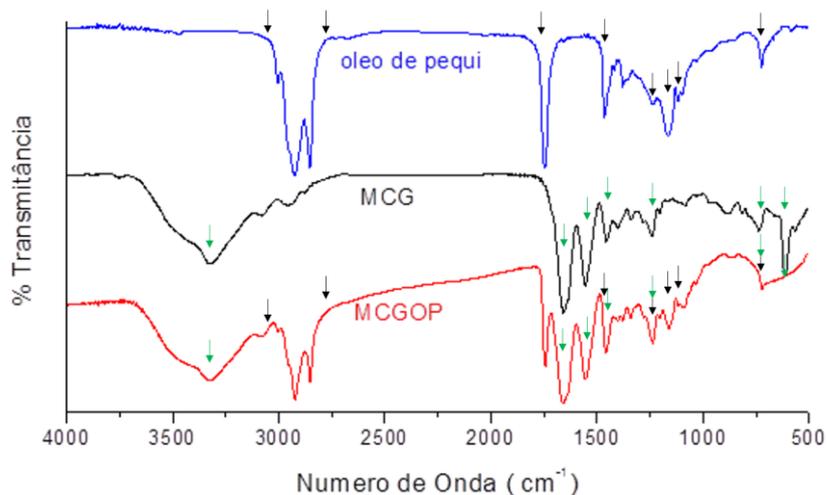


249

250 Figura 5. Gráfico das curvas termogravimétricas para MC e MCOP. Observa-se perda de massa em três
 251 etapas, sendo o primeiro de 25 a 200°C, o segundo, de 200 a 500°C e o terceiro de 500 a 700°C para as
 252 duas membranas testadas.

253

254 O espectro no infravermelho (Figura 6) do óleo de pequi mostrou, com base nas
 255 descrições de Barbosa (2007), bandas na região de aproximadamente 3020 a 2780 cm^{-1} ,
 256 referentes à ligação C-H de alcanos. A banda em 1743 cm^{-1} é referente ao estiramento
 257 do grupo carbonila (C=O), característico dos ésteres. As vibrações da ligação C-O em
 258 1238, 1163 e 1116 cm^{-1} são diagnósticos para a ligação éster no triacilglicerol. As
 259 bandas em 1464 e 721 cm^{-1} são referentes à deformação angular da ligação C-H
 260 simétrica e assimétrica, respectivamente.



261

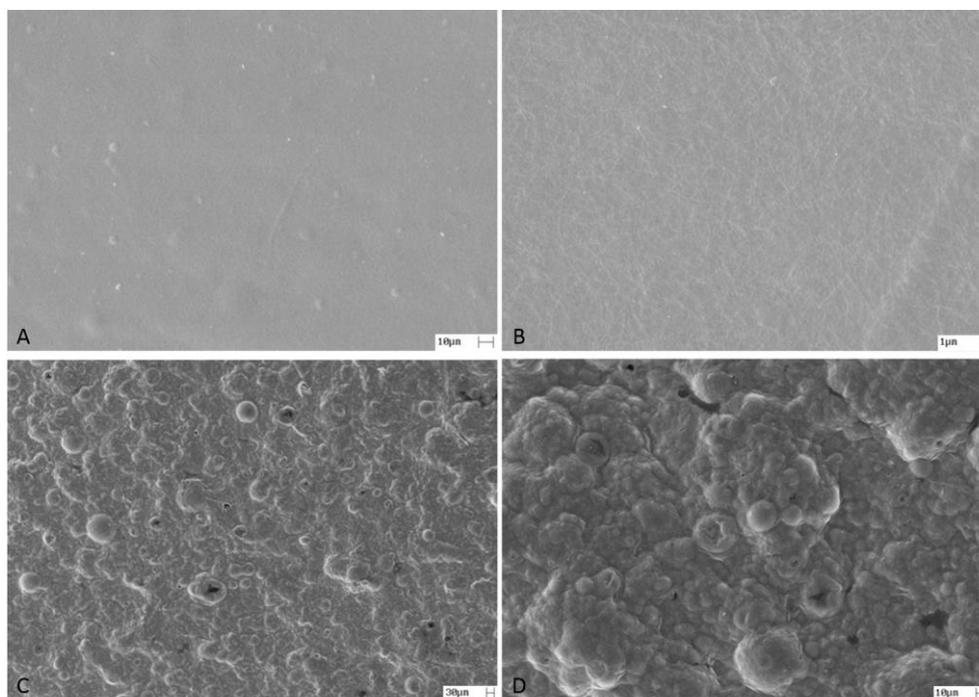
262 Figura 6. Espectros na região do infravermelho para óleo de pequi (linha azul), MC (linha preta) e MCOP
 263 (linha vermelha). As setas pretas na linha azul apontam as bandas correspondentes aos grupamentos
 264 químicos do óleo de pequi, enquanto as setas verdes na linha preta apontam para os grupamentos
 265 químicos da MC. As setas, pretas e verdes, na linha vermelha, indicam as bandas correspondentes a cada
 266 material, sem deslocamentos

267 No espectro no infravermelho da MC observou-se uma banda larga próxima a 3325 cm^{-1}
268 1 devido ao estiramento O-H. Já em 1659 cm^{-1} , a banda típica de amida I se deu em
269 virtude ao estiramento da carbonila. As vibrações no plano da ligação N-H provocaram
270 a formação de banda em 1556 cm^{-1} , relacionada à amida II. O estiramento C-N em 1454
271 cm^{-1} ocorreu de forma correspondente a estereoquímica dos anéis pirrolidínicos. Em
272 1242 cm^{-1} , observou-se estiramento de C-N e deformação de N-H, correspondente às
273 vibrações no plano da amida III. As bandas em 738 e 611 cm^{-1} são referentes a
274 deformação angular da ligação N-H (Figura 6). Esses resultados corroboram com os
275 achados de Tonhi e Plepis (2002) que trabalharam com membranas que apresentavam
276 colágeno em sua composição.

277 Para a MCOP, o espectro no infravermelho mostrou bandas características de cada
278 material, sem deslocamentos (Figura 6), indicando que não ocorreu interação entre o
279 óleo e as cadeias poliméricas do colágeno.

280 As fotomicrografias por MEV mostraram uma estrutura lisa, contínua para MC (Figura
281 7A e B). A presença de óleo causou formação de vesículas com tamanhos variados e
282 contornos muitas vezes não definidos (Figura 7C e 7D).

283



284
285
286
287

Figura 7. Fotomicrografias por MEV para as membranas de MC (A e B) e MCOP (C e D) em diferentes aumentos

288 O ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi utilizado como avaliação inicial do índice de
 289 sobrevivência das células após tratamento com os extratos das MC e MCOP a fim de
 290 detectar possível efeito citotóxico no sistema biológico. A determinação da viabilidade
 291 celular foi realizada segundo o método do MTT, o qual se baseia na capacidade das
 292 células viáveis de reduzir o anel tetrazólico presente no sal de MTT. Isso ocorre devido
 293 à ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa dessas células. Essas
 294 enzimas, ao reduzirem o anel tetrazólico, formam cristais de coloração roxa, que
 295 permite a quantificação das células viáveis (Mosmann, 1983).

296 O índice de sobrevivência celular de cada membrana analisada para a linhagem VERO
 297 pode ser visualizado na Tab. 1.

298
 299 Tabela 1. Índice de sobrevivência celular da linhagem VERO para cada amostra de
 300 membrana nas três diferentes concentrações

Amostra	Concentração (%)*	Média das Absorbâncias \pm dp ^A	IS ^B (%)
Controle	-	0,711 \pm 0,051	100
MC	100	0,7437 \pm 0,1300	105
	50	0,6970 \pm 0,0852	98
	25	0,7367 \pm 0,0710	104
MCOP	100	0,1175 \pm 0,0347	16
	50	0,1632 \pm 0,0187	23
	25	0,6177 \pm 0,0503	87

301 A - Desvio padrão, B - Índice de Sobrevivência. *porcentagens estão relacionadas ao extrato
 302 obtido na proporção de cinco membranas de 1 cm² mL⁻¹ de meio

303

304 Os resultados de índice de sobrevivência (IS) obtidos para a linhagem VERO
 305 foram todos acima de 98% para MC, indicando ausência efeito citotóxico. Contudo,
 306 para MCOP 100% e MCOP 50%, os valores inferiores a 60% indicaram alta
 307 citotoxicidade. Entretanto, para MCOP 25% o valor de 87% para IS sugere baixa
 308 citotoxicidade de acordo com Lönnroth (2005). No presente trabalho, a citotoxicidade
 309 foi realizada com óleo de pequi na estrutura de uma membrana, cujos resultados
 310 demonstraram que concentrações de óleo inferiores a 25% da concentração proposta
 311 inicialmente não apresentaram citotoxicidade. Apesar da escassez de dados acerca da
 312 citotoxicidade do óleo de pequi na literatura científica, estudos realizado por Ferreira *et*
 313 *al.*, (2011) utilizando o método de Meyer, apontou que o óleo de pequi apresenta
 314 citotoxicidade quando em concentrações superiores à 827,67 \pm 4,67 μ g/mL de meio de

315 *Artemia nauplii*. Ressalte-se a importância de investigações futuras a fim de esclarecer o
316 comportamento desse óleo *in vitro*.

317

318 **CONCLUSÕES**

319 As análises físico-químicas permitiram verificar que a adição do óleo de polpa de pequi
320 não interferiu no arranjo estrutural da hélice tripla do colágeno, fator fundamental para
321 manutenção das propriedades físicas e biológicas.

322 O teste de biocompatibilidade *in vitro* mostrou que a MCOP 25% não é citotóxico aos
323 fibroblastos da linhagem VERO de rim de macaco verde africano, *Cercopithecus*
324 *aethiops*. Apesar de mais estudos *in vitro* serem necessários, é sugestivo que esse
325 biomaterial possa ser utilizado *in vivo*.

326

327 **REFERÊNCIAS**

328 BARBOSA, L.C.A. Espectroscopia no infravermelho. Viçosa: UFV, 2007. 189p.

329 BATISTA, J.S.; SILVA, A.E.; RODRIGUES, C.M.F.; COSTA, K.M.F.M.;
330 OLIVEIRA, A.F.; PAIVA, E.S.; NUNES, F.V.A.; OLINDA, R.G. Avaliação da
331 atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas
332 cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. Arq. Inst. Biol., v.3, p.441-447,2010.

333 CEN, L.; LIU, W.; CUI, L. et al. Collagen tissue engineering: development of a novel
334 biomaterials and applications. Pediatric Research, v.63, a.5, p.492-496, 2008.

335 E'GUES, M.A.M.; PAULA, M.; GOISSIS, G. Compósito de colágeno com silicato e
336 hidroxiapatita como material para endodontia: preparação e caracterização. Ver Odonto
337 Ciênc., v.23, n.2, p.134-140, 2008.

338 FERNANDES, Y.O.M.; MARTINS, V.C.A.; VULCANI, V.A.S., PLEPIS, A.M.G.
339 Comportamento reológico de misturas de colágeno:gelatina: óleo de pequi. In:
340 Congresso Brasileiro de Polímeros, 12., 2013, Florianópolis. Anais... Florianópolis:
341 CBPol, 2013.

342 FERREIRA, B.S.; ALMEIDA, C.G.; FAZA, L.P.; ALMEIRA, A.; DINIZ, C.G.;
343 SILVA, V.L.; GRAZUL, R.M.; LE HYARIC, M. Comparative properties of

- 344 Amazonian oils obtained by different extraction methods. *Molecules*, v.16. p. 5875-
345 5885, 2011.
- 346 FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized*
347 *applications*. 6.ed. New York: Wiley BlackWell, 2010. 796p.
- 348 GIL, A.S.B. *Materiais a base de colágeno com capacidade de autorreparo*. 2013. 91f.
349 *Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) Universidade Federal de*
350 *Minas Gerais, Belo Horizonte*.
- 351 GOISSIS, G.; PLEPIS, A.M.G.; ROCHA, J.L. *Processo de extração de colágeno de*
352 *tecidos animais com auxílio de solventes orgânicos e meio alcalino*. Patente BR PI
353 9.405.043-0, 1994.
- 354 HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. *Rev Bras*
355 *Farm.*, v.88, a.2, p.53-58, 2007.
- 356 ISO 10993. *Biological evaluation of medical devices. Part 6: Test for local effects after*
357 *implantation*, 2007.
- 358 KAHN, R.; KAHN, M.H. Use of collagen as a biomaterial: na update. *J Indian Soc*
359 *Periodontol*, v.17, p.539-542, 2013.
- 360 LACERDA, C.; PLEPIS, A.M.G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de
361 resíduos de Asparagina e Glutamina em colágeno: preparação e caracterização de
362 matrizes aniônicas para uso como biomateriais. *Química Nova*, v.21, p.267-271, 1998.
- 363 LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *International*
364 *Journal of Pharmaceutics*, v.221, p.1-22, 2001.
- 365 LÖNNROTH, E.C. Toxicity of Medical Glove Materials: A Pilot Study. *International*
366 *Journal of Occupational Safety and Ergonomics (JOSE)*, v.11, n.2, p.131–139, 2005.
- 367 MARQUES, J. FREITAS, J.A.; COSTA, M.M.M. *Materiais de construção. Reologia*.
368 *Curitiba: UFPR*, 2007. 32p.
- 369 MCMURRY, J. *Química orgânica*. 7.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 549p.

- 370 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application
371 to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v.65, p.55-
372 63, 1983.
- 373 OLIVEIRA, L.S.A.; OLIVEIRA, C.S.; MACHADO, A.P.L.; ROSA, F.P. Biomateriais
374 como aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. *R Ci
375 Méd Biol.*, v.9, a.1, p.37-44, 2010.
- 376 ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, M.S. Biomateriais: fundamentos e
377 aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538p.
- 378 PAIVA, D.L.; LAMPMAN, G.N.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, K.J. Introdução à
379 Espectroscopia. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716p.
- 380 PETRIE, A.; WATSON, P. Estatística em ciência animal e veterinária. 2.ed. São Paulo:
381 Roca, 2009. 248p.
- 382 ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de
383 citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v.6,
384 a.3, p.317-320, 2003.
- 385 SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J.; Identificação Espectrométrica
386 de Compostos Orgânicos. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 506p.
- 387 TONHI, E.; PLEPIS, A.M.G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-
388 quitosana. *Quím. Nova*, v.25, n.6, p.943-948, 2002.
- 389 VULCANI, V.A.S.; BIZARRIAB, M.T.T.; D'ÁVILAC, M.A. et al. Cytotoxicity Tests
390 for Nanostructured Chitosan/PEO Membranes Using the Agar Diffusion Method.
391 *Material Research*, v.15, n.2, p.213-217, 2012.
- 392 VULCANI, V.A.S.; MACORIS, D.G.; PLEPIS, A.M.G. et al. Obtenção, caracterização
393 e aplicação cirúrgica de matrizes de colágeno na parede abdominal de equinos. *Ciência
394 Animal Brasileira*, v.9, n.3, p.778-785, 2008.
- 395

1 **CAPÍTULO 3 - Biocompatibilidade *in vivo* de biomembrana a base de colágeno e**
2 **óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**

3
4 *In vivo* biocompatibility of composite of collagen and pequi oil
5 (*Caryocar brasiliense* Camb.)

6
7
8 **RESUMO**

9 Lesões teciduais, ocasionadas por traumas ou enfermidades, necessitam de tratamento
10 que auxilie a reparação, substituição ou regeneração. Dessa forma, o desenvolvimento
11 de biomateriais tem sido alvo de pesquisas científicas. A biocompatibilidade já
12 conhecida do colágeno torna-o um dos materiais mais utilizados como arcabouço
13 tecidual. O óleo de pequi tem se mostrado favorável a cicatrização de feridas e, dessa
14 forma, investigações adicionais são necessárias. O biomaterial a base de colágeno 1,1%,
15 adicionado de gelatina 1%, e óleo de pequi, foi avaliado em comparação a membrana
16 controle, que consistiu em colágeno 1,1%, adicionado de gelatina 1%, sem adição de
17 óleo. Ambas membranas foram implantadas em subcutâneo de ratos e avaliadas por
18 histopatologia após retirada aos três, sete, 14, 21, 28 e 35 dias. Observou-se que a
19 presença de óleo de pequi reduziu a quantidade de células gigantes do tipo corpo
20 estranho e favoreceu o recrutamento de fibroblastos, promovendo, dessa forma, maior
21 produção de colágeno quando em comparação a membrana controle. Portanto, pode-se
22 concluir que a adição de óleo de pequi ao colágeno melhorou a biocompatibilidade do
23 colágeno e acelerou o processo cicatricial.

24 **Palavras-chave:** cicatrização, cirurgia, inflamação, materiais biocompatíveis

25
26 **ABSTRACT**

27 Tissue injury, caused by trauma or disease, needs treatments which help repair,
28 replacement or regeneration. Thus, the development of biomaterials has been the subject
29 of scientific research. The biocompatibility of collagen is already known and makes it
30 one of the most used materials as scaffold for tissue growth. Pequi oil has been shown
31 favorable characteristics for wounds healing and, thus, further investigations are
32 required. The biomaterial of collagen 1.1%, added gelatina 1%, and pequi oil was
33 evaluated in comparison to the control membrane, which consisted of 1.1% collagen,

34 added 1% gelatin without adding oil. Both membranes were implanted in rat
35 subcutaneous tissue and evaluated by histopathology after removing fragments thru
36 biopsy at three, seven, 14, 21, 28 and 35 days. It was observed that the presence of
37 pequi oil reduced the amount of foreign-body giant cell and favored the recruitment of
38 fibroblasts, promoting thereby greater production of collagen membrane as compared to
39 the control membrane. Therefore, it can be concluded that the addition of pequi oil
40 improved the biocompatibility of collagen and accelerated the healing process.

41 **Key-words:** healing, surgery, inflammation, biocompatible materials

42

43

INTRODUÇÃO

44 Lesões teciduais ocasionadas por traumas ou enfermidades podem levar a fragilidade e
45 degeneração de tecidos de humanos e animais, necessitando de tratamentos que
46 auxiliam a reparação, substituição ou regeneração. Apesar dos resultados promissores, a
47 utilização de enxertos autólogos ou transplante de tecidos ainda apresenta fatores
48 indesejáveis, como alto custo, consistir em procedimento doloroso, apresentar restrição
49 por limitações anatômicas e possibilidade de transmissão de enfermidades, o que
50 desfavorece seu uso em diversas ocasiões. Neste sentido, o uso de biomateriais, com
51 finalidade reparatória direta ou indireta, tem se apresentado como alternativa viável e
52 alvo de investigações científicas. Visto isso, a engenharia de tecidos propende o
53 desenvolvimento e aprimoramento de substitutos biológicos, além da pesquisa por
54 novas matérias-primas, a fim de otimizar seu uso em tecidos vivos de forma
55 biocompatível, mantendo ou melhorando a função do tecido (O'Brein, 2011; Pires *et al.*,
56 2015).

57 O colágeno tem sido amplamente empregado no preparo de biomateriais, como
58 arcabouço para crescimento tecidual e sistemas de liberação de fármacos (Cen *et al.*,
59 2008; Khan & Khan, 2013). Isto se deve ao fato do colágeno apresentar características
60 desejáveis como biocompatibilidade, biodegradabilidade controlável, flexibilidade,
61 capacidade de absorver fluídos orgânicos, indução de hemostasia e auxiliar no processo
62 de cicatrização. As principais aplicações têm sido feitas em feridas cutâneas e
63 preenchimento ósseo (Bunyaratavej & Wang, 2001; Ferreira *et al.*, 2012; Khan & Khan,
64 2013).

65 O óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) tem sido utilizado em diversas
66 aplicações biomédicas, principalmente como auxiliar de cicatrização. Seu uso para

67 tratamento de queimaduras cutâneas, sua ação antifúngica e anti-inflamatória tem
68 despertado interesse de pesquisadores. É sabido que a presença de altos teores de ácidos
69 graxos insaturados, como oleico e palmítico, favorece o processo cicatricial de feridas,
70 visto que atuam como mediadores pró-inflamatórios, estimulam a produção de fatores
71 de crescimento e promovem fibroplasia e angiogênese no tecido (Hatanaka & Curi,
72 2007; Batista *et al.*, 2010).

73 O objetivo desse trabalho consistiu em avaliar a biocompatibilidade *in vivo* do
74 biomaterial a base de colágeno e óleo de pequi implantado em subcutâneo de ratos por
75 meio de avaliações histopatológicas da interface formada entre material e tecido
76 hospedeiro.

77

78

MATERIAL E MÉTODOS

79 A preparação do biomaterial foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais
80 do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, Campus São
81 Carlos. Para obtenção da membrana, utilizou-se colágeno a 1,1% obtido a partir de
82 tendões bovinos adultos, coletados durante abate em frigorífico inspecionado, e tratados
83 em solução alcalina, segundo metodologia preconizada por Goissis *et al.* (1994). O óleo
84 da polpa de pequi foi obtido da Comunidade da Central Cerrado no Estado de Minas
85 Gerais e utilizado sem qualquer processamento.

86 Inicialmente, o colágeno foi misturado à gelatina 1% (SIGMA[®], tipo A) na proporção
87 1:1, para compor a mistura base. Em seguida, para preparar a membrana experimental
88 (MCOP), adicionou-se óleo da polpa de pequi, na quantidade de 0,127g de óleo de
89 pequi para cada grama da mistura colágeno e gelatina, obtendo-se a concentração final
90 igual a 12,7%. Preparou-se, obedecendo a mesma técnica, a membrana controle (MC),
91 no entanto, sem adição de óleo de pequi, consistindo apenas na mistura de colágeno e
92 gelatina. As membranas foram neutralizadas, desaeradas e secadas em estufa.
93 Posteriormente foram retiradas dos moldes e cortadas nas dimensões de um centímetro
94 quadrado, embaladas individualmente e esterilizadas em óxido de etileno.

95 Para avaliação da biocompatibilidade *in vivo* foram utilizados 30 ratos (*Rattus*
96 *novergicus albinus* Wistar), machos, adultos, sadios ao exame clínico, pesando entre
97 200 e 300g, com aproximadamente 90 dias de idade, oriundos do Biotério Central da
98 Universidade Federal de Goiás. Os animais foram alocados em caixas-gaiolas e
99 mantidos em sala climatizada, sob temperatura de 23°C, com ciclo claro/escuro de 12

100 horas. A alimentação foi a base de dieta sólida, específica para ratos, e fornecimento de
101 água à vontade (CONCEA, 2013). Todos os procedimentos de experimentação *in vivo*
102 foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, Pró Reitoria
103 de Pesquisa e Inovação da UFG (CEUA-PRPI-UFG), protocolo nº 058/2014.

104 Após o período de adaptação de sete dias, os animais foram divididos aleatoriamente em
105 seis grupos homogêneos para receber os implantes, cuja retirada ocorreu aos três, sete,
106 14, 21, 28, 35 dias após a implantação.

107 Para os procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos a anestesia dissociativa
108 por meio da injeção intraperitoneal de cloridrato de xilazina a 2% na dose de 8mg/kg
109 associada à cloridrato de cetamina a 5% na dose de 60mg/kg. Após tricotomia e
110 antissepsia da região dorsal do animal, foram feitas duas incisões no sentido
111 craniocaudal, de aproximadamente um centímetro e com um centímetro de distância
112 entre as mesmas, objetivando diminuir a interferência sobre a resposta inflamatória na
113 região intermediária. O tecido subcutâneo foi divulsionado com auxílio de tesoura
114 romba para criação de um túnel para inserção dos implantes. Em cada animal
115 implantou-se uma membrana MCOP e uma membrana MC. A dermorrafia foi realizada
116 com ponto simples com fio de poliamida 3-0 e os pontos retirados aos sete dias após
117 implantação.

118 No pós-operatório, instituiu-se antibioticoterapia com 5mg/kg de enrofloxacino 10%,
119 administrado por via subcutânea, SID, por um período de cinco dias. Para analgesia foi
120 preconizada a administração de 100mg/kg de dipirona sódica, por via subcutânea, SID,
121 iniciando imediatamente após a realização do procedimento cirúrgico e perdurando por
122 três dias consecutivos. Os curativos locais foram realizados diariamente com álcool
123 etílico 70% até a cicatrização clínica da ferida. Os animais foram avaliados diariamente,
124 verificando-se consumo de alimento e água e possíveis alterações de comportamento.

125 Para a retirada dos implantes, os animais foram submetidos à eutanásia utilizando-se de
126 anestesia inalatória com isoflurano na maior concentração possível, com auxílio de
127 caixa de indução e vaporizador artesanal conforme descrito por Miranda *et al.* (2011).
128 Após alcançado plano anestésico seguro, os animais foram sujeitos à hipovolemia
129 mediante exsanguinação por punção cardíaca, além de deslocamento cervical,
130 certificando inconsciência e morte (CONCEA, 2013).

131 Durante a retirada do biomaterial, analisou-se a dificuldade de dissecação, com base na
132 aderência tecidual sobre o implante seguindo a classificação: aderência mínima (+),

133 quando a liberação da amostra dos tecidos adjacentes era possível por dissecação romba
134 delicada; aderência moderada (++), quando a liberação da amostra dos tecidos
135 adjacentes era possível por dissecação romba grosseira; aderência máxima (+++),
136 quando era impossível a liberação por dissecação romba (Vulcani, 2008).

137 Os fragmentos contendo o biomaterial e tecido adjacente foram acondicionados em
138 frasco individuais, previamente identificados, contendo solução de formalina na
139 concentração de 10%, tamponada em fosfato (pH 7,2), e encaminhados ao Laboratório
140 de Patologia da Escola de Odontologia e Farmácia da Universidade Federal de Goiás
141 para o processamento e confecção de lâminas permanentes, segundo metodologia de
142 Masson (1956).

143 Realizou-se o processo de corte com cinco micrômetros de espessura, seguida pela
144 coloração com hematoxilina e eosina (HE) e picrossirius. Posteriormente, as análises dos
145 cortes histológicos foram realizadas em fotomicroscópio óptico de luz comum Leica
146 DM 750, 103 com câmera digital ICC50 (HD-521420221). Para a captura e
147 padronização da análise dos cortes histológicos corados em HE adotou-se como critério
148 a seleção de cinco áreas de cada amostra, utilizando objetiva de 40x. A contagem das
149 células inflamatórias presentes na região de interface foi realizada utilizando Software
150 ImageJ[®], por um único observador. Foram contadas todas as células encontradas no
151 campo, sendo contabilizados isoladamente neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células
152 espumosas, células gigantes, fibroblastos, linfócitos e neovasos. Para mensuração da
153 área total de colágeno produzido, as imagens foram capturadas a partir das lâminas
154 coradas com Picrossirius em microscópio de luz polarizada, acoplado em câmera
155 digital. Com auxílio do Software ImageJ[®] foi medida a área através da seleção de
156 tonalidades birrefringentes correspondentes às bandas de colágeno, não sendo
157 diferenciado entre tipo I e II. Os resultados obtidos em ambas análises foram tratados no
158 Software Sigmastat 3.5[®] pelos testes de Dunnett ($P>0,01$) e teste de Holm-Sidak
159 ($P=0,5$).

160

161

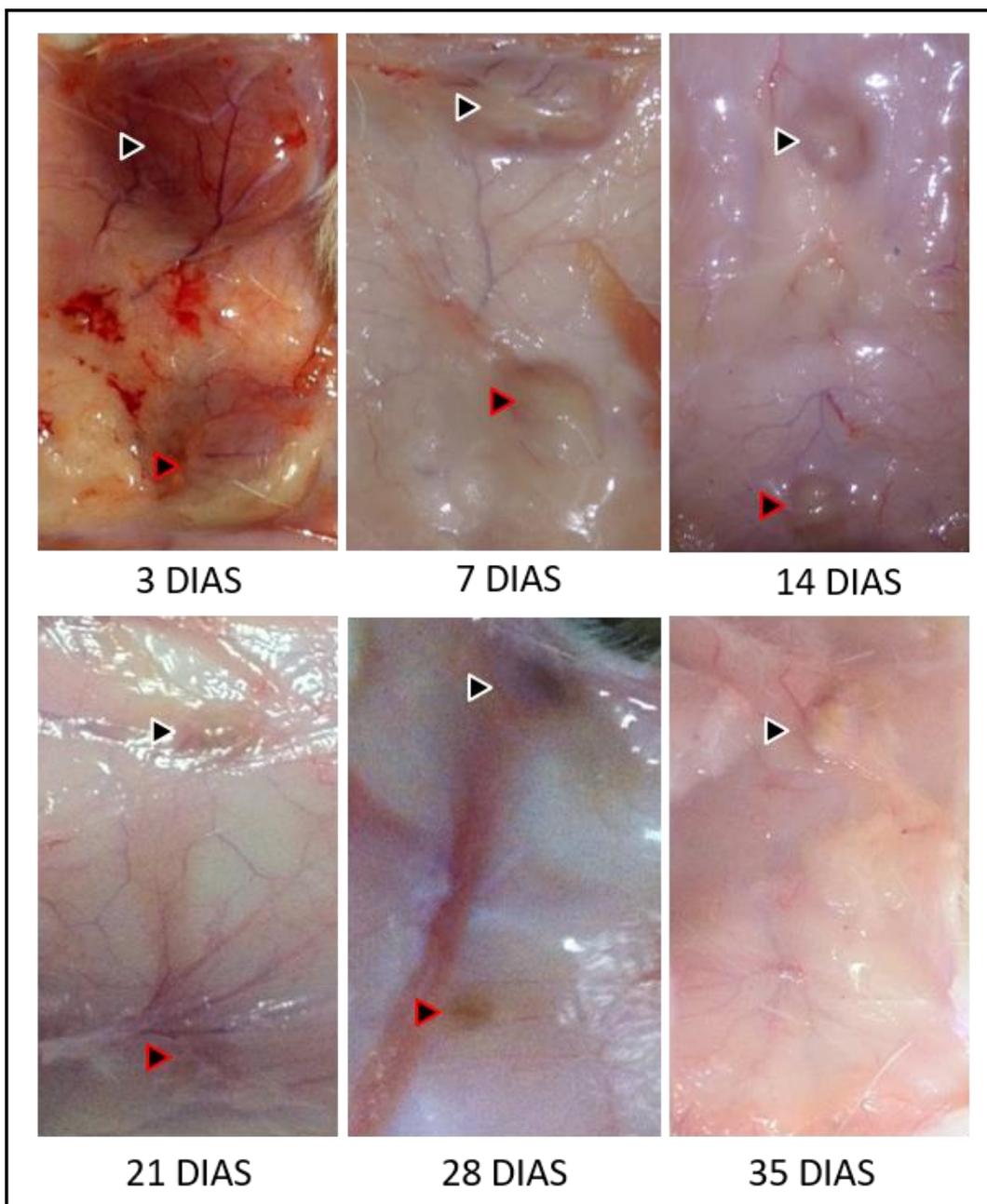
RESULTADOS E DISCUSSÃO

162 Durante o trans-cirúrgico, notou-se que a MCOP se apresentava mais maleável em
163 comparação a MC, cuja implantação tornou-se mais laboriosa, visto que fragmentava ou
164 dobrava com facilidade. Outros pesquisadores também ressaltam a importância da
165 facilidade de manipulação de biomateriais no transcirúrgico e preconizam o uso de

166 materiais com boa deformabilidade, de forma a se adaptar às diferentes superfícies de
167 implantação (Rabelo *et al.*, 2012; Rahmanian-Schwarz *et al.*, 2013).

168 No momento de retirada dos implantes não houve dificuldade de dissecação dos tecidos
169 adjacentes ao implante para as membranas do grupo controle e experimental,
170 predominando aderência mínima. Houve recobrimento das membranas por tecido
171 cicatricial, de forma a isolar os implantes, porém sem fibrose intensa que impedisse a
172 dissecação. Notou-se, ainda, presença de novos vasos direcionados ao local do implante.
173 A avaliação macroscópica da interface (Figura 1) evidenciou tumefação mais intensa
174 para MCOP em relação à MC. A tumefação em processos inflamatórios se deve ao
175 acúmulo de exsudato seroso como resultado direto do incremento na permeabilidade
176 vascular e é esperado no pós-cirúrgico de implantação subcutânea de biomateriais
177 (Oréfice *et al.*, 2006; Cheville, 2009).

178



179
 180 Figura 1. Registros fotográficos do local de implantação dos biomateriais em diferentes períodos
 181 após implantação no tecido subcutâneo de ratos. As setas com contorno branco indicam o local de
 182 implantação da MCOP e as setas com contorno vermelho indicam o local de implantação da MC.
 183 Verifica-se a diminuição gradativa da tumefação com o decorrer dos dias para os dois materiais.
 184 Para MC aos 35 dias não pode ser evidenciado o local da implantação. MCOP - membrana de
 185 colágeno e óleo de pequi; MC – membrana de colágeno

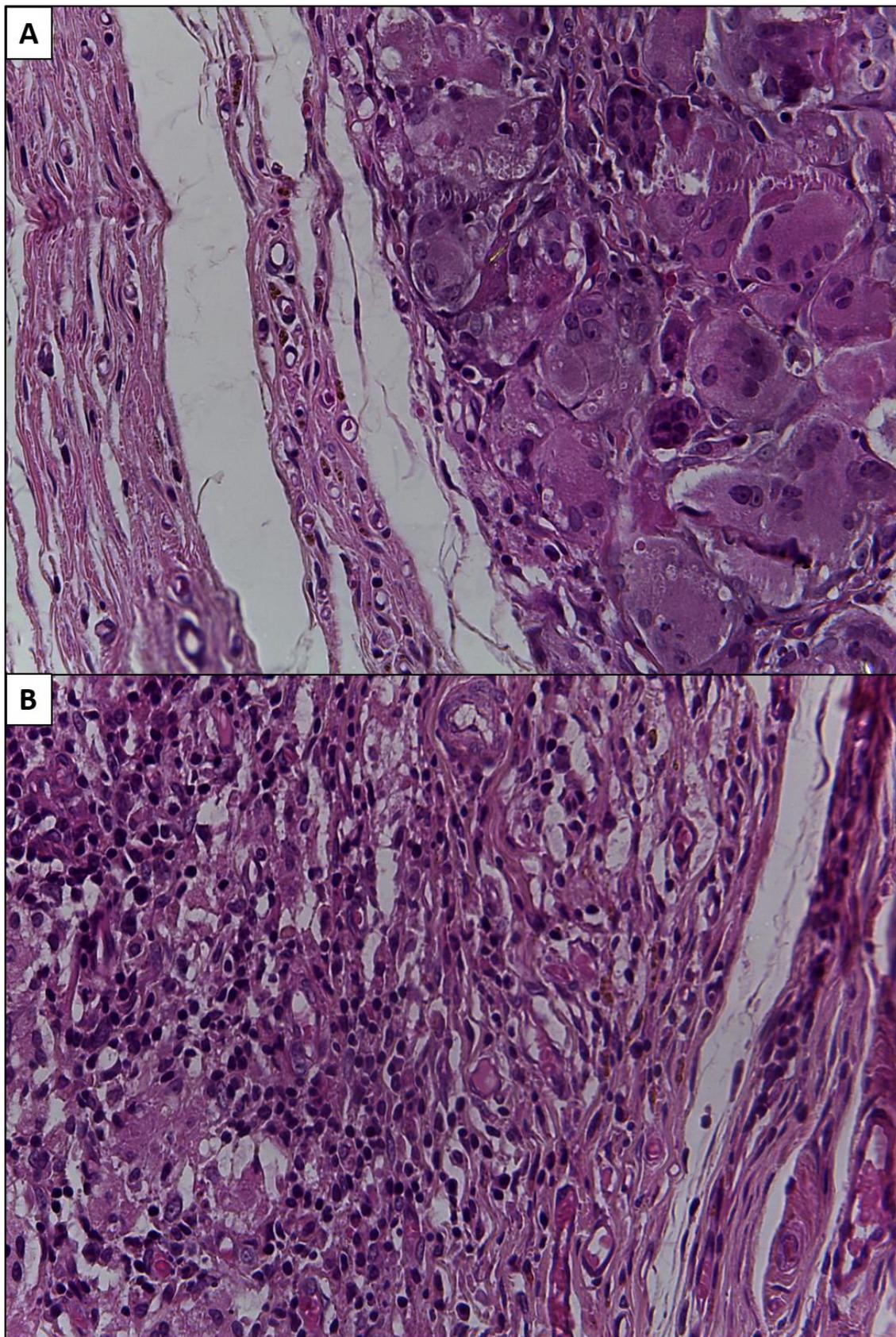
186
 187 A análise microscópica das reações teciduais para ambos tratamentos mostrou que não
 188 houve diferença ($P > 0,01$) entre os tratamentos quanto ao infiltrado celular
 189 correspondente aos neutrófilos, macrófagos, células espumosas e angiogênese nos
 190 diferentes períodos de retirada. No entanto, foi observado predomínio de neutrófilos nos

191 primeiros sete dias, em ambos os tratamentos, apresentado diminuição gradual após esse
192 período. Esse comportamento é característico para o processo inflamatório ocasionado
193 pela implantação de biomateriais nos primeiros dias e caracteriza o quadro típico de
194 inflamação aguda (Sanada *et al.*, 2003).

195 A contagem de macrófagos aumentou a partir do terceiro dia de implantação para
196 ambos os grupos, mas estabilizou até os 35 dias, sem diferença estatística significativa
197 ($P>0,01$) entre os diferentes períodos. Esse fato é indicativo de existência de material
198 ainda não degradado, promovendo o recrutamento de células do sistema imune, sem a
199 persistência de processo inflamatório crônico. Esses achados corroboram o estudo de
200 Wang *et al.*, (2006), que observaram a persistência de mononucleares em quantidade
201 estável até oito semanas após implante de esponja a base de colágeno em tecido
202 subcutâneo de ratos. Os mesmos pesquisadores descreveram, ainda, a formação de
203 cápsula fibrosa e intensa neovascularização, porém não correlacionaram essas
204 características com processo inflamatório crônico.

205 Aos 14 dias, a presença de células esponjosas mereceu destaque para os dois materiais
206 analisados, persistindo por maior período em MC (até 21 dias). Aos 28 dias notou-se
207 aumento significativo na contagem de células gigantes do tipo corpo estranho para MC
208 (Figura 2).

209



210

211 Figura 2. Fotomicrografia de amostras da interface aos 28 dias. Notar a intensa quantidade de células
212 gigantes para MC (A), tipo celular pouco visualizado para as amostras de MCOP (B).

213 A presença destas células está relacionada à reação de corpo estranho por macrófagos e
 214 células gigantes do tipo corpo estranho da fase final das respostas inflamatórias e de
 215 cura de feridas após a implantação de biomateriais. Os resultados mostraram que a
 216 presença do óleo de pequi reduziu a quantidade destas células comparadas com a
 217 membrana sem o óleo. Isso pode ser justificado, ainda, pela degradação mais lenta da
 218 MCOP, elucidando menor reação inflamatória. Outros pesquisadores também
 219 verificaram comportamento semelhante utilizando nanofibras poliméricas de
 220 poli(lactide-co-glicolide)-poli(3-hexilthiophene) (Subramanain et al., 2013).

221 A identificação de estratégias que regulem a resposta inflamatória tem implicações
 222 importantes para o bom funcionamento do biomaterial. Estudos *in vitro* tem mostrado
 223 que, embora a resposta de corpo estranho não possa ser completamente evitada, a
 224 adesão das células inflamatórias é influenciada pela estrutura química da superfície do
 225 material (Rolfe et al., 2011). Segundo Anderson *et al.*, (2008) a incorporação de
 226 componentes biológicos de origem alogênica ou xenogênica, bem como células tronco
 227 em abordagens de engenharia de tecidos ou regeneração, abrem possibilidades de
 228 modulação das respostas do hospedeiro, amenizando o processo inflamatório. Nesse
 229 sentido, alguns autores relataram modulação da resposta de corpo estranho revestindo os
 230 dispositivos implantados com polímeros sintéticos poli-álcool vinílico, poli-ácido
 231 láctico e poli (co-glicólico) ácido e com biopolímeros, como quitosana, colágeno e
 232 alginato (Morais *et al.*, 2010; Rolfe et al., 2011).

233 A contagem de fibroblastos mostrou diferença significativa entre as amostras das
 234 membranas MCOP e MC (Tabela 1).

235

236 Tabela 1. Média das contagens de fibroblastos para cada grupo experimental nos
 237 diferentes dias de retirada dos biomateriais implantados em subcutâneo de ratos.

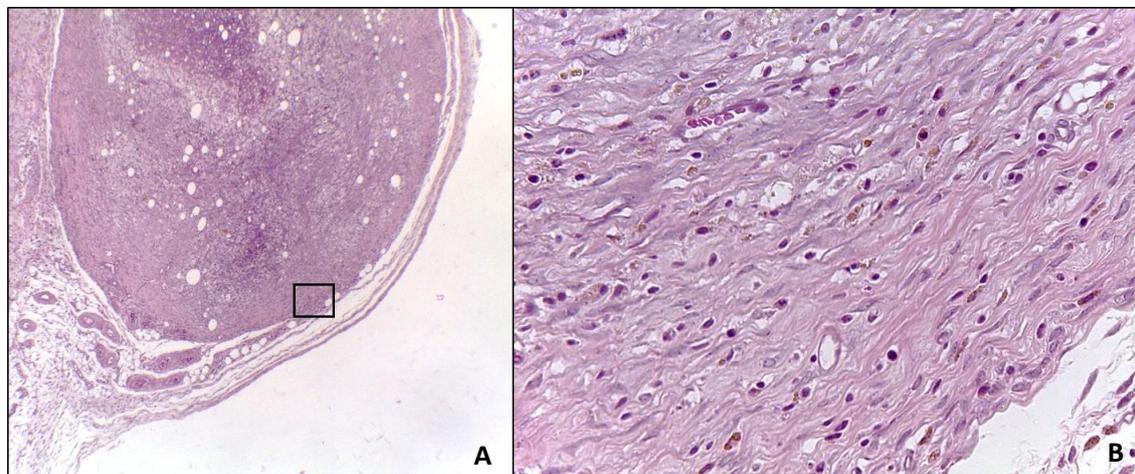
238

Dias	MC	MCOP
3	15,38 Ab ± 14,70	8,53 Ab ± 9,36
7	7,38 Ab ± 9,07	20,16 Bb ± 7,21
14	25,81 Ac ± 11,88	32,84 Bc ± 21,26
21	79,40 Ad ± 25,92	62,85 Ad ± 25,81
28	69,33 Ad ± 20,78	74,70 Bd ± 21,61
35	58,90 Ad ± 14,05	74,00 Bd ± 28,61

239 Para cada variável analisada, médias seguidas de letras iguais maiúsculas na linha,
 240 assim 200 como médias seguidas de letras iguais minúsculas na coluna, não diferem
 241 entre si pelo teste 201 de Dunnett (P>0,01).

242 Apesar de haver aumento gradativo de fibroblastos em ambos os tratamentos em relação
243 aos tempos de retirada, notou-se valores superiores para MCOP em relação à MC,
244 observada principalmente aos dias sete, 14, 28 e 35. Estes resultados foram confirmados
245 pela análise da produção de colágeno pelos fibroblastos. Ambos os tratamentos
246 apresentaram a mesma tendência, cujo aumento da produção de colágeno ocorreu de
247 forma gradativa, atingindo o pico aos 21 dias. Entretanto, a maior produção ocorrida nos
248 casos de MCOP em comparação a MC foi evidente. Desta forma, é possível inferir que
249 a presença do óleo de pequi induziu ao maior recrutamento de fibroblastos e,
250 consequentemente, a maior produção de colágeno. Embora não tenha sido realizada
251 mensuração individual quanto aos subtipos de colágeno, a visualização microscópica
252 das lâminas coradas em Picrosirius permitiu verificar predominância do colágeno tipo I
253 em todos os grupos experimentais. Durante o processo cicatricial, ocorre inicialmente a
254 formação de fibras de colágeno tipo III, sendo posteriormente substituídas por fibras de
255 colágeno I (Ribeiro et al., 2015).

256 Ressalte-se que a deposição de colágeno ocorreu em torno do biomaterial, de forma
257 circunscrita, de modo a formar uma cápsula englobando o processo inflamatório,
258 juntamente ao material implantado (Figura 3).



259
260 Figura 2. Formação de cápsula fibrosa envolvendo o processo inflamatório para MCOP aos 14 dias após
261 implantação (A). Em B, referente a imagem em maior aumento da porção destacada em A pelo
262 quadrilátero preto, nota-se presença de fibroblastos e fibras colágenas, além de novos vasos (HE)

263 Acredita-se que causa da formação da cápsula pode ser decorrente da pobre adesão da
264 superfície do implante aos tecidos, conforme descrito por outros pesquisadores. Isso é
265 justificado pela ausência de poros em ambos materiais, característica que, quando
266 presente, favorece a incorporação do material pela proliferação celular para o interior do
267 mesmo (Kaluzny et al., 2007; Passos et al., 2008). Além disso, a incapacidade de

268 fagocitose do material pelas células inflamatórias, devido seu tamanho, leva a
269 persistência do processo inflamatório, fato que favorece a formação da cápsula de tecido
270 fibroso denso, cuja função é isolar o material do tecido adjacente e diminuir a ação do
271 sistema imune sobre o mesmo (Rolfe et al., 2011).

272 A avaliação da espessura da cápsula mostrou, em diferentes tempos de retirada do
273 material, que a mesma se apresentou mais espessa para MCOP ($91,71\mu\text{m} \pm 10,46$, aos
274 14 dias e $80,00 \pm 5,00$, aos 28 dias) que para MC ($56,22\mu\text{m} \pm 2,63$, aos 14 dias e $60,00$
275 $\pm 11,5$, aos 28 dias), corroborando com os achados de maior agregação de fibroblastos
276 e, conseqüentemente, maior produção de colágeno.

277 A observação desses resultados permitiu confirmar a biocompatibilidade já conhecida
278 do colágeno, por meio do comportamento biológico apresentados pela MC, cujo
279 processo inflamatório não persistiu, tendendo a resolução cicatricial sem se tornar
280 crônico. O colágeno é uma das proteínas mais prevalentes no tecido conjuntivo dos
281 animais e constitui aproximadamente 25% da proteína total do corpo nos vertebrados e,
282 devido a baixa variação na sequência de aminoácidos nas diferentes espécies de
283 mamíferos, favorece a biocompatibilidade apresentada por esse material (Fietzek &
284 Kuhn, 1976; Wang *et al.*, 2010). O uso de novas substâncias, como óleo de polpa de
285 pequi, a fim de incrementar a biocompatibilidade do colágeno, apresenta-se de acordo
286 com autores que estudam a compatibilidade *in vivo* de biomateriais (Anderson *et al.*,
287 2008; Patel *et al.*, 2012)

288

289

CONCLUSÕES

290 A avaliação da biocompatibilidade da MCOP, em comparação com a MC, permitiu
291 verificar que a presença do óleo de polpa de pequi reduziu a intensidade do processo
292 inflamatório e otimizou o recrutamento de fibroblastos e, conseqüentemente, a produção
293 de colágeno quando implantado em subcutâneo de ratos. Neste aspecto, apesar da
294 necessidade de mais estudos *in vivo* para compreender a relação do óleo de pequi com a
295 modulação do processo inflamatório, pode-se concluir que sua presença na membrana
296 proporcionou melhora na biocompatibilidade e acelerou o processo cicatricial.

297

298

299

300

REFERÊNCIAS

301

302 ANDERSON, J.M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D.T. Foreign body reaction to
303 biomaterials. *Seminars in Immunology*, v.20, n.2, p.86–100, 2008.

304 BATISTA, J.S.; SILVA, A.E.; RODRIGUES, C.M.F.; COSTA, K.M.F.M.;
305 OLIVEIRA, A.F.; PAIVA, E.S.; NUNES, F.V.A.; OLINDA, R.G. Avaliação da
306 atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas
307 cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. *Arq. Inst. Biol.*, v. 3, p. 441-447,
308 2010.

309 BUNYARATAVEJ, P.; WANG, H-L. Collagen membranes: a review. *J. Periodontol.*,
310 v.72, n.2, p.215-229, 2001.

311 CEN, L.; LIU, W.; CUI, L.; ZHANG, W.; CAO, Y. Collagen tissue engineering:
312 development of a novel biomaterials and applications. *Pediatric Research*, v.63, n.5,
313 p.492-496, 2008.

314 CHEVILLE, N.F. Introdução à patologia veterinária. 3.ed. Brueri: Manole, 2009. 462p.

315 CONCEA. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Brasília, 2013.

316 FERREIRA, B.S.; ALMEIDA, C.G.; FAZA, L.P.; ALMEIRA, A.; DINIZ, C.G.;
317 SILVA, V.L.; GRAZUL, R.M.; LE HYARIC, M. Comparative properties of
318 Amazonian oils obtained by different extraction methods. *Molecules*, v.16. p. 5875-
319 5885, 2011.

320 FIETZEK, P.P.; KUHN, K. The primary structure of collagen. *Int. Rev. Connect. Tissue*
321 *Res.*, v.7, n.1, p.60, 1976.

322 GOISSIS, G.; PLEPIS, A.M.G.; ROCHA, J.L. Processo de extração de colágeno de
323 tecidos animais com auxílio de solventes orgânicos e meio alcalino. Patente BR PI
324 9.405.043-0, 1994.

325 HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. *Rev. Bras.*
326 *Farm.*, v.88, n.2, p.53-58, 2007.

- 327 KAHN, R.; KAHN, M.H. Use of collagen as a biomaterial: an update. *J. Indian. Soc.*
328 *Periodontol.*, v.17, p.539-542, 2013.
- 329 KALUZNY, J.J.; JÓZWICKI, W.; WISNIEWSKA, H. Histological biocompatibility of
330 new, non-absorbable glaucoma deep sclerectomy implant. *J. Biomed. Mater. Res. B.*
331 *Appl. Biomater.*, v.81, n.2, p.403-409, 2007.
- 332 MASSON, P. *Techniques In tumeurs humanies: histology, diagnostic at techniques.* 2.
333 ed. Paris: Librarie Meloine, p.1061-1148, 1956.
- 334 MIRANDA, E.G.; NASCIMENTO, V.P.; WAISBERG, D.R.; SOUSA, M.W.G.;
335 LIMA, M.F.M.B.; SILVA, D.S.; WAISBERG, J. Inhalation anesthetic equipment for
336 rats with provision of simultaneous anesthetic and oxygen. *Acta Cir Bras.*, v.26, n.2,
337 p.140-143, 2011.
- 338 MORAIS, J. M., PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D.J.
339 Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response.
340 *AAPS J.*, v.12, n.2, p. 188-196, 2010.
- 341 O'BREIN, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, v.14,
342 n.3, p.88-95, 2011.
- 343 ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, M.S. Biomateriais: fundamentos e
344 aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538p.
- 345 PASSOS, A.H.R.; COSTA, F.; MARCHESI, L.T.; GUIMARÃES, S.A.C.; OREINI,
346 W.A. Fibrosis in tubulized skin flaps in rats using silicone catheters of two different
347 flexibility: experimental model. *Acta Cir. Bras.*, v.23, n.3, p.243-246, 2008.
- 348 PATEL, N.R.; GOHIL, P.P. A review on biomaterials: scope, applications & human
349 anatomy significance. *Int. J. Emerging Tech. Adv. Eng.*, v.2, n.4, p.91-101, 2012.
- 350 PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, A.M. Biomateriais: tipos, aplicações e
351 mercado. *Quim. Nova*, v.38, n.7, p.957-971, 2015.
- 352 RABELO, R.R.; BRITO, L.A.B.; RODRIGUES, A.P.; MORAES, A.M.;
353 DAMASCENO, A.; VULCANI, V.A.S.; SILVA, L.A.F., LIMA C.R.O. Use of chitosan

- 354 and polypropylene for the surgical correction of penile deviation in bulls: clinical and
355 histological aspects. Arch. Med. Vet., v.44, p.303-310, 2012.
- 356 RAHMANIAN-SCHWARZ, A.; HELD, M.; KNOELLER, T.; STACHON, S.;
357 SCHMIDT, T.; SCHALLER, H-E.; JUST, L. *In vivo* biocompatibility and
358 biodegradation of a novel thin and mechanically stable collagen scaffold. J Biomed.
359 Mat. Res., v.102, n.4, p.1173-1179, 2014.
- 360 VULCANI, V.A.S. Obtenção e processamento de matrizes tridimensionais de colágeno
361 e implantação em parede abdominal de equinos [Tese]. 93p. Universidade Estadual
362 Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
363 Jaboticabal. 2008.
- 364 WANG, X.H.; YAN, Y.N.; ZHANG, R.J. A comparison of chitosan and collagen
365 sponges as heostatic sressings. J. Bioact. Compat. Polym. V.21, n.1, p.39-54, 2006.
- 366 WANG, X.H.; YAN, Y.N.; ZHANG, R.J. Gelatin-based hydrogels for controlled cell
367 assembly. In: OTTENBRITE, R.M. Biomedical applications of hydrogels handbook.
368 Nova York: Springer, 2010. p.269-284.
369
370

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento e caracterizações físico-químicas e biológicas de biomateriais é uma ciência interdisciplinar e complexa, cujo intuito é analisar e prever os mecanismos moleculares da composição dos materiais e correlacionar com a biocompatibilidade. Neste contexto, os materiais naturais, principalmente derivados de origem animal, como o colágeno, tem apresentado biocompatibilidade superior em relação aos materiais sintéticos. Sua associação com outros materiais para a obtenção de compósitos é importante, pois agrega propriedades de matérias-primas diferentes, otimizando a bioatividade do implante.

A busca por novas substâncias, como o óleo de pequi, apresenta-se como importante alternativa para associação com colágeno na obtenção de compósitos para ser aplicado em tecidos moles e estabelecer, dentre outros aspectos, sua biocompatibilidade.

Apesar dos resultados evidenciados neste estudo, acredita-se que a realização de pesquisas futuras faz-se necessária, uma vez que o potencial terapêutico que óleo de pequi ainda não foi totalmente desvendado, sendo a literatura especializada ainda escassa.

ANEXOS