

COLEÇÃO
DESAFIOS
DAS
ENGENHARIAS:

ENGENHARIA BIOMÉDICA



CLAUDIANE AYRES
(ORGANIZADORA)

Atena
Editora
Ano 2021

COLEÇÃO
DESAFIOS
DAS
ENGENHARIAS:

ENGENHARIA BIOMÉDICA



CLAUDIANE AYRES
(ORGANIZADORA)

Atena
Editora
Ano 2021

Editora Chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Assistentes Editoriais

Natalia Oliveira

Bruno Oliveira

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto Gráfico e Diagramação

Natália Sandrini de Azevedo

Camila Alves de Cremona

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

Imagens da Capa

iStock

Edição de Arte

Luiza Alves Batista

Revisão

Os autores

2021 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2021 Os autores

Copyright da Edição © 2021 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná

Prof. Dr. Américo Junior Nunes da Silva – Universidade do Estado da Bahia

Profª Drª Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Arnaldo Oliveira Souza Júnior – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Crisóstomo Lima do Nascimento – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Daniel Richard Sant’Ana – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros
Prof. Dr. Humberto Costa – Universidade Federal do Paraná
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. José Luis Montesillo-Cedillo – Universidad Autónoma del Estado de México
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas
Profª Drª Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Miguel Rodrigues Netto – Universidade do Estado de Mato Grosso
Prof. Dr. Pablo Ricardo de Lima Falcão – Universidade de Pernambuco
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Ribeiro Simon Cavalcanti – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal do Semi-Árido
Prof. Dr. Jayme Augusto Peres – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Profª Drª Ana Grasielle Dionísio Corrêa – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Linguística, Letras e Artes

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Profª Drª Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Edna Alencar da Silva Rivera – Instituto Federal de São Paulo
Profª Drª Fernanda Tonelli – Instituto Federal de São Paulo,
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobom – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Conselho Técnico científico

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí
Profª Ma. Adriana Regina Vettorazzi Schmitt – Instituto Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Alex Luis dos Santos – Universidade Federal de Minas Gerais
Prof. Me. Alexsandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional
Profª Ma. Aline Ferreira Antunes – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Andrezza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia
Profª Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá
Profª Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais
Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco
Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Me. Carlos Augusto Zilli – Instituto Federal de Santa Catarina
Prof. Me. Christopher Smith Bignardi Neves – Universidade Federal do Paraná
Profª Drª Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas
Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará

Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília
Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa
Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás
Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia
Prof. Me. Edson Ribeiro de Brito de Almeida Junior – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases
Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Prof. Me. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí
Prof. Dr. Everaldo dos Santos Mendes – Instituto Edith Theresa Hedwing Stein
Prof. Me. Ezequiel Martins Ferreira – Universidade Federal de Goiás
Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora
Prof. Me. Fabiano Eloy Atílio Batista – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas
Prof. Me. Francisco Odécio Sales – Instituto Federal do Ceará
Prof. Me. Francisco Sérgio Lopes Vasconcelos Filho – Universidade Federal do Cariri
Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramirez – Centro Universitário Adventista de São Paulo
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
Prof. Me. Gustavo Krahl – Universidade do Oeste de Santa Catarina
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro
Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza
Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará
Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social
Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFGA
Prof. Dr. Kárpio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia
Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis
Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR
Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Ma. Lillian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
Profª Ma. Lillian de Souza – Faculdade de Tecnologia de Itu
Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
Profª Drª Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe
Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná
Profª Ma. Luana Ferreira dos Santos – Universidade Estadual de Santa Cruz
Profª Ma. Luana Vieira Toledo – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
Prof. Me. Luiz Renato da Silva Rocha – Faculdade de Música do Espírito Santo
Profª Ma. Luma Sarai de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas
Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos

Prof. Me. Marcelo da Fonseca Ferreira da Silva – Governo do Estado do Espírito Santo
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
Prof. Me. Marcos Roberto Gregolin – Agência de Desenvolvimento Regional do Extremo Oeste do Paraná
Profª Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará
Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Dr. Pedro Henrique Abreu Moura – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Prof. Me. Pedro Panhoca da Silva – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Profª Drª Poliana Arruda Fajardo – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Rafael Cunha Ferro – Universidade Anhembi Morumbi
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Renan Monteiro do Nascimento – Universidade de Brasília
Prof. Me. Renato Faria da Gama – Instituto Gama – Medicina Personalizada e Integrativa
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba
Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco
Profª Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Prof. Dr. Sullivan Pereira Dantas – Prefeitura Municipal de Fortaleza
Profª Ma. Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Universidade Estadual do Ceará
Profª Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí
Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Coleção desafios das engenharias: engenharia biomédica

Bibliotecária: Janaina Ramos
Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Mariane Aparecida Freitas
Edição de Arte: Luiza Alves Batista
Revisão: Os autores
Organizadora: Claudiane Ayres

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C691 Coleção desafios das engenharias: engenharia biomédica / Organizadora Claudiane Ayres. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-5983-256-9
DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.569211607>

1. Engenharia biomédica. I. Ayres, Claudiane (Organizadora). II. Título.

CDD 610.28

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, desta forma não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

APRESENTAÇÃO

A Engenharia Biomédica envolve a aplicação de princípios e métodos dos diversos ramos da engenharia que levam ao desenvolvimento, criação e adaptação de diversos instrumentos capazes de auxiliar na compreensão, definição, diagnóstico, monitoração, terapia, recuperação, reabilitação e prevenção de diversas afecções que podem comprometer a vida, atuando com inovação e tecnologia voltadas à área da saúde e biologia.

Trata-se de uma área multidisciplinar que associa conhecimentos de química, biologia, física, informática, entre outras diversas.

Pensando em todas as possibilidades e atualizações que envolvem a área das engenharias, a Atena Editora lança a Coleção “DESAFIOS DAS ENGENHARIAS: ENGENHARIA BIOMEDICA”, que traz 07 artigos capazes de fundamentar e evidenciar a importância dessa área de atuação das engenharias, que objetiva o cuidado, manutenção e valorização da vida.

Convido-te a conhecer as diversas possibilidades que envolvem essa área tão inovadora e abrangente.

Aproveite a leitura!


Claudiane Ayres

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

LABOR CONDITIONS OF INFORMAL MINING AND ITS RELATIONSHIP WITH LATUBERCULOSIS AND SILICOSIS SUFFERED BY WORKERS IN THE MINING ZONE OF OTOCA - LUCANAS -AYACUCHO - 2014


Jessenia Leonor Loayza Gutiérrez
Primitivo Bacilio Hernández Hernández
Omar Michael Hernández García
Aníbal Bacilio Hernández García
Walter Merma Cruz
Edward Paul Sueros Ticona

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5692116071>

CAPÍTULO 2..... 14

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA ÁRVORE BRÔNQUICA DO *GRACILINANUS AGILIS*


João Pedro Alves de Araújo
Mariane Ferracin Martucci Perandr e
Ana Flávia de Carvalho
Ricardo Alexandre Rosa
Celina Almeida Furlanetto Man anares

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5692116072>

CAPÍTULO 3..... 25

EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE GENIPINA A PARTIR DOS FRUTOS VERDES DE GENIPA AMERICANA L


Bruna de Freitas Leite
Rafael Braga da Cunha
João Emídio da Silva Neto
José Filipe Bacalhau Rodrigues
Maria Roberta de Oliveira Pinto
Solomon Kweku Sagoe Amoah
Marcus Vinicius Lia Fook

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5692116073>

CAPÍTULO 4..... 34

PROSPECÇÃO *IN SILICO* DE ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNINOCELULOLÍTICO EM *BACILLUS THURINGIENSIS*

Dimitri Sokolowskei
Edvar Carneiro Silva Junior
Paulo Roberto Martins Queiroz

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5692116074>


CAPÍTULO 5..... 50

REVISÃO DAS ROTAS DE POLIMERIZAÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO FACTÍVEIS PARA O

PREPARO DE MATERIAIS ÚTEIS PARA APLICAÇÕES EM MEDICINA REGENERATIVA

Aghata Rodrigues Souza

Carolina Cruz Ferreira


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5692116075>

CAPÍTULO 6..... 62

SUBSTITUTOS TISSULARES APLICADO AO TECIDO ÓSSEO

Luciana Pastena Giorno

Arnaldo Rodrigues Santos Jr

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5692116076>


CAPÍTULO 7..... 88

DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DE SÍNTESE NA MORFOLOGIA E PUREZA DA HAP OBTIDA VIA REAÇÃO DE COMBUSTÃO

Thaíla Gomes Moreira

Kaline Melo de Souto Viana

Amanda Melissa Damiano Leite

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.5692116077>

SOBRE A ORGANIZADORA 97

ÍNDICE REMISSIVO..... 98

CAPÍTULO 1

LABOR CONDITIONS OF INFORMAL MINING AND ITS RELATIONSHIP WITH LATUBERCULOSIS AND SILICOSIS SUFFERED BY WORKERS IN THE MINING ZONE OF OTOCA - LUCANAS -AYACUCHO - 2014

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 11/06/2021

Jessenia Leonor Loayza Gutiérrez

<https://orcid.org/0000-0001-8721-7939>

Primitivo Bacilio Hernández Hernández

<https://orcid.org/0000-0003-3028-6671>

Omar Michael Hernández García

<https://orcid.org/0000-0002-0131-8788>

Aníbal Bacilio Hernández García

<https://orcid.org/0000-0002-1472-3205>

Walter Merma Cruz

Universidad Nacional de Moquegua- Perú
Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera
<https://orcid.org/0000-0003-3742-6235>

Edward Paul Sueros Ticona

Universidad Nacional de Moquegua- Perú
Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera
Ciudad de Tacna
<https://orcid.org/0000-0003-4609-2185>

RESUMEN: El objetivo principal del presente trabajo de investigación fue determinar la relación que existe entre las condiciones laborales y los factores socio-demográficos con la tuberculosis y la silicosis en la población obrera de la zona minera de Otoca - Lucanas, Ayacucho - 2014. Método se realizó un estudio descriptivo transversal. La muestra estuvo constituida por 47 obreros de la zona minera de Otoca - Lucanas quienes aceptaron voluntariamente participar en

el estudio. Se evaluaron las variables como edad, sexo, estado civil, grado de instrucción, afiliación al seguro, equipo de protección personal y ambiente laboral, tuberculosis y silicosis. Se tuvo como resultados y discusión que la prevalencia de tuberculosis fue de 19,1%, esta cifra se aproxima a la hallada por Garrote y otros quienes encontraron una prevalencia de tuberculosis de 17,1% en población de trabajadores mineros colombianos; la silicosis fue de 14,9%, cifra mucho menor que la referida por Loayza y otros, quienes publicaron un estudio en el que hallaron un porcentaje de 43% de silicosis población de trabajadores mineros bolivianos. Se halló en cuanto a la edad y presencia de tuberculosis (0,046), no se halló asociación entre el sexo (0,482). Los factores socio-demográficos edad y estado civil presentan asociación con la presencia de silicosis en la población de estudio. El sexo, el grado de instrucción y las condiciones laborales no presentan asociación con la tuberculosis.

PALABRAS CLAVE: Silicosis, tuberculosis, Condiciones laborales.

CONDICIONES LABORALES DE LA MINERÍA INFORMAL Y SU RELACIÓN CON LATUBERCULOSIS Y LA SILICOSIS QUE PADECEN LOS OBREROS DE LA ZONA MINERA DE OTOCA - LUCANAS -AYACUCHO – 2014

ABSTRACT: The main objective of this research work was to determine the relationship between working conditions and socio-demographic factors with tuberculosis and silicosis in the working population of the mining area of Otoca - Lucanas, Ayacucho - 2014. Method was carried

out a descriptive cross-sectional study, "The sample consisted of 47 workers from the Otocá-Lucanas mining area who voluntarily agreed to participate in the study. Variables such as age, sex, marital status, educational level, insurance affiliation, personal protective equipment and work environment, tuberculosis and silicosis were evaluated. The results and discussion were that the prevalence of tuberculosis was 19.1%, this figure is close to that found by Garrote and others who found a prevalence of tuberculosis of 17.1% in the population of Colombian mining workers; silicosis was 14.9%, a figure much lower than that reported by Loayza and others, who published a study in which they found a 43% percentage of silicosis in the population of Bolivian mining workers. It was found in terms of age and presence of tuberculosis (0.046), no association was found between sex (0.482). Socio-demographic factors, age and marital status are associated with the presence of silicosis in the study population. Sex, educational level, and working conditions are not associated with tuberculosis.

KEYWORDS: Silicosis, tuberculosis, working conditions.

1 | INTRODUCCIÓN

La minería puede ocasionar un serio impacto ambiental, especialmente cuando se trata de partículas de un diámetro inferior a 10 pm, lo que permite que ellas puedan ser inhaladas y provocar importantes daños a la salud al introducirse en las vías respiratorias.

La minería informal es una actividad de alto impacto ambiental, social y cultural. Una actividad insostenible, ya que la explotación del recurso supone su agotamiento y por otro lado deteriora en forma acelerada de la salud de aquellos que se dedican a estas labores. Se considera que las excavaciones diarias cada obrero genera alrededor de 250 Kg de polvo fino, del cual un 17% es polvo respirable, lo que se esparce en el aire, manteniéndose suspendido en él, en un porcentaje aproximado del 2,5% por metro cúbico, de donde el obrero lo absorbe al respirar, penetrando el polvo más fino hasta los alveolos pulmonares, generando enfermedades como la silicosis y la tuberculosis, entre otras.

El material particulado a que se hace referencia, es una mezcla compleja de componentes con características físicas y químicas.

Actualmente se reconocen al menos dos modos: el particulado fino y el particulado grueso. El particulado fino a su vez comprende al particulado ultrafino con diámetro aerodinámico menor a 0.1 micrón (que a su vez comprende el modo de nucleación y el modo de Aitken) y que constituyen en número la mayor parte de las partículas y el particulado de acumulación que representa por que va de 0.1 a 1 micrones y que se forma a partir de procesos de coagulación o condensación de ultrafino.

. Por último, el particulado grueso habitualmente equivalente a más de 2.5 micrones de diámetro aerodinámico y que proviene predominantemente de procesos mecánicos de ruptura de sólidos.

El particulado grueso comprende las partículas de origen natural y también de origen antropogénico.

Las concentraciones son espacialmente más heterogéneas que las del particulado fino debido a la rápida precipitación al suelo. El particulado grueso comprende polvo en suspensión de los caminos y de procesos industriales, construcción, y también un componente biológico en que destacan el polen, y fragmentos de bacterias que contienen lipopolisacáridos. También a nivel urbano el desgaste de neumáticos, frenos y pavimento produce un material particulado muy distinto al que proviene de procesos naturales de erosión.

(De Re metálica, 1494) ya hablaba de los efectos perniciosos del polvo inhalado en los mineros. Desde entonces ha ido creciendo el conocimiento sobre los diferentes aspectos del depósito de polvo en los pulmones asociado a una respuesta patológica, que es lo que hoy denominamos neumoconiosis.

La sílice (dióxido de silicio, formas cristalinas), debido a su poder patógeno y a su abundancia en la corteza terrestre, es el principal protagonista en la mayoría de las neumoconiosis, cuando no es el único. De ahí que con frecuencia el término silicosis se use para denominar cualquier neumoconiosis.

En el presente estudio responde a la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál será la relación que existe entre las condiciones laborales y los factores socio-demográficos con la tuberculosis y la silicosis en la población obrera de la zona minera de Otonaga - Lucanas - Ayacucho - 2014?

2 | OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Objetivo general

- Determinar la relación que existe entre las condiciones laborales y los factores socio-demográficos con la tuberculosis y la silicosis en la población obrera de la zona minera de Otonaga - Lucanas - Ayacucho - 2014.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de la tuberculosis en la población laboral de la minería informal en la zona de Otonaga - Lucanas - Ayacucho – 2014
- Determinar la prevalencia de la silicosis en la población laboral de la minería informal en la zona de Otonaga - Lucanas - Ayacucho — 2014.
- Determinar la relación entre los factores socio-demográficos y las condiciones laborales con la presencia de tuberculosis y silicosis en la población de estudio.

3 | HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Hipótesis general

- Los factores socio-demográficos y las condiciones laborales se relacionan con la silicosis y tuberculosis en los obreros de la zona minera de Otoa - Lucanas - Ayacucho - 2014.

3.2 Hipótesis específica

- Los factores socio-demográficos y las condiciones laborales se relacionan con la presencia de tuberculosis en la población de estudio.
- Los factores socio-demográficos y las condiciones laborales se relacionan con la presencia de silicosis en la población de estudio.

4 | JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La presente investigación es importante porque permitirá establecer criterios científicos para determinar las causas del deterioro de la salud de los obreros de la zona minera informal de Otoa, de la provincia de Lucana, región Ayacucho y de la población de la zona de influencia en su conjunto, considerando que a diario sucede donde realizan actividad minera la remoción de toneladas de mineral y que generan gran cantidad de polvo con partículas respirables de acción tóxica.

5 | VARIABLES

Variables Independientes: Factores socio-demográficos, Sub-variables: Edad y sexo, Estado civil Grado de instrucción Condiciones laborales.

Sub-variables: Afiliación a seguro Equipo de protección personal Ambiente laboral.

Variable dependiente. Silicosis y Tuberculosis.

6 | BASE TEÓRICA

Garrote C, Malagón J, Morgan G, Combariza D y Varona M, publicaron un estudio titulado “Caracterización de las condiciones de salud respiratoria de los trabajadores expuestos a polvo de carbón en minería subterránea en Bocayá, 2013”, Colombia, Cuyo objetivo fue caracterizar las condiciones de salud respiratoria e identificar los factores de riesgo asociados al desarrollo de neumoconiosis en trabajadores que han laborado expuestos a polvo de carbón en minas de socavón en Boyacá, 2013. Participaron 170 trabajadores masculinos determinando que los cambios radiológicos sugestivos de neumoconiosis fueron más frecuentes en trabajadores con antigüedad menor de 20 años.

Los hallazgos espirométricos anormales predominaron en el grupo con antigüedad mayor a 20 años.

En el año 2006 Pineda K, presentó su tesis Material particulado y las enfermedades ocupacionales de la minería a la Universidad Católica de Santiago de Chile. Estudio Experimental cuyo objetivo es establecer la relación entre las enfermedades ocupacionales y el polvo o material particulado generado durante ciertas operaciones mineras. En esta investigación el autor según los reportes obtenidos los mineros sufren: de silicosis, dolores de cabeza, náuseas, dificultad para respirar, vómitos, anemia y taquicardia.

En el año 2007, Mendoza E., presentó su tesis El polvo generado por la minería y su influencia en la contaminación del medio ambiente y el deterioro de la salud, a la Universidad Nacional de Ingeniería. Lima, cuyo principal objetivo fue determinar el grado de influencia del polvo generado en minería en la contaminación ambiental de las zonas de influencia. Concluyeron que la minería, especialmente la minería de cielo abierto descarga efluentes de alta carga contaminante para el medio ambiente, afectando no solo el agua y los suelos, sino además la atmósfera causando daño a las personas con diversas enfermedades de tipo crónicas y agudas y a las plantaciones.

7 | METODOLOGÍA DE MEDICIÓN

7.1 Tipo, nivel y diseño de la investigación

Tipo de investigación: Esta investigación no experimental, es de nivel descriptivo y correlacional ya que relaciona el problema de salud con la contaminación del medio ambiente, específicamente en los trabajadores mineros informales. “Se trata de investigaciones que se caracterizan por su interés en la aplicación, utilización y consecuencias prácticas de los conocimientos” (Ander-Egg, 1987).

El estudio se ha desarrollado mediante un diseño no experimental, descriptivo transversal y correlacional, la misma que correlaciona los datos obtenidos, es decir, se ha evaluado las variables mediante la observación, sin manipulación de las variables independientes y se han medido en una sola oportunidad.

7.2 Población y muestra

7.2.1 Población

La población objetivo estuvo constituida por 120 obreros debidamente registrados el padrón de la Asociación Minera Informal Otoa.

7.2.2 Muestra

La muestra estuvo conformada por 47 obreros de la zona minera informal de Otoa.

8 I TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

8.1 Técnicas de recolección de información

La recolección de datos se ha efectuado mediante la aplicación de un muestreo no aleatorio por conveniencias. Esto se llevó a cabo con la ayuda de un padrón de trabajadores debidamente registrados en la Asociación Minera Informal de Otona.

8.2 Instrumentos de recolección de información

Se ha realizado la revisión documental para establecer los síntomas y afecciones de los obreros de las zonas mineras informales afectados de silicosis y tuberculosis.

La información complementaria se ha realizado mediante la aplicación de una ficha de encuesta, elaborada para este estudio, la cual fue aplicada a cada uno de los miembros que estuvieron de acuerdo con su participación en el estudio.

Para evaluar las condiciones laborales se ha considerado tres sub- variables: pertenencia a un sistema de salud, equipo de protección personal y el ambiente de trabajo. Se ha asignado un punto a cada uno de los indicadores de las variables que estuvieron presentes en el momento de la recolección de datos.

Variables	Puntaje asignado
Pertenencia a un sistema de salud	
- Pertenece a un sistema	1
- No pertenece a un sistema	0
Equipo de protección personal	
- Casco	1
- Botas	1
- Lentes	1
- Filtro/mascarilla	1
- Tapones	1
- Guantes	1
- Arnés	1
- Ropa	1
Ambiente de trabajo	
- Subterráneo	2
- Tajo abierto	1
- Pallaqueo	0
Total (0-11)	11

Tabla 01: Cuadro de asignación de puntos.

Fuente: Propia.

Se utilizó una escala tipo Likert, para categorizar las condiciones laborales:

Deficientes condiciones laborales:	0-4
Regulares condiciones laborales:	5-8
Eficientes condiciones laborales:	9-11

8.3 Técnicas de análisis e interpretación de datos

Los datos se han procesado estadísticamente con el fin de cumplir con los objetivos del estudio, para lo cual se construyó tablas de distribución de frecuencias para presentar la prevalencia de la TBC y la silicosis en la muestra de estudio. Se sometieron a prueba las variables a la hipótesis nula y alterna, con la estadística chi cuadrado.

9 | RESULTADOS

Descripción de la muestra de estudio.

		Frecuencia	Porcentaje
Edades	30 o menos años	34	72,3
	31 a más años	13	27,7
	Total	47	100,0

Tabla 02: Distribución de edades de la muestra de estudio.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información.

La muestra de estudio ha estado constituida en mayor proporción por trabajadores de 30 o menos años.

		Frecuencia	Porcentaje
Sexo Masculino		45	95,7
	Femenino	2	4,3
	Total	47	100,0

Tabla 03: Distribución de sexo de la muestra de estudio.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información.

La muestra de estudio ha estado constituida en mayor proporción por trabajadores que refirieron tener secundaria completa.

9.1 Prevalencia de las enfermedades laborales en la población de estudio

		Frecuencia	Porcentaje
Tuberculosis	Si presenta	9	19,1
	No presenta	38	80,9
	Total	47	100,0

Tabla 04: Prevalencia de tuberculosis en la muestra de estudio.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información.

La prevalencia de tuberculosis hallada fue de 19,1%, es decir, casi 2 por cada 10 trabajadores mineros presentan tuberculosis en las condiciones en que laboran en la zona minera informal de Otoa - Lucanas, Ayacucho.

		Frecuencia	Porcentaje
Silicosis	Si presenta	7	14,9
	No presenta	40	85,1
	Total	47	100,0

Tabla 05. Prevalencia de silicosis en la muestra de estudio.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información.

La prevalencia de silicosis hallada fue de 14,9%, es decir, casi 15 por cada 100 trabajadores mineros presentan silicosis en las condiciones en que laboran en la zona minera informal de Otoa - Lucanas, Ayacucho

9.2 Factores socio-demográficos y condiciones laborales asociados a la tuberculosis en la población de estudio

		Tuberculosis			
		Si presenta	No presenta	Total	
Edades	30 a menos años	f	4	30	34
		%	11,8%	88,2%	100,0%
	31 a más años	f	5	8	13
		%	38,5%	61,5%	100,0%
Total		f	9	38	47
		%	19,1%	80,9%	100,0%

Tabla 06. La edad y su relación con la tuberculosis.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información. (χ^2 : 0,046).

La prevalencia de tuberculosis es mayor en trabajadores de 31 a más años de edad.

La prueba chi cuadrado indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre estas proporciones.

			Tuberculosis		Total
			Si Presenta	No Presenta	
Sexo	Masculino	f	9	36	45
		%	20,0%	80,0%	100,0 %
	Femenino	f	0	2	2
		%	0,0%	100,0 %	100,0 %
Total		f	9	38	47
			19,1%	80,9%	100,0 %

Tabla 07. El sexo y su relación con la tuberculosis.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información. (χ^2 : 0,482).

La prevalencia de tuberculosis es mayor en trabajadores varones. La prueba chi cuadrado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre estas proporciones.

			Tuberculosis		Total
			Si Presenta	No Presenta	
Estado Civil	Soltero	f	2	20	22
		%	9,1%	90,9%	100,0 %
	Casado	f	1	2	3
		%	33,3%	66,7 %	100,0 %
	Conviviente	f	6	16	22
		%	27,3%	72,7 %	100,0 %
Total		f	9	38	47
			19,1%	80,9%	100,0 %

Tabla 08. El estado civil y su relación con la tuberculosis.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información. (χ^2 : 0,251).

La prevalencia de tuberculosis es mayor en trabajadores casados. La prueba chi cuadrado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre estas proporciones.

			Tuberculosis		
			Si Presenta	No Presenta	Total
Grado de instrucción	Prim Completa	f	3	10	13
		%	23,1%	76,3%	100,0 %
	Sec Completa	f	5	26	31
		%	16,1%	83,9 %	100,0 %
	Superior	f	1	2	3
		%	33,3%	66,7 %	100,0 %
Total	f	9	38	47	
			19,1%	80,9%	100,0 %

Tabla 9. El grado de instrucción y su relación con tuberculosis.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información. (chi2: 0,704).

La prevalencia de tuberculosis es mayor en trabajadores con estudios superiores. La prueba chi cuadrado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre estas proporciones.

			Tuberculosis		
			Si Presenta	No Presenta	Total
Condiciones laborales	laborales	f	6	21	27
		%	22,2%	77,8%	100,0%%
	Regular	f	3	17	20
		%	15,0%	85,0%	100,0%
Total	f	9	38	47	
	%	19,1%	80,9%	100,0%	

Tabla 10. Condiciones laborales y su relación con la tuberculosis.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información. (chi2:0,534).

La prevalencia de tuberculosis es mayor en trabajadores que presentan deficientes condiciones laborales, sin embargo, la prueba chi cuadrado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre estas proporciones.

Factores socio-demográficos y condiciones laborales asociados a la silicosis en la población de estudio.

		Silicosis			
			Si presenta	No presenta	Total
Edades	30 o menos años	f	1	33	34
		%	2,9%	97,1%	100,0%
	31 a más años	f	6	7	13
		%	46,2%	53,8%	100,0%
Total		f	7	40	47
		%	14,9%	85,1%	100,0%

Tabla 11. La edad y su relación con la silicosis.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información.

La prevalencia de silicosis es mayor en trabajadores de 31 a más años. La prueba chi cuadrado indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre estas proporciones.

		Silicosis			
			Si presenta	No presenta	Total
Sexo	Masculino	f	7	38	45
		%	15,6%	84,4%	100,0%
	Femenino	f	0	2	2
		%	0,0%	100,0%	100,0%
Total		f	7	40	47
		%	14,9%	85,1%	100,0%

Tabla 12. El sexo y su relación con la silicosis.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información. ($\chi^2:0,545$).

La prevalencia de silicosis es mayor en trabajadores. La prueba chi cuadrado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre estas proporciones.

		Silicosis			
			Si presenta	No presenta	Total
Estado civil	Soltero	f	1	21	22
		%	4,5%	95,5%	100,0%
	Casado	f	2	1	3
		%	66,7%	33,3%	100,0%
	Conviviente	f	4	18	22
		%	18,2%	81,8%	100,0%
Total		f	7	40	47

%	14,9%	85,1%	100,0%
---	-------	-------	--------

Tabla 13. El estado civil y su relación con la silicosis.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información. (chi2: 0,015).

La prevalencia de silicosis es mayor en trabajadores casados. La prueba chi cuadrado indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre estas proporciones.

		Silicosis			
			Si presenta	No presenta	Total
Grado de instrucción	Prim completa	f	4	9	13
		%	30,8%	69,2%	100,0%
	Sec completa	f	3	28	31
		%	9,7%	90,3%	100,0%
	Superior	f	0	3	3
		%	0,0%	100,0%	100,0%
Total	f	7	40	47	
	%	14,9%	85,1%	100,0%	

Cuadro 14. El grado de instrucción y su relación con la silicosis.

Fuente: Datos de la hoja de recolección de información. (chi2; 0,151).

La prevalencia de silicosis es mayor en trabajadores con primaria completa. La prueba chi cuadrado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre estas proporciones.

		Silicosis			
			Si presenta	No presenta	Total
Condiciones laborales	Deficiente	f	3	24	27
		%	11,1%	88,9%	100,0%
	Regular	f	4	16	20
		%	20,0%	80,0%	100,0%
Total	f	7	40	47	
	%	14,9%	85,1%	100,0%	

Cuadro 15. La condición laboral y su relación con la silicosis.

Fuente: Datos de Ja hoja de recolección de información (chi2:0,397).

La prevalencia de silicosis es mayor en trabajadores con regulares condiciones laborales. La prueba chi cuadrado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre estas proporciones.

10 | CONCLUSIONES

- La prevalencia de la tuberculosis en la muestra de estudio hallada fue de 19,1%, esta cifra se aproxima a la hallada por Garrote y otros quienes encontraron una prevalencia de tuberculosis de 17,1% en población de trabajadores mineros colombianos.
- La silicosis encontrada en esta investigación fue de 14,9%, cifra mucho menor que la referida por Loayza y otros, quienes publicaron un estudio en el que hallaron un porcentaje de 43% de silicosis población de trabajadores mineros bolivianos. Otros estudios no reportan cifras análogas.
- Se halló asociación entre la edad y la presencia de tuberculosis (0,046), no se encontró asociación entre el sexo (0,482), el estado civil (0,251), el grado de instrucción (0,704) y la condición laboral (0,534) en la muestra de estudio.

REFERENCIAS

Garrote C, Malagón J, Morgan G, Combariza D y Varona M. Caracterización de las condiciones de salud respiratoria de los trabajadores expuestos a polvo de carbón en minería subterránea en Bocayá, 2013". Revista industrial de Santander. Salud Vol 46 No.3 Set- Dic; 2014.

Loayza M, Medrano D. y Magne G. Incidencia de silicosis en trabajadores mineros de la cooperativa minera siglo XX Ltda. Revista Medicina, Ciencia, Investigación y Salud- Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina UTO. Nro. 1, Año 1, Mayo 2005.

Pineda K. Material particulado y las enfermedades ocupacionales de la minería. Chile. Universidad Católica de Santiago. 2006.

Mendoza E. El polvo generado por la minería y su influencia en la contaminación del medio ambiente y el deterioro de la salud. Lima. Universidad Nacional de Ingeniería. 2007.

Astete J, Gastañaga M, Fiestas V, Oblitas T, Sabastizagal i, Lucero M y otros. Enfermedades transmisibles, salud mental y exposición a contaminantes ambientales en población aledaña al proyecto minero Las Bambas antes de la fase de explotación, Perú 2006.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA ÁRVORE BRÔNQUICA DO *GRACILINANUS AGILIS*

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 20/04/2021

João Pedro Alves de Araújo

Centro Universitário da Fundação de Ensino
Octávio Bastos- Unifeob
São João da Boa Vista – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/1373840157947892>

Mariane Ferracin Martucci Perandr 

Centro Universitário da Funda o de Ensino
Octávio Bastos- Unifeob
São João da Boa Vista – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/8114204427130229>

Ana Flávia de Carvalho

Centro Universitário da Funda o de Ensino
Octávio Bastos- Unifeob
São João da Boa Vista – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/8788491510610457>

Ricardo Alexandre Rosa

Centro Universitário da Funda o de Ensino
Octávio Bastos- Unifeob
São João da Boa Vista – São Paulo

Celina Almeida Furlanetto Man anares

Centro Universitário da Funda o de Ensino
Octávio Bastos- Unifeob
São João da Boa Vista – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/4569724203159872>

RESUMO: O *Gracilinanus agilis*, também conhecido como cuíca-graciosa,   um marsupial presente em vários países sul-americanos e os dados sobre sua morfologia respiratória ainda

são escassos. Para realiza o do trabalho, foram utilizados cinco animais, que foram incisados em sua porão cervical e torácica, a após divulsão dos tecidos, realizou-se a avalia o "in situ" e, posteriormente, "ex situ", para análise mais detalhada, identificando assim, cinco lobos pulmonares, quatro lobos do lado direito e um do lado esquerdo. Em seguida, realizou-se incisões transversais em cada lobo, para melhor avalia o do parênquima pelo estudo histológico dos segmentos pulmonares. Foram realizadas três colora es, hematoxilina e eosina, azul de toluidina e, picros rius, através das quais, observou-se que a cartilagem da traqueia   hialina com anéis incompletos, reduzida presença de cartilagem nos segmentos bronquiais e ausência nos bronquiolares. O presente trabalho objetivou obter mais dados sobre a morfologia da árvore brônquica do *G. agilis*, contribuindo para maior conhecimento morfológico da espécie, para a medicina da conserva o e zoologia.

PALAVRAS-CHAVE: Brônquios; Bronquiolos; Marsupiais; Traqueia.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS STUDY OF *GRACILINANUS AGILIS* BRONCHIAL TREE

ABSTRACT: The *Gracilinanus agilis*, also known as graceful-cuica, is a South-America marsupial, and data about its respiratory morphology are still scarce. For carrying out the work were used five animals. They were incised in its cervical and thoracic portion, after divulsion of abdominal wall's tissues, "in situ" and subsequently "ex situ" evaluation has been made to obtain more details, identifying five pulmonare lobes, four on the right

and one on de left. Then transversal incisions were made in each lobe, for the histologic study of pulmonary segments. Three colorings were performed, hematoxilin and eosin, toluidine blue and picosirius, through witch, it was observed that the tracheal cartilage is hyaline with incomplete rings, there is reduced presence of cartilage on bronchial segments, absence in bronchiolar. This work had the objective to get more knowledge about the *G. agilis* bronchial tree morphology, contributing to greater morphological knowledge of the specie, conservation medicine and zoology.

KEYWORDS: Bronchi; Bronchioles; Marsupials; Trachea.

INTRODUÇÃO

Pertencente à classe Mammalia, interclasse marsupialia e ordem Didelphimorphia, o *Gracilinanus agilis*, assim como outros marsupiais, habitam territórios variados, de acordo com seus hábitos alimentares e características próprias de cada espécie (HICKMAN JR. et al., 2016). Comumente conhecido como cuíca, o *G. agilis* vive em regiões de vegetação, como Mata Atlântica, nos galhos das copas das árvores, e por isso, são animais ágeis e com cauda estrategicamente preênsil (ANTUNES et al., 2006).

Devido aos seus hábitos de frugivoria, desempenha significativa papel na dispersão de sementes, o que contribui para o aumento no número de espécies vegetais das regiões em que vivem, como já foi comprovado por estudos em determinadas áreas do Cerrado (CAMARGO et al., 2011). O sistema respiratório é composto por narinas, seios paranasais, parte nasal da faringe, laringe, traqueia e árvore brônquica. A traqueia segue como uma estrutura indivisível até certo ponto da cavidade torácica, onde se ramifica em dois brônquios classificados de acordo com sua localização, como extrapulmonares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A traqueia é um órgão tubular revestido internamente por um epitélio classificado como pseudoestratificado colunar ciliado com células caliciformes. Em continuidade com esse epitélio, há um tecido conjuntivo extremamente vascularizado e rico em glândulas seromucosas, sendo essas duas características histológicas responsáveis por aquecer e umedecer o ar inalado, respectivamente. A presença de células caliciformes é importante, pois o conteúdo mucoso formado pela secreção dessas células e das glândulas seromucosas é responsável pela retenção de sujidades inaladas. O muco e as sujidades retidas nele são eliminados em sentido à faringe, tal eliminação é possível graças ao batimento ciliar (MONTANARI, 2016).

O *G. agilis* não se classifica como um grupo em risco de extinção (LESSA et al., 2009; CARMIGNOTTO et al., 2015). O dimorfismo sexual nessa espécie não é evidente, não apresentando diferenças significativas (RIBEIRO, 2011).

Assim, devido à sua presença em vários cenários brasileiros, é necessário maior conhecimento sobre as características morfológicas do *G. agilis*. O presente trabalho objetivou analisar as principais características anatômicas e histológicas, presentes na

árvore brônquica desses animais. Os dados obtidos serão uma importante contribuição para somar às características já conhecidas sobre sua morfologia, possibilitando, portanto, um conhecimento mais amplo sobre a fauna nacional.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Ciências Morfológicas do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octavio Bastos – UNIFEOB, localizado na cidade de São João da Boa Vista, SP. Para a classificação da árvore brônquica foram utilizados cinco animais de ambos os sexos, sendo três machos e duas fêmeas, sem idade definida, pertencentes ao acervo de peças anatômicas do Laboratório de Anatomia Veterinária da UNIFEOB. Esses animais foram cedidos com autorização do IBAMA, pelo processo número 02001.007176/03-69. Foram respeitados os parâmetros Internacionais da bioética e bem-estar animal conforme preconiza a CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária de São João da Boa Vista – UNIFEOB.

Para a observação das estruturas pertencentes à árvore brônquica do *Gracilinanus agilis*, foi feita incisão cervical e torácica (da região do pescoço até próximo a região epigástrica). Após a realização da incisão cutânea, foi feita a divulsão dos músculos esterno-hioide, esterno cefálico, esterno-tireoideo, para localização da traqueia e, divulsão dos músculos peitorais superficial, transverso e profundo. Em seguida, fez-se a ruptura dos ossos do gradil costal e retirada do osso esterno, o que permitiu acesso ao coração e aos pulmões direito e esquerdo, seguido da avaliação das estruturas “*in situ*”. Em seguida foi realizada a ruptura dos ligamentos e tracionamento da traqueia em sua porção mais cranial, juntamente com as cartilagens da laringe, para a retirada dessas estruturas da cavidade torácica e realização das análises “*ex situ*”. Após a exteriorização do conjunto traqueia, pulmões e coração, retirou-se o coração, desagrupando assim, coração e pulmões, para o isolamento e melhor visualização dos lobos pulmonares. Cada lobo pulmonar foi individualizado e incisado duas vezes (Figura 1), sendo uma incisão cranial e outra caudal, com lâmina de bisturi número 21, o que permitiu a obtenção de três regiões. As regiões obtidas a partir das incisões foram: cranial, média e caudal, com exceção do lobo pulmonar cranial direito que devido ao seu tamanho menor, foi incisado apenas uma vez em sua porção mediana e, assim, foi separado apenas nas porções cranial e caudal. O objetivo das incisões foi avaliar os ramos da árvore brônquica quanto ao seu calibre e distribuição no parênquima. Desse modo, realizou-se a classificação dos brônquios lobares, segmentares e subsegmentares. Posteriormente à análise e identificação macroscópica, os tecidos foram submetidos à processos que permitiram a obtenção das lâminas histológicas.

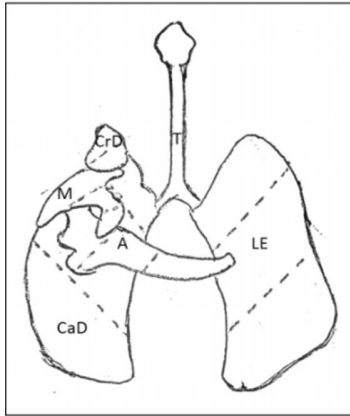


Figura 1: Representação ilustrativa das regiões onde foram realizadas as incisões em cada lobo pulmonar. Observar a traqueia (T), o lobo pulmonar cranial direito (CrD), lobo pulmonar médio (M), lobo pulmonar acessório (A), lobo pulmonar caudal direito (CaD) e lobo pulmonar esquerdo (LE).

Os tecidos passaram inicialmente por concentrações crescentes de álcoois, de 70% a 100%, sendo introduzidos três vezes no álcool 100%, para que ocorresse sua desidratação. Esses segmentos de pulmões foram transferidos para xilol, um solvente que atua clareando os tecidos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) e posteriormente emblocados em similar parafina Histosec®. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo LEICA®, modelo 2165, com espessura média de 5µm e posteriormente corados seguindo as técnicas de Hematoxilina e Eosina, Azul de Toluidina e Picrosirius.

Todos os resultados obtidos foram descritos de acordo com a Nomenclatura Anatómica Veterinária (International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2017) e com a Nomenclatura Histológica Veterinária (International Committee on Veterinary Histological Nomenclature, 2017).

RESULTADOS

Após a dissecação, a cavidade torácica do *Gracilinanus agilis* foi mensurada em 20 mm, sendo esse o comprimento identificado da base do pescoço até o diafragma no início da região abdominal. A cavidade torácica é protegida pelo gradil costal e, em sua superfície caudal é delimitada pelo diafragma, sendo este responsável por dividir a cavidade torácica da cavidade abdominal. A maior parte da cavidade torácica é preenchida pelos pulmões e nela encontra-se o mediastino, espaço onde se localiza o coração. Através da avaliação “in situ” confirmou-se a íntima relação dos lobos pulmonares com órgãos de outros sistemas, como o coração e o nervo vago (Figura 2).

Observou-se em avaliação “ex situ” que ao todo, o *G. agilis* possui cinco lobos pulmonares, sendo quatro deles direitos, divididos em cranial, médio, caudal e acessório, e um lobo esquerdo único (Figura 3).

Constatou-se que a traqueia possui comprimento de 6mm e que há ramificação das estruturas correspondentes à árvore brônquica, uma vez que nos parênquimas dos lobos cortados, visualizou-se brônquios de calibre maior, localizados centralmente no parênquima e à medida que os brônquios progridem em sentido às porções mais distais dos lobos pulmonares, observa-se estruturas de calibre menor em relação às que se localizam nas porções centrais, logo, as estruturas de maior calibre e localizadas na região extralobar, são os brônquios principais, dos quais se originam os brônquios lobares, presentes nas porções mais proximais dos lobos pulmonares, e as estruturas distais e de calibre menor correspondem aos brônquios segmentares e subsegmentares.

Assim, a ramificação anatômica da árvore brônquica do *G. agilis* demonstrou a traqueia se bifurcando em sua porção distal em dois brônquios principais e extralobares, cuja ramificação do brônquio principal direito, formava quatro brônquios denominados brônquios lobares e, identificados como os mais calibrosos presentes nas regiões centrais dos lobos pulmonares. Os brônquios segmentares e subsegmentares foram identificados de acordo com seus calibres e suas localizações mais distais nos parênquimas pulmonares anteriormente incisados (Figura 4). O brônquio principal esquerdo originou o brônquio lobar, uma vez que adentrou no parênquima pulmonar sem ramificações prévias. Com base nesses dados, fez-se a representação ilustrativa (Figura 5) da orientação intralobar dos lobos pulmonares descritos. Os tecidos foram processados e preparados para confecção de laminário histológico, possibilitando, assim, a obtenção de dados referentes à sua morfologia microscópica da traqueia e do parênquima pulmonar.

Microscopicamente avaliou-se que a traqueia (Figura 6) apresenta de anéis incompletos, constituídos por cartilagem do tipo hialina e seu epitélio de revestimento é pseudoestratificado colunar ciliado com células calciformes. Na avaliação do parênquima (Figura 7), observou-se que os segmentos de cartilagem, quando presentes ao longo das estruturas bronquiais, são mínimos, tendo em vista que em nenhum brônquio observou-se a presença de anéis incompletos ou de segmentos extensos, mas sim grande quantidade de musculatura lisa e porções extremamente discretas da cartilagem. Observou-se que o epitélio respiratório, anteriormente observado na traqueia, não se estende ao lúmen das estruturas bronquiais, que são internamente revestidas por um epitélio simples cúbico e as estruturas bronquiolares apresentam epitélio simples pavimentoso em seu lúmen. Tais dados condizem com um adelgaçamento precoce das porções de revestimento da árvore brônquica da espécie em questão.

A ramificação histológica da árvore brônquica do *G. agilis*, foi descrita de acordo com as estruturas constituintes de cada segmento observado, onde os brônquios originam bronquíolos, os bronquíolos se ramificam em bronquíolos terminais. Os bronquíolos terminais se ramificam em bronquíolos respiratórios e esses por sua vez, se ramificam e originam ductos alveolares. Os ductos alveolares se ramificam em sacos alveolares e, os sacos alveolares se ramificam em alvéolos pulmonares, que são constituídos por células

distintas, entre as quais, destacam-se pneumócitos do tipo I e do tipo II. Com base nesses resultados, realizou-se um esquema representativo (Figura 8), evidenciando as diferenças morfológicas entre as principais estruturas supracitadas.

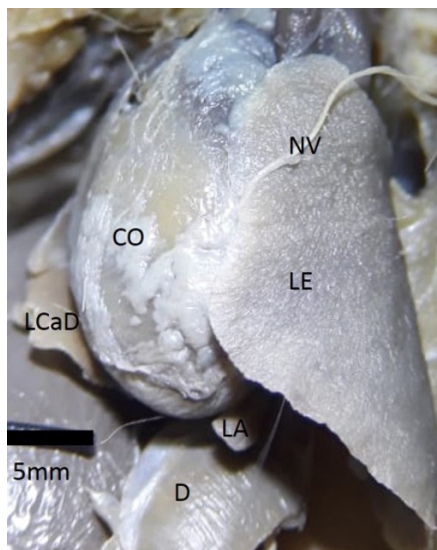


Figura 2: Pulmão “in situ”, é possível observar o coração (CO), revestido pelo pericárdio, o diafragma (D), o lobo pulmonar esquerdo (LE), lobo pulmonar caudal direito (LCaD), o lobo acessório (LA) e o nervo vago (NV). Barra: 5mm.

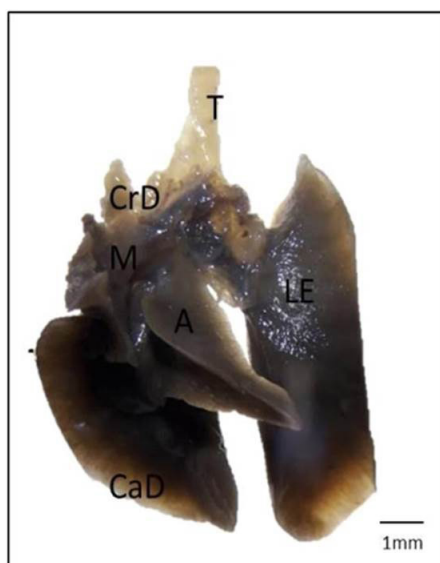


Figura 3 :Vista ventral do pulmão do *Gracilinanus agilis*, observa-se a traqueia (T), a subdivisão do pulmão direito em lobo pulmonar cranial direito (CrD), Lobo pulmonar médio (M), lobo pulmonar acessório (LA), lobo pulmonar caudal direito (CaD); e lobo pulmonar esquerdo (LE). Barra: 1mm.

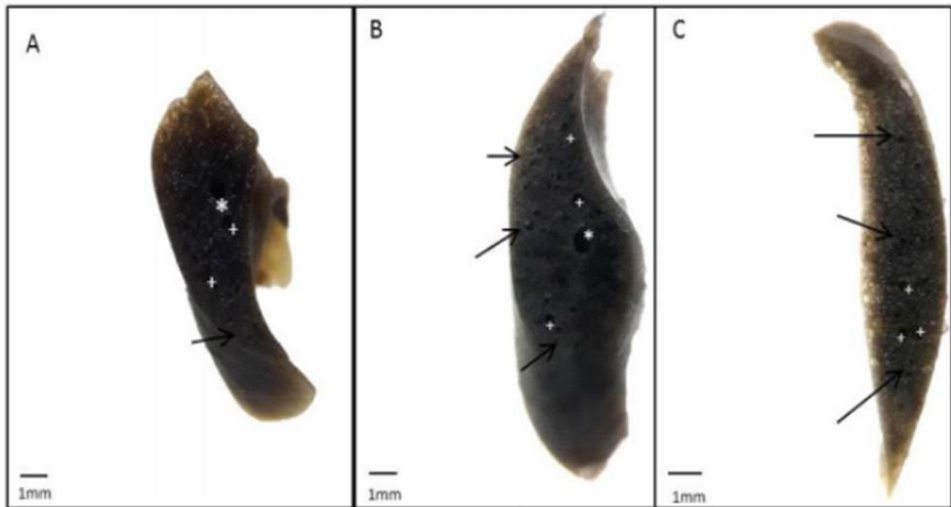


Figura 4: A, porção cranial do lobo pulmonar esquerdo. Observar: brônquio lobar, (*); brônquio segmentar, (+); brônquio subsegmentar (seta). B, porção média do lobo pulmonar esquerdo; brônquio lobar, (*); brônquio segmentar (+); brônquio subsegmentar (seta). C, porção distal do lobo pulmonar esquerdo; brônquio segmentar (+) e brônquio subsegmentar (seta). Barra: 1mm

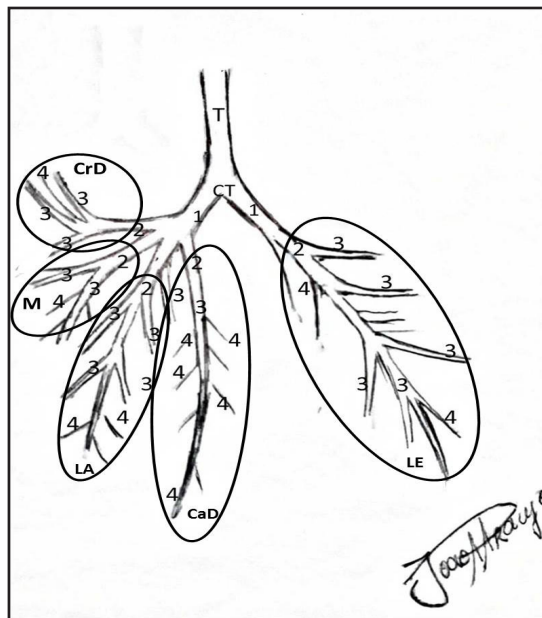


Figura 5: Observar a traqueia (T), carina traqueal (CT), lobo pulmonar cranial direito (CrD), lobo pulmonar médio (M), lobo pulmonar acessório (LA), lobo pulmonar caudal direito (CaD), lobo pulmonar esquerdo (LE). Cada lobo com suas respectivas ramificações da árvore brônquica: brônquios principais (1), brônquios lobares (2), brônquios segmentares (3), brônquios subsegmentares (4).

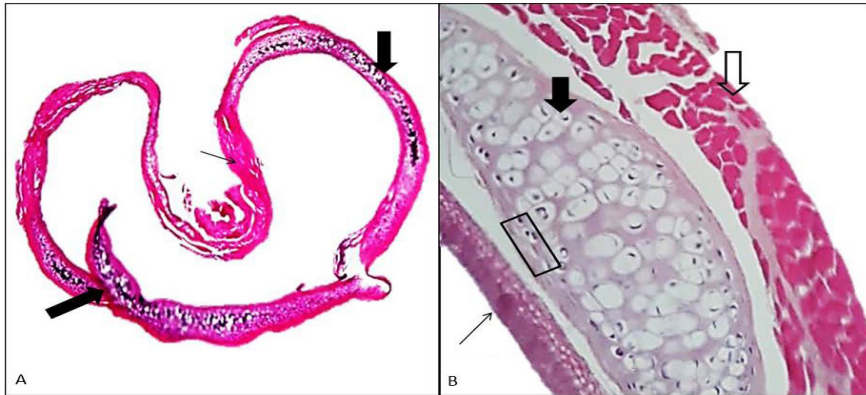


Figura 6: Fotomicrografia da traqueia. A, cartilagem hialina (seta grossa); segmento de musculatura lisa (seta fina). HE, 40x. B- epitélio pseudoestratificado colunar ciliado com células caliciformes (seta fina); condrócitos (seta grossa); seta vazia: músculo liso (seta vazia); pericôndrio e condroblastos (quadrado). HE, 100x.

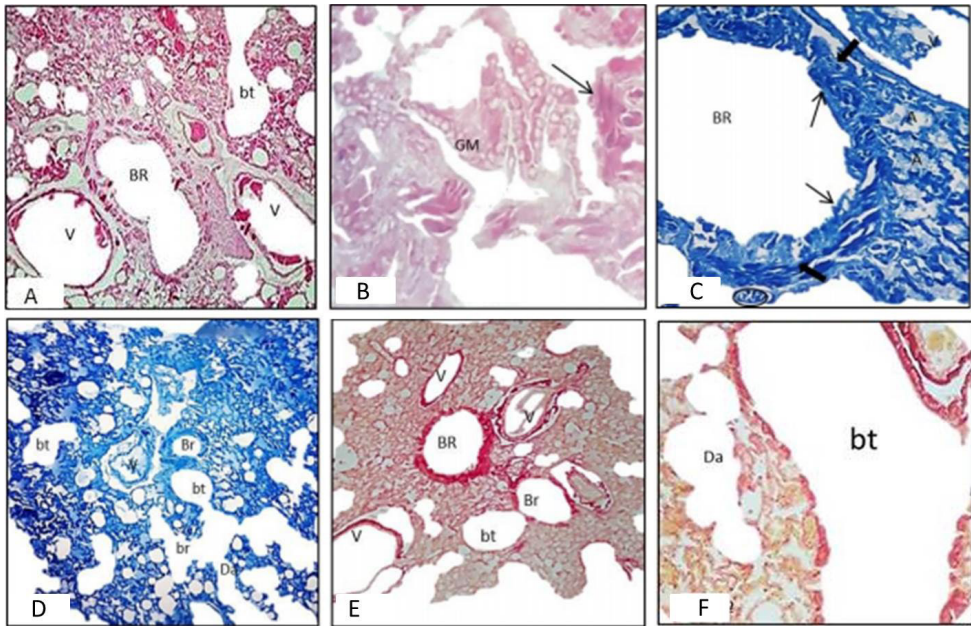


Figura 7: A, Brônquio (BR), bronquíolo terminal (bt), vaso sanguíneo (v). Hematoxilina e eosina, 10x. B, glândula mucosa (GM), músculo liso (seta). Hematoxilina e eosina, 100x. C, brônquio (BR), epitélio simples cúbico (seta fina), musculatura lisa (seta grossa), cartilagem hialina (círculo). alvéolo (A). Azul de Toluidina, 40x. D- bronquíolo (Br), bronquíolo terminal (bt), bronquíolo respiratório (br), vaso sanguíneo (v), ducto alveolar (Da). Azul de Toluidina, 10x. E, brônquio (BR), bronquíolo (Br), bronquíolo terminal (bt), vaso sanguíneo (V). Picosírius, 10x. F, bronquíolo terminal (bt); ducto alveolar (Da). Picosírius, 40x.

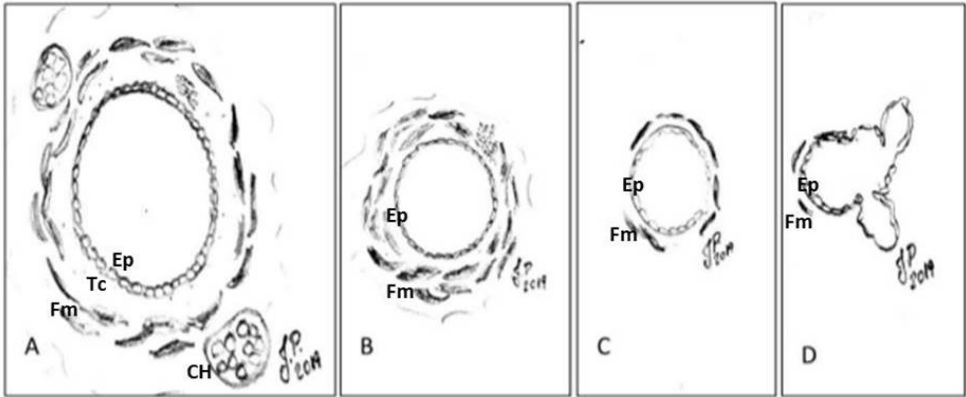


Figura 8: A, brônquio; epitélio simples cúbico (Ep); tecido conjuntivo da lâmina própria (Tc); fibras musculares (Fm); cartilagem hialina (CH). B, bronquíolo; epitélio simples pavimentoso (Ep); fibras musculares (Fm). C, bronquíolo terminal; epitélio simples pavimentoso (Ep), fibras musculares (Fm). D, bronquíolo respiratório; epitélio simples pavimentoso (Ep).

DISCUSSÃO

Segundo Hildebrand (1995), os mamíferos em geral, possuem pulmão ramificado em lobos. Essa ramificação expressiva, que também pode ser observada no *Gracilinanus agilis*, está intimamente relacionada com a alta taxa metabólica desses animais, que necessitam de uma ação mais eficiente do pulmão, por isso, o maior número de ramificações. A divisão do pulmão direito em quatro lobos, cranial, médio, caudal e acessório foi relatada em animais silvestres como quati (*Nasua nasua*), descrito por Oliveira et al. (2012), ouriço-cacheiro (*Sphiggurus villosus*), descrito por Guimarães et al. (2012). Penno et al. (2005), constatou que a cutia (*Dasyprocta aguti*) também possui o pulmão direito subdividido em quatro lobos pulmonares, assim como o caititu (*Pecari tajacu*), descrito por Oliveira et al. (2015).

Hare (1986) também constatou que todos os animais domésticos apresentam seu pulmão direito subdividido em quatro lobos, com exceção dos equinos. A subdivisão do pulmão direito em quatro lobos, cranial, médio, caudal e acessório, foi igualmente observada no *G. agilis*, assim como nas demais espécies silvestres usadas como comparação. Todavia, ao contrário do que foi observado por Oliveira et al. (2015) em relação à ramificação da árvore brônquica de caititus, o *G. agilis*, não apresenta brônquio traqueal, e assim, o único ponto de ramificação da traqueia, presente na espécie estudada, está restrito à carina traqueal. Assim, a morfologia de sua árvore brônquica, se assemelha em partes, à morfologia de animais domésticos como cães e gatos, e de outros animais silvestres como quati, ouriço cacheiro e cutia.

Por meio da análise microscópica, observou-se que a traqueia do *G. agilis*, apresenta a mesma divisão histológica descrita por Gartner e Hiatt (2007), sendo este órgão dividido

histologicamente na camada mucosa, composta pelo epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células caliciformes, ou simplesmente epitélio respiratório e por um tecido conjuntivo frouxo, caracterizando a lâmina própria.

A submucosa apresentando tecido conjuntivo denso não modelado, extremamente rico em glândulas mucosas. As glândulas mucosas são exócrinas, e especializadas na produção de mucinogênio, uma variação de proteína que em contato com a água torna-se mucina, uma secreção pegajosa e principal constituinte do muco. Os ductos dessas glândulas se abrem no epitélio, ultrapassando as camadas de tecido conjuntivo ricas em fibras elásticas. Ainda na camada submucosa se identifica aglomerados de tecidos linfóides (GARTNER; HIATT, 2007). Entretanto, a submucosa da traqueia do *G. agilis* é delgada, e não foi possível observar nódulos linfóides. A presença de glândulas serosas no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio respiratório, foi comprovada em gambás (*Didelphis* sp.) por Bertassoli et al. (2013), que também observou a presença de anéis cartilagosos constituídos por cartilagem hialina, acompanhada de musculatura lisa. No *G. agilis* também se observou essa relação íntima entre cartilagem e musculatura lisa.

Banks (1992) descreveu a presença de glândulas mucosas em segmentos mais profundos da árvore brônquica na espécie felina, e ressaltou que o mesmo não é observado em algumas outras espécies, nas quais, essas glândulas se limitam a porções extrapulmonares da árvore brônquica. No *G. agilis*, assim como na espécie felina, a presença de glândulas mucosas pode ser observada ao longo de segmentos mais profundos da árvore brônquica.

Conclui-se, portanto, que a árvore brônquica do *G. agilis* apresenta diversos pontos semelhantes às outras espécies domésticas e silvestres, mas apresenta particularidades histológicas marcantes, como a diminuição e adelgaçamento das estruturas do revestimento interno dos segmentos de sua árvore brônquica.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento e à UNIFEOB por fornecer o ambiente e materiais necessários à realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, V. Z.; LORETTO, D.; DELCIELLOS, A. C. **Marsupiais na Mata Atlântica**. Ciência Hoje, Rio de Janeiro, v. 38, n. 223, p. 66-69, 2006.

BERTASSOLI, B. M.; SANTOS, A. C.; OLIVEIRA, F. D.; OLIVEIRA, D. M.; NETO, A. C. A.; CARVALHO, A. F. **Morfologia da laringe e traqueia de gambás (*Didelphis* sp.)**. Ciência Animal Brasileira, Goiânia, v. 14, n. 2, p. 222-229, 2013.

BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**. São Paulo: Manole, 2ed.1992p.504.

CAMARGO, N. F.; CRUZ, R. M. S.; RIBEIRO, J. F.; VIEIRA, E. M. **Frugivoria e potencial dispersão de sementes pelo marsupial *Gracilinanus agilis* (Didelphidae: Didelphimorphia) em áreas de Cerrado no Brasil central.** Acta Botanica Brasílica, Belo Horizonte, v. 25, n. 3, p. 646-656, 2011.

CARMIGNOTTO, A.P., SOLARI, S., DE LA SANCHA, N.; COSTA, L. 2015. *Gracilinanus agilis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e. T9417A22169828. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T9417A22169828>. en. Downloaded on 22 November 2020.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores.** Rio de Janeiro, Elsevier, 3 ed. 2007. 592 p.

GUIMARÃES, G. C.; LOPES, G. C.; ROSA, M. C. B.; SESTARI, C. E. O.; OLIVEIRA, F. S. **Lobação pulmonar e distribuição brônquica do ouriço-cacheiro (*Sphiggurus villosus*).** Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, v. 40, n. 2, p. 1- 4, 2012.

HARE, W. C. D. **Sistema respiratório do carnívoro.** In: GETTY, R. D. V. M. (Ed.). Anatomia dos animais domésticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p. 466-490.

HICKMAN JR., C. P.; ROBERTS, L. S.; KEAN, S.; EINSENHOUR, D. J.; LARSON, A.; L'ANSON, H. **Princípios integrados à Zoologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. e-book.

HILDEBRAND, M. **Análise da estrutura dos vertebrados.** São Paulo: Atheneu, 1995. 700 p.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., **Histologia básica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 538 p.

LESSA, G.; COSTA, H. C.; MOURA, M. R. **Cuíca-graciosa (*Gracilinanus agilis*).** Universidade Federal de Viçosa; Museu de Zoologia João Moojen, n. 8.

MONTANARI, T. **Histologia, texto, atlas e roteiro de aulas práticas.** Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2016. 231 p.

OLIVEIRA, G. B.; OLIVEIRA, R. E. M.; BEZERRA, F. V. F.; OLIVEIRA, M. F. **Lobação, árvore brônquica e vascularização do pulmão de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1785),** Revista Caatinga, Mossoró, v. 28, n. 1, p. 247-255, 2015.

OLIVEIRA, V. C.; SOUZA, A. F.; SANTOS, A. C.; BERTOLOSSI, B. M.; ROSA, R. A.; CARVALHO, A. F.; MANÇANARES, C. A. F. **Estudo morfológico do sistema respiratório do quati (*Nasua nasua*).** Revista Biotemas, Florianópolis, v. 25, p. 81-92, 2012.

PENNO, A. K.; CARVALHO, M. A. M.; ASSIS-NETO, A. C.; AZEVEDO, M.; MELLO, G. W. S. **Lobação, ramificação brônquica e distribuição arterial no pulmão da cutia (*Dasyprocta* sp., Mammalia – Rodentia).** Brazilian Journal of Veterinary Research and Science Animal, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 327-332, 2005.

RIBEIRO, J. F. **Avaliação do uso do espaço pelo marsupial *Gracilinanus agilis* em área de cerrado no Brasil Central.** 2011.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W.; BARNASH, T.A. **Atlas de Histologia Descritiva Humana.** Porto Alegre: Artmed. 2012.

EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE GENIPINA A PARTIR DOS FRUTOS VERDES DE GENIPA AMERICANA L

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 04/05/2021

Marcus Vinicius Lia Fook

Dep. De Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande Campina Grande (PB), Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4149843752530120>

Bruna de Freitas Leite

Departamento de Química, Universidade Estadual da Paraíba Campina Grande (PB), Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3594950981664430>

Rafael Braga da Cunha

Dep. De Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande Campina Grande (PB), Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2866448066348667>

João Emídio da Silva Neto

Dep. De Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande Campina Grande (PB), Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5378979151011506>

José Filipe Bacalhau Rodrigues

Dep. De Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande Campina Grande (PB), Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4896638137311286>

Maria Roberta de Oliveira Pinto

Departamento de Química, Universidade Estadual da Paraíba Campina Grande (PB), Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9225790526299506>

Solomon Kweku Sagoe Amoah

Dep. De Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande Campina Grande (PB), Brasil
<http://lattes.cnpq.br/6445921030833387>

RESUMO: A genipina é uma substância incolor encontrada nos frutos de Jenipapo (*Genipa americana* Linnaeus) que, espontaneamente, reage com grupos aminos em presença de oxigênio formando um pigmento de coloração que pode variar do violeta ao azul escuro. Na forma não reagida, ela apresenta propriedades de agente natural de ativação ou reticulante, podendo associar-se covalentemente a diferentes materiais para aumentar sua estabilidade química e física, além de possibilitar a ocorrência de reações biofuncionais. No entanto, o preço elevado do padrão em pó desta substância dificulta os estudos de sua aplicação e, desta forma, surge a necessidade de extrair e purificar a genipina por meio de ensaios laboratoriais de modo a se obter uma melhor relação custo-benefício. Portanto, o objetivo deste trabalho foi promover a extração e purificação de genipina na forma sólida a partir de frutos verdes de Jenipapo (*Genipa americana* L.). Os frutos foram obtidos em um sítio localizado na Ilha de Itamaracá – PE. Para o preparo do extrato, três frutos verdes de tamanhos e pesos semelhantes, foram cortados ao meio e despulpados. O endocarpo e as sementes foram pesados juntos (200 g). A obtenção do produto com a maior qualidade foi alcançada pela extração líquida da polpa com clorofórmio em proporção 2:1 solvente/matriz,

seguida da precipitação e purificação com diclorometano. Amostra de genipina purificada e padrão comercial foram analisados e comparados por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), espectrometria de massas (MS) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Também foi realizada a quantificação por análise gravimétrica da genipina. De acordo com os resultados, a genipina extraída e purificada dos frutos de Jenipapo apresentou fragmentos de massa e bandas de vibração de infravermelho semelhantes ao do padrão comercial. Logo, foi possível obter a genipina com alto grau de pureza.

PALAVRAS-CHAVE: Genipina, *Genipa americana* Linnaeus, Frutos verdes de Jenipapo.

GENIPINE EXTRACTION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION FROM UNRIPE FRUITS OF AMERICAN GENIPA L.

ABSTRACT: Genipin is a colorless substance found in the fruits of Jenipapo (*Genipa americana* Linnaeus) that spontaneously reacts with amino groups in the presence of oxygen to form a coloring pigment which can range from violet to dark blue. In the unreacted form, it has properties of a natural activating or cross-linking agent, and can be covalently associated with different materials to increase its chemical and physical stability, in addition to allowing the occurrence of biofunctional reactions. However, the high price of the powdered standard of this substance makes studies of its application difficult and, thus, the need arises to extract and purify genipin through laboratory tests in order to obtain a better cost-benefit ratio. Therefore, the objective of this work was to promote the extraction and purification of genipin in solid form from green fruits of Jenipapo (*Genipa americana* L.). The fruits were obtained from a farm located on the Island of Itamaracá - PE. To prepare the extract, three green fruits of similar sizes and weights were cut in half and pulped. The endocarp and seeds were weighed together (200 g). The acquisition of the product with the highest quality was achieved by liquid extraction of the pulp with chloroform in a 2: 1 solvent / matrix ratio, followed by precipitation and purification with dichloromethane. Sample of purified genipin and commercial standard were analyzed and compared using thin layer chromatography (CCD), mass spectrometry (MS) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Quantification was also performed by gravimetric analysis of genipin. According to the results, the genipin extracted and purified from Jenipapo fruits showed fragments of mass and infrared vibration bands similar to the commercial standard. Therefore, it was possible to obtain genipin with a high degree of purity.

KEYWORDS: Genipine, *Genipa americana* Linnaeus, Unripe fruits of Jenipapo.

1 | INTRODUÇÃO

O Jenipapo (do tupi-guarani “fruto que serve para pintar”) é o fruto do jenipapeiro, árvore da espécie *Genipa americana* Linnaeus originária do noroeste da América do Sul e distribuída de norte a sul do Brasil. Durante a fase imatura, o pH do fruto e o contato com o oxigênio possibilitam a reação de um metabólito secundário do tipo iridoide (o Metil (1S,2R,6S)-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-dieno-5-carboxilato, comercialmente conhecido como genipina) com grupos amino presentes em sua constituição, formando um pigmento azul. (Bentes, 2014; Bentes et al., 2015; Silva et al.,

2016; Neves et al., 2017; Neves et al., 2018; Neves; Meireles, 2018).

De forma geral, existem três métodos conhecidos para a extração da genipina, são eles: hidrólise enzimática, solventes e ultrassom. É possível notar que até o ano de 2011 as extrações de genipina eram realizadas somente com solventes (Djerassi et al. 1960; Zhou et al. 2005; Wang et al. 2011). Pesquisas têm mostrado que a utilização de solventes pode ser combinada com outros métodos, o que simplifica e barateia o método extrativo por solvente quando comparado a outras metodologias de extração (Yang et al. 2011; Wang et al. 2012; Winotapun et al. 2013; Dong et al. 2014; Zhu et al. 2015).

Na maioria dos vegetais, a genipina pode ser encontrada naturalmente. A escolha do vegetal vai ser influenciada principalmente pela composição percentual de genipina presente no fruto e pela disponibilidade. Por exemplo, no fruto da gardênia, encontrada principalmente na Ásia, o percentual de genipina é de 0,17 %, enquanto no jenipapo pode chegar a 3 % (Djerassi et al. 1960; Ramos-de-la-Peña et al. 2016).

Cada método apresenta sua extração visando à obtenção de um produto específico para a aplicação posterior, e por isso, podem apresentar características inviáveis para este trabalho, cujo intuito é a obtenção do sólido puro. É importante destacar os cuidados na escolha do agente extrator para que não haja riscos de contaminação do sólido extraído, como também na elaboração de um sistema com no mínimo 2 fases, para que se possa realizar a separação da genipina e do geniposídeo desde a extração (Zhu et al., 2015; Bellé, 2017).

A genipina apresenta atividade contra danos por oxidação e trombose, antimicrobiana, anti-inflamatória, protege o hipocampo dos neurônios, doenças hepáticas e diabetes, e gera corantes estáveis para indústria têxtil e alimentícia (*CHRONOPOULOU et al., 2018; SUN et al., 2018*). Além disso, é um agente natural de ativação ou reticulante, que pode ser associada covalentemente a diversos materiais para elevar sua estabilidade física e química e prover a possibilidade de reações biofuncionais, sendo empregada na imobilização de enzimas, liberação gradativa de fármacos, bioadesivos na constituição de próteses para aumentar a resistência mecânica de ossos e cartilagens, nos tratamentos de ferimentos cutâneos, etc. (Velásquez; Rivas; Ocanto, 2014; Ramos-de-La-Peña et al., 2016; Bellé, 2017; Neves; Meireles, 2018).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo extração da genipina sólida a partir do endocarpo e das sementes de frutos verdes de Jenipapo armazenados sob congelamento e análise de sua identidade, pureza e rendimento. A metodologia aplicada será baseada na adaptação do trabalho de Velásquez et al. (2014).

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Os frutos verdes de Jenipapo (*Genipa americana* L.) foram obtidos em um sítio localizado na Ilha de Itamaracá – PE. Os reagentes utilizados na extração foram: HCl (37%;

Neon); Acetona P.A. (P.A.; Dinâmica); n-Hexano (95%; Dinâmica); Clorofórmio (99,8%; Neon); Diclorometano (99,5%; Vetec); Acetato de Etila (P.A.; Química Moderna).

O processo de extração da genipina dos frutos verdes de *Genipa americana* L. ocorreu de acordo com as etapas ilustradas pela Fig. 1.

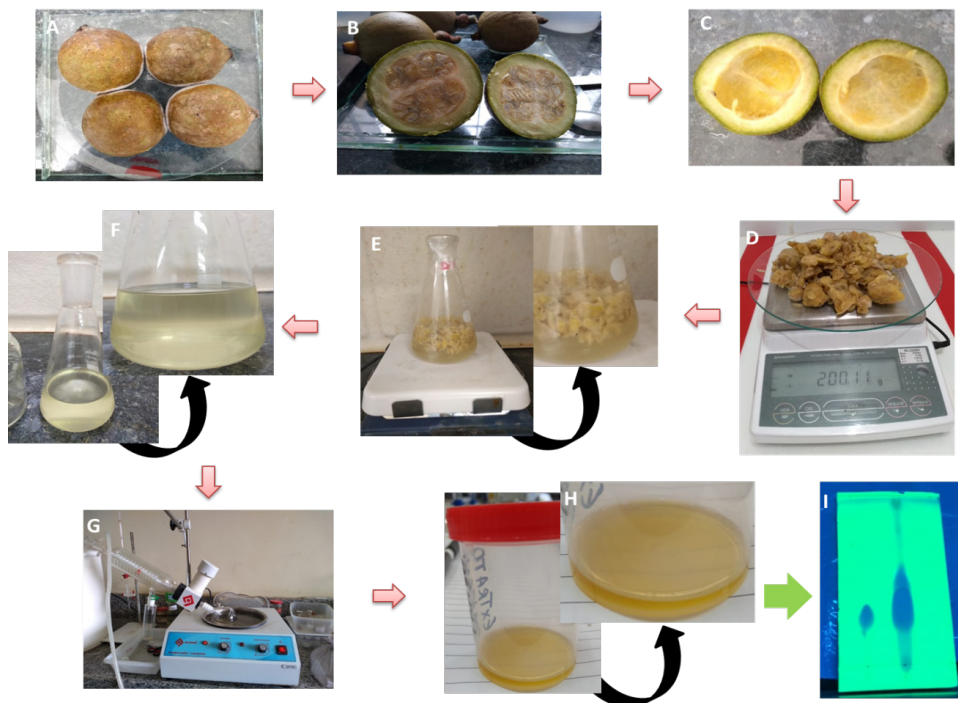


Figura 1. Fluxograma de extração da genipina.

Fonte: Própria.

Três frutos verdes, de tamanhos e pesos semelhantes, foram cortados ao meio e despolpados. O endocarpo e as sementes foram misturados para serem pesados (amostra com 200g). A amostra da polpa pesada foi então colocada em um béquer de plástico, onde foi acidificada. Em seguida, foi acrescido 400 mL de clorofórmio à mistura, com maceração contínua até que as sementes estivessem o mais separadas possível da polpa. Esta foi então colocada sob agitação moderada por um tempo total de 2h e 30min.

A amostra foi então filtrada por gravidade com papel de filtro qualitativo e o extrato foi armazenado e colocado sob refrigeração até o momento da evaporação do solvente.

O extrato foi concentrado por meio da remoção do solvente em um rotaevaporador à temperatura ambiente por 2 horas. O líquido resultante (cor de mel, odor agudo de jenipapo e consistência oleaginosa) foi armazenado em um frasco coletor com tampa e colocado sob refrigeração até a etapa de precipitação. Antes de realizar o procedimento de precipitação

da substância, uma CCD do extrato foi realizada para confirmação de sua presença.

- Purificação da genipina sólida

Ao extrato foi adicionado algumas gotas de acetona P.A. para induzir a precipitação da genipina, seguida da mistura com n-hexano e filtrado a vácuo. O procedimento foi repetido no filtrado e ambos os sólidos retidos foram misturados. Uma pequena quantidade de amostra foi retirada e uma nova CCD realizada para mapear a remoção das impurezas.

O sólido foi raspado do papel de filtro e colocado em um novo frasco coletor, onde foi misturado ao diclorometano. Um banho-maria foi preparado e o frasco foi submetido à aquecimento brando (~ 70°C). Uma vez solubilizado por completo o sólido no solvente, o frasco foi colocado em um banho de gelo até total precipitação da genipina. Realizou-se então uma filtração a vácuo e o resíduo resultante foi armazenado em novo frasco coletor. A Fig.2 representa o fluxograma de recuperação da genipina.

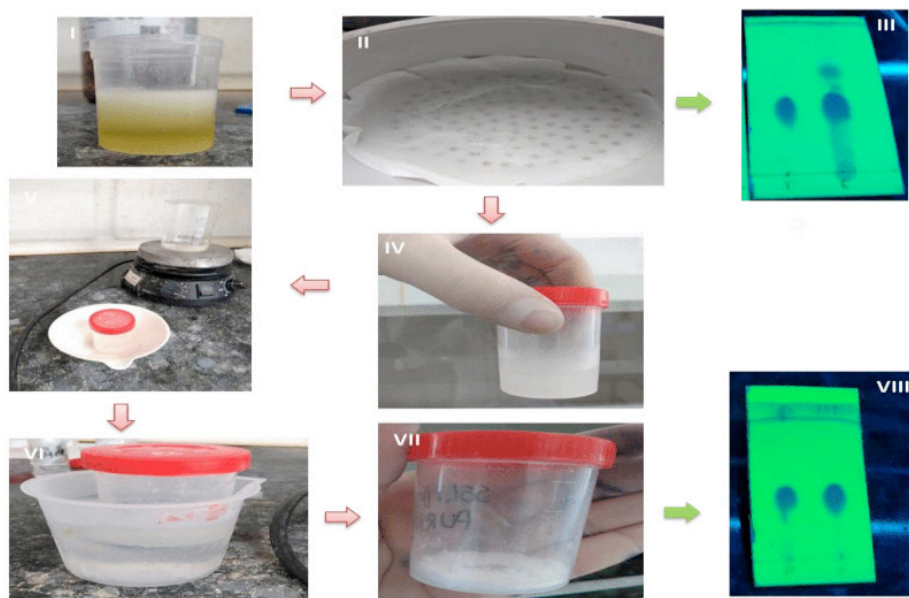


Figura 2. Fluxograma de recuperação da genipina.

Fonte: Própria.

O extrato obtido foi submetido a cromatografia em camada delgada (CCD), comparado-o com a genipina comercial. Quantificação da genipina extraído foi por análise gravimétrica. Um Espectrômetro de Massa da Perkin-Elmer modelo AxION 2 TOF foi utilizada para verificar a massa molar da genipina comercial e o sólido obtido do processo extrativo. Além disso, ambas foram avaliadas por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Por CCD, foi observado grande quantidade de genipina - fato reforçado pelo fator de retenção (RF) do padrão, no entanto, ainda foi observado a presença de impurezas ou outras substâncias na amostra extraída. Neste sentido, a produto extraído foi submetido a purificação como descrita na metodologia. Após a purificação, foi observado que o sólido branco obtido demonstrou excelente correspondência com o padrão e ausência de impurezas ou outras substâncias.

3.2 Quantificação da genipina

A massa média do frasco foi de 5,2602g e o conjunto (massa do frasco e a genipina) pesou 5,4475g. Logo a massa de genipina obtida foi de:

$$M_{\text{genipina}} = 5,4475\text{g} - 5,2602\text{g} = 0,1873\text{g}$$

O rendimento em massa da extração é dado por:

$$R(\%) = (M_{\text{genipina}} / M_{\text{polpa}}) * 100 = (0,1873\text{g} / 200,11\text{g}) * 100 = 0,0936\%$$

Realizando um procedimento de secagem por liofilização com a mesma massa de polpa, foi possível determinar que o fruto apresentou cerca de 70% (m/m) de água em sua composição. Logo, a estimativa para o rendimento do processo extrativo em base seca foi de:

$$M_{\text{polpa seca}} = 30\% \cdot 200,11\text{g} = 60,033\text{g}$$

$$M_{\text{genipina}} = 5,4475\text{g} - 5,2602\text{g} = 0,1873\text{g}$$

O rendimento em massa seca da extração é dado por:

$$R(\%) = (M_{\text{genipina}} / M_{\text{polpa}}) * 100 = (0,1873 / 60,033\text{g}) * 100 = \mathbf{0,3120\%}.$$

3.3 Espectrometria de Massa

A Fig. 3 representa os espectros obtidos:

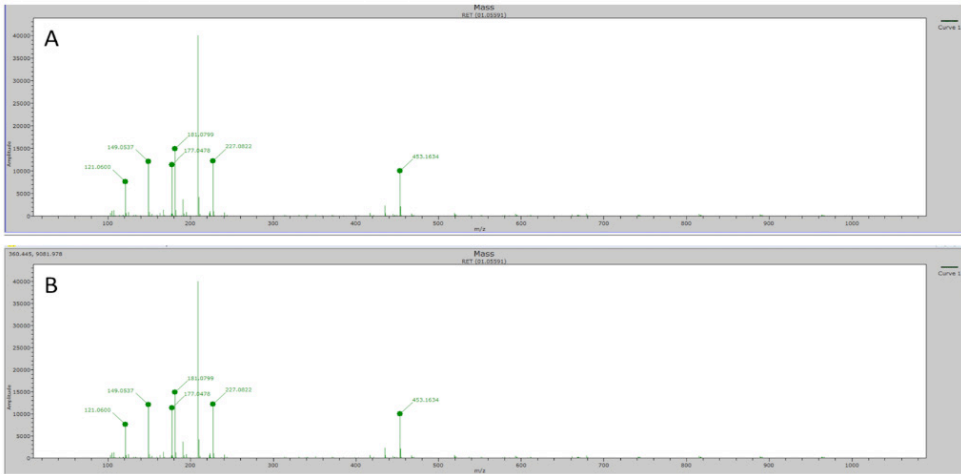


Figura 3. Espectros de massa da A) Genipina Padrão e B) Genipina isolada da *Genipa americana* L.

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os espectros, corroborando os resultados com a identificação realizada pela CCD, e comprovando a ausência de quaisquer outras substâncias que poderiam estar contaminando o sólido. Observa-se no espectro um valor m/z em 227,0822 que é atribuído a massa da genipina $[C_{11}H_{14}O_5 + H]^+$ já que o espectro foi adquirido no modo positivo e sabendo que a massa molar de genipina é 226,2 g/mol. A m/z em 453,1634 é a $[2M+H]^+$ da genipina.

3.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As bandas de absorção do FTIR para o padrão comercial e a *Genipa americana* L. estão ilustradas na Fig. 4.

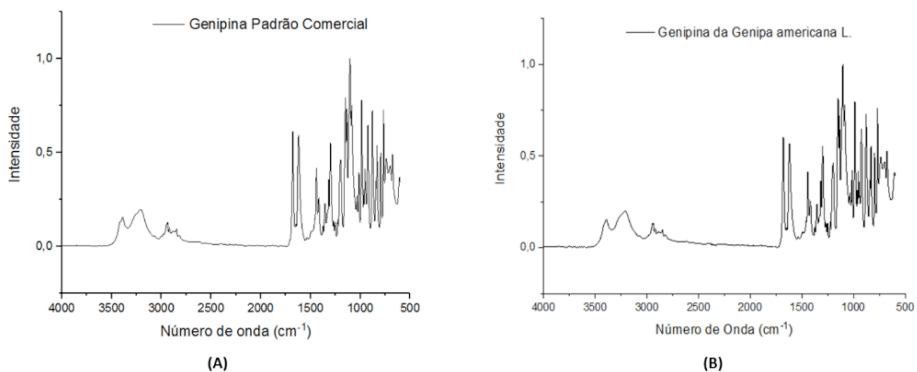


Figura 4. Espectro de FTIR do (A) Padrão Comercial e (B) Genipina da *Genipa americana* L.

Na Figura 4 mostra os espectros de infravermelho da genipina comercial e da genipina

extraída no laboratório CERTBIO. Observa-se que os espectros são similares e apresentam bandas características dos grupos funcionais da genipina, como: deformação axial de OH em 3392 cm^{-1} (OH livre) e em 3212 cm^{-1} (OH em ligação de hidrogênio); deformação axial de C=C de alcenos (em 1621 cm^{-1}); a vibração de 1150 cm^{-1} e estiramento com formação de pico em 1105 cm^{-1} são referentes às vibrações C-O e C-O, respectivamente, e a vibração de 1681 cm^{-1} corresponde ao grupo dos ácidos carboxílicos e são características das C=O. As bandas características do padrão de genipina comercial não apresentaram diferenças significativas das bandas apresentadas pela amostra da genipina extraído da *Genipa americana* L.

Desta forma, é possível afirmar que o FTIR reforça a identidade do produto obtido - previamente atestada pela CCD - e a ausência de substâncias diferentes de genipina em sua constituição, ou seja, sua elevada pureza.

4 | CONCLUSÕES

De acordo com os resultados foi possível a extração da genipina sólida a partir do endocarpo e das sementes de frutos verdes de Jenipapo. A CCD do sólido branco demonstrou excelente correspondência com o padrão comercial e ausência de impurezas. O FTIR e a espectrometria de massas reforçaram a identidade do produto obtido. Logo, foi possível obter uma genipina com alto grau de pureza.

AGRADECIMENTOS

A UFCG, Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO pela realização dos ensaios e o Ministério da Saúde pelo fomento.

REFERÊNCIAS

BELLÉ, A. S. Extração de genipina a partir do jenipapo (*Genipa americana* Linnaeus) para imobilização de enzimas. 2017. 171 p. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

BENTES, A. S. Compostos bioativos de jenipapo, laranja e manga: Composição e desenvolvimento de métodos de extração. 2010. 130 p. Tese (Ciência dos Alimentos) — Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

BENTES, A. S. et al. Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit on the formation of blue pigment. *Food Science and Technology*. v. 52, n. 6, p. 3919 – 3924, 2015.

C Djerassi, J Gray, F Kincl. Naturally Occurring Oxygen Heterocyclics. IX. Isolation and Characterization of Genipin. *J. Organic Chemistry*, 25(12), 2174-2177 (1960).

CHRONOPOULOU, L. et al. A physico-chemical approach to the study of genipin crosslinking of biofabricated peptide hydrogels. *Process Biochemistry*, v. 70, p. 110–116, 2018.

- Dong, Y. et al., 2014. Biotransformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* to genipin by *Trichoderma harzianum* CGMCC 2979. *Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis*, 35(9), pp.1534–1546.
- NEVES, G. N. et al. Extraction of bioactive compounds from genipap (*Genipa americana* L.) by pressurized ethanol: Iridoids, phenolic content and antioxidant activity. *Food Research International*. v. 102, p. 595 – 604, 2017.
- NEVES, G. N. et al. Identification and quantification of genipin and geniposide from *Genipa americana* L by HPLC-DAD using a focused-core column. *Food Science and Technology*. v. 38, n. 1, p. 116 – 122, 2018.
- NEVES, G. N.; MEIRELES, M. A. A. Genipap: A new perspective on natural colorants for the food industry. *Food and Public Health*. v. 8, n. 1, p. 21 – 33, 2018.
- RAMOS-DE-LA-PENÁ, A. M. A review through recovery, purification and identification of genipin. *Phytochem Reviews*. v. 15, p. 37-49, 2016.
- SILVA, D. B. et al. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para futuro – Região centro-oeste. Ministério do Meio Ambiente – Secretaria de Biodiversidade. Brasília, 2016, p.228-236.
- SUN, Y. S. et al. Bone cell responses to a low elastic modulus titanium alloy surface immobilized with the natural cross-linker genipin. *Surface and Coatings Technology*, v. 350, p. 918–924, 2018.
- VESLÁSQUEZ, C. J.; RIVAS A; OCANTO, I. S. Obtención de genipina a partir de caruto (*Genipa americana* L.) dellano venezolano. *Avances en Química*. v. 9, n. 2, p. 75 – 86, 2014.
- Wang, S.C. et al., 2011. Using orthogonal arrays to obtain efficient and reproducible extraction conditions of geniposide and genipin in gardenia fruit with liquid chromatography-mass spectrometry determinations. *Journal of Food and Drug Analysis*, 19(4), pp.486–494.
- Wang, X.S. et al., 2012. Ultrasound-assisted extraction of geniposide from *Gardenia jasminoides*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(6), pp.1155–1159.
- Winotapun, W. et al., 2013. One-enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption 170 and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from gardenia fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 53(2), pp.92–96.
- Yang, Y.S. et al., 2011. Transformation of geniposide into genipin by immobilized β glucosidase in a two-phase aqueous-organic system. *Molecules*, 16(5), pp.4295– 4304.
- Zhou, T. et al., 2005. Large-scale isolation and purification of geniposide from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1100(1), pp.76–80.
- ZHU, Y. et al., 2015. A Substrate Fed-Batch Biphasic Catalysis Process for the Production of Natural Crosslinking Agent Genipin with *Fusarium solani* ACCC 36223. *J Microbiol Biotechnol*.

PROSPECÇÃO *IN SILICO* DE ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNINOCELULOLÍTICO EM *BACILLUS THURINGIENSIS*

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 05/05/2021

Dimitri Sokolowski

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília
Brasília - DF
<http://lattes.cnpq.br/6130952385155283>

Edvar Carneiro Silva Junior

Centro Universitário de Brasília
Brasília - DF
<http://lattes.cnpq.br/6003910369013056>

Paulo Roberto Martins Queiroz

Centro Universitário de Brasília
Brasília - DF
<http://lattes.cnpq.br/9245644174659431>

RESUMO: A busca por novas fontes de energia alternativa avança à medida que a disponibilidade de recursos petróleo dependentes diminuem. Bactérias do gênero *Bacillus spp.* são produtoras de enzimas do complexo ligninocelulolítico e apresentam grande potencial de uso na produção de biocombustíveis. Todavia, algumas espécies do gênero *Bacillus* ainda carecem de maiores investigações para identificar tais enzimas, como é o caso do *Bacillus thuringiensis*. Portanto, o objetivo do presente trabalho é identificar e descrever a presença de enzimas do complexo ligninocelulolítico em *B. thuringiensis*. Os proteomas das bactérias utilizadas no estudo foram coletados no banco de dados NCBI e os dados foram pré-tratados utilizando linguagem

de programação *Python*. Um *script* em VBA foi escrito para semi automatizar a procura das enzimas desejadas nos proteomas das bactérias via interface gráfica *Excel*. Por fim, foi utilizado o programa Clustal Omega para construção de árvore filogenética das espécies/estirpes coletadas. Foram encontrados 4 diferentes tipos de enzimas no proteoma de *B. thuringiensis*: 6-phospho- β -glucosidase, α -glucosidase, α -amilase e laccase. Ao analisar outras espécies do gênero, foi identificado um maior número e diversidade de enzimas do complexo ligninocelulolítico principalmente em *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. velezensis* e *B. subtilis*. Conclui-se que apesar de *B. thuringiensis* apresentar um potencial na degradação de biomassa, outras espécies do gênero podem ser mais eficientes em aplicações reais. Esses achados podem ampliar o potencial biotecnológico de *B. thuringiensis*, para produção de biocombustíveis, antes restrito à produção de bioinseticidas e plantas resistentes à praga.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus thuringiensis*; Biocombustíveis; Enzimas; Ligninocelulolítico.

IN SILICO PROSPECTION OF LIGNOCELLULOLYTIC COMPLEX ENZYMES IN *BACILLUS THURINGIENSIS*

ABSTRACT: The search for new alternative energy sources advances as the availability of petroleum dependent resources decreases. Bacteria of *Bacillus spp.* genus are producers of lignocellulolytic complex enzymes and present a great potential in biofuels production. However, some species in the *Bacillus* genus still need further investigations to identify these enzymes,

which is the case of *Bacillus thuringiensis*. Therefore, the objective of this work is to identify and describe the presence of lignocellulolytic complex enzymes in *B. thuringiensis*. The proteomes of the bacteria in this study were collected from the NCBI data bank and the data were pretreated using python programming language. A script in VBA was written to semi automate the search for the enzymes of interest in the bacteria's proteome files through Excel interface. Lastly, Clustaw Omega program was used to generate a phylogenetic tree for the species/lineages collected. Four different enzymes from *B. thuringiensis* proteome were identified: 6-phospho- β -glucosidase, α -glucosidase, α -amylase and laccase. Analyzing other's species in the genus, it was found a bigger number and a greater diversity of lignocellulolytic complex enzymes, specially in *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. velezensis* and *B. subtilis*. It is concluded that although *B. thuringiensis* has a potential for biomass degradation, other species of the genus may be more efficient in real applications. These findings may expand the biotechnological potential of *B. thuringiensis* to biofuel production, previously restricted to the production of bioinsecticides and plants resistant to pests.

KEYWORDS: *Bacillus thuringiensis*; Biofuels; Enzymes; Lignocellulolytic.

1 | INTRODUÇÃO

O amplo uso e queima de derivados do petróleo representa grande parte da matriz energética consumida mundialmente. O diesel, por exemplo, é um combustível muito utilizado na movimentação de veículos, seja para transporte ou para aplicações industriais. Tais combustíveis, de fontes não renováveis, possuem esgotamento premeditado para um futuro próximo, podendo colocar em risco grande parte da estrutura energética global (FERREIRA *et al.*, 2014).

A produção e pesquisa de vias energéticas alternativas vêm ganhando notoriedade devido ao potencial de menor produção de gases poluentes e contínuo esgotamento dos combustíveis fósseis (AKIA *et al.*, 2014). Todavia, dificuldades de implantação de matrizes energéticas “verdes” são consideráveis, em parte pelo alto custo da substituição da infraestrutura mundial petróleo-dependente e pelo baixo rendimento energético comparado às fontes fósseis em utilização atualmente (CARNEIRO *et al.*, 2017).

As biomassas são, potencialmente, todas e quaisquer formas de matéria orgânica capazes de serem convertidas em energia (BRACMORT, 2013). Devido a abundância de biomassas na natureza e nas formas artificialmente produzidas, a partir de resíduos de colheita, desperdício alimentar ou resíduos sólidos de esgoto, as biomassas tornaram-se uma fonte viável e importante para produção de energia pela conversão das biomassas em biocombustíveis de segunda geração (TUCK *et al.*, 2012).

As matrizes estruturais básicas das paredes celulares das biomassas são muito similares, apesar da proporção de cada componente variar dependendo da origem e do tipo de substrato orgânico (STEFANIDIS *et al.*, 2013). Três principais componentes formam a biomassa: celulose, hemicelulose e lignina. O entendimento da organização e composição primordial das biomassas lignocelulolíticas são essenciais para o desenho de métodos de

degradação e reaproveitamento eficazes e inteligentes, e influenciam o grau de degradação de biomassas (JIMENEZ-FLORES *et al.*, 2010; CHEN, 2014).

A descoberta de enzimas em microrganismos capazes de degradar biomassa possibilitou a aplicação de agentes biológicos no pré-tratamento da biomassa e consiste numa abordagem promissora na produção de biocombustíveis (AGBOR *et al.*, 2011). Alguns fungos, por exemplo, são excelentes produtores de celulases e enzimas degradadoras de lignina, mas diversas bactérias produtoras de enzimas do complexo ligninocelulolítico já foram descritas na literatura e são importantes focos de estudo (MAKI; LEUNG; QIN, 2009).

O gênero *Bacillus spp.* é constituído por bactérias, em sua maioria, gram-positivas, aeróbicas e formadoras de esporos que podem garantir grande resistência e longa vida destes microrganismos em ambientes hostis. Esses microrganismos são encontrados em abundância na natureza como no solo, vegetação, águas, alimentos, insetos e, em determinadas situações, em seres humanos (FANGIO; ROURA; FRITZ, 2010).

Dentro desse contexto, várias espécies de bactérias do gênero *Bacillus spp.* foram descritas como produtoras de enzimas ligninocelulolíticas (RASTOGI *et al.*, 2010). Alguns membros, no entanto, ainda carecem de investigações mais aprofundadas a respeito do seu potencial enzimático quanto à degradação de biomassa, como é o caso do *Bacillus thuringiensis* (Bt). O estudo dessa bactéria específica em busca de enzimas do complexo ligninocelulolítico poderia, não somente ampliar o número de bactérias descritas com potencial degradador de biomassa, mas também expandir as propriedades biotecnológicas já descritas nesse microrganismo (SANAHUJA *et al.*, 2011).

Com isso, o objetivo do presente trabalho foi identificar e descrever a presença de enzimas do complexo em *B. thuringiensis*.

2 | METODOLOGIA

2.1 Coleta dos dados

Os dados utilizados para realização do presente trabalho foram coletados do banco de dados *Assembly* administrado pelo NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*). Essa base de dados provê informações básicas a respeito de genomas montados e proteomas elucidados de diferentes organismos. Após o *download* dos proteomas das bactérias desejadas, os arquivos foram convertidos do formato *.faa* para *.txt*.

2.2 Tratamento de dados

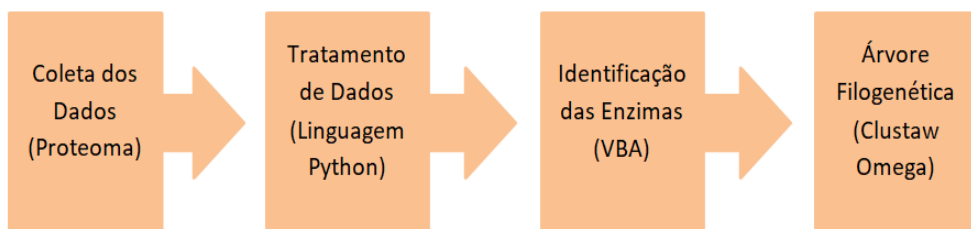
O grande volume de dados obtidos requisitou um pré-tratamento básico. Foi utilizado um *script* em linguagem python (versão 3.6.9) utilizando o IDE (do inglês, *Integrated Development Environment*) Atom (versão 1.50), para conversão e formatação dos arquivos dos proteomas completos em outros arquivos *.txt* separados e menores.

2.3 Identificação de enzimas

Para busca das enzimas desejadas no proteoma das estirpes de cada espécie, foi escrito um *script* em VBA (do inglês, *Visual Basic Applications*) que possibilitou a automatização da procura das enzimas nos arquivos dos proteomas via interface gráfica Excel. A procura das enzimas desejadas se deu pela inserção dos nomes das enzimas, em inglês, no programa, descritas pela literatura e associadas a degradação de biomassa (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; SAINI; SAINI; TEWARI, 2015; GONG *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018). As enzimas que, eventualmente, possam ter sido selecionadas, mas que não tenham correlação ao propósito da pesquisa foram excluídas.

2.4 Construção da Árvore Filogenética

Por fim, a inferência de similaridade entre as diferentes espécies e estirpes coletadas foi realizada pelo programa Clustal Omega (SIEVERS *et al.*, 2011) utilizando o gene *gyrA*. A partir da árvore filogenética construída pôde-se propor relação evolutiva e de semelhança entre as espécies e estirpes estudadas. O **fluxograma 1** esquematiza as etapas do trabalho.



Fluxograma 1. Metodologia de trabalho.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram coletadas nove diferentes espécies de *Bacillus* e para cada espécie foram estudadas três estirpes cada, resultando na coleta total de vinte e sete proteomas diferentes. Na **tabela 1** encontra-se a relação das espécies analisadas e suas respectivas estirpes.

Espécie de <i>Bacillus</i> spp.	Estirpe 1	Estirpe 2	Estirpe 3
<i>B. amyloliquefaciens</i>	FS1092	KC41	Y2
<i>B. anthracis</i>	2000013094	2000031021	AFS072084
<i>B. cereus</i>	ATCC14579	MLY1	SB1
<i>B. licheniformis</i>	BL1202	DSM13	SCDB34
<i>B. megaterium</i>	AFS057444	ATCC14581	M4
<i>B. pumilus</i>	145	SH-B9	SH-B11
<i>B. subtilis</i>	168	MB9_01	PY79
<i>B. thuringiensis</i>	ATCC35646	ATCC 10972	C15
<i>B. velezensis</i>	9912D	CBMB205	FZB42

Tabela 1. Relação de espécies e estirpes coletadas para estudo.

Em todas as espécies e estirpes, investigadas no presente trabalho, foram encontradas enzimas descritas na literatura com potencial de degradação de biomassa (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). A produção de enzimas ligninocelulolíticas por *Bacillus* não é novidade. Estudos conduzidos por Jones e colaboradores (2012) permitiram a identificação de complexos multienzimáticos em *B. subtilis* capazes de degradar xilana, um importante componente da hemicelulose de biomassas. Ainda, a identificação de novas enzimas, como endo-1,4- β -xilânase, em *B. amyloliquefaciens* propicia novas aplicações desse microrganismo na sacarificação de grãos de interesse na produção de biocombustíveis (AMORE *et al.*, 2015).

Apesar da grande relevância biotecnológica de *B. thuringiensis* na produção de bioinseticidas e desenvolvimento de plantas resistentes a pragas (SANAHUJA *et al.*, 2011), seu potencial na produção de enzimas ligninocelulolíticas ainda não é totalmente conhecido. Lin e colaboradores (2012) reportaram a produção de celulases de *B. thuringiensis* com potencial hidrolítico contra carboximetil celulose (CMC). Apesar disso, a identificação e caracterização estrutural das enzimas não foi realizada. As análises de bioinformática conduzidas no presente estudo identificaram no total quatro classes distintas de enzimas em *B. thuringiensis* capazes de degradar biomassa. São essas: 6-fosfo- α -glicosidase, α -glicosidase, α -amilase e lacase (tabela 2).

Enzimas identificadas	<i>B. thuringiensis</i>		
	ATCC 35646	ATCC 10972	C15
6-phospho- β -glicosidase	O	O	O
α -glicosidase	X	O	O
α -amilase	O	O	O
laccase	X	O	O

Tabela 2. Enzimas presentes no proteoma de diferentes estirpes de *B. thuringiensis*. O - Enzimas encontradas, X - Enzimas não encontradas.

As α -amilases, assim como, α -glicosidases, são consideradas enzimas degradadoras de amido (MARQUES *et al.*, 2018). As macromoléculas de amido são polímeros de carboidratos de plantas que atuam como reservas de carboidratos e são formados por monômeros de açúcar conectados por ligações α -1,4-glicosídicas e ramificados por ligações α -1,6-glicosídicas (BERTOFT, 2017). A grande abundância de açúcares presentes no amido, o faz um substrato viável e factível para fermentação e possivelmente para produção de biocombustíveis (MARQUES *et al.*, 2018).

O uso de α -amilases de microrganismos para degradação de amido já foi amplamente descrito na literatura, sendo essa enzima responsável pela hidrólise das ligações α -1,4-glicosídicas liberando produtos como glicose e maltose, açúcares esses importantes para processo de sacarificação e para produção de biocombustíveis (RUIZ *et al.*, 2011). As α -glicosidases promovem o rompimento tanto das ligações α -1,4-glicosídicas quanto α -1,6-glicosídicas dos açúcares não redutores do amido para produção de glicose (HII *et al.*, 2012). Ainda, as enzimas da família glicosil hidrolases (GH4), na qual a 6-fosfo-glicosidase incluem-se, também são relacionadas a ruptura de ligações Beta de dissacarídeos naturalmente fosforilados (YIP; WITHERS, 2004). As lacases são enzimas polifenoloxidasas capazes de promover a oxidação de componentes aromáticos de substratos orgânicos, tendo como oxigênio o aceptor de elétrons final (MADHAVI; LELE, 2009).

Após a identificação das classes enzimáticas encontradas no proteoma de *B. thuringiensis* foram investigadas a quantidade total de enzimas ligninocelulolíticas. O *script* desenvolvido identificou no total 17 enzimas, produzidas pelas 3 estirpes coletadas, onde destas, sete são α -amilases, quatro são α -glicosidases, quatro 6-fosfo- β -glicosidase e duas lacases. Não houve diferenças significativas quanto ao total produzido por cada estirpe. No entanto, a estirpe ATCC 10972 possui uma α -amilase a mais que as demais, e a ATCC 35646 apresenta uma 6-fosfo- β -glicosidase adicional (**gráfico 1**).

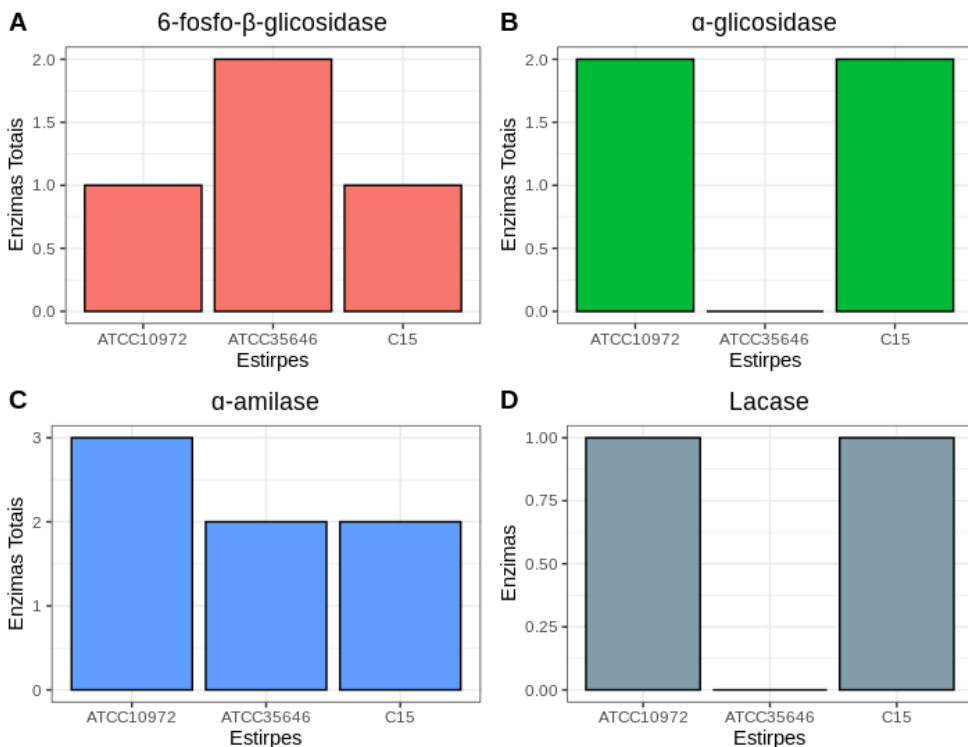


Gráfico 1. **(A)** Número total de 6-fosfo-β-glicosidase nas diferentes estirpes de *B. thuringiensis*. **(B)** Número total de α-glicosidase nas diferentes estirpes de *B. thuringiensis*. **(C)** Número total de α-amilase nas diferentes estirpes de *B. thuringiensis*. **(D)** Número total de Lacase nas diferentes estirpes de *B. thuringiensis*.

Devido a sua complexidade e abundância de polímeros aromáticos, oriundas da polimerização de monolignóis, a lignina é uma fração da biomassa muito suscetível a ação das lacases (VANHOLME *et al.*, 2010; RALPH; LAPIERRE; BOERJAN, 2019). A identificação de lacases em diferentes membros do gênero *Bacillus* já foram muito bem descritas na literatura (SONDHI *et al.*, 2014; RAJESWARI; BHUWANESVARI, 2016). No entanto, apesar das descrições de lacases em *B. thuringiensis* não serem consideráveis, Olukanni e colaboradores (2013) indicaram a possível produção de lacases em *B. thuringiensis* estirpe RUN1 e seu envolvimento na degradação de corantes industriais.

A avaliação do potencial total de degradação de biomassa em *B. thuringiensis* é difícil principalmente pela falta de dados e estudos na literatura. O número considerável de α-amilases pode indicar capacidade considerável na degradação de substratos de amido. Um estudo conduzido por Bozic e colaboradores (2011) identificou uma α-amilase termoestável altamente eficiente na degradação de amido bruto em *B. licheniformis*. A eficácia das α-amilases, quanto à degradação de biomassa, de *B. thuringiensis* ainda deve, no entanto, ser avaliada. A presença de lacases em *B. thuringiensis* amplia o potencial da

bactéria em processos de deslignificação (ROTH; SPIESS, 2015), podendo favorecer a produção de monômeros de açúcar de biomassa total, e amplia o potencial biotecnológico da bactéria na degradação de poluentes e descoloração de rejeitos industriais (GUAN *et al.*, 2018)

A identificação das enzimas do complexo ligninocelulolítico nas várias espécies de *Bacillus* identificou uma grande diversidade entre as espécies (**Tabela 3**). As espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus* foram as espécies nas quais foram identificadas a maior diversidade enzimática. As enzimas mais comumente encontradas entre as espécies incluem: 6-fosfo- β -glicosidase, α -glicosidase, α -amilase, lacase, sacarose-6-fosfato hidrolase e pectato liase. A enzima lacase foi encontrada em todas as espécies estudadas, indicando um alto grau de conservação no gênero.

A grande abundância de distintas espécies de *Bacillus* encontradas nos mais diversos ambientes é um indicativo da heterogeneidade e diversidade do gênero (OGUNTOYINBO, 2007; CIHAN *et al.*, 2012). A construção da árvore filogenética, com os dados coletados, apontou uma elevada proximidade evolutiva entre as espécies *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis*. Essa proximidade era esperada, pois tais bactérias são membros do grupo *B. cereus* apresentando entre 99.5% e 100% de similaridade genética, muitas vezes sendo necessários outros métodos de análise para diferenciação (PORWAL *et al.*, 2009). Ademais, as demais espécies e suas respectivas estirpes permaneceram próximas entre si.

Enzimas	Espécies de <i>Bacillus</i>								
	Amyloque-faciens	An-thacis	Ce-reus	Licheni-formis	Megate-rium	Pu-milus	Subiti-lis	Thurin-giensis	Velezen-sis
endoglucanase	X	X	X	O	X	O	X	X	X
β -glucanase	X	X	X	X	X	X	O	X	X
glucohydrolase	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6-phospho- α -glucosidase	O	X	X	O	X	O	O	X	O
6-phospho- β -glucosidase	O	O	O	O	O	O	O	O	O
α -glucosidase	O	O	O	O	O	O	O	O	O
aryl-phospho- β -D-glucosidase	X	X	X	X	X	X	O	X	X
α -amylase	X	O	O	O	O	X	O	O	X
glycoside hydrolase 43 family	O	X	X	O	X	O	O	X	O
arabinoxylan	X	X	X	X	X	X	X	X	X
arabinofuranohydrolase	X	X	X	X	X	X	O	X	X
glucuronoxylanase	O	X	X	X	X	O	X	X	O
arabinan endo-1,5- α -L-arabinosidase	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Endo- α -(1-5)-L-arabinanase	X	X	X	X	X	X	X	X	X
α -N-arabinofuranoside	X	X	X	X	X	O	X	X	X
β -mannosidase	O	X	X	O	X	X	O	X	O
endo-1,4- β -galactanase	X	X	X	O	X	X	O	X	X
6-phospho- β -galactosidase	O	X	X	X	X	X	X	X	X
laccase	O	O	O	O	O	O	O	O	O
sucrose-6-phosphate hydrolase	O	X	X	O	O	O	O	X	O
pectate lyase	O	X	X	O	X	O	O	X	O
endo-1,4-beta-xylanase	O	X	X	X	X	X	O	X	O
alpha-N-arabinofuranosidase	O	X	X	O	X	X	O	X	O
acetylxyylan esterase	O	X	X	X	X	O	O	X	O

Tabela 3. Enzimas presentes no proteoma das estirpes de espécies de *Bacillus*. **O** - Enzimas encontradas, **X** - Enzimas não encontradas.

A **figura 1** mostra a relação filogenética das espécies e estirpes estudadas. A maior parte das espécies e suas respectivas estirpes são mais próximas entre si do que das demais. A grande proximidade entre *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* é evidente.

O uso do gene *gyrB* para construção da árvore filogenética foi preferido em relação ao gene 16S. Isso se deu pela baixa taxa de mutação evolutiva do gene 16S, podendo acarretar dificuldades na classificação e discriminação de espécies similares (NICHOLSON *et al*, 2009; TAKEDA *et al.*, 2010). Também presentes universalmente em espécies de bactérias gram negativas e positivas, o gene *gyrB* torna-se um alvo importante para condução eficiente de estudos taxonômicos em bactérias (TAKEDA *et al.*, 2010).

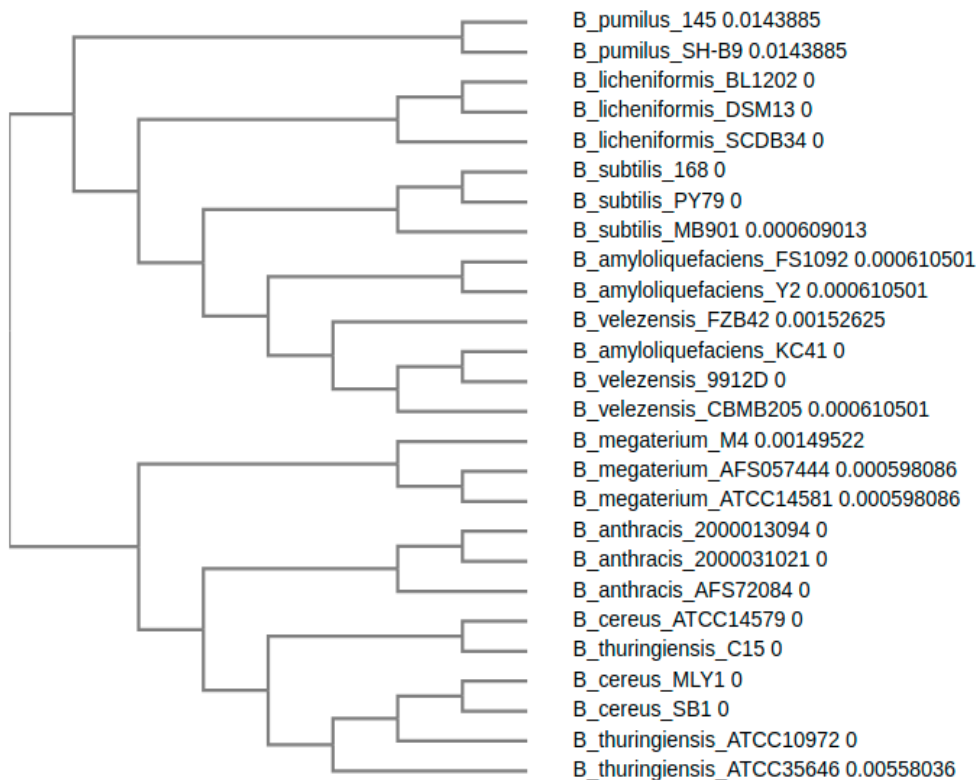


Figura 1. Árvore filogenética das espécies e suas respectivas estirpes coletadas.

Ao comparar as enzimas produzidas entre *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* pode-se observar que ambas as espécies produzem as mesmas classes de enzimas lignocelulolíticas, um potencial similar, senão idêntico na degradação de biomassa (**tabela 3**). Se esses membros do gênero são uma única espécie e cada espécie na realidade é uma variante, ainda há de ser esclarecido (RASKO *et al.*, 2005; PATINO-NAVARRETE; SANCHIS, 2017). Esse achado, todavia, é interessante pois mostra que mesmo bactérias, como *B. anthracis* e *B. cereus*, relacionadas a doenças em humanos e animais (BOTTONE, 2010; CARDOSO; VIEIRA, 2015), podem ser fontes de enzimas de potencial biotecnológico.

A investigação de enzimas do complexo ligninocelulolítico em outras espécies do gênero *Bacillus* também foi conduzida, tendo como objetivo avaliar e comparar a produção das enzimas de interesse em relação ao Bt. Comparativamente ao *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis*, os demais membros apresentaram uma quantidade e variabilidade consideravelmente maior de enzimas do complexo ligninocelulolítico. No entanto, enzimas como 6-fosfo-glicosidase, α -glicosidase, α -amilase e lacase foram encontradas em todas as espécies e praticamente todas as estirpes, indicando que essas enzimas são conservadas entre o gênero. Provavelmente, a abundância de biomassa nos habitats naturais dos

Bacillus pode ter impulsionado a manutenção de enzimas eficientes na degradação de plantas e extratos vegetais ao longo da história evolutiva do gênero.

A enzima mais presente, em número total, nas espécies estudadas, e em suas respectivas estirpes, apontam a α -glicosidase como a mais comum e frequente dentro do gênero, seguida pelas pectato liase e lacase. No entanto, outras enzimas como α -amilase e hidrolases da família 43 também são abundantes, como mostrado pelo **gráfico 2**.

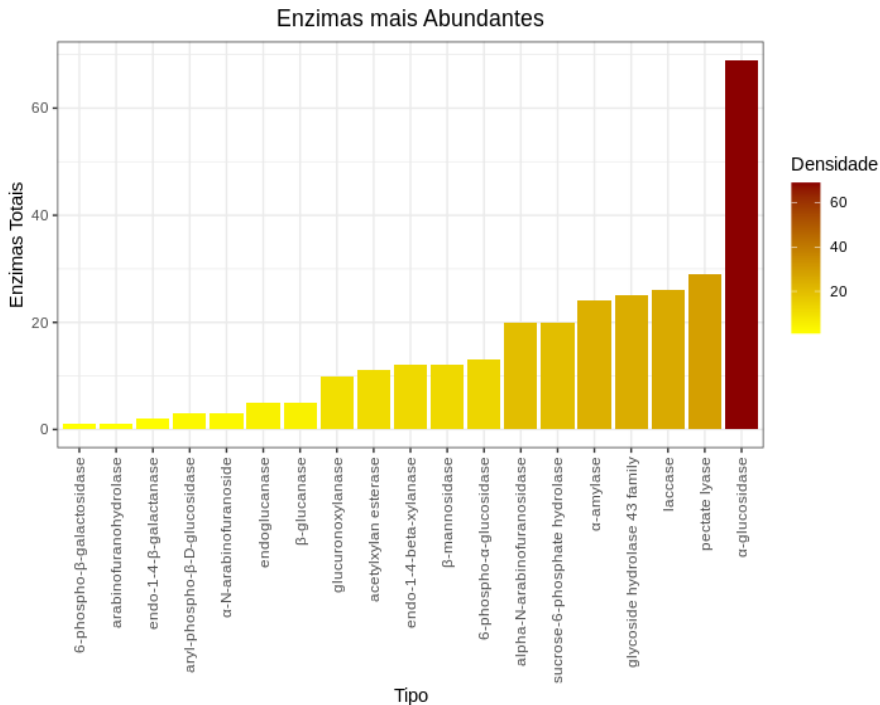


Gráfico 2. Enzimas mais presentes em todas as espécies do gênero *Bacillus* spp.

Esses dados corroboram com a literatura. Enzimas lignocelulolíticas já foram descritas em *B. pumilus* (ARIFFIN *et al*, 2006), *B. licheniformis* (VAN DYK *et al*, 2009), *B. subtilis* (RAWAT; TEWARI, 2012) etc. Tais resultados mostram que o gênero *Bacillus*, em sua totalidade, possui potencial biotecnológico na degradação de biomassa. Ainda, apesar do Bt apresentar enzimas relevantes, essa espécie em particular provavelmente não é a mais promissora no uso biotecnológico na produção de biocombustíveis, tendo representantes como *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. velezensis* e *B. subtilis* com potencial muito maior. Isso pode explicar, em parte, o motivo de estudos sobre *B. thuringiensis* serem escassos quanto à capacidade enzimática da bactéria, e investigações em outras bactérias do gênero *Bacillus* serem mais abundantes e promissoras.

O **gráfico 3** aponta o número total de enzimas do complexo lignocelulolítico

produzidos por cada espécie e suas estirpes, indicando o possível potencial biotecnológico quanto à degradação de biomassa. As espécies *B. subtilis*, *B. amyloquefaciens* e *B. velezensis* apresentam o maior número total de enzimas, sendo as estirpes PY79 e MB901, Y2 e FZB42 mais promissoras na degradação de biomassa para cada espécie, respectivamente.

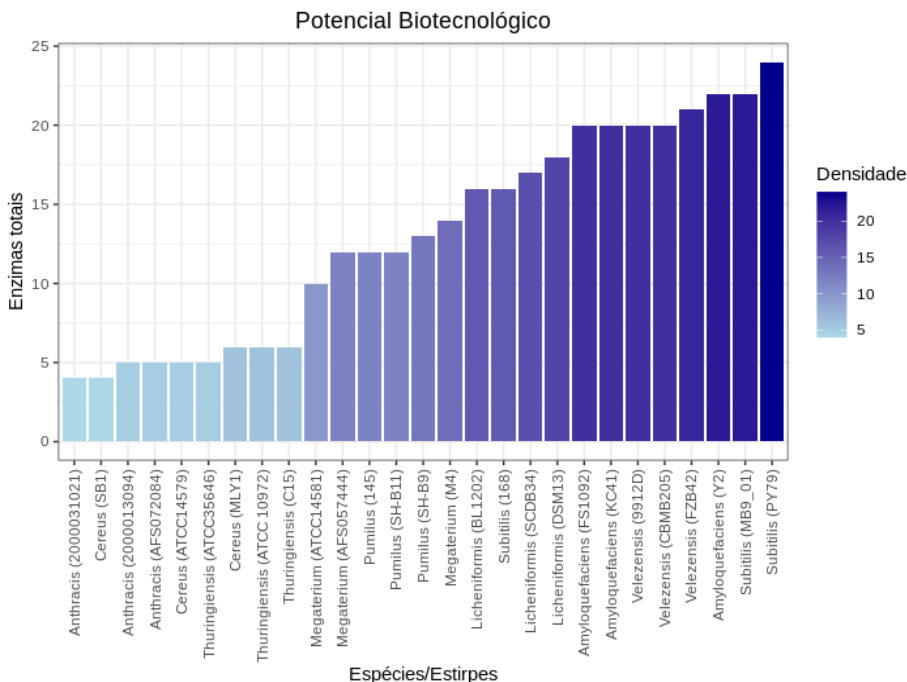


Gráfico 3. Espécies com o maior número de enzimas ligninolulíticas do gênero *Bacillus* spp.

E, por fim, comparando a identificação das espécies usando-se o gene da girase A e o espectro de produção de enzimas foi possível observar a separação das espécies em dois grupos. Um grupo, constituído pelas espécies *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. thuringiensis*. Nesse grupo estão as espécies nas quais foram encontradas as menores quantidades totais de enzimas do complexo ligninolulítico. Já no outro grupo composto pelas espécies *B. amyloquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. velezensis* foram encontradas as espécies com a maior quantidade de enzimas de interesse.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se, com o presente trabalho, que *B. thuringiensis* é uma bactéria potencialmente capaz de degradar biomassa, podendo, portanto, ser usada como agente biológico na produção de biocombustíveis. Todavia, se as enzimas sintetizadas pelas suas

respectivas estirpes são capazes de promover uma degradação eficiente, ainda deverá ser melhor avaliado em próximos estudos. Apesar de produzir enzimas do complexo lignocelulolítico, *B. thuringiensis* possui uma diversidade e quantidade total de enzimas muito menor que outros membros do gênero, não sendo provavelmente a “primeira escolha” em possíveis aplicações reais. Finalmente, a identificação dessas enzimas propicia a ampliação do potencial biotecnológico da bactéria, não somente para combate de insetos e pragas, mas na produção de biocombustíveis de 2º geração, além de implicações possíveis no tratamento de rejeitos industriais e até mesmo no combate à poluição gerado por resíduos lignocelulolíticos.

REFERÊNCIAS

- AGBOR, V.B. *et al.* Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 675-685, dez, 2011.
- AKIA, M. *et al.* A review on conversion of biomass to biofuel by nanocatalysts. **Biofuel Research Journal**, v. 1, n. 1, p. 16-25, jan. 2014.
- AMORE, A. *et al.* Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 573-581, mar. 2015.
- ARIFFIN, H. *et al.* PRODUCTION AND CHARACTERISATION OF CELLULASE BY *BACILLUS PUMILUS* EB3. **International Journal of Engineering and Technology**, Gurpukur, v. 3, n. 1, p. 47-53, jan. 2006.
- BERTOFT, E. Understanding Starch Structure: Recent Progress. **Agronomy**, Basel, v. 7, n. 3, p. 1-29, ago. 2017.
- BOTTONE, E. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, n. 2, p. 382-398, abr. 2010.
- BOZIC, N. *et al.* Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 203-209, jan. 2011.
- BRACMORT, K. Biomass: Comparison of Definitions in Legislation. **Congressional Research Service**, nov. 2013.
- CARDOSO, T.B.O.; VIEIRA, D.N. *Bacillus anthracis* como ameaça terrorista. **Saúde Debate**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 107, p. 1138-1148, dez. 2015.
- CARNEIRO, M.L.N.M. *et al.* Potential of biofuels from algae: Comparison with fossil fuels, ethanol and biodiesel in Europe and Brazil through life cycle assessment (LCA). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 632-653, jun. 2017.
- CHEN, H. *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Londres: Springer, 2014.

CHEN, L. *et al.* Comparative genome analysis of *Bacillus velezensis* reveals a potential for degrading lignocellulosic biomass. **3 Biotech**, Berlin, v. 8, n. 5, p. 253 (1-5), maio. 2018.

CIHAN, A.C. *et al.* The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16s rRNA gene sequences and ardra analyses isolated from geothermal regions of turkey. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 309-324, jan. 2012.

FANGIO, M.F.; ROURA, S.I.; FRITZ, R. Isolation and identification of *Bacillus* spp. and related genera from different starchy foods. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 75, n. 4, p. 218-221, maio. 2010.

FERREIRA, R.B. *et al.* TENDÊNCIAS NA LITERATURA CIENTÍFICA GLOBAL SOBRE O BIODIESEL: UMA ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 547-554, out. 2014.

GONG, G. *et al.* Complete genome sequence of *Bacillus* sp. 275, producing extracellular cellulolytic, xylanolytic and ligninolytic enzymes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 254, p. 59-62, jul. 2017.

GUAN, Z.B. *et al.* Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 75, n. 19, p. 3569-3592, out. 2018.

HII, S.L. *et al.* Pullulanase: Role in Starch Hydrolysis and Potential Industrial Applications. **Enzyme Research**, London, v. 2012, n. 921362, set. 2012.

JIMENEZ-FLORES, R. *et al.* A novel method for evaluating the release of fermentable sugars from cellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 47, n. 5, p. 206-11, out. 2010.

JONES, S.M.; VAN DYK, S.; PLETSCHKE, B.I. BACILLUS SUBTILIS SJ01 PRODUCES HEMICELLULOSE DEGRADING MULTI-ENZYME COMPLEXES. **BioResources**, Raleigh, v. 7, p. 1294-1309, jan. 2012.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J.B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 119-134, jun. 2007.

LIN, L. *et al.* Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 15, n. 3, p. 1-7, maio. 2012.

MADHAVI, V.; LELE, S.S. laccase: properties and applications. **BioResources**, Raleigh, v. 4, n. 4, p. 1694-1717, ago. 2009.

MAKI, M.; LEUNG, K.T.; QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Heaven, v. 5, n. 5, p. 500-516, jul. 2009.

MARQUES, S. *et al.* **Biomass and Green Chemistry: Building a Renewable Pathway**. Londres: Springer, 2018

NICHO, Z. *et al.* Comparison of 16S rRNA, 23S rRNA and gyrB genes sequences in phylogenetic relationships of *Shigella* isolates from Iran. **Annals of Microbiology**, Milano, v. 59, n. 3, p. 615-622, ago. 2009.

OGUNTOYINBO, F.A. *et al.* Monitoring of marine Bacillus diversity among the bacteria community of sea water. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 2, p. 163-166, jan. 2007.

OLUKANNI, O.D. *et al.* Biodegradation of Malachite Green by Extracellular Laccase Producing Bacillus thuringiensis RUN1. **Journal of Basic & Applied Sciences**, Karachi, v. 9, p. 543-549, set. 2013.

PATINO-NAVARRETE, R.; SANCHIS, V. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of Bacillus cereus group bacteria. **Research Microbiology**, Amsterdam, v. 168, n. 4, p. 309-318, maio. 2017.

PORWAL, S. *et al.* Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in Bacillus. **PLoS One**, São Francisco, v. 4, n. 2, p. e4438, fev. 2009.

RAJESWARI, M.; BHUVANESWARI, V. Production of extracellular laccase from the newly isolated Bacillus sp. PK4. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 15, n. 34, p. 1813-1826, ago. 2016.

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BOERJAN, W. Lignin Structure and its Engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 59, p. 240-249, abr. 2019.

RASKO, D.A. *et al.* Genomics of the Bacillus cereus group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 303-329, abr. 2005.

RASTOGI, G. *et al.* Characterization of thermostable cellulases produced by Bacillus and Geobacillus strains. **Bioresource technology**, Barking, v. 101, n. 22, p. 8798-8806, nov. 2010.

RAWAT, R.; TEWARI, L. Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by Bacillus subtilis strain LFS3. **Extremophiles: life under extreme conditions**, Berlin, v. 16, n. 4, p. 637-644, jul. 2012.

ROTH, S.; SPIESS, A.C. Laccases for biorefinery applications: a critical review on challenges and perspectives. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 38, n. 12, p. 2285-2313, dez. 2015.

RUIZ, M.I. *et al.* Enzymatic hydrolysis of cassava starch for production of bioethanol with a colombian wild yeast strain. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 12, p. 2337-2343, dez. 2011.

SAINI, J.K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, Berlin, v. 5, n. 4, p. 337-353, ago. 2015.

SANAHUJA, G. *et al.* Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 283-300, abr. 2011.

SIEVERS, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, London, v. 7, n. 539, out. 2011.

SONDHI, S. *et al.* Purification and Characterization of an Extracellular, Thermo-Alkali-Stable, Metal Tolerant Laccase from Bacillus tequilensis SN4. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e96951, maio. 2014.

STEFANIDIS, S.D. *et al.* A study of lignocellulosic biomass pyrolysis via the pyrolysis of cellulose, hemicellulose and lignin. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Amsterdam, v. 105, p. 143-150, jan. 2014.

TAKEDA, K. *et al.* Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 59, n. 2, p. 165-171, fev. 2010.

TUCK, C.O. *et al.* Valorization of Biomass: Deriving More Value from Waste. **Science**, Nova Iorque, v. 337, n. 6095, p. 695-699, ago. 2012.

VAN DYK, J.S. *et al.* The cellulolytic and hemi-cellulolytic system of *Bacillus licheniformis* SVD1 and the evidence for production of a large multi-enzyme complex. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 45, n. 5, p. 372-378, nov. 2009.

VANHOLME, R. *et al.* Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, Painesville, v. 153, n. 3, p. 895-905, jul. 2010.

YIP, V.L.Y.; WITHERS, S.G. Nature's many mechanisms for the degradation of oligosaccharides. **Organic & biomolecular chemistry**, Cambridge, v. 2, n. 19, p. 2707-2713, out. 2004.

REVISÃO DAS ROTAS DE POLIMERIZAÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO FACTÍVEIS PARA O PREPARO DE MATERIAIS ÚTEIS PARA APLICAÇÕES EM MEDICINA REGENERATIVA

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 27/03/2021

Aghata Rodrigues Souza

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro – RJ
<http://lattes.cnpq.br/5812838408239713>

Carolina Cruz Ferreira

Universidade Estadual de Campinas
Campinas – SP
<http://lattes.cnpq.br/2003185391332907>
<https://orcid.org/0000-0002-1345-4904>

RESUMO: É intensa a busca por materiais para a confecção de dispositivos médicos que permitam a recuperação parcial ou total de órgãos e tecidos danificados em decorrência de acidentes ou doenças degenerativas. Nesse contexto, os polímeros sintéticos ganharam ênfase, sendo o Poli(ácido láctico) (PLA) um polímero de base biológica comercialmente utilizado em uma gama de aplicações devido à sua alta resistência e biodegradabilidade. Como um polímero bioabsorvível, o PLA é um dos biopolímeros mais promissores por ser um ácido orgânico de ocorrência natural, além da possibilidade de produção de seus monômeros a partir de matéria-prima renovável não tóxica. Nas áreas da saúde e bioengenharia, esse poliéster tornou-se um destaque devido à sua capacidade de atender aos requisitos complexos como biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência mecânica e processabilidade. Além

disso, as blendas de PLA com outros polímeros naturais ou sintéticos, tais como PCL, PLGA e quitosana, garantem sua aplicabilidade como biomaterial, sendo amplamente exploradas para aplicações biomédicas e engenharia de tecidos. Sua síntese pode ser realizada por diferentes processos de polimerização a partir do ácido láctico, incluindo: polimerização por condensação direta, polimerização por abertura de anel (ROP) e por métodos diretos como desidratação azeotrópica e polimerização enzimática. Atualmente, a policondensação e a ROP são as técnicas de produção mais utilizadas industrialmente. A primeira tem como principal vantagem a simplicidade tecnológica e seu baixo custo operacional, produzindo um PLA de menor massa molar. A segunda rota, apesar de mais complexa, apresenta um produto final de alta massa molar e é amplamente utilizada pelos maiores produtores de PLA no mercado. O presente trabalho tem por objetivo abordar as principais rotas de polimerização utilizadas recentemente para produção de PLA, em especial as de interesse para aplicação em materiais utilizados em medicina regenerativa.

PALAVRAS-CHAVE: PLA; Polimerização; Medicina Regenerativa.

REVIEW OF THE USUAL LACTIC ACID POLYMERIZATION ROUTES FOR THE PREPARATION OF USEFUL MATERIALS FOR APPLICATIONS IN REGENERATIVE MEDICINE

ABSTRACT: It is intense the search for materials to confect medical devices that allow the total or partial recovery of organs and damaged tissues

caused by accidents or degenerative diseases. In this context, synthetic polymers have gained focus, and the Poli(lactic acid) (PLA) is a biological polymer commercially used in a range of applications due to its high resistance and biodegradability. As a bioabsorbable polymer, the PLA is one of the most promising ones because it can be produced from a naturally occurring organic acid, besides the possibility of producing its monomers from atoxic and renewable raw materials. In Health and Bioengineering areas, this polyester became significant because of its capability to meet complex requirements, such as biocompatibility, biodegradability, mechanical resistance, and processability. Furthermore, the PLA blends with other synthetic or natural polymers, like PCL, PLGA, and chitosan, ensure its application as a biopolymer, being widely explored for tissue engineering and biomedical applications. The PLA can be synthesized by different lactic acid polymerization processes, including direct polycondensation, ring-opening polymerization (ROP), azeotropic dehydration or even enzymatic polymerization. Today, polycondensation and ROP are the most used procedures in Industry. The first one has technological simplicity and low operational cost as the main advantage, which produces a low molecular weight PLA. The second route, despite being more complicated, presents a final product with high molecular weight, and it is extensively used by the biggest PLA producers in the market. The main objective of this article is to review the main polymerization routes to produce PLA recently, with a particular focus on the ones of interest for biomaterials and Regenerative Medicine.

KEYWORDS: PLA; Polymerization; Regenerative Medicine.

1 | INTRODUÇÃO

Polímeros bioabsorvíveis têm sido identificados como materiais alternativos para aplicações biomédicas, uma vez que esses materiais se degradam por simples hidrólise em produtos que podem ser metabolizados pelo corpo humano. Com sua excelente biocompatibilidade, as poli(lactonas) e seus copolímeros têm recebido atenção significativa, tornando-se os polímeros sintéticos biodegradáveis mais comumente usados na confecção de dispositivos médicos (LASPRILLA et al., 2012; LOPES; JARDINI; FILHO, 2012).

Caracterizado por ser um poliéster alifático semicristalino, o PLA pode ser fabricado com boa plasticidade térmica e biocompatibilidade. Juntamente com outros plásticos biodegradáveis comercialmente disponíveis, tais como ácido poliglicólico (PGA) e policaprolactona (PCL), consolidados para aplicações em embalagens, revestimentos e agricultura, o PLA e suas blendas ganharam destaque na área médica, em dispositivos para liberação controlada de fármacos, implantes temporários, peças de fixação óssea, entre outros. Ele vem sendo considerado um dos biopolímeros mais promissores na área médica, por ter demonstrado de forma convincente a prova de conceito para uso em polímero bioabsorvível como dispositivo de fixação óssea, devido às suas propriedades mecânicas desejáveis, possibilidade termoplástica, biocompatibilidade e biodegradabilidade. (DESHMUKH et al., 2017; FERREIRA et al., 2018; HAMAD et al., 2015; KARKRI, 2017; MEHTA et al., 2005; LOPES; JARDINI; FILHO, 2012; NAMPOOTHIRI; NAIR; JOHN, 2010; SAINI; ARORA; KUMAR, 2016).

Apesar das vantagens do PLA puro em um espectro mais amplo de aplicações, seu uso pode ser limitado por sua hidrofobicidade, baixa resistência ao impacto e taxa de degradação lenta. Como alternativa, ele pode ser satisfatoriamente combinado com outros polímeros sem a necessidade de desenvolver novos materiais. Aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e autoridades reguladoras europeias para aplicações clínicas em humanos, *scaffolds* bioreabsorvíveis têm sido desenvolvidos com PLA e blendas, obtendo bons resultados para engenharia tecidual (DESHMUKH et al., 2017; LOPES; JARDINI; FILHO, 2012; REICHERT et al., 2020; SAINI; ARORA; KUMAR, 2016).

Embora a embalagem ainda seja o maior segmento de mercado, espera-se que a vasta atividade de pesquisa em andamento nos campos biomédicos eleve a demanda por PLA e suas blendas para aplicações biomédicas e possíveis aplicações de bens de consumo (FERREIRA et al., 2018; HAMAD et al., 2015; REICHERT et al., 2020).

Outra grande vantagem do PLA sobre os demais poliésteres biodegradáveis é sua disponibilidade abundante e baixo custo. De base biológica, o PLA é produzido a partir do ácido láctico, um ácido orgânico que ocorre naturalmente e que pode ser produzido por fermentação de açúcares obtidos de recursos renováveis, como a cana-de-açúcar, milho e batata (FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016; LOPES; JARDINI; FILHO, 2012; SAINI; ARORA; KUMAR, 2016).

Essa classe de polímero pode ser sintetizada por dois principais métodos industriais: policondensação direta de ácido láctico ou polimerização por abertura de anel (ROP) de ésteres cíclicos usando um catalisador adequado. Recentemente, processos enzimáticos usando lipases também têm sido relatados para a produção de PLA, eliminando o uso de catalisadores metálicos (CHIARADIA et al., 2018; KARKRI, 2017; LI et al., 2020; SAINI; ARORA; KUMAR, 2016).

Apesar dessas diversas rotas de síntese, nenhuma delas é de fácil execução, visto que requerem controle rigoroso das condições (temperatura, pressão e pH), uso de catalisadores e longos tempos de polimerização, implicando em alto consumo energético. (FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016; LOPES; JARDINI; FILHO, 2012; PRETULA; SLOMKOWSKI; PENCZEK, 2016). O presente trabalho visa revisar as principais rotas de polimerização utilizadas atualmente para produção de PLA, dando especial ênfase àquelas que apresentem resultados de interesse para aplicação em materiais utilizados em dispositivos biomédicos para medicina regenerativa.

2 | METODOLOGIA

Para realização desta revisão, foram utilizadas as plataformas Google Scholar e Science Direct, utilizando como palavras-chave para pesquisa: *PLA polymerization, lactic acid, polylactic acid synthesis, biomedicine, biomedical applications, biomaterials, tissue engineering, polymerization routes, ring opening polymerization, polycondensation reaction,*

enzymatic polymerization. Não foi utilizada restrição de período ou data de publicação.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características do PLA

Devido a presença de dois centros quirais na molécula de ácido láctico (LA), o PLA possui estereoisômeros, ilustrados na Figura 1. São eles: poli(L-lactídeo) (PLLA), poli(D-lactídeo) (PDLA) e poli(DL-lactídeo) (PDLLA), os quais têm propriedades diferentes. Os dois homopolímeros enantiomericamente puros (PLLA e PDLA) são opticamente ativos, cristalinos e isotáticos, enquanto o PDLLA é amorfo relativamente atático, opticamente inativo e mais sensível à hidrólise (FERREIRA et al., 2018; RAQUEZ et al., 2013; SCAFFARO et al., 2017; TAN et al., 2013).

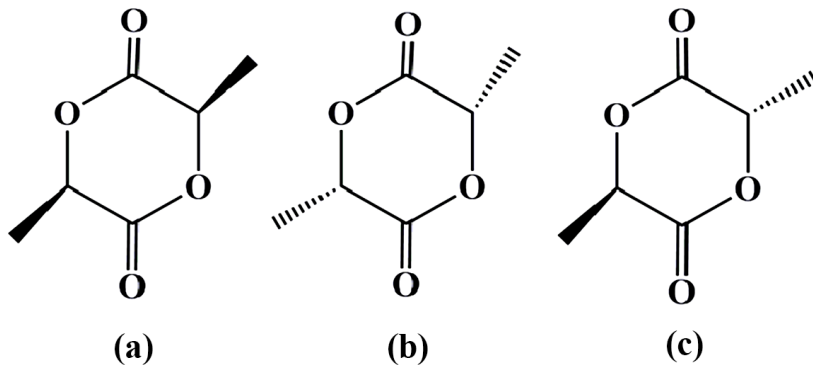


Figura 1- Estruturas químicas dos lactídeos.

Fonte: Adaptado de RAQUEZ et al, 2013. (a) D-lactídeo; (b) L-lactídeo; (c) D,L-lactídeo.

Embora o PLA tenha propriedades mecânicas semelhantes aos polímeros tradicionais, como módulo de Young de 0,35-3,5 GPa e resistência à tração de cerca de 50 MPa com baixo alongamento na ruptura (menos de 5%), suas propriedades térmicas não são atrativas devido à baixa Tg (em torno de 60 °C). Geralmente, tais propriedades e a taxa de biodegradação do PLA dependem da escolha e distribuição dos estereoisômeros dentro das cadeias poliméricas, de modo que o PLA comercial é usado na forma de mistura racêmica ou em diferentes proporções de seus dois tipos de monômeros isoméricos, para obter as características finais desejadas (BABU; O'CONNOR; SEERAM, 2013; FERREIRA et al., 2018; POH et al., 2016; TAN et al., 2013).

O PLLA tem recebido grande atenção devido à sua excelente biocompatibilidade e propriedades mecânicas. O L-isômero é um metabólito biológico que constitui a principal fração do PLA derivado de fontes renováveis, uma vez que a maioria do ácido láctico de

fontes biológicas existe nessa forma. No entanto, seu longo tempo de degradação aliado a alta cristalinidade de seus fragmentos podem causar reações inflamatórias no organismo, de modo que a combinação de monômeros D e L é viabilizada, visto que o DL-lactídeo é rapidamente degradado sem formação de fragmentos cristalinos durante este processo (GHALIA; DAHMAN, 2017; LOPES; JARDINI; MACIEL FILHO, 2012; SINGHVI; ZINJARDE; GOKHALE, 2019; TAN et al., 2013).

Além da quiralidade, a massa molar também influencia diretamente nas propriedades térmicas e mecânicas do PLA. Diferentes rotas de polimerização permitem produzir polímeros com propriedades diferentes, sendo atualmente três as principais rotas citadas para produção do PLA: a policondensação direta, condensação por desidratação azeotrópica e a polimerização por abertura de anel de lactídeo (ROP), ilustradas na Figura 2. A primeira produz PLA com menor massa molar, por meio de um processo tecnologicamente simples e com baixo custo. As outras duas resultam em um polímero de alta massa molar, sendo a última a mais aplicada industrialmente, apesar da complexidade (CASTRO-AGUIRRE et al., 2016; DOMB; SLOMKOWSKI, 2015; FERREIRA et al., 2018; HORBAN et al., 2017; LI et al., 2020; PRETULA; SLOMKOWSKI; PENCZEK, 2016; REICHERT et al., 2020; SAINI; ARORA; KUMAR, 2016).

Mais recentemente, alguns processos de síntese enzimática usando lipases estão emergindo como uma das alternativas mais viáveis e ambientalmente favoráveis para a produção de PLA, eliminando o uso de catalisadores metálicos. Além disso, reações enzimáticas altamente específicas podem ser capazes de sintetizar polímeros com uma estrutura fina a partir de matérias-primas baratas, enquanto os processos químicos requerem monômeros extremamente puros, condições anidras e altas temperaturas para evitar reações colaterais. Apesar de vantajosa sobre os demais processos químicos, a biossíntese completa de PLA ainda está em seu estágio inicial de pesquisa e a maior produção de PLA ainda depende das técnicas tradicionais de condensação (SAINI; ARORA; KUMAR, 2016; SINGHVI; ZINJARDE; GOKHALE, 2019).

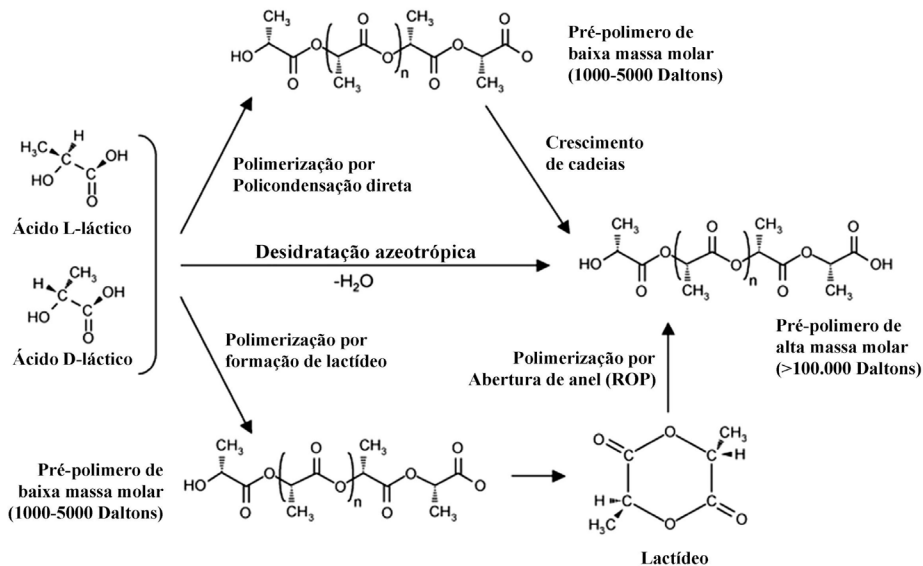


Figura 2 - Síntese de ácido polilático (PLA) a partir dos estereoisômeros D e L.

Fonte: Adaptado de LI, G. *et al.* (2020).

A produção de PLA é também considerada vantajosa e *eco-friendly*, visto que utiliza recursos renováveis (como cana-de-açúcar e milho, por exemplo) para produção de ácido láctico, consome dióxido de carbono e o produto final é biodegradável, reciclável e compostável. (FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016; JAMSHIDIAN *et al.*, 2010; RASAL; JANORKAR; HIRT, 2010).

3.2 O PLA na Medicina Regenerativa

Os biomateriais são caracterizados como substâncias capazes de tratar ou substituir um tecido, órgão ou função sistêmica, tendo como diferencial a combinação de propriedades mecânicas, físico-químicas e biológicas que viabilizam sua implantação sem causar reações adversas. Para aplicações médicas, eles devem ser biocompatíveis, atóxicos, não carcinogênicos, antigênicos e não mutagênicos (FERREIRA *et al.*, 2017, 2019; HELENIUS *et al.*, 2006; LASPRILLA *et al.*, 2012; RODRIGUES, 2013).

Por serem de fácil manuseio e apresentarem propriedades físico-químicas e mecânicas comparáveis aos tecidos biológicos, os materiais poliméricos sintéticos são indicados para aplicação como biomaterial, sendo amplamente empregados na confecção de *scaffolds* para dispositivos médicos e engenharia de tecidos, visto que a biodegradabilidade deles auxilia também na liberação de fármacos (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2017, 2019; LASPRILLA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2010;

SAINI, 2015; SHOJA; KAMYAR; AHMAD, 2015).

Dispositivos bioabsorvíveis têm sido amplamente utilizados para suturas e substitutos ortopédicos, sendo vantajosos quando comparados a implantes metálicos, uma vez que não causam erosão óssea quando inseridos no corpo humano. Outra vantagem é que esses dispositivos dispensam uma segunda cirurgia para remoção do implante, reduzindo custos médicos e possíveis complicações, além de permitirem a recuperação gradual da função do tecido à medida que o dispositivo é degradado. O PLA apresenta extensa aplicação neste campo, tendo sido base de polímeros em diversas aplicações biomédicas, como já citadas anteriormente (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; FERREIRA et al., 2019; LASPRILLA et al., 2012; LOPES; JARDINI; FILHO, 2012; RODRIGUES, 2013; SAINI, 2015).

Uma área amplamente estudada para aplicação do PLA, em particular o PLLA, é a ortopedia. Os implantes biodegradáveis são alternativas atrativas, em contraparte aos de aço e titânio tipicamente utilizados, por propiciarem um suporte temporário ao mesmo tempo em que permitem um crescimento tecidual de longo prazo. Sendo assim, tornam-se uma opção interessante para implantes em crianças, onde o crescimento do paciente leva a necessidade de substituição ou remoção do implante futuramente. O PLLA torna-se uma escolha muito utilizada nesses casos, devido ao seu período de degradação ser longo e ter natureza não-tóxica. Estudos comparativos da força entre as contrapartes metálicas e dispositivos degradáveis mostram taxas de sucesso bem similares. É importante salientar também que, para esse fim, o material polimérico não pode ser facilmente deformado sob aplicação de estresse (BERGSTRÖM; HAYMAN, 2015).

A degradação do PLA ocorre principalmente por hidrólise, quando em contato com umidade por um período de tempo, tendo como subproduto o ácido láctico, o qual é inócuo e pode ser metabolizado pelo organismo. A degradação do polilactídeo ocorre em dois estágios. Primeiro, ocorre a cisão aleatória da cadeia não enzimática dos grupos éster, reduzindo a massa molar. Depois, a massa molar é reduzida até que o ácido láctico e os oligômeros de baixa massa molar sejam naturalmente metabolizados por microorganismos para produzir dióxido de carbono e água (DESHMUKH et al., 2017; FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016; LOPES; JARDINI; FILHO, 2012; POH et al., 2016; SAINI; ARORA; KUMAR, 2016).

A taxa de degradação do polímero é determinada principalmente pela reatividade do polímero com água e catalisadores. Dentre os fatores que influenciam tal reatividade, a massa molar tem impacto significativo, além de afetar outras propriedades como resistência mecânica e solubilidade. PLA de alta massa molar tem um tempo de reabsorção completa de 2 a 8 anos. Quando *in vivo*, esse longo período pode ocasionar processos inflamatórios e infecciosos, de modo que a produção de PLA de baixa massa molar é desejável, fornecendo uma taxa de degradação mais curta (FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016; LOPES; JARDINI; FILHO, 2012).

3.3 Polimerização de PLA

O PLA pode ser sintetizado tanto a partir do ácido láctico (LA) quanto do lactídeo. O LA proporciona a funcionalização de ácido hidroxílico e carboxílico que pode levar a reações de esterificação intermoleculares (REICHERT et al, 2020).

A existência de grupos hidroxila e carboxila no ácido láctico o permite que seja convertido diretamente em poliéster por meio de uma reação de policondensação. O PLA é então sintetizado basicamente em três etapas: produção de LA por fermentação microbiana, seguida da purificação de LA seguida pela preparação de dímero cíclico (lactídeo) e polimerização por policondensação de LA ou por abertura de anel (ROP) de lactídeos (KARKRI, 2017; LASPRILLA et al., 2012; NAMPOOTHIRI; NAIR; JOHN, 2010; SINGHVI; ZINJARDE; GOKHALE, 2019).

O LA pode ser diretamente sintetizado em PLA por policondensação, por meio da destilação de água condensada e aumento contínuo de vácuo e temperatura. Se necessário, é também adicionado um catalisador durante esse processo. Nesse método, obtém-se um polímero de baixa massa molar, porém de estereoregularidade descontrolada, sendo essa a maior desvantagem dessa rota. Outras rotas de policondensação incluem a policondensação por solução e a policondensação por fusão, que é a alternativa menos cara. Nessas, também obtém-se PLA de baixa massa molar (AURAS et al. 2004; REICHERT et al, 2020).

A ROP é a rota mais comum para obter polímeros de alta massa molar (Auras et al. 2010). Esse processo envolve a abertura do anel do dímero cíclico LA (lactídeo) na presença do catalisador. A ROP do lactídeo precisa de um catalisador, mas resulta em PLA com alta massa molar. É possível controlar a razão e a sequência de unidades de LA no polímero final, controlando o tempo de residência e as temperaturas em combinação com o tipo de catalisador e a concentração (SINGHVI; ZINJARDE; GOKHALE, 2019).

A desidratação azeotrópica é um método direto para a síntese de PLA de alta massa molar (Garlotta 2001). O PLA é quimicamente sintetizado pela ROP catalisada por metais pesados do lactídeo que, por sua vez, é derivado do lactato fermentativo (LA). No entanto, os vestígios de resíduos do catalisador de metal pesado são desfavoráveis para certas aplicações, em particular, aplicações médicas e alimentares. Assim, a substituição do catalisador de metal pesado por alternativas seguras e ambientalmente aceitáveis é uma questão crucial. (SINGHVI; ZINJARDE; GOKHALE, 2019).

Alternativamente à utilização dos metais como catalisadores nas rotas descritas anteriormente, tem-se estudado o uso de enzimas para as reações de polimerização de ésteres por serem mais específicas e terem menor impacto ambiental. Estudos realizados por Kobayashi (2015) mostraram a possibilidade de polimerização por ROP de lactonas, onde monômeros macrolídeos apresentaram alta reatividade na catálise utilizando lipases, que são altamente seletivas. O autor também apresentou resultados promissores na

policondensação utilizando essas enzimas.

4 | CONCLUSÃO

O PLA tem atraído muita atenção de pesquisadores e da indústria por ser um polímero biodegradável e bioabsorvível, que pode ser sintetizado a partir de recursos renováveis. Sua versatilidade permite uma gama de aplicações por simples modificações de sua estrutura físico-química, resultante da quiralidade da molécula de ácido láctico. Vários dispositivos biomédicos foram feitos a partir de diferentes tipos de PLA e suas blendas, incluindo suturas biodegradáveis, micropartículas de liberação de fármacos, nanopartículas e suportes porosos para aplicações celulares, além do enorme potencial que o polímero apresenta como substrato para manufatura aditiva.

Recentemente, os materiais metálicos têm sido substituídos por materiais biodegradáveis na confecção de dispositivos de fixação óssea, de modo que o PLA também tem se destacado para a produção de placas, pinos, parafusos e fios, os quais exigem alta resistência, semelhante à do osso.

Observa-se então que o PLA, além da aplicabilidade consolidada no ramo agrícola e de embalagens, é dos principais biomateriais com múltiplos usos, apontando para um futuro promissor para suas aplicações na ciência médica, em especial na engenharia de tecidos e outros campos da saúde humana.

Com o levantamento bibliográfico feito nessa revisão, para que o PLA seja aplicável na medicina regenerativa, é desejável que ele apresente baixa massa molar. Dessa forma, o material será devidamente degradado no organismo, sem gerar fragmentos cristalinos, os quais podem causar resposta inflamatória. Portanto, conclui-se que a policondensação é a alternativa mais adequada para produção de PLA factível para produção de biomateriais a serem utilizados nesse campo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos as instituições que tornaram essa parceria possível a partir da disciplina “Circularidade e Engenharia de Polímeros”, sendo elas: UFRGS, UNICAMP, UFRJ, UFSCar, USP e UFSC. E à professora Liliane Lona, pela supervisão na realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

BABU, R. P.; O’CONNOR, K.; SEERAM, R. Current progress on bio-based polymers and their future trends. **Progress in Biomaterials**, v. 2, n. 1, p. 8, 18 mar. 2013.

S. BERGSTRÖM, Jörgen; HAYMAN, Danika. An Overview of Mechanical Properties and Material Modeling of Polylactide (PLA) for Medical Applications. **Annals of Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 44, p. 330-340, 14 set. 2015.

CASTRO-AGUIRRE, E. et al. Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 333–366, 2016.

CHIARADIA, V. et al. Polyester nanoparticles from macrolactones via miniemulsion enzymatic ring-opening polymerization. **Colloid and Polymer Science**, v. 296, n. 5, p. 861–869, 2018.

DESHMUKH, K. et al. Biopolymer Composites with High Dielectric Performance: Interface Engineering. In: **Biopolymer Composites in Electronics**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 27–128.

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

FARAH, S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 367–392, 2016.

FERREIRA, C. C. et al. Improvement of titanium corrosion resistance by coating with poly-caprolactone and poly-caprolactone/titanium dioxide: Potential application in heart valves. **Materials Research**, v. 20, p. 126–133, 2017.

FERREIRA, C. C. et al. Titanium biomimetically coated with hydroxyapatite, silver nitrate and polycaprolactone, for use in biomaterials (biomedicine). **Materials Research**, v. 22, p. 20190177, 2019.

FERREIRA, F. V. et al. How do cellulose nanocrystals affect the overall properties of biodegradable polymer nanocomposites: A comprehensive review. **European Polymer Journal**, v. 108, n. July, p. 274–285, 2018.

GHALIA, M. A.; DAHMAN, Y. Biodegradable poly(lactic acid)-based scaffolds: synthesis and biomedical applications. **Journal of Polymer Research**, v. 24, n. 5, p. 1–22, 2017.

HAMAD, K. et al. Properties and medical applications of polylactic acid: A review. **Express Polymer Letters**, v. 9, n. 5, p. 435–455, 2015.

HELENIUS, G. et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 76, n. 2, p. 431–438, fev. 2006.

HORBAN, M. A. et al. Produção De Poli(Ácido Láctico) a Partir Do Soro Do Leite. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 8, p. 1136–1150, 2017.

JAMSHIDIAN, M. et al. Poly-Lactic Acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, p. 552–571, 1 set. 2010.

KARKRI, M. Thermal Conductivity of Biocomposite Materials. In: **Biopolymer Composites in Electronics**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 129–153.

KOBAYASHI, S. Enzymatic ring-opening polymerization and polycondensation for the green synthesis of polyesters. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 26, n. 7, p. 677–686, 2015.

LANGER, R.; BASU, A.; DOMB, A. J. Special issue: Polylactide (PLA) Based Biopolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 1–2, 15 dez. 2016.

LASPRILLA, A. J. R. et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 321–328, 2012.

LI, G. et al. Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 5023, 29 out. 2020.

LOPES, M. S.; JARDINI, A. L.; MACIEL FILHO, R. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications. **Procedia Engineering**, v. 42, p. 1402–1413, 2012.

MEHTA, R. et al. Synthesis of poly(lactic acid): A review. **Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews**, v. 45, n. 4, p. 325–349, 2005.

NAMPOOTHIRI, K. M.; NAIR, N. R.; JOHN, R. P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8493–8501, 2010.

OLIVEIRA, L. S. DE A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 37, 2010.

POH, P. S. P. et al. Polylactides in additive biomanufacturing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 228–246, 15 dez. 2016.

PRETULA, J.; SLOMKOWSKI, S.; PENCZEK, S. Polylactides—Methods of synthesis and characterization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 3–16, 2016.

RAQUEZ, J. M. et al. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1504–1542, 2013.

RASAL, R. M.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Poly(lactic acid) modifications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 35, n. 3, p. 338–356, 2010.

REICHERT, C. L. et al. Bio-based packaging: Materials, modifications, industrial applications and sustainability. **Polymers**, v. 12, n. 7, 2020.

RODRIGUES, L. B. Aplicações de biomateriais em ortopedia. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 2, p. 63–76, 2013.

SAINI, M. Implant biomaterials: A comprehensive review. **World Journal of Clinical Cases**, v. 3, n. 1, p. 52, 2015.

SAINI, P.; ARORA, M.; KUMAR, M. N. V. R. Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 47–59, 2016.

SCAFFARO, R. et al. Green Nanocomposites-Based on PLA and Natural Organic Fillers. In: **Handbook of Composites from Renewable Materials**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. v. 1–8p. 637–669.

SHOJA, M.; KAMYAR, S.; AHMAD, M. B. Preparation and characterization of poly (ϵ - caprolactone)/ TiO₂ micro-composites. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 10, n. 2, p. 471–477, 2015.

SINGHVI, M. S.; ZINJARDE, S. S.; GOKHALE, D. V. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 6, p. 1612–1626, 2019.

TAN, L. et al. Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 29, n. 6, p. 503–513, 2013.

SUBSTITUTOS TISSULARES APLICADO AO TECIDO ÓSSEO

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 04/05/2021

Luciana Pastena Giorno

Universidade Federal do ABC
São Bernardo do Campo/SP
<http://lattes.cnpq.br/1142041496567181>

Arnaldo Rodrigues Santos Jr

Universidade Federal do ABC
São Bernardo do Campo/SP
<http://lattes.cnpq.br/6900410067408108>

RESUMO: Fundamentado na capacidade variável, por vezes restrita, de diferentes tecidos em se reconstituírem, os avanços da ciência associam-se com o aumento da expectativa de vida e a longevidade humana. O tecido ósseo é capaz de se recompor após uma lesão. Esse processo ocorre dentro de parâmetros biológicos precisos e regulados; apesar disso, existe um limite nesse reparo. Dessa forma, há grande interesse no desenvolvimento de procedimentos que substituam o osso perdido ou que aperfeiçoem o processo natural de reparo ósseo. Neste capítulo são apresentados substitutos tissulares aplicados a esse tecido, e identifica-se que, ao relacionar a fisiologia com engenharia dos materiais, reunindo diferentes competências técnicas, a capacidade regenerativa transcende como alternativa de tratamento, impactando também, a qualidade de vida do indivíduo.

PALAVRAS-CHAVE: Polímeros biorreabsorvíveis; engenharia de tecidos;

reparo ósseo; envelhecimento celular; materiais biocompatíveis.

TISSUE SUBSTITUTES APPLIED TO BONE TISSUE

ABSTRACT: Based on the variable and sometimes restricted ability of different tissues to reconstitute themselves, scientific advances are associated with increased life expectancy and human longevity. Bone tissue can recover after an injury. This process occurs within precise and regulated biological parameters; nevertheless, there is a limit to this repair. Thus, there is a significant interest in the development of procedures that replace the lost bone support or that improve the natural bone repair process. In this chapter, tissue substitutes are presented to apply to this tissue, and it is identified that, when relating physiology to materials engineering, bringing together different technical skills, the regenerative capacity is a broader concept than alternative treatment, it also impacts the individual's quality of life.

KEYWORDS: Bioresorbable polymers; tissue engineering; bone repair; cellular senescence; biocompatible materials.

1 | INTRODUÇÃO

A utopia da vida eterna – a transição demográfica e o processo de envelhecimento evidenciam outra perspectiva sobre conceitos e a reestruturação em seus determinantes, como a própria saúde, questões psicossociais, econômicas e sociais. Esse fenômeno natural

e multifatorial suscita desde um declínio na replicação, com mutações somáticas no encurtamento dos telômeros e estresse celular, até um desajuste no controle do sistema neuroendócrino. Essas respostas adaptativas refletem a suscetibilidade às doenças crônicas e o impacto no desempenho da funcionalidade do organismo. Além da vulnerabilidade existente frente a situações passíveis de acidentes ou ao estilo de vida adotado, por vezes, de forma inadequada (ESQUENAZI *et al.*, 2014; TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

As lesões traumáticas, por exemplo, são responsáveis por mais de 3,2 milhões de mortes e mais de 312 milhões de feridos ao ano em todo o mundo. Nos Estados Unidos da América (EUA) foram registradas mais de 60 milhões de vítimas de lesões traumáticas anuais, com destaque para as lesões ósseas e faixa etária de até 40 anos (PINHEIRO *et al.*, 2011; SAMUEL *et al.*, 2009). Definidas como defeitos ósseos, essas lesões geralmente são causadas por perda de massa óssea decorrentes de traumas, fraturas patológicas, desenvolvimento anormal do esqueleto e ressecção de tumores. No Brasil, os maiores registros de traumas no esqueleto se devem aos acidentes de trânsito e as fraturas decorrentes de quedas em pessoas da terceira idade. Esses traumatismos são destacados pelo Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Universidade de São Paulo (IOT-USP) como a principal causa de incapacidade e óbito de indivíduos entre 15 e 50 anos (IBGE, 2011).

Ocorrem cerca de 20 mil mortes/ano e um número quase imensurável de incapacitações. Metade são as chamadas vítimas vulneráveis, ou seja, pedestres, ciclistas e motociclistas. Os custos para o tratamento desses pacientes são estimados em 4% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro. Quanto ao envelhecimento da população, a expectativa de vida está aumentando e em 2050, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a expectativa do brasileiro será de 81 anos (IBGE, 2018). Isso traz um aumento na incidência de doenças crônicas ligadas à idade como a osteoporose, sedentarismo, deficiência de cálcio ou vitamina D; e traumas devido a quedas (BRASIL, 2006).

Nesse sentido, intervenções são necessárias para sobrevida do indivíduo, uma vez que algumas lesões excedem a capacidade de reparo tecidual. Entretanto, os atuais procedimentos terapêuticos utilizados para o tratamento de defeitos ósseos críticos também têm limitações (SANTOS Jr *et al.*, 2014). Somente nos EUA em 2003, foram realizadas mais de um milhão de cirurgias para enxerto ósseo, sendo que destes, aproximadamente 250.000 foram para o tratamento de falhas ósseas. Os danos nesse tecido são frequentemente reparados pela utilização de transplantes ou enxertos ósseos do próprio paciente (autógenos ou autólogos). Nesta técnica a probabilidade de rejeição diminui, contudo, deve-se levar em consideração alguns fatores como: região doadora, acesso cirúrgico e desconforto pós operatório. Para lesões graves e morbidade no sítio doador existem limitações e, conseqüentemente, uma grande quantidade de material é necessária para este implante (BOULER *et al.*, 2017; MADL; HEILSHORN; BLAU, 2018).

Visto as limitações relacionadas ao uso de enxertos autólogos, aumentaram-

se as buscas por novos métodos que sejam eficazes no reparo ósseo. Materiais como implantes vêm sendo desenvolvidos de forma que ao interagirem com o tecido receptor estimulem o processo de regeneração (CAO; DOU; DONG, 2014; HENCH, 1998). O uso desses implantes também tem algumas limitações, por exemplo, a possibilidade de efeitos tóxicos produzidos pelos mesmos, dificuldade para moldar e preencher o defeito ósseo, e até mesmo efeitos de corrosão como nos casos de implante metálico (SANTOS Jr; LOMBELLO; GENARI, 2012; ZAVAGLIA; SILVA, 2016).

A partir dessa necessidade, a engenharia de tecidos tem desenvolvido biomateriais que possam estimular a rápida proliferação celular óssea tornando-os assim uma alternativa interessante para a medicina regenerativa (RATNAYAKE; MUCALO; DIAS, 2017). E para possibilitar a reconstrução de lesões ósseas, superando essas limitações, a compreensão da fisiologia humana e os processos que envolvem o reparo tecidual pós lesão são preditivos para nortear as características necessárias do biomaterial a ser utilizado. Dito isso, são apresentados substitutos tissulares aplicados a esse tecido ao longo do texto.

2 | LESÕES NO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é dinâmico, sendo formado, reabsorvido e remodelado de forma contínua sob o controle de fatores hormonais e físicos. Nos adultos este processo de renovação do tecido é geralmente baixo, apresentando um metabolismo mais alto em bebês e crianças. Esse tecido consiste de componentes orgânicos, predominantemente o colágeno, além de minerais, principalmente a hidroxiapatita. No tecido ósseo encontramos células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócito e osteoclastos. Essas células secretam e sintetizam a matriz óssea, como também formam, degradam e modelam o tecido ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O comportamento das fraturas são variáveis e dependem tanto das características e propriedades do tecido ósseo como do mecanismo de lesão. Outro fator determinante no processo de reparo é o tamanho da lesão. Nesse caso, pode-se ter uma lesão com ou sem perda de massa óssea (GHIASI *et al.*, 2017).

O reparo de uma fratura sem a perda de massa óssea ocorre em uma ordem determinada biologicamente, independentemente de interferências externas, embora influenciadas por elas (GHIASI *et al.*, 2017; HENCH, 1998; MARSELL; EINHORN, 2011). Ela ocorre pela estabilização e consolidação da área lesada pela junção das partes ósseas, reorganização das extremidades dos fragmentos avasculares, muitas vezes em necrose, e finalmente, reorganização do tecido novo. Todos esses eventos biológicos do reparo ósseo recapitulam a histogênese observada na fase embrionária e fetal, com a participação ativa das células ósseas: células osteogênicas irão se diferenciar em osteoblastos na área da lesão, ocorrendo um aumento na celularidade e produção de colágeno, ao mesmo tempo que vasos sanguíneos invadem a área lesada; os osteoblastos iniciam a produção de matriz

óssea orgânica e promovem sua mineralização, ao mesmo tempo em que são envolvidos e aprisionados por essa matriz, diferenciando-se em osteócitos, as células responsáveis pela manutenção da matriz óssea. Os osteoclastos, que também se diferenciam nessa região a partir de células do sangue, atuam reabsorvendo a matriz formada. Esse balanço entre síntese e reabsorção é conhecido como remodelação óssea. Desta forma, paulatinamente tem-se a formação do tecido ósseo primário e sua conversão em tecido ósseo secundário na fratura (GHIASI *et al.*, 2017; SANTOS Jr; LOMBELLO; GENARI, 2012).

Apesar do exposto acima, intrinsecamente, existe um limite para a capacidade do tecido ósseo se recompor em lesão. Isso vai ocorrer nos casos onde se observam fraturas com grandes perdas de massa óssea. Infelizmente, não se sabe qual é esse limite em seres humanos. Nos casos de fraturas com perda de massa óssea é necessário a utilização de enxertos ou implantes, pois normalmente o tamanho da lesão está além da capacidade natural de recomposição do tecido (GHIASI *et al.*, 2017; HENCH, 1998; SANTOS Jr; LOMBELLO; GENARI, 2012). Eles servem como suporte para a regeneração óssea, interagindo com a interface dos fragmentos “receptores” e estimulando o processo de restauração tecidual. Esses dispositivos, desenvolvidos para serem implantados, são atualmente conhecidos como biomateriais (ANSARI, 2019; MUNHOZ *et al.*, 2020).

3 | ENGENHARIA DE TECIDOS

Procedimentos tecnológicos ligados à medicina regenerativa vêm fornecendo uma alternativa viável para tratamento de lesões como as descritas anteriormente. A terapia celular abrange o desenvolvimento de tecidos *in vitro* para transplantes subsequentes, visando regeneração de órgãos e de tecidos danificados (MADL; HEILSHORN; BLAU, 2018). A engenharia de tecido também é uma alternativa, se refere à combinação de métodos da biologia celular e tecidual com a engenharia e a cirurgia, sendo um campo de amplitude, diversidade e constantes mudanças (FISHER; MAUCK, 2013; LANGER; VANCANTI, 1993). Ela se baseia no uso de uma fonte celular (podendo ser do próprio paciente) em conjunto com biomateriais desenvolvidos, como arcabouços, de modo a se criar *in vitro* uma estrutura que possa ser usada para o reparo ou substituição do tecido no indivíduo (ATALA, 2009; HENCH, 1998; SANTOS Jr; LOMBELLO; GENARI, 2012). Na engenharia de tecido, destacam-se três fatores muito importantes: (1) a fonte celular, (2) o biomaterial que atuam como um suporte para as células e (3) os fatores de indução para o crescimento celular (CARDOSO; ARRUDA, 2009). Direcionando para o item (2), alguns exemplos de biomateriais são apresentados ao longo do texto.

3.1 Biomateriais

A definição adotada na *Consensus Conference of the European Society for Biomaterials* caracteriza um biomaterial como:

Uma substância projetada para ter uma forma que isoladamente, ou como parte de um sistema complexo, é usado para direcionar, através do controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, a curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, em medicina humana ou medicina veterinária (WILLIAMS, 2009, v. 30, p. 5908, tradução nossa).

Os biomateriais são ambientes tridimensionais onde, com a presença de um substrato agindo como matriz, permite o crescimento, proliferação e diferenciação das células. O suporte tridimensional, arcabouço ou *scaffold* é preparado de forma a mimetizar as condições do tecido original (BAUDEQUIN; TABRIZIAN, 2018). Eles podem ser usados como suporte de fontes celulares para a regeneração óssea, interagindo com a interface dos fragmentos receptores e estimulando o processo de restauração tecidual ou agindo como substitutos ósseos eficazes (HENCH, 1998; LANGER; VACANTI, 1993; ZAVAGLIA; SILVA, 2016).

Sendo um substituto ósseo, vários fatores são levados em consideração, como fabricação do polímero, composição química e, tratando-se de um tecido de estrutura complexa, uma abordagem sobre o mesmo é necessária para o desenvolvimento de um material eficaz. Para que o material não venha causar danos ao tecido humano, como reações sistêmicas indesejáveis ou reações alérgicas, é importante entender as relações dos mesmos quando utilizados *in vivo* (BAUDEQUIN; TABRIZIAN, 2018; O'KEEF; MAO, 2011).

No princípio os estudos relacionados aos biomateriais preocupavam-se em não torná-los prejudiciais aos tecidos, ficando inerte no organismo. São materiais permanentes e utilizados com o objetivo de substituir o tecido lesado por um tempo indefinido – não sendo absorvidos. Para este fim, suas características mecânicas, físico-químicas são desenvolvidas para durarem por longos períodos, como no caso das próteses (ZAVAGLIA; SILVA, 2016).

No entanto, em alguns casos é necessário um suporte que substitua o tecido lesado temporariamente, ou ainda, que estimule o processo regenerativo do local. Por isso os estudos vêm investindo em materiais que interajam com o organismo induzindo respostas fisiológicas de crescimento ou diferenciação celular. São classificados com biomateriais temporários (SANTOS Jr; ZAVAGLIA, 2016).

Quatro classes de materiais são amplamente utilizadas e estão disponíveis comercialmente, sendo eles: metais, cerâmicas, polímeros (sintéticos e naturais) e os compósitos (ZAVAGLIA; SILVA, 2016).

Os polímeros de interesse biológico e biomédico podem ser classificados como biodegradáveis e biorreabsorvíveis. Na respectiva definição, o primeiro tem um tempo limite quanto sua aplicação na área da medicina e, posteriormente, o material é eliminado e/ou bio-reciclado. Isso faz com que haja a redução da massa molar de macromoléculas que formam as substâncias poliméricas pela ação enzimática das células. Já o segundo,

são eliminados do organismo por vias naturais assim como os subprodutos que podem ser gerados, sem causar danos colaterais. Este material é aquele que é eliminado do corpo humano ou animal independente da via, podendo ser através de um processo metabólico, por secreção ou excreção. Essas características poliméricas evitam atos cirúrgicos adicionais, por exemplo, a retirada do material (VERT *et al.*, 2012).

Segundo Barbanti e colaboradores (2011), fatores como composição química, morfologia e energia de superfície, estão inter-relacionados ao processo de eliminação dos polímeros biorreabsorvíveis. Outro fator que também influencia é o local onde o material é implantado (ATHANASION *et al.*, 1998).

Uma grande vantagem dos materiais poliméricos é que podem ser moldados em diversas formas e estruturas complexas, o que atenderia diversas aplicações na área médica. No entanto, os mesmos não substituem os dispositivos metálicos ou cerâmicos em aplicações que exigem elevadas propriedades mecânicas de resistência e baixo coeficiente de atrito (ESPOSITO *et al.*, 2013).

As técnicas para fabricação dos polímeros podem influenciar muito na estrutura do material, composição química e resposta celular. De acordo com McNamara *et al.* (2010) a técnica de nanotopografia pode ser útil para guiar a diferenciação de células-tronco mesenquimais.

A estrutura de alguns polímeros pode permitir a penetração de vasos sanguíneos, e até mesmo exercer atividade morfogenética quando enriquecidos com hidroxiapatita, fatores de crescimento e proteínas ósseas morfogenéticas (JAFARI *et al.*, 2017; SHOICHET, 2010). Ainda assim, estudos são necessários para apontar polímeros que sirvam como suporte para o crescimento das células ósseas (RODRIGUES *et al.*, 2012). Dentre os biomateriais biorreabsorvíveis mais comuns estão os poliésteres alifáticos sintéticos, como o poli (ácido glicólico) [PGA], poli (ácido láctico) [PLA] e poli (ϵ -caprolactona) [PCL]. São amplamente usados nas técnicas de engenharia de tecidos pelo fato de serem naturalmente eliminados pelas vias metabólicas (BARBANTI *et al.*, 2011). A estrutura de alguns desses polímeros pode ser vista na Figura 1.

Outros polímeros promissores são os polihidroxialcanoatos – poliésteres produzidos por microorganismos via fermentação (RIVERA-BRISO; SERRANO-AROCHA, 2018). Dentre os polihidroxialcanoatos, destacam-se o poli(3-hidroxi butirato) [PHB], o copolímero de 3-hidroxi butirato e 3-hidroxi valerato (PHBV), o poli(4-hidroxi butirato) [P4HB], o copolímero de 3-hidroxi butirato e 3-hidroxi hexanoato (PHBHHx) e poli(3-hidroxi octanoate) [PHA] (CHEN; WU, 2005; LEE *et al.*, 2002). O PHBV apresenta boa biocompatibilidade sendo eliminado *in vivo* através da ação de D-3 hidroxi butirato, um ácido presente no sangue humano (SULTANA; WANG, 2012).

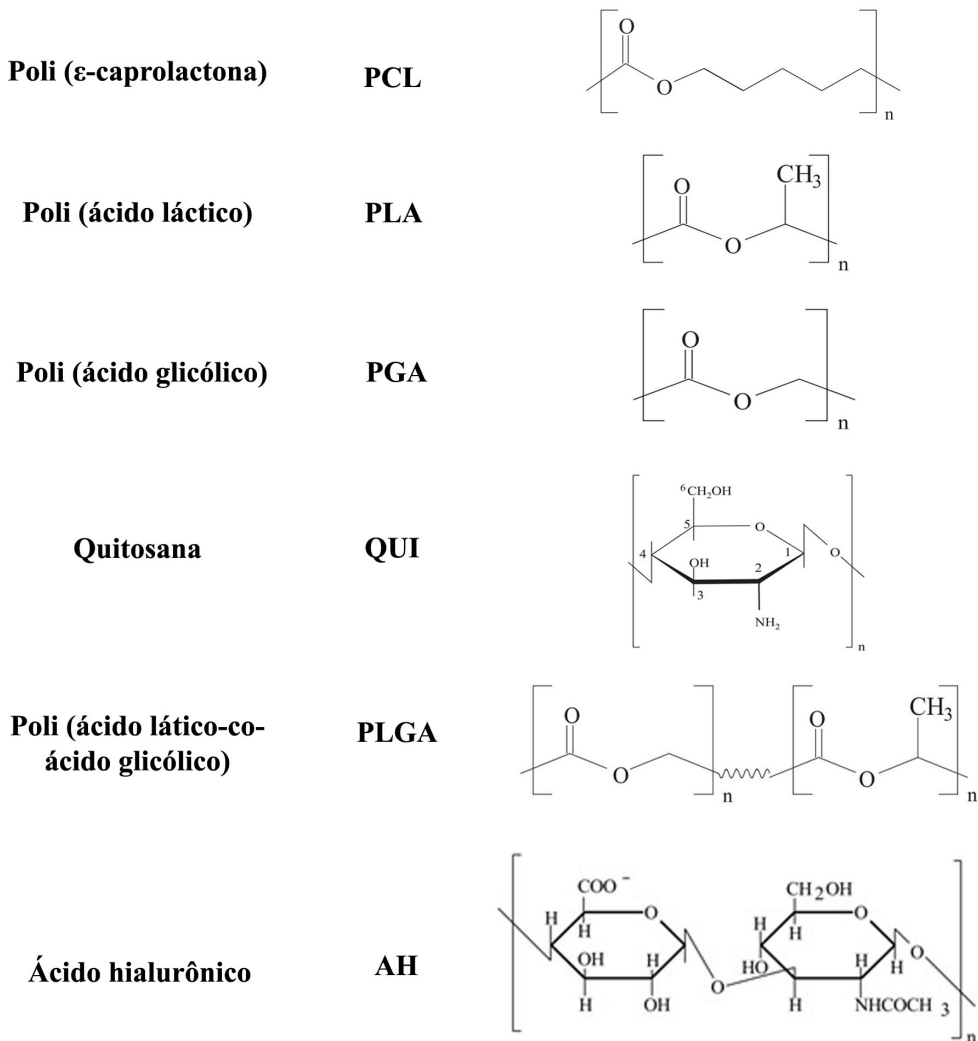


Figura 1. Fórmula estrutural geral de alguns polímeros utilizados para produzir arcabouços em engenharia de tecidos. Fonte: SANTOS *et al.*, Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 13, p. 242-249, 2003 (para QUI); GOISSIS; GÓES, Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 3, p. 32-39, 1997 (para AH); BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 15, p. 13-21, 2005 (para os demais), com autorização da editora.

A mistura de polímeros, definida como blenda, permite alcançar combinações de propriedades para aplicações específicas melhorando consideravelmente algumas características indesejáveis, a depender da aplicabilidade (IMRE; PUKÁNSZKY, 2013).

Células cultivadas em matrizes densas de alguns dos polímeros biorreabsorvíveis puros citados anteriormente podem ser vistas na Figura 2. Também podem ser vistas algumas blends que serviram de arcabouço para o crescimento celular. Em todos os casos analisados, as células mostram um bom padrão de crescimento, ocupando toda a

superfície do substrato.

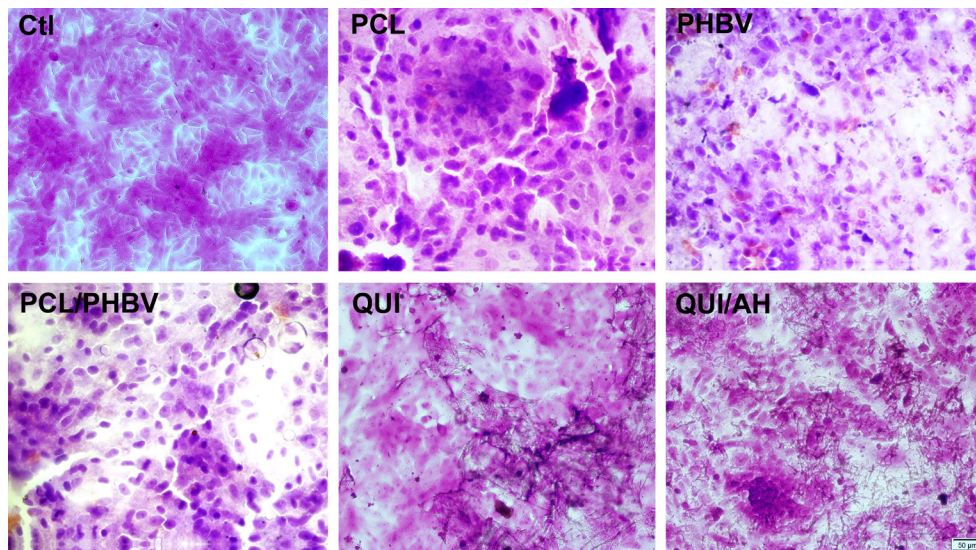


Figura 2. Células Vero cultivadas em diferentes materiais poliméricos por 48 h. Note as células sobre matrizes densas de polímeros puros de PCL, PHBV e Quitosana (QUI), além de sobre blends de PCL com PHBV e QUI com ácido hialurônico (AH). Ctl = controle em placa de cultivo. Coloração: Cristal Violeta. Barra de aumento: 50 μm para todas as imagens.

Fonte: Arquivo pessoal dos autores.

3.1.1 Poli (ϵ -caprolactona)

O PCL é um poliéster alifático biodegradável sintético que tem atraído consideravelmente a atenção nos últimos anos, além de ser um material aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em humanos. Apresenta degradação lenta por hidrólise (em valores de pH fisiológico), biocompatibilidade e custo relativamente baixo. Este polímero pode agir como iniciador na polimerização de álcoois de baixo peso molecular que, também, pode ser utilizado como finalizador para o processo (AZIMI *et al.*, 2014; SIDDIQUI *et al.*, 2018).

Nas áreas biomédicas, o PCL é utilizado nos sistemas de liberação controlada de drogas, como material cirúrgico absorvível em suturas, guias nervosas, e em estruturas tridimensionais para engenharia de tecidos (SIDDIQUI *et al.*, 2018). Sua fácil processabilidade permite a fabricação de uma variedade de estruturas e formas, como microesferas, microcápsulas, nanopartículas, pellets, implantes e filmes. Por ser um polímero sintético, ele não interage com as células diretamente. Apesar disso, é um bom substrato para o crescimento celular, dando suporte para adesão, crescimento e migração celular tanto *in vitro* como *in vivo* (BADROSSAMAY *et al.*, 2014; CASARIN *et al.*, 2011). Bons resultados têm sido obtidos com células cultivadas sobre arcabouços de PCL nas formas

densas, porosos (BAPTISTA-PERIANES *et al.*, 2019) e fibrosas (GIORNO; RODRIGUES; SANTOS Jr, 2020).

Uma propriedade muito interessante do PCL é sua propensão a formar blendas compatíveis com uma variedade de outros polímeros, o que supre a deficiência em algumas propriedades do PCL (COOMBES *et al.*, 2004; PACHENCE; BOHRER; KOHN, 2007; SIDDIQUI *et al.*, 2018). Foi avaliado o PCL incorporado com poli(ácido vinilfosfonico-co-ácido acrílico) [PVPA]. Tal junção melhorou significativamente a resistência do material (BASSI *et al.*, 2011).

3.1.2 Poli (ácido láctico)

O uso do PLA na regeneração de tecidos tem se mostrado promissor. Caracterizado como um polímero biológico, biodegradável e biorreabsorvível, o PLA pode ser usado em mistura racêmica como: poli (DL-ácido láctico) – PDLLA ou como um dos seus enantiômeros, o poli (L-ácido láctico) – PLLA e o poli (D-ácido láctico) – PDLA (MISTURA *et al.*, 2013; SHIN; HAN, 2013). Os representantes dos polímeros poliésteres alifáticos e seus compostos, têm sido desenvolvidos para substituir a matriz extracelular (MEC) devido à sua boa biocompatibilidade (CHEN *et al.*, 2013).

Destacando o PLLA, é metabolizado em ácido láctico e eliminado via ciclo de Krebs liberando CO₂ e água. Por possuir um longo tempo de degradação (2 a 5 anos) e alta massa molar, durante o processo de biorreabsorção, identifica-se a presença de cristalinos associados à acidificação do pH local, sendo assim, como um polímero puro, sua completa introdução para uso clínico fica restrita (MINATA *et al.*, 2013). Além disso, o PLLA apresenta fragilidade especialmente sob carga de impacto e rápida hidrólise, nesse sentido, estratégias como blendas poliméricas no intuito de melhorar suas propriedades mecânicas são objeto de investigação (FUKUSHIMA; FEIJOO; YANG, 2012; TODO *et al.*, 2007, 2009). O PCL e PLLA são exemplos de blendas, dada à similaridade molecular possibilita uma vasta gama de composições de mistura a ser estudada em um único modelo. Onde ambos são poliésteres alifáticos lineares com estrutura química semelhante, fornecem mais resistência, apresentam biocompatibilidade e biodegradabilidade mais tolerável (SHIN; HAN, 2013).

Relatos da literatura informam que a blenda 50/50 % de PLLA/PCL produz fibras mais uniformes em eletrofiação, e na produção de membranas, a flexibilidade na ruptura tende a aumentar com a adição de 50 % de PCL (CHEN *et al.*, 2013; HAROOSH; DONG; LAU, 2014; KOUYA *et al.*, 2013). A blenda formada por esses dois polímeros atraem pesquisadores ao longo dos anos pelas potenciais aplicações como material biomédico e menor custo quando comparado à síntese de copolímero. Dentre as aplicações clínicas têm-se suturas cirúrgicas, pele artificial, implantes temporários, cateteres, parafusos ortopédicos, sistemas de entrega de drogas e curativos (LEBOURG; ANTÓN; RIBIELLES, 2008). Blendas de

PLLA e Quitosana (QUI) produzidas tanto por eletrofiação quanto por rotofiação, também mostraram bons resultados quanto às suas características físicas e capacidade de estimular o crescimento celular. Desta forma, também se mostram promissoras em engenharia de tecidos (VIDA *et al.*, 2017).

3.1.3 Poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)

O PHBV é um termoplástico natural produzido por bactérias (RIVERA-BRISO; SERRANO-AROCA, 2018; SULTANA; WANG, 2012). Por conta de sua termoplaticidade, biocompatibilidade com tecidos humanos e por ser de origem natural, o PHBV se mostra como um polímero promissor para a engenharia de tecidos. De acordo com Köse *et al.* (2003) e Dias *et al.* (2008), este biomaterial é uma alternativa viável no reparo de lesões ósseas.

Esses polímeros têm sido utilizados como matéria-prima em diversos dispositivos de aplicação médica como fios de sutura, dispositivos para guiar o reparo tecidual, implantes cardíacos, pinos ortopédicos, *stents*, túbulos para regeneração nervosa e membranas para regeneração de pele (CHEN; WU, 2005). Também utilizado como implante para reparar pequenas fraturas ósseas e lesões na medula espinhal, o que demonstra sua biocompatibilidade e adequação como material a ser implantado *in vivo* (LU *et al.*, 2012).

Lu e colaboradores (2012) avaliaram o comportamento de Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) sobre fibras de PHBV, obtendo resultados positivos tanto na viabilidade quanto no crescimento celular. Mostrou-se ainda, que as CTMs responderam de forma diferente às características do substrato, dependendo da orientação e espessura das fibras de PHBV. Mais recentemente, foram conduzidos vários ensaios para reconstrução óssea com substratos à base de PHBV, e os resultados mostraram bom crescimento de CTMs *in vitro* e uma boa capacidade regenerativa *in vivo* (ZHONG *et al.*, 2019).

O PHBV tem um comportamento frágil e uma baixa taxa de degradação hidrolítica em condições de pH e temperaturas fisiológicas, devido ao seu alto grau de cristalinidade (ALMEIDA NETO *et al.*, 2019; CASARIN *et al.*, 2011); e por esse motivo, além do uso do PHBV puro, ele é associado com outros materiais, como partículas nanométricas de diamante ou hidroxiapatita, pode ser bastante promissor para bioengenharia óssea (ALMEIDA NETO *et al.*, 2019).

O PLLA foi usado em conjunto com o PHBV, blendas na proporção de 60/40, 50/50, 40/60 além dos polímeros puros, a fim de avaliar o potencial das diferentes amostras como substratos para cultivo de células Vero, uma linhagem de célula fibroblástica. Embora as células tenham crescido e se proliferado sobre todas as amostras testadas, o resultado de adesão celular foi melhor quando os polímeros foram utilizados em conjunto (SANTOS JR *et al.*, 2005).

As propriedades do PHBV e do PCL podem se complementar de modo a formar uma

blenda com características mais próximas às ideais para sua utilização na engenharia de tecido (CASARIN *et al.*, 2011). Rodrigues *et al.* (2012) avaliaram blendas densas de PHBV com PCL para seu possível uso no tratamento de defeitos osteocondrais. CTMs cultivadas sobre o PHBV/PCL densos apresentaram um padrão morfológico celular compatível com o esperado. Embora os polímeros não tenham interferido no desenvolvimento das CTMs, foi possível manter a diferenciação óssea das CTMs cultivadas nestes materiais.

Materiais porosos apresentam uma melhor integração com o tecido ósseo. Esses materiais facilitam a vascularização e conseqüentemente a difusão de nutrientes e gases, além de afetar as propriedades mecânicas e degradação do polímero, como os biorreabsorvíveis (DUAN; WANG, 2010). Por outro lado, materiais fibrosos, em tese, representam um ambiente mais fisiológico, pois se assemelham a MEC fibrosa que pode ser encontrada nos tecidos (IGUMA; MALMONGE; SANTOS Jr, 2019).

Materiais poliméricos biorreabsorvíveis podem ser transformados por fiação, em filamentos, para posterior fabricação de estruturas fibrosas. A fiação pode ser realizada por várias abordagens metodológicas e quase todos os materiais fibrosos existentes, podem ser utilizados na área médica. Podem também ser definidos como sendo produtos concebidos para atender necessidades específicas com influência direta no tratamento médico, cirúrgico e pós cirúrgico do paciente. Esse grande interesse remete a diversas características desse material, tais como: resistência, flexibilidade, porosidade e versatilidade quanto a estruturação e acabamento das fibras (GIORNO; RODRIGUES; SANTOS Jr, 2020; HELL *et al.*, 2018).

3.1.4 Quitosana

A QUI é um biopolímero que apresenta semelhanças estruturais às dos glicosaminoglicanos (GAGs) da MEC dos vertebrados que são de grande importância para a adesão celular (ORYAN; SAHVIEH, 2017). A QUI é um derivado desacetilado de quitina de forma parcial ou completa, ou seja, um polímero primário (polissacarídeo) presente no exoesqueleto de artrópodes e crustáceos. Biomateriais à base de QUI são considerados, um dos mais promissores polissacarídeos para o desenvolvimento de biomateriais biorreabsorvíveis e biologicamente ativos (DUMITRIU, 2001).

Como dito, a fonte primária para quitina ou QUI é o exoesqueleto de caranguejo, camarão e lagosta. Resumidamente, as carapaças são desmineralizadas com ácido clorídrico (HCl), desproteinizadas com proteases e depois desacetilada com hidróxido de sódio (NaOH) concentrado. O polímero é linear e consiste em ligações beta (1 → 4) ligadas à resíduos de D-glucosamina com um número variável de grupos N-acetilglucosamina localizados aleatoriamente. Em essência, a QUI é uma celulose com a hidroxila do carbono 2 substituída por um grupo amino acetilado ou amino, dependendo do processo de preparação ou origem. O peso molecular pode variar de 50 a 1000 kDa.

A QUI comercialmente disponíveis têm graus de desacetilação que variam de 70% a 90% (ALLAN; PEYRON, 1995). A estrutura da QUI pode ser vista na Figura 1.

QUI é um polissacarídeo semi-cristalino. Seu grau de cristalinidade é em função do teor de desacetilação, variando de 0% na quitina e podendo chegar a formas de QUI até 100% desacetilada. A cristalinidade mínima é alcançada nos graus intermediários de desacetilação. A QUI é normalmente insolúvel em solução aquosa acima de pH 7 e em diluições em solução ácida, os grupos amino livres estão protonados ($-\text{NH}^{3+}$), tornando a QUI um polissacarídeo policatiónico com alta densidade de cargas positivas, e a molécula se torna solúvel abaixo de pH ~ 5 . Com o aumento do pH, os grupos amino se tornam cada vez mais desprotonados e tornam-se disponíveis para ligação de hidrogênio (TAN *et al.*, 2009; WU; LIN; YAO, 2014). Em pH crítico, as moléculas em solução formam ligações de hidrogênio suficientes para estabelecer uma rede de gel. O pH ao qual essa transição ocorre depende do grau de desacetilação e da massa molecular média da molécula (DUMITRIU, 2001; SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2015).

O potencial de utilização da QUI como biomaterial decorre da sua natureza catiónica e alta densidade de carga em solução. A densidade de carga permite a formação de complexos iônicos insolúveis, com uma ampla variedade de polímeros aniônicos solúveis em água. A formação do complexo foi documentada com polissacarídeos aniônicos, tais como a heparina e os alginatos (DUMITRIU, 2001; ORYAN; SAHVIEH, 2017).

Uma variedade de interações não específicas entre QUI e proteínas são mediadas por suas cargas positivas, uma vez que boa parte das proteínas solúveis apresentam carga negativa em pH fisiológico. A porção N-acetil-glucosamina é também uma característica estrutural encontrada nos GAGs da MEC. Estas moléculas têm interações específicas com receptores de fatores de crescimento e proteínas de adesão. Isto sugere que a estrutura da QUI possa ser também relacionada com a bioatividade. Polissacarídeos como a QUI têm demonstrado efeito estimulador de macrófagos, devido aos resíduos acetilados (ALLAN; PEYRON, 1995). Além disso, tanto a QUI quanto sua precursora quitina têm demonstrado exercer efeitos quimiotáticos para o recrutamento de neutrófilos *in vitro* e *in vivo* (DUMITRIU, 2001).

QUI é hidrolisada enzimaticamente *in vivo*. O agente primário é a lisozima, a qual parece ter como alvo resíduos acetilados. Os produtos de degradação são oligossacarídeos de comprimento variável. A taxa de degradação é inversamente relacionada com o grau de cristalinidade. Acredita-se que a baixa taxa de degradação *in vivo* de implantes de QUI desacetilados seja devido à incapacidade de penetração de enzimas hidrolíticas na microestrutura cristalina. Porém, a alteração da cadeia molecular e o aumento da fração amorfa, permite a degradação mais rápida, afetando assim, tanto as propriedades mecânicas quanto a solubilidade (MATTHEW, 2001). Além disso, a QUI pode ser degradada enzimaticamente *in vivo* por proteínas presentes na matriz extracelular da cartilagem humana. Essas características fazem da QUI um material potencial para uso na engenharia

do tecido cartilaginoso (TAN *et al.*, 2009).

Os contaminantes decorrentes da preparação de QUI podem ditar a natureza da resposta do tecido. A depender deles, um material biocompatível pode apresentar-se adverso e gerar uma resposta inflamatória grave e possivelmente crônica acompanhada de excesso de fibrose. Assim, assegurar-se do alto grau de purificação e esterilização da QUI são extremamente necessários para sua utilização (FRANÇA *et al.*, 2013).

Os numerosos grupos hidroxila presentes em uma molécula de carboidrato, fornecem uma variedade de locais para a ligação de grupos laterais. Tais grupos podem proporcionar características específicas de funcionalidade e de reconhecimento biológico, ou podem simplesmente servir para modular as propriedades mecânicas ou biológicas da molécula principal. Os polissacarídeos são também hidrofílicos, e muitos têm o potencial de serem processados como hidrogéis de várias densidades bem como estruturas mais densas (SUH; MATTHEW, 2001). Nesse contexto, a QUI é amplamente pesquisada para aplicações biomédicas, por exemplo, em administração controlada de medicamentos e proteínas, em administração de genes não-virais e em Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa (ETMR). Além disso, a QUI não só pode fornecer um microambiente apropriado para a regeneração da cartilagem, como também pode estimular a proliferação celular e promover o reparo tecidual através de diversas vias (CAO; DOU; DONG, 2014).

Para Ding *et al.* (2004) a interação entre a célula e a superfície de um substrato com QUI poderia modular o citoesqueleto e a morfologia celular. Além disso, Huang *et al.* (2005) sugerem que a proliferação e morfologia das células podem ser moduladas pelas características estruturais dos arcabouços de QUI. Nesse mesmo estudo, os autores cultivaram células em substratos bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) de QUI. Na condição 2D, as células se espalharam em apenas um plano de crescimento. Em contraste, as matrizes 3D forneceram melhores condições para a adesão célula-célula e célula-matriz, permitindo com que as células crescessem de forma tridimensional (HUANG *et al.*, 2005).

Células cultivadas sobre substratos de QUI costumam mostrar um padrão de agregação peculiar, crescendo fortemente aglomeradas (CAMPOS; MEI; SANTOS Jr, 2015; LIN *et al.*, 2005). Lin e colaboradores (2005) criam a hipótese de que existe um equilíbrio dinâmico entre as forças que levam as interações célula-substrato e célula-célula. Para esses autores, quando em uma baixa densidade de célula são semeadas na superfície da QUI, a dominância é da interação célula-substrato, uma vez que a distância entre as células é grande. Por outro lado, quando o espaçamento entre as células é pequeno, a interação célula-célula passa a ser a mais importante, que permite uma maior agregação celular e subsequente formação de esferóides sobre o arcabouço.

Resultados anteriores publicados mostraram-se conflitantes sobre os efeitos da QUI em fibroblastos. Embora a QUI tenha demonstrado ter efeito estimulador sobre a atividade de fibroblastos (LAHIJI *et al.*, 2000), outros resultados mostraram alguns efeitos inibitórios sobre as mesmas células (MORI *et al.*, 1997). Sobre a capacidade da QUI de interferir na

proliferação celular, os dados são também controversos. Alguns dados sugerem que a QUI não apresenta efeito sobre a proliferação de fibroblasto em cultivo (CAMPOS; MEI; SANTOS Jr, 2015; MORI *et al.*, 1997). No entanto, outros relatos mostraram que a QUI pode estimular a proliferação de fibroblastos *in vivo* (UENO *et al.*, 1999, UENO; MORI; FUJINAGA, 2001). Por fim, foi sugerido que a QUI poderia atuar como estimulador ou repressor, a depender da variação de diferentes níveis de sua concentração (UENO; MORI; FUJINAGA, 2001). Talvez as variações na preparação das amostras, como discutido anteriormente, possam ajudar a explicar esses resultados discrepantes na literatura.

3.1.5 Ácido Hialurônico

O AH é um polissacarídeo poliônico linear e hidrofílico. É encontrado naturalmente como um glicosaminoglicano não sulfatado, de alta massa molar, presente na matriz extracelular dos tecidos: epitelial (na lâmina basal), conjuntivo (principalmente na cartilagem), nervoso, e mucoso do cordão umbilical (BURDICK; PRESTWICH, 2011; KIERSZENBAUM; TRES, 2015). Sintetizado na membrana plasmática, o AH é constituído por unidades alternadas dissacarídicas repetitivas de um ácido glicurônico e ácido N-acetil-d-glucosamina unidos alternadamente por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 4) (DUMITRIU, 2001). A estrutura da AH é mostrada na Figura 1.

No organismo humano, o AH tem muitas funções fisiológicas, incluindo regulação da água no processo de reparação de feridas da pele, homeostasia da MEC e resistência à compressão na cartilagem. De textura viscosa, é também encontrado no líquido sinovial e no humor vítreo. No líquido sinovial, as propriedades viscoelásticas do AH permitem que ele funcione como um lubrificante e amortecedor de impactos (BURDICK; PRESTWICH, 2011; KIERSZENBAUM; TRES, 2015).

Além das fontes citadas anteriormente, o AH pode também ser produzido industrialmente por fermentação microbiana, a partir de linhagens de bactérias, tais como *Streptococcus* (ANDEREGG; SIMON; AVERBECK, 2014). Por possuir vários sítios de modificações químicas em sua cadeia polimérica, o AH tem sido amplamente utilizado na área de engenharia de tecido em aplicações ortopédicas, cardiológicas e dermatológicas (DUMITRIU, 2001). Os arcabouços produzidos com AH têm, tipicamente, proteínas agregadas, tais como a fibronectina, que facilita a migração celular para o local da lesão. A presença de AH confere uma variedade de funções celulares essenciais ao reparo tecidual. Estas funções incluem o estímulo à migração e proliferação celular na lesão, além da organização da matriz do tecido de granulação (ANDERSON, 2004).

Condrócitos humanos cultivados em arcabouços de AH proliferam e produzem *in vitro*, dentre outros componentes, colágeno tipos I e II, moléculas importantes do tecido cartilaginoso (GRIGOLO *et al.*, 2002). Outros estudos também mostraram a utilização de arcabouço celularizados *in vitro* ou não e transplantado para o defeito na cartilagem de

humanos, com resultados bastante animadores (MARCACCI *et al.*, 2005). Verifica-se ainda arcabouços de AH implantados em falhas ósseas produzidas em ratos. Os resultados, avaliados por radiologia e histologia, mostraram boa osteogênese dos implantes. Por outro lado, a osteogênese foi ainda mais marcante com a adição do fator de crescimento de fibroblasto (FGF), proteína morfogenética óssea (BMP) e células progenitoras da medula óssea (LISIGNOLI *et al.*, 2002)

3.1.6 Colágeno/Gelatina

A proteína de colágeno define-se por ser uma estrutura helicoidal tridimensional composta por três cadeias que podem variar sua combinação de homo ou heterotrímero. Essas possibilidades de variações quanto a sequência e estrutura também refletem em diferentes funções, alguns dos exemplos são: estabilidade, integridade estrutural, substrato para crescimento celular, proteção e conectividade (FERREIRA *et al.* 2012; LIU *et al.* 2015; RICARD-BLUM, 2011).

Conhecido por formar fibras insolúveis *in vitro*, o colágeno tipo I, em particular, é encontrado principalmente em ossos, dentes e tendões. Ao longo do tempo, a extensão da ligação cruzada entre esse tecido conjuntivo aumenta e a função de alta resistência à tração e estabilidade é comprometida (DONG; LV, 2016; FERREIRA *et al.* 2012; LIU *et al.* 2015; RICARD-BLUM, 2011).

Fundamentado em sua importância fisiológica e estrutural, alguns biomateriais utilizando colágeno são estudados para diferentes aplicações, dentre elas, a médica. Além de serem utilizados na obtenção de hidrogéis, micropartículas, membranas, dentre outros, e estarem disponíveis em diferentes formas (COPES *et al.*, 2019; DONG; LV, 2016; FERREIRA *et al.* 2012; RICARD-BLUM, 2011). Caracterizado por ser biorreabsorvível, resistente a forças de distensão, além da disponibilidade, pode ter suas propriedades alteradas por modificação de seus grupos funcionais viabilizando inúmeras utilidades. Entretanto ele apresenta algumas desvantagens para aplicações esqueléticas como degradação rápida, grande hidrofobicidade predispondo a um intumescimento significativo, baixa resistência a forças mecânicas de compressão, alto custo de purificação e dificuldade de esterilização. Isso vem limitando a sua utilização (COPES *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.* 2012; MA *et al.*, 2003; RICARD-BLUM, 2011).

Células cultivadas em matrizes de colágeno é um modelo experimental bastante clássico. Fibroblastos e células fibroblásticas em géis de colágeno são capazes de penetrar na matriz e formar uma estrutura que lembra as características do tecido conjuntivo (pode ser visto na Figura 3). Por outro lado, células epiteliais permanecem na superfície da matriz, formando uma ou mais camadas celulares. Em ambos os casos, as células parecem tentar recriar um ambiente semelhante ao encontrado *in vivo*. Nesse sentido, modificações vêm sendo propostas às matrizes colágenas com o objetivo de otimizá-las.

Por exemplo, aumentar as ligações cruzadas na resposta do colágeno às forças de tensão (DONG; LV, 2016) e na redução de sua degradação *in vivo*. Provavelmente esse efeito fornece certa proteção à molécula à degradação enzimática. Outra modificação importante é a associação do colágeno nativo com outros componentes, como os glicosaminoglicanos (BURKE; NAUGHTON; CASSAI, 1985; YANNAS; BURKE, 1980; YANNAS *et al.*, 1980), bem como proteínas bioativas (AHMED *et al.*, 2004; DONG; LV, 2016) ou biocerâmicas (DONG; LV, 2016; ZHANG *et al.*, 2018). Ou ainda, aumentar a carga negativa presente nele, formando matrizes do chamado colágeno aniônico (PELPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996).

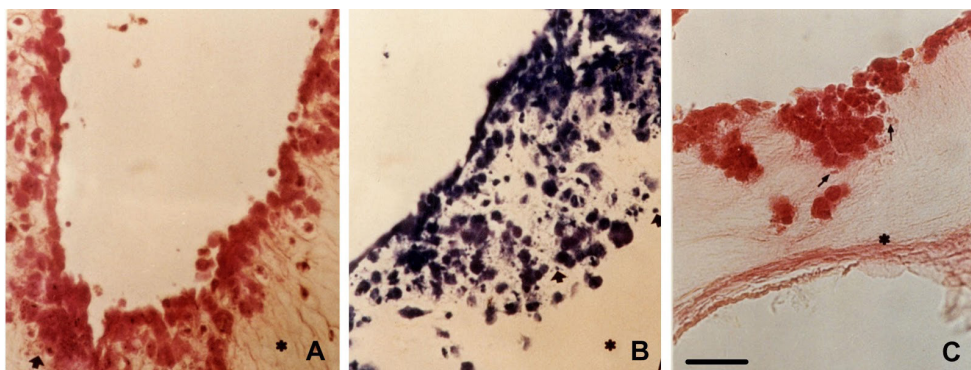


Figura 3. Células Vero cultivadas em géis de colágeno tipo I por 120 h. Observe as células penetrando na matriz colágena e modificando essa matriz por meio de deposição de um material extracelular identificado citoquimicamente. Coloração: A) hematoxiliza e eosina (para morfologia celular); B) azul de toluidina em pH 4,0 (cora ácidos nucleicos e glicosaminoglicanos); C) xylydine ponceau em pH 2,5 (cora proteínas totais). Barra de aumento: 50 μm para todas as imagens.

Fonte: Arquivo pessoal dos autores.

O colágeno aniônico apresenta uma modificação importante na sua estrutura, a remoção por hidrólise alcalina dos grupos carboxamidados resíduos de asparagina e glutamina, e conseqüente formação de grupos carboxila. Com um tratamento alcalino por 72 h ocorre a remoção completa dos resíduos carboxaminos e conversão em carboxila. Estas modificações promovem alterações no padrão de auto-agregação das microfibrilas de colágeno provavelmente devido a novas interações eletrostáticas no interior da matriz colágena. As matrizes produzidas foram caracterizadas como sendo de colágeno tipo I. Com o tratamento alcalino não ocorre modificação na estrutura da tripla hélice ou na estabilidade térmica do colágeno polianiônico em relação à matriz colagênica original (GOISSIS *et al.*, 1999; PELPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996). Contudo, as modificações promovidas aumentam as propriedades dielétricas do colágeno (PELPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996). Do ponto de vista biológico, a adição de cargas negativas, dentro de certos limites, é desejável pois muitas células apresentam uma predileção por cargas

estas para adesão celular (DAVIES *et al.*, 1986; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002). Entretanto, para alguns tipos celulares o aumento de cargas negativas parece inibir ou até bloquear a adesão (HSU; CHEN, 2000). Essas matrizes aniônicas quando implantadas em animais de experimentação não mostraram resposta inflamatória e apresentaram um nível de biocompatibilidade muito bom. Essas matrizes foram testadas para a promoção da regeneração óssea com resultados bastante promissores (MIGUEL *et al.*, 2013; PETTIAN *et al.*, 2018; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002). *In vitro*, existem dados mostrando que as membranas de colágeno polianiônico não apresentaram sinais de toxicidade e se mostram muito receptivas à adesão, crescimento e diferenciação celular (BET *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2012).

Produto da hidrólise parcial do colágeno, a gelatina se torna outra opção na condução de estudos da engenharia de tecidos. Formada por uma mistura de oligopeptídeos e polipeptídeos, as cadeias de sua tripla-hélice estão dissociadas e observam-se características hidrofílicas, baixo peso molecular quando comparado ao colágeno (sua fonte natural), degradação via enzimática e ponto de fusão em torno de 30 °C (ECHAVE *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2015).

Esse polímero natural pode ser extraído de diferentes fontes, como pele, ossos e tecido conjuntivo de animais — gado bovino, suíno e ovino. Apesar da principal fonte de extração ser a bovina, a complexidade intrínseca desse procedimento resulta em uma purificação por vezes complexa. Para tal, as etapas iniciais de processamento da matéria prima se dá por tratamento ácido ou alcalino — isso afeta a estrutura quaternária do colágeno facilitando a dissociação das cadeias peptídicas bem como leva a alguma extensão de hidrólise das ligações peptídicas para a formação de peptídeos de cadeia mais curta. Logo, a composição da gelatina pode variar influenciando suas propriedades finais, a depender do tratamento empregado (ECHAVE *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2015).

A chamada gelatina tipo A (ponto isoelétrico a pH 6–9) é obtida da pele de animais mais jovens, um tratamento ácido de menor tempo é suficiente para que o colágeno possa ser desnaturado e solubilizado. Por outro lado, a gelatina tipo B (ponto isoelétrico a pH 4–5) utiliza como fonte de colágeno animais relativamente velhos, com extração alcalina verifica-se um maior teor de ácidos carboxílicos, baixa faixa de distribuição de massa molar e um procedimento mais drástico e extenso (ECHAVE *et al.*, 2017; KOMMAREDDY; SHENOY; AMIJI, 2007; LIU *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018).

Independentemente do pré-tratamento, a gelatina interage de modo favorável com a estrutura celular e apresenta aplicações na área médica, farmacêutica e cosmética, tais como sistemas particulados na liberação de fármacos de estruturas flexíveis ou rígidas e na composição de produtos para uso capilar e limpeza da pele. Entretanto, diferentes estratégias são utilizadas para otimizar as propriedades viscoelásticas da gelatina e integrá-la como um biomaterial na engenharia de tecidos (ECHAVE *et al.*, 2017; KOMMAREDDY; SHENOY; AMIJI, 2007; LIU *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018).

Para impedir a hidrólise da gelatina em condições fisiológicas, a reticulação química ou *cross-linking* é utilizado na estabilização de sua estrutura. Essa reticulação promove a união de duas ou mais cadeias poliméricas por meio da formação irreversível de ligações covalentes, refletindo na resistência do produto obtido à elevadas temperaturas e à valores extremos de pH desse polímero natural. Exemplos de agentes químicos reticuladores são a genipina, o formaldeído, o gliceraldeído e a proantocianidina (ECHAVE *et al.*, 2017; KOMMAREDDY; SHENOY; AMIJI, 2007; LIU *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018).

Giorno e colaboradores (2020) produziram um *scaffold* associando polímeros sintéticos e naturais, PCL/gelatina, e o glutaraldeído como estratégia de reticulação. Esse conjunto de ações auxiliou na formação do arcabouço, na realização de testes *in vitro* e o material não se mostrou tóxico.

4 | CONCLUSÃO

A restrição funcional humana juntamente com as características dos materiais representam um desafio que ainda precisa ser superado. Contudo, inúmeras estratégias são testadas na busca de um material com desempenho ideal. Dentre os materiais citados, destacam-se os estudos que utilizaram substratos de colágeno e AH na engenharia de tecido ósseo. No entanto, a tecnologia com os materiais poliméricos avança rapidamente e já se mostra promissora.

A tentativa de mimetização do sistema biológico fornece recursos para a medicina regenerativa no quesito de personalização terapêutica, apresentando-se cada vez mais tangível.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não têm qualquer conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

AHMED, M.R.; GOPINATH, D.; GOMATHI, K.; SEHGAL, P.K.; JAYAKUMAR, R. Alpha-crystallin-incorporated collagen matrices as aid for dermal wound healing. **J Biomed Mater Res**, v. 69B, p. 241-248, 2004.

ALLAN, G.G; PEYRON, M. Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. **Carbohydrate Research**, v. 277, n. 2, p. 257-272, 1995.

ALMEIDA NETO, G.R.; BARCELOS, M.V.; RIBEIRO, M.E.A.; FOLLY, M.M.; RODRÍGUEZ, R.J.S. Formulation and characterization of a novel PHBV nanocomposite for bone defect filling and infection treatment. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 104, 110004, 2019.

ANDEREGG, U.L.F.; SIMON, J.C.; AVERBECK, M. More than just a filler - the role of hyaluronan for skin homeostasis. **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 5, p. 295- 303, 2014.

ANDERSON, J.M. **Inflammation, wound healing and the foreign body response**. IN: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E., eds. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2nd edn, Elsevier: Amsterdam, p. 296–303, 2004.

ANSARI, M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. **Prog. Biomater.**, v. 8, p. 223-237, 2019.

ATALA, A. Engineering organs. **Cur. Opin. Biotechnol.**, v. 20, p. 575-592, 2009.

ATHANASION, K.A.; AGRAWAL, C.E.; BARBER, F.A.; BURKHART, S.S. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. **Arthroscopy**, v. 14, p. 726-737, 1998.

AZIMI, B.; NOURPANAH, P.; RABIEE, M.; ARBAB, S. Poly (ϵ -caprolactone) Fiber: An Overview. **J. Eng. Fiber. Fabrics**, v.9, 155892501400900, 2014.

BADROSSAMAY, M.R.; BALACHANDRAN, K.; CAPULLI, A.K.; GOLECKI, H.N.; AGARWAL, A.; GOSS, J.A.; KIM, H.; SHIN, K.; PARKER, K.K. Engineering hybrid polymer-protein super-aligned nanofibers via rotary jet spinning. **Biomaterials**, v. 35, p. 3188-3197, 2014.

BAPTISTA-PERIANES, A.; MALMONGE, S.M.; SIMBARA, M.M.O.; SANTOS Jr, A.R. In vitro evaluation of PHBV/PCL blends for bone tissue engineering. **Mater. Res.**, v. 22, e20190338, 2019.

BARBANTI, S.H.; SANTOS Jr, A.R.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Poly(caprolactone) and poly(d,l-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds used in bone tissue engineering prepared by melt compression particulate leaching method. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 22, p. 2377-2385, 2011.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 15, p. 13-21, 2005.

BASSI, A.K.; GOUGH, J. E.; ZAKIKHANI, M.; DOWNES, S. The chemical and physical properties of poly(ϵ -caprolactone) scaffolds functionalized with poly(vinyl phosphonic acid-co-acrylic acid). **J. Tissue Eng.**, v. 2, 615328, 2011.

BAUDEQUIN, T.; TABRIZIAN, M. Multilineage constructs for scaffold-based tissue engineering: a review of tissue-specific challenges. **Adv Healthc Mater**, v. 7, n. 3, 1700734, 2018.

BET, M.R.; GOISSIS, G.; VARGAS, S.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. **Biomaterials**, v. 24, p. 131-37, 2003.

BOULER, J.M.; PILET, P.; GAUTHIER, O.; VERRON, E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. **Acta Biomater**, v. 53., p. 1-12, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Envelhecimento e saúde da pessoa idosa / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 192 p. il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica, n. 19).

BURDICK, J.A.; PRESTWICH, G.D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. **Adv. Mater.**, v. 23, n. 12, p. 41-56, 2011.

BURKE, J.F.; NAUGHTON, G.; CASSAI, N. A histological, immunological and electron microscopy study of bovine collagen implanted in the human. **Ann Plastic Sur**, v. 14, p. 515-522, 1985.

CAMPOS, M.G.N.; MEI, L.H.I.; SANTOS Jr, A.R. Sorbitol-plasticized and neutralized chitosan membranes as skin substitutes. **Materials Research**, v. 18, p. 781-790, 2015.

CAO, Z.; DOU, C.; DONG, S. Scaffolding biomaterials for cartilage regeneration. **J. Nanomater.**, v. 2014, 489128, 2014.

CARDOSO, G.B.C.; ARRUDA A.C.F. O papel das células tronco na engenharia de tecidos. **Ciências & Cognição**, v. 14, n. 3, p. 214-219, 2009.

CASARIN, S.A.; MALMONGE, S.M.; KOBAYASHI, M.; AGNELLI, J.A.M. Study on in vitro degradation of bioabsorbable polymers poly(hydroxybutyrate-co-valerate) - (PHBV) and poly(caprolactone) - (PCL). **J Biomat Nanobiotechnol.**, v. 2, p. 207-215, 2011.

CHEN, G.Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, p. 6565-6578, 2005.

CHEN, L.; BAI, Y.; LIAO, G.; PENG, E.; WU, B.; WANG, Y.; ZENG, X.; XIE, X. Electrospun poly(L-lactide)/poly(ε-caprolactone) blend nanofibrous scaffold: characterization and biocompatibility with human adipose-derived stem cells. **PLoS One**, v. 8, p. 1-10, 2013.

COOMBES, A.G.A.; RIZZI, S.C.; WILLIAMSON, M.; BARRALET, J.E.; DOWNES, S.; WALLACE, W.A. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. **Biomaterials**, v. 25, p. 315-325, 2004.

COPES, F.; PIEN, N.; VAN VLIERBERGHE, S.; BOCCAFOSCHI, F.; MANTOVANI, D. Collagen-based tissue engineering strategies for vascular medicine. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 166, 2019.

DAVIES, J.E.; CAUSTON, B.; BOVELL, Y.; DAVY, K.; STURT, C.S. The migration of osteoblasts over substrata of discrete surface charge. **Biomaterials**, v. 7, p. 231-233, 1986.

DIAS, M.; ANTUNES, M.C.M.; SANTOS Jr, A.R.; FELISBERTI, M.I. Blends of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(p-dioxanone): miscibility, thermal stability and biocompatibility. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 19, p. 3535-3544, 2008.

DING, Z.; CHEN, J.; GAO, S.; CHANG, J.; ZHANG, J.; KANG, E. Immobilization of chitosan onto poly-L-lactic acid film surface by plasma graft polymerization to control the morphology of fibroblast and liver cells. **Biomaterials**, v. 25, p.1059-1067, 2004.

DONG, C.; LV, Y. Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives. **Polymers**, v. 8, 42, 2016.

DUAN, B.; WANG, M. Customized Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor. **J. Royal Soc Interface**, v.7, p. S615-S629, 2010.

DUMITRIU, S. **Polymeric Biomaterials**, 2nd ed. Canada: Taylor & Francis Group, p. 1167, 2001.

ECHAVE, M.C.; SAENZ DEL BURGO, L.; PEDRAZ, J.L.; ORIVE, G. Gelatin as biomaterial for tissue engineering. **Curr Pharm Des.**, v. 23, n. 24, p. 3567-3584, 2017.

ESPOSITO, A.R.; MODA, M.; CATTANI, S.M.M.; DE SANTANA, G.M.; BARBIERI, J.A.; MUNHOZ, M.M.; CARDOSO, T.P.; BARBO, M.L.P.; RUSSO, T.; D'AMORA, U.; GLORIA, A.; AMBROSIO, L.; DUEK, E.A.R. PLDLA/PCL-T Scaffold for meniscus tissue engineering. **BioResearch Open Access**, v. 2, n. 2, p. 164-172, 2013.

ESQUENAZI, D.; DA SILVA, S.B.; GUIMARÃES, M.A. Aspectos fisiopatológicos do envelhecimento humano e quedas em idosos. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 2, p. 11-20, 2014.

FERREIRA, A.M.; GENTILE, P.; CHIONO, V.; CIARDELLI, G. Collagen for bone tissue regeneration. **Acta Biomater**, v. 8, n. 9, p. 3191-3200, 2012.

FISHER, M.B.; MAUCK, R.L. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Recent Innovations and the Transition to Translation. **Tissue Eng. Part B**, v. 19, p. 1-13, 2013.

FRANÇA, R.; MBEH, D.A.; SAMANI, T.D.; TIEN, C.L.; MATEESCU, M.A.; YAHIA, L.; SACHER, E. The effect of ethylene oxide sterilization on the surface chemistry and in vitro cytotoxicity of several kinds of chitosan. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 101, n. 8, p.1444-1455, 2013.

FUKUSHIMA, K.; FEIJOO, J. L.; YANG, M.C. Abiotic degradation of poly(DL-lactide), poly(3-caprolactone) and their blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, p. 2347-2355, 2012.

GHIASI, M.S.; CHEN, J.; VAZIRI, A.; RODRIGUEZ, E.K.; NAZARIAN, A. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. **Bone Rep.**, v. 6, p. 87-100, 2017.

GIORNO, L.P.; RODRIGUES, L.R.; SANTOS Jr., A.R. Fibrous PCL scaffolds as tissue substitutes. **Int. J. Adv. Med. Biotechnol.**, v. 3, n. 1, p. 40-45, 2020.

GOISSIS, G.; GÓES, J.C. Géis de Colágeno Aniônico: Ransana como Biomateriais. Preparação e Caracterização Físico-química. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 3, p. 32-39, 1997.

GOISSIS, G.; LACERDA, C.; BARBOSAS, M.P.; PINATTI, A. Surface tension control of collagen biomaterials by the selective hydrolysis of internal carboxyamides of the protein matrix. **Rev Bras Eng Biomed**, v.15, p. 55-61, 1999.

GRIGOLO, B.; LISIGNOLI, G.; PIACENTINI, A.; FIORINI, M.; GOBBI, P.; MAZZOTTI, G.; DUCAC, M.; PAVESIOC, A.; FACCHINI, A. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAff 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. **Biomaterials**, v. 23, p.1187-1195, 2002.

HAROOSH, H.J.; DONG, Y.; LAU, K.T. Tetracycline hydrochloride (TCH)-loaded drug carrier based on PLA:PCL nanofibre mats: experimental characterization and release kinetics modeling. **J Mater Sci**, v. 49, p. 6270-6281, 2014.

HELL, A.F.; SIMBARA, M.M.O.; RODRIGUES, P.; KAKAZU, D.A.; MALMONGE, S.M. Production of fibrous polymer scaffolds for tissue engineering using an automated solution blow spinning system.

Res. Biomed. Eng., v. 34, n. 3, p. 273-278, 2018.

HENCH, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v. 19, p. 1419-1423, 1998.

HSU, S.; CHEN, W.C. Improved cell adhesion by plasma-induced grafting of L-lactide onto polyurethane surface. **Biomaterials**, v.21, p. 359-367, 2000.

HUANG, Y.; ONYERI, S.; SIEWE, M.; MOSHFEGHIAN, A.; MADIHALLY, S.V. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, p. 7616-7627, 2005.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Óbitos por causas externas – acidentes de transporte – taxa de mortalidade específica (TME)**. Anuário estatístico do Brasil, volume 70, 2011.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Projeções da população: Brasil e unidades da federação: revisão 2018** / IBGE, Coordenação de População e Indicadores Sociais. – 2. ed. - Rio de Janeiro : IBGE, 2018

IGUMA, T.S.; MALMONGE, S.M.; SANTOS Jr, A.R. Natural fibrous polymers for tissue engineering. **Stem Cells Regen. Med.**, v. 3, p. 1-10, 2019.

IMRE, B.; PUKÁNSZKY, B. Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 1215-1233, 2013.

JAFARI, M.; PAKNEJAD, Z.; RAD, M.R.; MOTAMEDIAN, S.R.; EGHBAL, M.J.; NADJMI, N.; KHOJASTEH, A. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v. 105, n. 2, p. 431-459, 2017.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12.ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L. **Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology**, 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2015.

KOMMAREDDY, S.; SHENOY, D.B.; AMIJI, M.M. **Gelatin nanoparticles and their biofunctionalization**. In: CHALLA, S.S.; KUMAR, R. (eds), Nanotechnologies for the life sciences Vol. 1. Biofunctionalization of Nanomaterials. Weinheim: Wiley, p. 330-352, 2007.

KÖSE, G.T.; KENAR, H.; HASIRCI, N.; HASIRCI, V. Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 1949-1958, 2003.

KOUYA, T.; TADA, S.; MINBU, HIROMI.; NAKAJIMA, Y.; HORIMIZU, M.; KAWASE, T.; LLOYD, DOUGLAS.; TANAKA, TAKAAKI. Microporous membranes of PLLA/PCL blends for periosteal tissue scaffold. **Materials Letters**, v. 95, p. 103-06, 2013.

LAHIJI, A.; SOHRABI, A.; HUNGERFORD, D.S.; FRONDOZA, C.G. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 51, p. 586-595, 2000.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, p. 920-926, 1993.

LEBOURG, M.; ANTÓN, S.J.; RIBELLES, J.L.G. Porous membranes of PLLA–PCL blend for tissue engineering applications. **European Polymer Journal**, v. 44, p. 2207-2218, 2008.

LEE, S.J.; LEE, Y.M.; KHANG, G.; KIM, I.Y.; LEE, B.; LEE, H.B. Effect of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) surface with different wettability on fibroblast behavior. **Macromol. Res.**, v. 10, n. 3, p. 150-157, 2002.

LIN, S.J.; JEE, S.H.; HSAIO, W.C.; LEE, S.J.; YOUNG, T.H. Formation of melanocyte spheroids on the chitosan-coated surface. **Biomaterials**, v. 26, p. 1413-1422, 2005.

LISIGNOLI, G.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; NICOLI, A.N.; TONEGUZZI, S.; FACCHINI, A. Osteogenesis of large segmental radius defects enhanced by basic fibroblast growth factor activated bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid-based polymer scaffold. **Biomaterials**, v. 23, p. 1043-1051, 2002.

LIU, D.; NIKOO, M.; BORAN, G.; ZHOU, P.; REGENSTEIN, J.M. Collagen and gelatin. **Annu Rev Food Sci Technol.**, v. 6, p. 527-557, 2015.

LU, L.X.; WANG, Y.Y.; MAO, X.; XIAO, Z.D.; HUANG, N.P. The effects of PHBV electrospun fibers with different diameters and orientations on growth behavior of bone-marrow derived mesenchymal stem cells. **Biomed. Mater.**, v. 7, 015002, 2012.

MA, L.; GAO, C.; MAO, Z.; ZHOU, J.; SHEN, J.; HU, X.; HAN, C. Collagen/chitosan porous scaffold with improved biostability of skin tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 4833-4841, 2003.

MADL, C.M.; HEILSHORN, S.C.; BLAU, H.M. Bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics. **Nature**, v. 557, n. 7705, p. 335-342, 2018.

MARCACCI, M.; BERRUTO, M.; BROCCHETTA, D.; DELCOGLIANO, A.; GHINELLI, D.; GOBBI, A.; KON, E.; PEDERZINI, L.; ROSA, D.; SACCHETTI, G.L.; STEFANI, G.; ZANASI, S. Articular cartilage engineering with Hyalograft C. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 435, p. 96-105, 2005.

MARSELL, R.; EINHORN, T.A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551-555. 2011.

MATTHEW, H. **Polymers for Tissue Engineering Scaffolds: Interactions with Biomolecules and Cells**. In: DUMITRIU, S. *Polymeric Biomaterials*, 2nd ed. Canada: Taylor & Francis Group, 2001. Cap. 8. p. 173-174, 2001.

MCNAMARA, L.E.; MCMURRAY, R.J.; BIGGS, M.J.P.; KANTAWONG, F.; OREFFO, R.O.C.; DALBY, M.J. Nanotopographical control of stem cell differentiation. **J. Tissue Eng.**, v. 1, 120623, 2010.

MIGUEL, F. B.; BARBOSA JÚNIOR, A.A.; PAULA, F. L.; BARRETO, I. C.; GOISSIS, G.; ROSA, F. P. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 11, p. 2567-275, 2013.

MINATA, M.K.; MOTTA, A.C.; DE BARBO, M.L.P.; DO RINCON, M.C.A.; DUEK, E.A.R. biocompatibility study of poly(l-acid-lactic)/polycaprolactone triol blend [estudo da biocompatibilidade da blenda de poli(l-ácido láctico)/policaprolactona-triol]. **Polímeros**, v. 23, p. 242-47, 2013.

MISTURA, D.V.; MESSIAS, A. D.; DUEK, E.A.R.; DUARTE, M.A.T. Development, characterization, and cellular adhesion of poly(l-lactic acid)/poly(caprolactone triol) membranes for potential application in bone tissue regeneration. **Artificial Organs**, v. 37, p. 978-84, 2013.

MOREIRA, P.L.; GENARI, S.C.; GOISSIS, G.; GALEMBECK, F.; AN, Y. H.; SANTOS Jr, A.R. Bovine osteoblasts cultured on polyanionic collagen scaffolds: An ultrastructural and immunocytochemical study. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 101B, p. 18-27, 2012.

MORI, T.; OKUMURA, M.; MATSUURA, M.; UENO, K.; TOKURA, S.; OKAMOTO, Y.; MINAMI, S.; FUJINAGA, T. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, v. 18, p. 947-951, 1997.

MUNHOZ, M.A.E.S.; POMINI, K.T.; PLEPIS, A.M.G.; MARTINS, V.D.C.A.; MACHADO, E.G.; DE MORAES R.; CUNHA, F.B.; SANTOS Jr, A.R.; CARDOSO, G.B.C.; DUARTE, M.A.H.; ALCALDE, M.P.; BUCHAIM, D.V.; BUCHAIM, R.L.; CUNHA, M.R. Elastin-derived scaffolding associated or not with bone morphogenetic protein (BMP) or hydroxyapatite (HA) in the repair process of metaphyseal bone defects. **PLoS One**, v. 15, n. 4, e0231112, 2020.

O'KEEF, R.J.; MAO, J. Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic - an overview. **Tissue Eng. Part B**, v. 17, n. 6, p. 389-392, 2011.

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

PACHENCE, J.M.; BOHRER, M.P.; KOHN, J. **Biodegradable polymers**. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J.P. Principles of Tissue Engineering. Boston: Elsevier, 3rd ed, p. 323-339, 2007.

PELPIS, A.M.D.; GOISSIS, G.; DAS-GUPTA, D.K. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. **Pol Eng Sci**, v. 36, p. 2932-2938, 1996.

PETTIAN, M.S.; PLEPIS, A.M.G.; MARTINS, V.C.A.; DOS SANTOS, G.R.; PINTO, C.A.L.; GALDEANO, E. A.; CALEGARI, A.R.A.; MORAES, C.A.; CUNHA, M.R. Use of an anionic collagen matrix made from bovine intestinal serosa for in vivo repair of cranial defects. **PLoS One**, v. 13, e0197806, 2018.

PINHEIRO, D.F.C.; FONTES, B.; SHIMAZAKI, J.K.; BERNINI, C.L.; RASSLAN, S. Valor diagnóstico da tomografia de coluna cervical em vítimas de trauma contuso. **Rev. Col. Bras. Cirurg.**, v. 38, p. 299-303, 2011.

RATNAYAKE, J.T.B.; MUCALO, M.; DIAS, G.J. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 105, p. 1285-1299, 2017.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 3, n. 1, a004978, 2011.

RIVERA-BRISO, A. L.; SERRANO-AROCA, A. Poly(3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate): enhancement strategies for advanced applications. **Polymers**, v. 10, 732, 2018.

ROCHA, L.B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M.A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, v. 23, p. 449-456, 2002.

RODRIGUES, A.A.; BATISTA, N.A.; BAVARESCO, V.P.; BARANAUSKAS, V.; CERAGIOLI, H.J.; PETERLEVITZ, A.C.; SANTOS Jr, A.R.; BELANGERO, WD. Polyvinyl alcohol associated with carbon nanotube scaffolds for osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells. **Carbon**, v. 50, p. 450-459, 2012.

SAMUEL, J.C.; AKINKUOTO, A.; VILAVECES, A.; CHARLES, A.G.; LEE, C.N.; HOFFMAN, I.F.; MILLER, W.C.; BALOYI, P.; HOFFMAN, M.; BROWN, L.B.; MUYCO, A.P. Epidemiology of Injuries at a tertiary care center in Malawi. **World. J. Surg.**, v. 33, p. 1836-1841, 2009.

SANTOS Jr, A.R.; LOMBELLO, C.B.; GENARI, S.C. **Technologies applied to stimulate bone regeneration**. In: DAVIES, J. (Org.). Tissue Regeneration - From Basic Biology to Clinical Application. 1ed. Rijeka (Croatia): InTech, p. 339-366, 2012.

SANTOS Jr, A.R.; NASCIMENTO, V.A.; GENARI, S.C.; LOMBELLO, C.B. **Mechanisms of cell regeneration from differentiation to maintenance of cell phenotype**. In: EBERLI, D. (Org.). Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine. 1ed., Rijeka, Croatia: InTech, p. 37-69, 2014.

SANTOS Jr, A.R.; ZAVAGLIA C.A.C. **Tissue engineering concepts**. In: HASHMI, S. (editor-in-chief), Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. Oxford: Elsevier; p.1-5, 2016.

SANTOS Jr. AR; FERREIRA, B.M.P.; DUEK, E.A.R ; DOLDER, H.; WADA, M.L.F. Bioabsorbable blends of poly (L-lactic acid)/poly (hydroxybutyrate- co-hydroxyvalerate) for cell culture. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 11, p. 1623-1632, 2005.

SANTOS, J.E., SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R.; CAMPANA FILHO, S.P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, p. 242-249, 2003.

SHIN, B.Y.; HAN, D.H. Compatibilization of immiscible poly(lactic acid)/poly(e- caprolactone) blend through electron-beam irradiation with the addition of a compatibilizing agent. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 83, p. 98-104, 2013.

SHOICHET, M.S. Polymer scaffolds for biomaterials applications. **Macromolecules**, v. 43, p. 581-591, 2010.

SIDDIQUI, N.; ASAWA, S.; BIRRU, B.; BAADHE, R.; RAO, S. PCL-Based composite scaffold matrices for tissue engineering applications. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 7, p. 506-532, 2018.

SUH, J.-K.F.; MATTHEW, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2589-2598, 2000.

SULTANA, N.; WANG, M. PHBV/PLLA-based composite scaffolds fabricated using an emulsion freezing/freezing-drying technique for bone tissue engineering: surface modification and in vitro biological evaluation. **Biofabrication**, v. 4, 015003, 2012.

SZYMAŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p.1819-1846, 2015.

TAN, H.; CHU, C.R.; PAYNE, K.A.; MARRA, K.G. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 2499-2506, 2009.

TEIXEIRA, I.N.D.O; GUARIENTO, M.E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 2845-2857, 2010.

TODO, M.; PARK, JOO-E.; KURAOKA, H.; KIM, JIN-W.; TAKI, K.; OHSHIMA, M. Compressive deformation behavior of porous PLLA/PCL polymer blend. **J Mater Sci**, v. 44, p. 4191- 4194, 2009.

TODO, M.; PARK, S.-D.; TAKAYAMA, T.; ARAKAWA, K. Fracture micromechanisms of bioabsorbable PLLA/PCL polymer blends. **Engineering Fracture Mechanics**, v. 74, p. 1872- 1883, 2007.

UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 52, p.105-115, 2001.

UENO, H.; YAMADA, H.; TANAKA, I.; KABA, N.; MATSUURA, M.; OKUMURA, M.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. **Biomaterials**, v. 20, p.1407-1414, 1999.

VERT, M.; DOI, Y.; HELLWICH, K.H.; HESS, M.; HODGE, P.; KUBISA, P.; RINAUDO, M.; SCHUÉ, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure Appl. Chem.**, v. 84, p. 377-410, 2012.

VIDA, T.A.; MOTTA, A.C; SANTOS Jr, A.R.; ZAVAGLIA, C.A.C. Fibrous PCL/PLLA scaffolds obtained by rotary jet spinning and electrospinning. **Mater. Res.**, v. 20 (Suppl. 2), p. 910-916, 2017.

WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, p. 5897-5909, 2009.

WU, Q.X.; LIN, D.Q.; YAO, S.J. Design of chitosan and its water soluble derivatives- based drug carriers with polyelectrolyte complexes. **Marine Drugs**, v. 12, p. 6236-6253, 2014.

YANG, G.; XIAO, Z.; LONG, H.; MA, K.; ZHANG, J.; REN, X.; ZHANG, J. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. **Sci Rep.**, v. 8, n. 1, 1616, 2018.

YANNAS, I.V.; BURKE, J.F. Design of an artificial skin 1: Basic design principles. **J Biomed Mater Res Appl Biomat**, v.14, p. 65-81, 1980.

YANNAS, I.V.; BURKE, J.F.; GORDON, P.L.; HUANG, C.; RUBENSTEIN, R.H. Design of an artificial skin 2: Control of chemical composition. **J Biomed Mater Res Appl Biomat**, v.14, p.107-131, 1980.

ZAVAGLIA, C.A.C.; SILVA, M.H.P. **Feature Article: Biomaterials**. In: HASHMI, S. (editor-in-chief), Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. Oxford: Elsevier; v.10, p. 1-5, 2016.

ZHANG, D.; WU, X.; CHEN, J.; LIN, K. The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. **Bioactive Materials**, v.3, p.129-138, 2018.

ZHONG, L.; HU, D.; QU, Y.; PENG, J.; HUANG, K.; LEI, M.; QIAN, Z. Preparation of adenosine-loaded electrospun nanofibers and their application in bone regeneration. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 15, p. 857-877, 2019.

DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DE SÍNTESE NA MORFOLOGIA E PUREZA DA HAP OBTIDA VIA REAÇÃO DE COMBUSTÃO

Data de aceite: 01/07/2021

Data de submissão: 05/05/2021

Thaíla Gomes Moreira

Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
Departamento de Engenharia Biomédica
Natal – RN
<http://lattes.cnpq.br/0968966207021956>

Kaline Melo de Souto Viana

Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
Escola de Ciências e Tecnologia
Natal – RN
<http://lattes.cnpq.br/3289446495842859>

Amanda Melissa Damião Leite

Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
Escola de Ciências e Tecnologia
Natal – RN
<http://lattes.cnpq.br/3077817092155432>

RESUMO: Hidroxiapatita - HAp, principal versão sintética das fases de fosfatos de cálcio, que correspondem a 70% da composição dos ossos humanos, é um biomaterial que desperta grande interesse na área odonto-médica, devido a sua similaridade em composição e estrutura. Sabendo da influência direta do método de síntese na estrutura do material obtido, este trabalho de pesquisa se propôs a obter HAp nanométrica, para que fosse o mais similar possível à biológica, por reação de combustão, avaliando a influência da escolha combustíveis, juntamente com a razão de diluição dos reagentes, na estrutura da HAp obtida. Para caracterização, foram utilizadas

as técnicas: DRX, MEV e FTIR. Os resultados mostraram que foi obtida a fase HAp micrométrica formando aglomerados heterogêneos de fácil desaglomeração, de modo mais eficiente e com maior grau de pureza quando utilizadas a glicina como combustível, razão de diluição 1:3 e calcinação em forno de mufla a 600 e 900°C.

PALAVRAS-CHAVE: pH, Temperatura, Calcinação, HAp, Combustão.

DETERMINATION OF THE SYNTHESIS PARAMETERS' INFLUENCE ON THE MORPHOLOGY AND PURITY OF THE HAP OBTAINED BY COMBUSTION REACTION

ABSTRACT: Hydroxyapatite - HAp, the main synthetic version of the calcium phosphate phases, which corresponds to 70% of the human bones' composition, is a biomaterial that attracts great interest in the odonto-medical area due to its similarity in composition and structure. Knowing the direct synthesis method's influence on the structure of the obtained material, this research work proposed to obtain nanometric HAp, to be as similar as possible to the biological one, by combustion reaction, evaluating the influence of the choice of fuels, together with the dilution ratio of the reagents in the obtained HAp structure. For characterization, the following techniques were used: DRX, SEM and FTIR. The results showed that the micrometric HAp phase was obtained more efficiently and with a higher purity when using glycine as fuel, 1:3 dilution ratio and calcination in a muffle furnace at 600 and 900°C.

KEYWORDS: pH, Temperature, Calcination, HAp, Combustion.

1 | INTRODUÇÃO

Aproximadamente 70% do osso humano é composto por fosfatos de cálcio, consistindo esta parte inorgânica em uma fase amorfa e uma fase cristalina, formada pela apatita biológica (TORKITTIKUL e CHAIPANICH, 2012). Hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ - HAp é, juntamente com o β -fosfato tricálcio $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, um dos mais utilizados representantes sintéticos bioativos destes fosfatos, uma vez que, apresentam alta biocompatibilidade, excelente osteoindução e osteocondução, além da composição e estrutura similares as do material biológico esquelético.

Na literatura médica, devido as suas propriedades de biocompatibilidade, a HAp é utilizada rotineiramente em intervenções odontológicas, cirurgias plásticas reconstrutivas e em cirurgias ortopédicas. O aumento de rebordo alveolar, como coadjuvante na colocação de implantes metálicos, na reconstrução buco-maxilo-facial, no reparo e substituição de paredes orbitárias, no preenchimento de cavidades anoftálmicas, como envoltório para equipamento percutâneos, na regeneração guiada de tecidos ósseos e no recobrimento de implantes metálicos e próteses de quadril, são alguns dos exemplos da utilização deste material (DÓREA NETO, 2007; COSTA et al, 2009).

Em laboratório, a hidroxiapatita pode ser sintetizada através de métodos úmidos e reações de estado sólido, utilizando os mais diversos compostos. Pode-se citar dentre os métodos de síntese: gravitacional (NATHANAEL et al, 2011), hidrotermal (SIMOMUKAY, 2013), micro-ondas (KALITA e VERMA, 2010), precipitação (ARAÚJO et al, 2012), reação de combustão (GHOSH et al, 2009) e sol-gel (RODRIGUES, 2008). Uma característica extremamente importante no que diz respeito a sua aplicação é o tamanho de partículas que se pode obter, devendo ser levado em consideração durante a escolha do método de síntese a ser utilizado.

Este trabalho se propôs a obter hidroxiapatita formada por grãos nanométricos, através da síntese por reação de combustão, analisando se, a estrutura da HAp obtida, sofreria influência de diferentes temperaturas de calcinação, dentro de uma faixa pré-determinada, ao variar a taxa de diluição dos reagentes, combinada ao uso de dois combustíveis distintos, glicina $[\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2]$ e ureia $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$, e mantendo o pH de solução sempre na mesma faixa, de modo que a sua estrutura e composição fossem as mais similares possível à apatita biológica.

A síntese por reação de combustão, método escolhido devido a sua fácil execução, baixo custo e por permitir produção de pós de HAp em larga escala, é descrito como um método baseado no princípio de uma reação exotérmica capaz de se auto-sustentar durante certo intervalo de tempo, tendo como resultado final pós finos e homogêneos (ALVES, BERGMANN e BERUTTI, 2013).

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Pós de hidroxiapatita foram sintetizados e analisados como descrito nas subseções a seguir apresentadas, para fins de estudo.

2.1 Procedimento Experimental

As sínteses, neste trabalho, foram realizadas de acordo com o proposto por Gosh et al (2010) quanto a metodologia e proporção de reagentes. Foram utilizados como precursores de cálcio e fósforo, respectivamente, nitrato de cálcio tetrahidratado $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ (Vetec – Química Fina, Brasil) e fosfato de amônio di-básico $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ (Vetec – Química Fina, Brasil), acrescidos de água destilada em proporções de 1:2 e 1:3. As misturas foram então colocadas sob agitação magnética, e adicionadas de ácido nítrico (Vetec – Química Fina, Brasil, 69%), em pequenas quantidades até a completa diluição do precipitado. O combustível glicina $[\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2]$ (Vetec – Química Fina, Brasil) a uma solução, enquanto ureia $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$ (Vetec – Química Fina, Brasil) foi adicionada a segunda, estando ambas as soluções ainda sob agitação magnética, como mostrado na Figura 1. Os pHs foram monitorados utilizando-se um pHmetro HANNA de modelo HI 221, e corrigidos com hidróxido de cálcio P.A. (Biodinâmica, Brasil), até atingir pH 1,0. As soluções foram transferidas para cadinhos metálicos e colocadas em resistência elétrica para que houvesse combustão. Os produtos obtidos, a partir das soluções, foram macerados, pesados e divididos em quatro amostras de pesos semelhantes, após atingirem temperatura ambiente. Três das amostras, de cada solução, foram colocadas para calcinar durante 12 horas em forno de mufla, com temperatura inicial de 25°C até atingirem 600°C, 900°C e 1200°C, respectivamente, a uma taxa de 10°C/min.

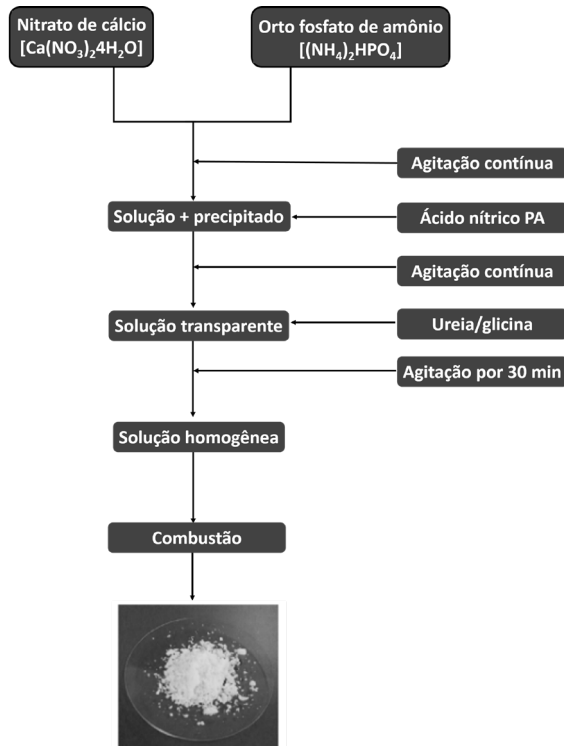


Figura 1 – Representação esquemática do processo de combustão de solução para síntese de HAp (MOREIRA, VIANA e LEITE, 2018).

2.2 Caracterizações

As técnicas Difração de Raios-X (DRX), utilizando um difratômetro BRUKER de modelo D2 PHASER para registrar os dados em 2θ no intervalo de 3° a 70° , e Espectroscopia de Infravermelhos com Transformadas de Fourier (FTIR), utilizando um espectrômetro BRUKER de modelo FT-IR VERTEX 70, na faixa de 400 a 4000cm^{-1} , com resolução de 4cm^{-1} , foram empregadas para a caracterização microestrutural dos pós obtidos. A análise dos dados foi realizada utilizando o software Origin Versão 2019b (9.65) e os picos classificados de acordo com a carta da JCPDS para HAp, e dados presentes na literatura. E Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi a técnica realizada para caracterização morfológica, utilizando microscópio eletrônico de mesa Hitachi de modelo TM-3000.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Difração de Raios-X (DRX)

Analisando os picos cristalográficos presentes nos difratogramas e comparando-os com a ficha padrão de HAp da JCPDS e resultados apresentados por Ghosh et al (2009), Ramakrishnan et al (2012), Carrodegua e De Aza (2011), e Sasikumar e Vijayaraghavan

(2010), foi possível comprovar a obtenção de HAp, como principal fase de fosfatos de cálcio, em todos os casos. Os materiais sintetizados apresentaram ainda, formação de outras duas fases de fosfatos de cálcio, a β -fosfato tricálcio (β -TCP) que ocorre entre 20 e 30° e o α -fosfato tricálcio (α -TCP) que ocorre entre 40-50°, como ilustrado nas Fig. 2 e 3. Quando analisados separadamente, os pós que apresentaram menor formação das outras fases, foram aqueles cujas soluções foram diluídas em razão 1:3 de água destilada, calcinados a 600°C para o combustível glicina e, calcinados a 1200°C para o combustível ureia.

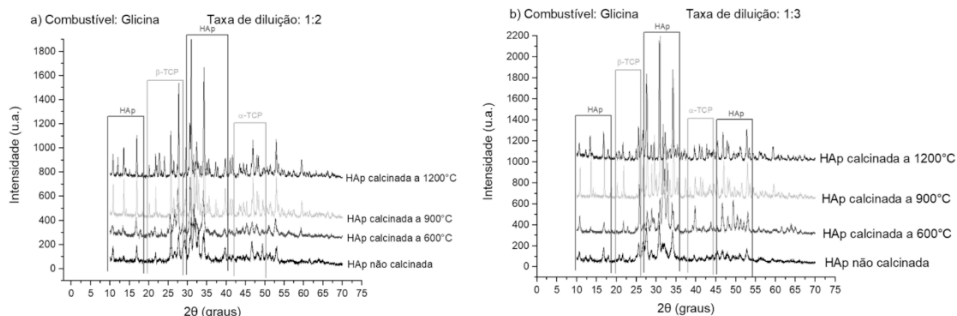


Figura 2 – HAp sintetizada utilizando o combustível glicina, a partir de soluções de razões de diluição (a) 1:2 e (b) 1:3.

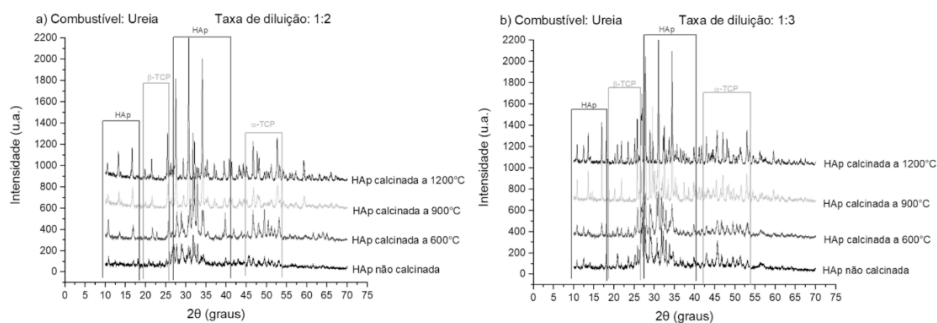


Figura 3 – HAp sintetizada utilizando o combustível ureia, a partir de soluções de razões de diluição (a) 1:2 e (b) 1:3.

3.2 Espectroscopia de Infravermelhos com Transformadas de Fourier (FTIR)

As Figuras 4 e 5 mostram os espectros de infravermelho dos pós obtidos, os quais apresentaram picos correspondentes aos grupamentos que compõe os materiais. Bandas na faixa entre 3600 e 3200 cm^{-1} , que representam os grupamentos OH-, foram observadas de forma significativa apenas nos pós não calcinados em forno de mufla. A existência de grupamentos CO_3^{2-} foi observada na faixa entre 1650 e 1400 cm^{-1} , tendo desaparecido após os materiais serem submetidos a calcinação em mufla. Os grupamentos PO_4^{3-} foram

atestados devido aos picos existentes nas faixas de 1200 a 850 cm^{-1} e 570 a 470 cm^{-1} . Na faixa entre 2200 e 1900, para todos os casos foi observada a formação de pequenos picos, que poderiam indicar a presença de grupamentos nitrato, os quais precisam ser melhor analisados, uma vez que não são desejados para aplicações do material na área biomédica.

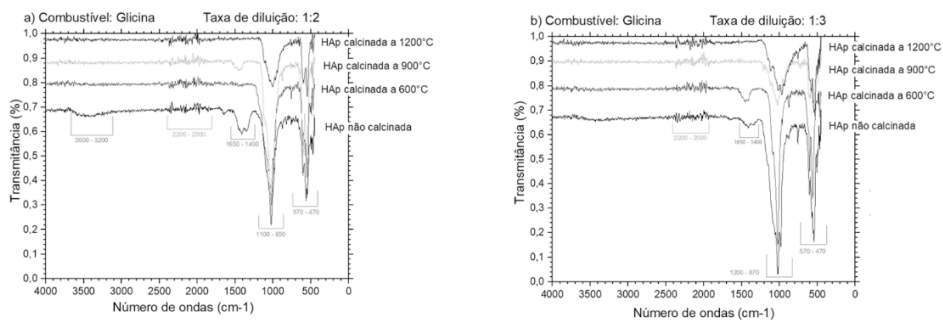


Figura 4 – Espectro de FTIR de HAp sintetizada utilizando o combustível glicina, a partir de soluções de razões de diluição (a) 1:2 e (b) 1:3.

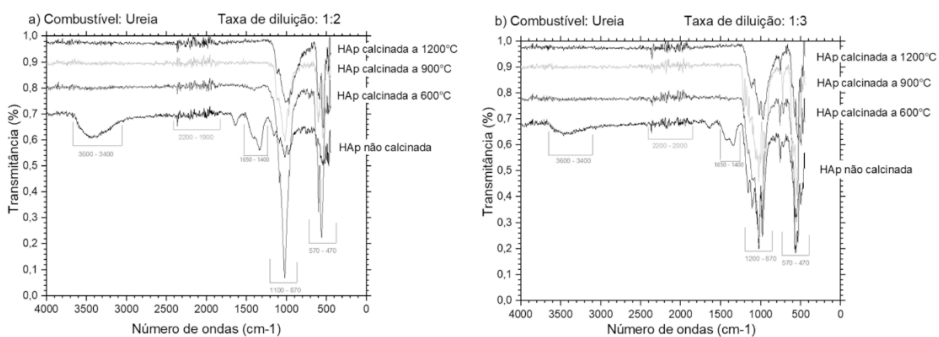


Figura 5 – Espectro de FTIR de HAp sintetizada utilizando o combustível ureia, a partir de soluções de razões de diluição (a) 1:2 e (b) 1:3.

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Por análise morfológica foi observado que a proporção de diluição, tipo de combustível e temperatura de calcinação tem influência direta na morfologia dos grãos. Tendo as amostras, sintetizadas a partir de reagentes diluídos em razão 1:3 e calcinadas a 900°C, para ambos os combustíveis, não apresentou maior porosidade e menor dificuldade no que diz respeito a desaglomeração de seus grãos, como mostrados nas Fig. 6 a 9.

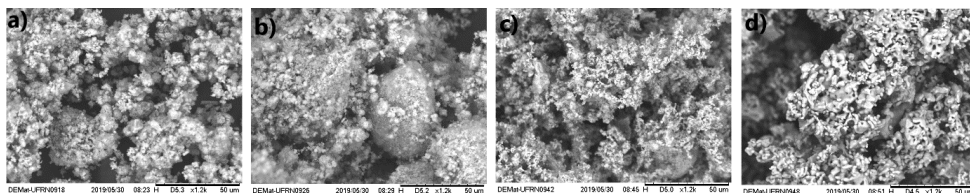


Figura 6 – Micrografias das amostras de HAp sintetizadas com o combustível glicina, a partir de solução com razão de diluição 1:2, com aumento de 1200X. (a) Não calcinada, (b) Calcinada a 600°C, (c) Calcinada a 900°C, (d) Calcinada 1200°C.

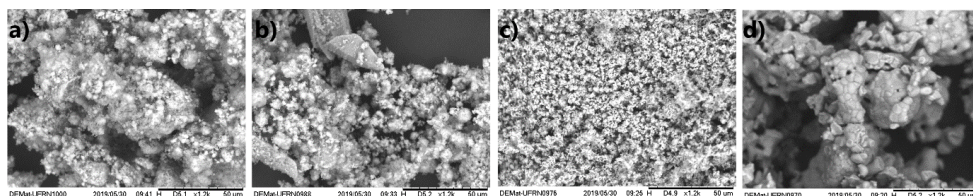


Figura 7 – Micrografias das amostras de HAp sintetizadas com o combustível glicina, a partir de solução com razão de diluição 1:3, com aumento de 1200X. (a) Não calcinada, (b) Calcinada a 600°C, (c) Calcinada a 900°C, (d) Calcinada 1200°C.

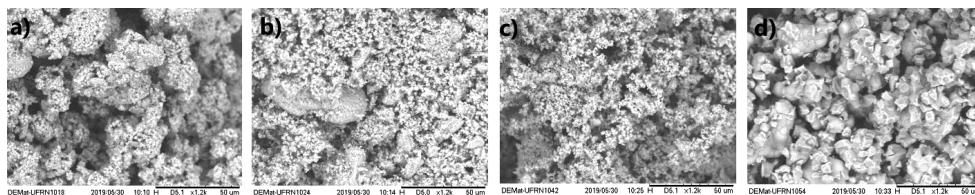


Figura 8 – Micrografias das amostras de HAp sintetizadas com o combustível ureia, a partir de solução com razão de diluição 1:2, com aumento de 1200X. (a) Não calcinada, (b) Calcinada a 600°C, (c) Calcinada a 900°C, (d) Calcinada 1200°C.

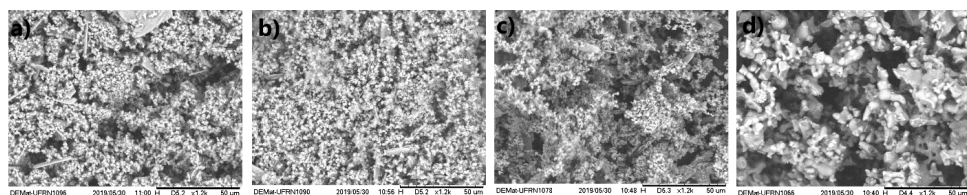


Figura 9 – Micrografias das amostras de HAp sintetizadas com o combustível ureia, a partir de solução com razão de diluição 1:3, com aumento de 1200X. (a) Não calcinada, (b) Calcinada a 600°C, (c) Calcinada a 900°C, (d) Calcinada 1200°C.

4 | CONCLUSÕES

Diferentemente do interesse inicial, as amostras sintetizadas neste trabalho não foram compostas apenas pela fase hidroxiapatita (HAp) e sim uma mistura de três fases de fosfatos de cálcio (HAp + β -TCP + α -TCP). Através da caracterização morfológica foi possível classificar os pós das amostras como aglomerados porosos, tendo as amostras de glicina de razão 1:3, calcinadas a 900°C apresentado esta característica em grau mais elevado.

Através da análise dos resultados das caracterizações, concluiu-se que o combustível mais propício para a síntese de hidroxiapatita foi a glicina, sob razão de diluição de reagentes 1:3, e calcinados as temperaturas de 600 e 900°C em forno de mufla, uma vez que a fase predominante obtida foi a de HAp. No entanto, verifica-se a necessidade de melhoramento das condições de síntese para obter-se a HAp 100% pura e sem grupamentos nitrato.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e as professoras pela disponibilidade em ensinar e orientar. Aos colegas e técnicos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ALVES, Annelise Kopp; BERGMANN, Carlos P.; BERUTTI, Felipe Amorim. Combustion Synthesis. *In: ALVES, Annelise Kopp; BERGMANN, Carlos P.; BERUTTI, Felipe Amorim. Novel Synthesis and Characterization of Nanostructured Materials*. [S. L.]: Springer Science & Business Media, 2013. Cap. 2. p. 12-13.

ARAÚJO, M. S. O., FOOK, M. V. L., FURTADO, G. T. F. S., SILVA, M. F. A., MELO, O. B. Síntese E Caracterização De Hidroxiapatita Carbonatada Obtida Pelo Método De Precipitação. *In: Congresso Latino-Americano De Órgãos Artificiais E Biomateriais, 7., 2012, Natal.*

CARRODEGUAS, R. G., DE AZA, S. α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 3536-3546, 2011.

COSTA, A. C. F. M., LIMA, M. G., LIMA, L. H. M. A., CORDEIRO, V. V., VIANA, K. M. S., SOUZA, V., LIRA, H. L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, Campina Grande. v. 4, n. 3, p. 29-38, Nov. 2009. Disponível em: <http://www2.ufcg.edu.br/revista-remap/index.php/REMAP/article/view/105/123>.

DÓREA NETO, F. A. **Avaliação do cimento de alfa-fosfato tricálcico em artrodese tarsocrurais experimentais em cães**. 2007. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2007.

GHOSH, S. K., ROY, S. K., KUNDU, B., DATTA, S., BASU, D. Synthesis of nanosized hydroxyapatite powders through solution combustion route under different reaction conditions. *Materials Science and Engineering B*, [s. l.], v. 176, p. 14–21, 2009.

KALITA, S. J., VERMA, S. Nanocrystalline hydroxyapatite bioceramic using microwave radiation: Synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering C*, [s. l.], v. 30, p. 295–303, 2010.

MOREIRA, T.G., VIANA, K.S., LEITE, A.M.D. Influência De Variáveis De Síntese Na Obtenção De Hidroxiapatita. *In: Congresso Latino-Americano De Órgãos Artificiais E Biomateriais, 10. 2018, João Pessoa.*

NATHANAEL, A. J., HONG, S. I., MANGALARAJ, D., CHEN, P. C. Large scale synthesis of hydroxyapatite nanospheres by high gravity method. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 173, p.846-854, 2011.

RAMAKRISHNAN, R., WILSON, P., SIVAKUMAR, T., JEMINA, I. A comparative study of hydroxyapatites synthesized using various fuels through aqueous and alcohol mediated combustion routes. **Ceramics International**, [s. l.], v. 39, p. 3519–3532, 2012.

RODRIGUES, L. R. Materiais e Métodos. *In*: RODRIGUES, L. R. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita e titânia nanoestruturadas para a fabricação de compósitos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) -- Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008. cap. 3, p. 28-30.

SASIKUMAR, S., VIJAYARAGHAVAN, R. Synthesis and Characterization of Bioceramic Calcium Phosphates by Rapid Combustion Synthesis. **Journal Of Materials Science & Technology**, [s. l.], v. 26, n. 12, p. 1114-1118, 2010.

SIMOMUKAY, E. Materiais e Métodos. *In*: SIMOMUKAY, E. **Síntese e Caracterização de Ortofosfatos de Cálcio dopados com Nióbio (V) por meio da Rota Hidrotérmica e Avaliação de Citocompatibilidade**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Faculdade de Química Aplicada, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013. cap. 3, p. 63, 68-70.

TORKITTIKUL, P. e CHAIPANICH, A. Optimization of calcium chloride content on bioactivity and mechanical properties of White Portland cement. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 282-289, 2012.

SOBRE A ORGANIZADORA

CLAUDIANE AYRES - Possui graduação em Fisioterapia pelo Centro de Ensino Superior de Campos Gerais (2012). Recebeu diploma de mérito acadêmico, conquistando o primeiro lugar geral da turma de formandos 2012, do curso de Fisioterapia do Centro Superior do Campos Gerais- CESCAGE. Mestre em Ciências Biomédicas - UEPG (2016-2018) Pós-graduada em Fisioterapia Dermatofuncional CESCAGE (2012-2013). Pós- graduada em Gerontologia-UEPG (2017-2018); Pós- graduada em Fisioterapia Cardiovascular (2017-2018); Tem experiência nas áreas de fisioterapia em de Fisioterapia em UTI (Geral, coronariana e neonatal); Fisioterapia Hospitalar, Fisioterapia em DTM e orofacial; Fisioterapia em Saúde do Idoso; Atuou como docente do curso técnico em estética do CESCAGE-2013; Atuou na área de fisioterapia hospitalar e intensivismo (UTI Geral e coronariana)- 2016- 2018; Atualmente, atua como docente em cursos profissionalizantes de estética facial, corporal e massoterapia na Ideale Cursos; Atua também como docente do curso de Fisioterapia do Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais- CESCAGE. Atua ainda como docente do curso Tecnólogo em Estética e Cosmetolgoia -UNICESUMAR PG.

ÍNDICE REMISSIVO

B

Bacillus thuringiensis 34, 35, 36, 47, 48

Biocombustíveis 34, 35, 36, 38, 39, 44, 45, 46

Bronquíolos 14, 18

Brônquios 14, 15, 16, 18, 20

C

Condiciones laborales 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12

E

Engenharia de tecidos 50, 55, 58, 62, 64, 65, 67, 68, 69, 71, 74, 78, 80, 81

Envelhecimento celular 62

Enzimas 27, 32, 34, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 57, 58, 73

F

Frutos verdes de Jenipapo 26

G

Genipa americana Linnaeus 25, 26, 32

Genipina 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 79

L

Ligninocelulolítico 34, 36, 41, 43, 44, 46

M

Marsupiais 14, 15, 23

Materiais biocompatíveis 62

Medicina regenerativa 50, 52, 55, 58, 64, 65, 74, 79

P

Polimerização 40, 50, 52, 54, 57, 69

Polímeros biorreabsorvíveis 62, 67, 68

R

Reparo ósseo 62, 64

S

Silicosis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13

T


Traqueia 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23


Tuberculosis 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 13

COLEÇÃO DESAFIOS DAS ENGENHARIAS:

ENGENHARIA BIOMÉDICA



 www.atenaeditora.com.br

 contato@atenaeditora.com.br

 @atenaeditora



 www.facebook.com/atenaeditora.com.br


Atena
Editora
Ano 2021

COLEÇÃO DESAFIOS DAS ENGENHARIAS:

ENGENHARIA BIOMÉDICA



-  www.atenaeditora.com.br
-  contato@atenaeditora.com.br
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  www.facebook.com/atenaeditora.com.br