

Escola Superior São Francisco de Assis
Curso de Graduação em Biomedicina

Catarina Caldas Fagundes Serrano

Julia Gabriela Oliveira Santana

Vitória Matiazzi Lirio

**DESENVOLVIMENTO DE *SCAFFOLD* À BASE DE ALGINATO E
COLÁGENO**

Santa Teresa – ES

2024

Catarina Caldas Fagundes Serrano

Julia Gabriela Oliveira Santana

Vitória Matiazzi Lirio

DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLD À BASE DE ALGINATO E COLÁGENO

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do curso de Biomedicina da Escola Superior São Francisco de Assis, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Henrique Taufner

Santa Teresa – ES

2024

Catarina Caldas Fagundes Serrano

Julia Gabriela Oliveira Santana

Vitória Matiazzi Lirio

DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLD À BASE DE ALGINATO E COLÁGENO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Biomedicina da Escola Superior São Francisco de Assis como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em ___ de _____ de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gabriel Henrique Taufner
Escola Superior São Francisco de Assis

Prof. Me. Vytor Hugo Mendes
Escola Superior São Francisco de Assis

Profa. Ma. Letícia Karolini Walger
Escola Superior São Francisco de Assis

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.”

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de expressar nossa sincera gratidão a todos que ajudaram a tornar realidade este Trabalho de Conclusão de Curso, de qualquer forma.

Primeiramente gostaríamos de agradecer a Deus pela oportunidade de estar aqui, ao nosso orientador pela paciência, dedicação e orientação durante toda a pesquisa. Suas contribuições foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Queremos agradecer também aos nossos professores que, com seu conhecimento e experiência, nos deram a base teórica e prática necessária para concluir este estudo.

Não podemos deixar de agradecer às nossas famílias, especialmente ao seu amor, apoio incondicional e incentivo em todas as fases dessa jornada.

Por fim, gostaríamos de agradecer a todas as organizações, instituições e profissionais que ajudaram neste trabalho, fornecendo os dados, informações e recursos que foram necessários.

Nosso muito obrigada a todos!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- a) Ácido β -D- manurônico, b) Ácido α L-gulurônico (G). Fonte: Bártolo, 2007.	14
Figura 2 - Estrutura do colágeno tipo I. (a) Sequência primária de aminoácidos, (b) hélice secundária esquerda e estrutura tripla hélice terciária direita e (c) estrutura quaternária escalonada. Fonte: Friess, 1998.	16
Figura 3 - Esquema representativo da interação fibronectina-fibronectina, e seus principais sítios. Fonte: Taufner, 2023.	18
Figura 4 – Etapas de produção do biomaterial. Em A) observa-se a bancada de trabalho, em B), C) e D) o procedimento de síntese.	27
Figura 5 – Visão macroscópica e aspectos físicos do biomaterial produzido.	30
Figura 6 - Resultados do teste de absorção de água. One-way ANOVA $P < 0,0001$	30
Figura 7 – Padrão ultraestrutural do <i>scaffolds</i> associando alginato e colágeno.....	31
Figura 8 – Perfil espectroscópico evidenciando picos característicos do colágeno e alginato.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores de crescimento envolvidos no processo tecidual. Fonte: Szwed (2016); Formularium (2022).....	17
Tabela 2 - Detalhamento da produção dos biomateriais.....	28
Tabela 3 – Frequências vibracionais das principais bandas evidenciadas pela espectroscopia de espalhamento Raman nos biomateriais produzidos. A frequência vibracional em biomateriais compactos pode sofrer sobreposição, portanto, considera-se variabilidade de $\pm 1-5 \text{ cm}^{-1}$	34

LISTA DE SIGLAS

AL	Alginato
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CO	Colágeno
EDS	Espectroscopia por Dispersão de Elétrons
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FGF	Fator de crescimento derivado do fibroblasto
FN	Fibronectina
kDA	Kilodalton
MEC	Matriz extracelular
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
pH	Potencial Hidrogenionico
TGF-β3	Fator transformador de crescimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 BIOENGENHARIA DE BIOMATERIAIS	11
2.2 CLASSIFICAÇÃO DE BIOMATERIAIS	12
2.2.1 Biomaterial de Alginato.....	13
2.2.2 Biomaterial de Colágeno.....	15
2.3 AGENTES PROMOTORES DE CRESCIMENTO	16
2.3.1 Fibronectina	18
3 JUSTIFICATIVA.....	20
4 OBJETIVOS.....	22
4.1 OBJETIVO GERAL.....	22
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5 ARTIGO CIENTÍFICO	23
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biomateriais para aplicações médicas e científicas tem despertado grande interesse devido ao seu potencial de impacto positivo nos cuidados de saúde. Dentre esses biomateriais, os scaffolds se destacam como uma ferramenta versátil e promissora, especialmente em aplicações de engenharia de tecidos e regeneração de órgãos. Esses scaffolds são estruturas tridimensionais que fornecem suporte físico e bioquímico para o crescimento celular e a regeneração de tecidos, sendo desenvolvidos a partir de uma variedade de materiais, incluindo polímeros naturais e sintéticos (Ravi *et al.*, 2014).

Entre os materiais utilizados para a produção de scaffolds, o alginato e o colágeno são amplamente estudados devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades bioativas (Roberts, 1992 *apud* Azevedo, 2007). O alginato, um biopolímero natural derivado de algas marrons, é conhecido por sua capacidade de formar géis suaves e porosos que podem atuar como matrizes ideais para aplicações biológicas. O colágeno, por sua vez, é a principal proteína estrutural da matriz extracelular e contribui para criar um ambiente favorável para a adesão, migração e diferenciação celular, aspectos essenciais para a regeneração tecidual (Prestes, 2015).

Apesar das propriedades benéficas desses biomateriais, a busca por estratégias que otimizem suas características e aprimorem o processo de regeneração tecidual é constante. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver scaffolds combinando alginato e colágeno, explorando a sinergia entre esses dois polímeros naturais. A proposta foi criar uma matriz tridimensional que ofereça um ambiente propício para a adesão e proliferação celular, com o potencial de servir como base para tratamentos inovadores em engenharia de tecidos e cicatrização.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOENGENHARIA DE BIOMATERIAIS

A bioengenharia é uma área multidisciplinar que combina conhecimentos de biologia, engenharia e outras ciências aplicadas para desenvolver soluções inovadoras na medicina regenerativa. Os avanços na engenharia de tecidos têm possibilitado o aperfeiçoamento de biomateriais projetados para favorecer a adesão, proliferação e diferenciação celular, além de estimular a produção de moléculas específicas do tecido-alvo (Oliveira *et al.*, 2010).

Um dos pilares da biotecnologia médica moderna é a engenharia de tecidos e órgãos, que alia biologia estrutural e biomimética. Essa área fundamenta-se na compreensão da biologia dos sistemas supramoleculares, biologia celular e tecidual, desenvolvimento e morfologia, bem como nos sistemas integradores dos organismos superiores (Oliveira *et al.*, 2010).

Nesse contexto, a bioengenharia tecidual surge como uma alternativa promissora para enfrentar desafios como a falência de órgãos e lesões extensas nos tecidos. Ela oferece a possibilidade de substituir tecidos danificados por substitutos biológicos, promovendo a regeneração de tecidos funcionais e órgãos saudáveis (Kaigler; Mooney, 2001).

Tecidos, por definição, são grupos de células especializadas, semelhantes ou diferentes, que trabalham em conjunto para desempenhar funções específicas em organismos multicelulares. Quando ocorre uma lesão significativa, resultando na perda de células e da função tecidual, o reparo natural do organismo pode ser insuficiente, exigindo intervenções externas. Esse suporte pode ser fornecido por cirurgias ou por tecnologias biomédicas avançadas.

Para que o processo de reparo seja bem-sucedido, algumas condições devem ser atendidas, como suprimento sanguíneo adequado, estabilidade mecânica e a presença de uma estrutura tridimensional de suporte (Salgado, 2002; Gondim, 2007 *apud* Carvalho, 2010). Muitas vezes, são necessários procedimentos de enxerto ou a substituição de tecidos por biomateriais que atuem como estruturas de suporte,

incentivando a migração e proliferação celular (Cancedda *et al.*, 2003; Schepers, 1998 *apud* Carvalho, 2010).

O maior desafio da bioengenharia tecidual é desenvolver biomateriais e técnicas que otimizem a regeneração tecidual (Langer *et al.*, 1999). Esses materiais têm sido extensivamente estudados por suas propriedades bioativas, biocompatíveis e, frequentemente, por apresentarem custos acessíveis (Verna *et al.*, 1986 *apud* Carvalho, 2010). A biocompatibilidade, em especial, é essencial para o sucesso do tratamento, pois regula respostas fisiológicas de maneira controlada e tolerada. Para garantir isso, é imprescindível realizar testes preliminares *in vitro* e *in vivo* antes de sua aplicação em humanos (Carvalho *et al.*, 2010).

Os biomateriais podem ser fabricados a partir de uma ampla variedade de matérias-primas, como metais, cerâmicas e polímeros, e estão disponíveis em diversas formas, incluindo adesivos, géis, cilindros, discos, microesferas, grânulos, filmes, membranas, pós, blendas, borrachas, fibras, espumas, entre outros (Martins, 2000 *apud* Santos, 2010). Essas versatilidades de composição e formato ampliam seu uso em diferentes aplicações da medicina regenerativa.

2.2 CLASSIFICAÇÃO DE BIOMATERIAIS

Biomateriais são definidos como substâncias de origem natural ou sintética que possuem a capacidade de tratar, substituir ou interagir funcionalmente com partes do corpo humano, como tecidos e órgãos (Williams, 2009). Embora seu uso não seja uma novidade, remontando à antiguidade em aplicações como implantes de lentes e restaurações dentárias, os avanços tecnológicos nas últimas décadas possibilitaram uma maior aplicabilidade clínica. No campo da engenharia de tecidos, os biomateriais têm desempenhado um papel crucial, permitindo o desenvolvimento de soluções inovadoras para a regeneração e substituição de tecidos. De acordo com Keane e Badylak (2014), os biomateriais podem ser classificados com base em sua origem (natural ou sintética) e estado físico (sólido ou líquido), o que define suas propriedades e potencial de aplicação.

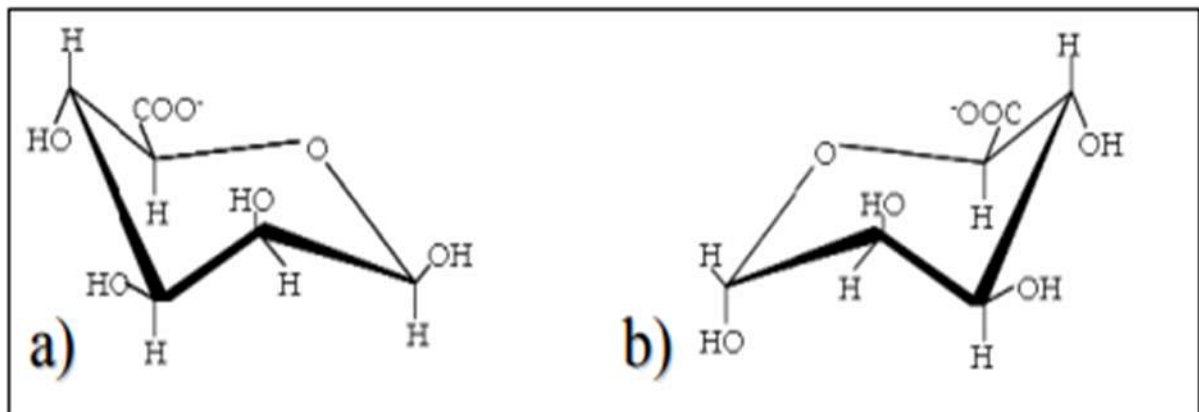
Os biomateriais de origem natural são encontrados em organismos vivos ou extraídos de tecidos biológicos. Esses materiais apresentam alta biocompatibilidade, reduzindo o risco de respostas adversas ou toxicidade. Exemplos incluem colágeno, uma proteína estrutural amplamente utilizada em engenharia de tecidos por promover a adesão e o crescimento celular, quitina, um polissacarídeo presente em exoesqueletos de crustáceos com aplicações em curativos e regeneração tecidual, e alginato, um componente natural extraído de algas marrons pertencentes às famílias *Phaeophyceae*, que se destaca como um biomaterial amplamente utilizado devido à sua capacidade de formar hidrogéis biocompatíveis e biodegradáveis (Spezzia, 2020).

Por outro lado, biomateriais sintéticos são desenvolvidos em laboratório e podem ser projetados para atender a requisitos específicos. Eles são divididos em quatro categorias principais: polímeros, metais, cerâmicas e compósitos. Os polímeros, como polietileno e polimetilmetacrilato, são amplamente utilizados em dispositivos médicos devido à sua flexibilidade e leveza. Metais, como titânio e aço inoxidável, são conhecidos por sua resistência mecânica e durabilidade, sendo essenciais em implantes ortopédicos e dentários. Cerâmicas, como a hidroxiapatita e os biovidros, possuem propriedades osteocondutivas, tornando-se ideais para regeneração óssea e dental. Já os compósitos combinam diferentes materiais, como polímeros reforçados com fibras, para proporcionar maior resistência e leveza em próteses e implantes (Keane; Badylak, 2014; Spezzia, 2020).

2.2.1 Biomaterial de Alginato

A engenharia de tecidos representa um novo campo interdisciplinar de conhecimento que consiste na aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da vida. Com relações a estrutura-função em tecidos humanos e de se desenvolverem substitutos biológicos para a reparação ou regeneração de tecidos e órgãos. O biomaterial alginato, é um polissacarídeo natural e bastante útil para a produção de *scaffolds*. É um copolímero linear constituído por blocos de (1-4) β -D- ácido manurônico (unidades M) e de α -L ácido gulurônico (unidades G). Esse polímero tende-se a reagir com íons divalentes, por exemplo de cálcio, sintetizando um gel ou com íons polivalentes formando ligações cruzadas (Bártolo, 2007).

Figura 1 - a) Ácido β -D- manurônico, b) Ácido α L-gulurônico (G). Fonte: Bártolo, 2007.



O alginato tem se destacado na bioengenharia tecidual devido às suas propriedades únicas que favorecem a regeneração e a criação de tecidos artificiais. Ele é um polímero natural extraído de algas marinhas e apresenta vantagens como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixo custo, tornando-o uma escolha promissora para aplicações médicas. Além disso, o alginato pode formar géis sob condições específicas, o que facilita sua manipulação e sua integração com células vivas, promovendo um ambiente favorável à adesão celular e à regeneração tecidual (Freitas; Destefani, 2022).

A utilização do alginato em engenharia de tecidos está especialmente focada em sua capacidade de criar matrizes tridimensionais, as quais proporcionam uma estrutura de suporte para células, imitando a matriz extracelular natural. Este aspecto é fundamental para o desenvolvimento de tecidos que podem ser usados em tratamentos regenerativos. Estudos indicam que o alginato pode ser combinado com fatores de crescimento e células-tronco para promover a formação de diferentes tipos de tecidos, como cartilagem e pele, além de ser eficaz na criação de ambientes controlados para a proliferação celular e diferenciação (Anselme *et al.*, 2000; Lucchesi *et al.*, 2008). A pesquisa continua avançando, mostrando o alginato como um biomaterial crucial para o desenvolvimento de soluções inovadoras na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos (Branco, 2014).

2.2.2 Biomaterial de Colágeno

Dados indicam que atualmente, a crescente extração do colágeno e seus derivados vem aumentando gradativamente, por sua capacidade na produção e utilização desta proteína em agentes sintéticos, assim valorizando os subprodutos que são desenvolvidos. A partir da extração, obtém a fibra do colágeno relativamente em seu estado de “gelatina” e o colágeno hidrolisado, desses derivados cada um tem a sua especificidade própria (Prestes, 2015).

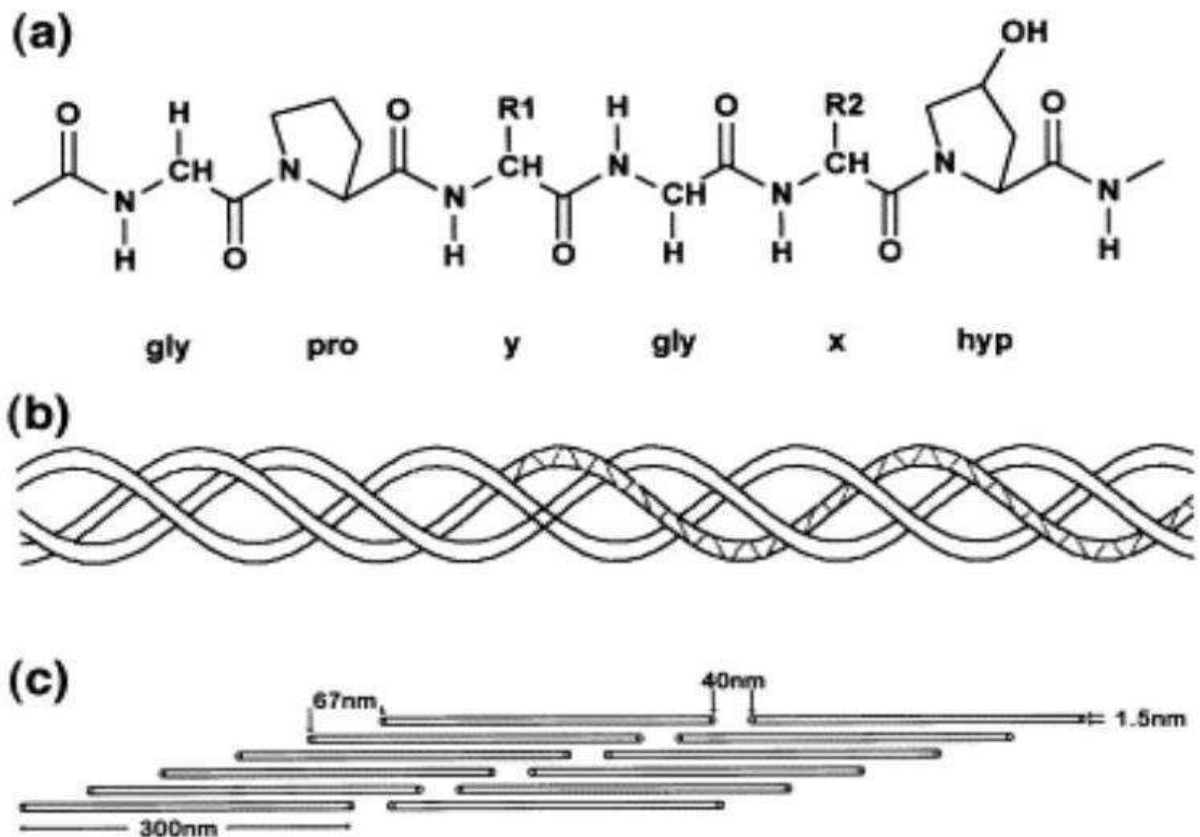
Principal proteína estrutural encontrada nos tecidos conjuntivos no corpo de diversas espécies, sua funcionalidade se dá pela sustentação e elasticidade à pele, músculos entre outros. Esse polímero compõe ao menos 30% da matéria-prima e orgânica do corpo dos animais e 60% das proteínas totais do corpo humano (Fachinelli, 2005).

Posterior a extração desse polímero, ele se divide em fibras de colágeno, geradas pela polimerização de unidades moleculares, denominadas em cadeias polipeptídicas, ligadas em pontes de hidrogênio e atreladas em um arranjo helicoidal. Até o momento, pesquisas concluíram aproximadamente 29 tipos genéticos distintos de colágeno, onde cada um contém características específicas, como dito anteriormente. Com esses variados tipos de colágenos, os mais utilizados são os colágenos tipo I, II, III, IV, V, VII, IX, XI e XII, para o intuito dessa pesquisa, o colágeno do tipo I é o mais farto, um componente mais comum e pioneiro da matriz extracelular como matriz natural, ele é quem estimula a formação de células e tecidos. Essas biocompatibilidades resultam o produto atraente para confecção do específico biomaterial em variadas formas, sendo em membranas e esponjas para reparações de queimaduras, hemostasia em gel e suporte ao desenvolvimento das células (Fachinelli, 2005).

O colágeno do tipo I, representa formação de fibrilas, uma proteína composta por uma tripla hélice, formada por três cadeias polipeptídicas (Figura 2). Essa estrutura confere ao colágeno sua resistência e durabilidade. Ele é fundamental para manter a força e a integridade estrutural de diversos tecidos. No caso da pele, tal como, o colágeno tipo I ajuda a mantê-la firme e elástica. Nos ossos, contribui para a sua resistência, funcionando como uma matriz na qual minerais como o cálcio se depositam. O corpo humano sintetiza esse biomaterial, através de células como os fibroblastos (na pele)

e osteoblastos (nos ossos). Com o tempo, especialmente com o envelhecimento, a produção de colágeno diminui e sua degradação aumenta, resultando em mudanças como perda de elasticidade na pele e fragilidade nos ossos (Fachinelli, 2005).

Figura 2 - Estrutura do colágeno tipo I. (a) Sequência primária de aminoácidos, (b) hélice secundária esquerda e estrutura tripla hélice terciária direita e (c) estrutura quaternária escalonada. Fonte: Friess, 1998.



2.3 AGENTES PROMOTORES DE CRESCIMENTO

No processo da cicatrização de feridas são utilizados agentes promotores de crescimento, eles possuem a capacidade de ativar o crescimento e a proliferação de células, atuam estimulando a angiogênese, a fibrogênese e o crescimento dos vasos sanguíneos (Mitchell et al., 2012; Masi, 2015).

Os fatores de crescimento estimulam a atividade dos genes reguladores do crescimento, age como proteínas que determinam a divisão celular quando ligadas às células. Os proto-oncogenes são genes que aumentam a proliferação celular, ou seja,

se a célula sofrer alguma mutação, a produção do fator de crescimento ocorre de forma excessiva e torna a célula propícia à oncogênese (Mitchell et al., 2012). Um claro exemplo de fatores de crescimento e suas funções estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 1 - Fatores de crescimento envolvidos no processo tecidual. Fonte: Szwed (2016); Formularium (2022).

Fator de crescimento	Símbolo	Funções
Fator de crescimento epidérmico	EGF	Presente na epiderme, promove a proliferação de células mesenquimais e epiteliais, o que aumenta a cicatrização.
Fator transformador de crescimento	TGF-β3	Estimula a replicação de hepatócitos e algumas células epiteliais. Favorece a proliferação de fibroblastos em condições fisiológicas ou patológicas.
Fator de crescimento derivado das plaquetas	PDGF	Ajudam em processos como: quimiotaxia, proliferação de células e síntese de matriz celular.
Fator de crescimento derivado do fibroblasto ácido e básico	FGF-a FGF-b	Participam no recrutamento da ativação a mitogênese, migração e diferenciação de alguns tipos celulares.

A matriz extracelular (MEC) é uma rede tridimensional extensa, proteínas estruturais e funcionais dispostas em camadas de suporte, fazem parte de sua composição (Theocharis *et al.*, 2016). Fornece uma estrutura de suporte para células nos tecidos e tem importante ligação com os fatores de crescimento por servir como substrato adesivo para a migração celular (Hynes, 2009).

A divisão da matriz extracelular é feita em matriz intersticial e pericelular. A matriz intersticial circunda as células e está concentrada no estroma tecidual, já a matriz pericelular está em contato próximo com as células, principalmente por meio de interações com receptores celulares como integrina (Theocharis *et al.*, 2016). A matriz pericelular, denominada membrana basal, está localizada entre o parênquima e o tecido conjuntivo e serve como ponto de ancoragem para as células, protegendo-as de danos causados pelas propriedades mecânicas induzidas do tecido. A Membrana basal contém colágeno tipo IV, nidogênio, laminina, perlecan e agrina (Jayadev; Sherwood, 2017). A matriz intersticial é composta por glicosaminoglicanos como o ácido hialurônico, que são moléculas importantes para a hidratação do tecido

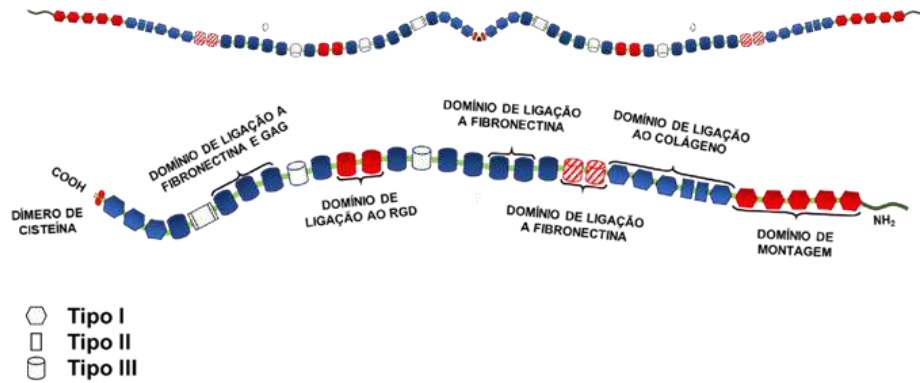
intersticial. Além de conter fibronectina, colágeno, elastina e proteoglicano, esses componentes formam uma rede profunda e dinâmica, ocasionada pela interação entre eles (Theocharis *et al.*, 2016).

2.3.1 O Uso da Fibronectina no Enriquecimento de *Scaffolds* à Base de Alginato e Colágeno

Na matriz extracelular existem proteínas que são importantes para a homeostase, sendo a fibronectina o primeiro componente descrito (Alberts *et al.*, 2002). A fibronectina (FN) apresenta um conjunto de isoformas de glicoproteínas diméricas, é conhecida por suas moléculas com funções de adesão, migração, diferenciação e organização celular (Menezes, 2003). A molécula possui subunidade com porção amino-terminal e carboxi-terminal, a conexão dessas subunidades se dá por meio de ligações dissulfeto, o que permite que a fibronectina tenha interações de sítio com diversas moléculas (Manabe *et al.*, 1997; Nardin, 2006).

Constituída por três domínios diferentes (I, II e III) (figura 2) que consiste em sequências repetidas com sítios ativos para interações com receptores celulares como integrina, bem como vários fatores de crescimento (Mezzenga; Mitsi, 2019). A fibronectina celular e a plasmática são junções codificadas do RNA mensageiro, em sua forma celular demonstra uma proteína insolúvel presente na matriz extracelular de aproximadamente 550 kDa. A plasmática é solúvel de 220 a 550 kDa, tem ligação com a fibrina e ajuda a estabilizar o coágulo que recupera as lacunas criadas por lesões. Suas duas formas possuem semelhança das propriedades funcionais e estruturais (Kierszenbaum, 2016).

Figura 3 - Esquema representativo da interação fibronectina-fibronectina, e seus principais sítios. Fonte: Taufner, 2023.



A fibronectina, com suas capacidades de promover adesão celular e facilitar interações com integrinas, tem o potencial de melhorar ainda mais a funcionalidade dos *scaffolds* de alginato e colágeno. Estudos indicam que a incorporação de fibronectina em *scaffolds* de alginato e colágeno pode aumentar a adesão e a migração celular, o que é fundamental para a regeneração de diversos tipos de tecido, como pele, cartilagem e osso (Akhundov *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2016). A fibronectina pode interagir com as células-tronco, favorecendo sua diferenciação para os tipos celulares desejados, o que representa um avanço significativo nas estratégias de bioengenharia tecidual (Harris *et al.*, 2015). Neste contexto, a associação do alginato e do colágeno com fibronectina oferece uma abordagem promissora para o desenvolvimento de biomateriais que possam ser usados em terapias regenerativas, especialmente em tratamentos de lesões e doenças degenerativas.

A incorporação de fibronectina em biomateriais como *scaffolds* de alginato e colágeno tem mostrado resultados promissores em diversos estudos. Em estudo de biofuncionalização de biomateriais de colágeno, foi demonstrado que a adição de fibronectina em *scaffolds* de colágeno aumenta a interação com as células, promovendo a adesão e a diferenciação celular em tipos específicos, o que é crucial para a regeneração eficaz de tecidos como osso, cartilagem e pele, dada a capacidade da fibronectina, em interagir se ligar a integrinas, vias de sinalização que incentivam a migração celular, a organização do tecido e a formação de novos vasos sanguíneos, um processo importante na reparação tecidual (Zumbo *et al.*, 2024).

Dada a natureza hidrofílica do alginato, incorporação de fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, podem ser possíveis. Evidências científicas sugerem que a combinação de alginato com fibronectina em *scaffolds* pode

aumentar a adesão celular e a migração, acelerando o processo de regeneração tecidual. Além disso, pesquisas têm mostrado que o alginato, por sua capacidade de liberar gradualmente fatores bioativos, pode contribuir para uma resposta regenerativa prolongada, tornando-o uma excelente escolha para terapias baseadas em biomateriais (Palomino-Durant *et al.*, 2021). A modificação de alginato com moléculas bioativas, como a fibronectina, amplia suas possibilidades terapêuticas, otimizando a interação do biomaterial com as células e a regeneração do tecido-alvo.

3 JUSTIFICATIVA

A medicina regenerativa é uma área de crescente relevância científica e clínica, impulsionada pela necessidade de desenvolver estratégias inovadoras para a regeneração de tecidos e órgãos danificados. No entanto, o sucesso dessas abordagens depende amplamente do design e das propriedades dos biomateriais utilizados. Biomateriais que combinam biocompatibilidade, suporte estrutural e funcionalidade bioativa são especialmente promissores, pois podem atuar como matrizes temporárias para regeneração tecidual e como plataformas de liberação controlada de fatores de crescimento essenciais para o processo regenerativo.

O colágeno, como proteína estrutural natural, apresenta excelente biocompatibilidade e promove adesão celular, sendo amplamente utilizado em aplicações biomédicas. Já o alginato, com sua capacidade de formar hidrogéis, destaca-se por sua facilidade de manipulação e habilidade de reter moléculas bioativas. A associação entre esses dois biopolímeros é uma estratégia altamente promissora, pois pode unir as propriedades biológicas do colágeno à funcionalidade estrutural e retenção do alginato, resultando em um material híbrido de alto desempenho.

Além disso, o desenvolvimento de plataformas de liberação controlada de fatores de crescimento pode otimizar o processo regenerativo, garantindo a liberação gradual de moléculas bioativas no microambiente tecidual e, assim, melhorando a eficácia terapêutica. O estudo deste biomaterial híbrido é, portanto, essencial para expandir o arsenal de ferramentas disponíveis na medicina regenerativa, potencializando seu impacto clínico em condições como lesões teciduais, defeitos ósseos e regeneração de pele.

Este trabalho se justifica pela carência de estudos que proponha a síntese simplificada de biomateriais híbridos de colágeno e alginato, que atuem como plataformas bioativas para atuar diretamente na regeneração tecidual, e servir como meio de veiculação de fator de crescimento e moléculas bioativas como fibronectina e ácido hialurônico. A produção e caracterização desse biomaterial oferecem uma oportunidade única de explorar novas possibilidades terapêuticas e ampliar as ferramentas aplicadas à regeneração tecidual.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biomaterial por meio da associação entre alginato e colágeno, visando aprimorar suas propriedades físicas e biológicas para aplicações em medicina regenerativa.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver métodos de fabricação para criar uma base tridimensional a partir de polímeros selecionados;
- Investigar junto a literatura a compatibilidade dos polímeros selecionados com fatores de crescimento para garantir interações eficazes;

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo Original

DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLD À BASE DE ALGINATO E COLÁGENO

SERRANO C. C. F¹; SANTANA J. G. O¹; LÍRIO V. M.¹; TAUFNER G. H²

¹*Graduando em Biomedicina, Escola Superior São Francisco de Assis, Santa Teresa, Brasil*

²*Docente do Curso de Biomedicina, Escola Superior São Francisco de Assis, Santa Teresa, Brasil*

RESUMO

A engenharia de biomateriais tem se destacado como uma área fundamental na medicina regenerativa, especialmente no desenvolvimento de terapias para regeneração de tecidos danificados. Dentre os biomateriais mais investigados, o colágeno e o alginato se destacam devido às suas propriedades biológicas e físico-químicas únicas. O colágeno, uma proteína abundante no corpo humano, é amplamente utilizado por sua biocompatibilidade e capacidade de promover adesão celular, enquanto o alginato, um polissacarídeo derivado de algas marinhas, é valorizado por sua habilidade em formar géis hidrofílicos e pela sua aplicação na encapsulação celular e liberação controlada de bioativos. A combinação desses dois materiais resulta em biomateriais híbridos com potencial para aplicações inovadoras em medicina regenerativa. Este estudo teve como objetivo produzir um biomaterial composto por colágeno e alginato, explorando seu potencial como uma matriz bioativa para regeneração tecidual. O processo de síntese envolveu a preparação de soluções de colágeno e alginato, que foram misturadas com cloreto de cálcio para promover a reticulação e formar um hidrogel. O biomaterial foi caracterizado por métodos como microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia Raman para analisar suas propriedades estruturais e funcionais. Os resultados indicaram que a combinação de colágeno e alginato melhorou as propriedades mecânicas do material em comparação ao alginato isolado. O biomaterial composto por ambos os polímeros mostrou maior firmeza e capacidade de retenção de água, o que pode ser crucial para sua aplicação em regeneração de tecidos. A análise da absorção de água revelou que o biomaterial híbrido foi mais eficiente em reter água, o que pode favorecer a liberação controlada de fármacos e outros fatores de crescimento. Além disso, a microscopia eletrônica de varredura mostrou uma estrutura tridimensional bem definida, indicando a eficácia do

processo de reticulação e a formação de uma rede estável e biocompatível. Esses achados sugerem que a combinação de colágeno e alginato pode resultar em biomateriais com propriedades otimizadas para aplicações em engenharia tecidual, como regeneração dérmica, óssea e cartilaginosa. No entanto, futuras pesquisas devem focar na avaliação de longo prazo da biocompatibilidade e eficácia do material em modelos *in vivo*.

Palavras-chave: Biomateriais, colágeno, alginato, engenharia tecidual e regeneração tecidual.

ABSTRACT

Biomaterial engineering has emerged as a key area in regenerative medicine, particularly in the development of therapies for tissue regeneration. Among the most studied biomaterials, collagen and alginate stand out due to their unique biological and physicochemical properties. Collagen, an abundant protein in the human body, is widely used for its biocompatibility and ability to promote cellular adhesion, while alginate, a polysaccharide derived from seaweed, is valued for its ability to form hydrophilic gels and its application in cell encapsulation and controlled release of bioactives. The combination of these two materials results in hybrid biomaterials with potential for innovative applications in regenerative medicine. This study aimed to produce a biomaterial composed of collagen and alginate, exploring its potential as a bioactive matrix for tissue regeneration. The synthesis process involved the preparation of collagen and alginate solutions, which were mixed with calcium chloride to promote crosslinking and form a hydrogel. The biomaterial was characterized by methods such as scanning electron microscopy and Raman spectroscopy to analyze its structural and functional properties. The results indicated that the combination of collagen and alginate enhanced the mechanical properties of the material compared to pure alginate. The biomaterial composed of both polymers showed greater firmness and water retention capacity, which could be crucial for its application in tissue regeneration. The water absorption analysis revealed that the hybrid biomaterial was more efficient at retaining water, which could favor the controlled release of drugs and other growth factors. Additionally, scanning electron microscopy showed a well-defined three-dimensional structure, indicating the effectiveness of the crosslinking process and the formation of a stable, biocompatible network. These findings suggest that the

combination of collagen and alginate may result in biomaterials with optimized properties for applications in tissue engineering, such as dermal, bone, and cartilage regeneration. However, future research should focus on the long-term evaluation of the material's biocompatibility and efficacy in in vivo models.

Keywords: Biomaterials, collagen, alginate, tissue engineering, and tissue regeneration.

Introdução

Os avanços na engenharia de biomateriais têm desempenhado um papel crucial no desenvolvimento de soluções terapêuticas para a medicina regenerativa. Entre os materiais amplamente estudados, o colágeno e o alginato destacam-se devido às suas propriedades biológicas e físico-químicas únicas. O colágeno, uma proteína estrutural abundante no corpo humano, é amplamente utilizado na engenharia de tecidos por sua biocompatibilidade e capacidade de promover adesão e proliferação celular (Lee *et al.*, 2001). Por outro lado, o alginato, um polissacarídeo natural derivado de algas marinhas, oferece a capacidade de formar géis hidrofílicos e apresenta características favoráveis para encapsulação celular e liberação controlada de bioativos (August *et al.*, 2006).

A associação desses dois biopolímeros tem atraído interesse crescente devido à possibilidade de unir as propriedades biológicas do colágeno com a funcionalidade estrutural e capacidade de retenção do alginato. Essa combinação pode resultar em sistemas híbridos altamente versáteis, com aplicações potenciais na liberação controlada de fatores de crescimento, bem como de moléculas com potencial bioativo, tal qual a fibronectina e ácido hialurônico, fundamentais para a regeneração tecidual (Drury; Mooney, 2003; Trujillo *et al.*, 2021; Zumbo *et al.*, 2024).

Dada a importância de desenvolver plataformas biomateriais inovadoras, este estudo visa produzir um material composto de colágeno e alginato, explorando seu potencial como uma matriz bioativa para aplicações regenerativas. Além disso, busca-se avaliar a capacidade retentiva do biomaterial, um potencial mecanismo para liberação de fatores de crescimento de maneira controlada e que pode contribuir para a regeneração de tecidos danificados.

Material e Métodos

Desenho Experimental

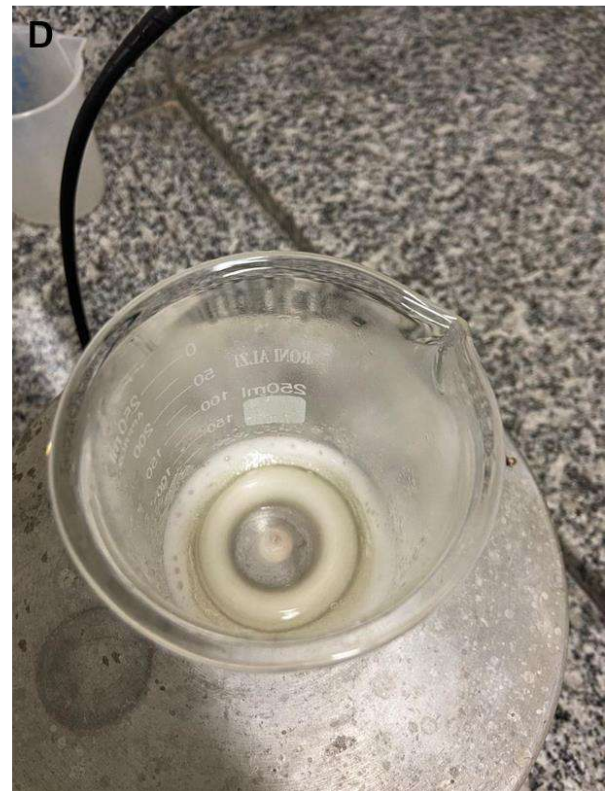
O estudo consiste em uma pesquisa experimental cujo intuito foi produzir *scaffolds* à base de alginato e colágeno. Os biomateriais foram desenvolvidos no laboratório de biologia molecular da Escola Superior São Francisco de Assis, localizada no município de Santa Teresa – ES, e caracterizados em parceria com o laboratório de ultraestrutura celular Carlos Alberto Redins da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado no município de Vitória – ES.

Síntese do Biomaterial

O preparo do hidrogel à base de alginato e colágeno foi dividido em etapas e proporções, que teve seu início com a preparação das soluções. Primeiramente, foram pesadas 1g de colágeno e 1g alginato com o auxílio de uma balança analítica, logo após para a diluição, foram adicionados 10 mL de água destilada ao colágeno e 20 ml de água destilada ao alginato, sendo os mesmos misturados em temperatura ambiente até atingir sua completa diluição.

No agitador magnético, em um béquer maior foram adicionados 10 mL da solução de colágeno e 10 mL da solução de alginato, posteriormente foram incorporados à solução 1 mL de cloreto de cálcio (CaCl_2), onde permaneceu no agitador em temperatura ambiente. Após 10 minutos no agitador magnético, foi adicionado mais 1 mL de cloreto de cálcio, sendo agitado por mais 10 minutos, e por fim, foram adicionados 1 mL de cloreto de cálcio, onde ficou por mais alguns minutos no agitador até atingir a textura desejada de um hidrogel, procedimentos ilustrados na figura 4.

Figura 4 – Etapas de produção do biomaterial. Em A) observa-se a bancada de trabalho, em B), C) e D) o procedimento de síntese.



Em seguida, foi realizada a preparação de hidrogel somente com alginato. No agitador magnético, em um béquer foram adicionados 10 mL da solução de alginato juntamente com 1 mL de cloreto de cálcio por 10 minutos, logo após, foram incorporados mais 500uL de cloreto de cálcio. Dentro de 7 minutos, o ponto ideal do hidrogel foi atingido. As etapas da produção estão representadas na tabela 2.

Tabela 2 - Detalhamento da produção dos biomateriais.

Biomaterial	Colágeno	Alginato	Reticulante (CaCl ₂)	Temperatura
AL	-	1g	1,5 mL	30°C a 37°C
AL-CO	1g	1g	3 mL	30°C a 37°C

AL = alginato; AL-CO = alginato e colágeno.

As amostras foram separadas em tubos cônicos de 15 mL (Falcon®), identificadas com os respectivos polímeros utilizados, e armazenados em geladeira a 4°C para preservação até a realização dos procedimentos analíticos.

Teste de Absorção

Para atestar a capacidade retentiva dos *scaffolds* produzido, pequenos fragmentos de aproximadamente 5mm² dos biomateriais de alginato e alginato-colágeno foram submersos em dois microtubos de centrífuga contendo 100µL de água destilada previamente pesadas em balança analítica (Marte). Os biomateriais foram mantidos submersos por 1 minuto e em sequência retirados e acondicionados em novos microtubos. Para atestar a capacidade retentiva dos *scaffolds*, os microtubos contendo a água destilada remanescente foram novamente pesados. A título de interpretação, os dados foram convertidos de peso (mg) para volume (mL).

Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras foram acondicionadas sob fita de carbono aderidas à *stubs* metálicos que passaram por um processo chamado de metalização, que consiste na evaporação de ouro sob a superfície da amostra. A metalização ocorreu em um Metalizador (Denton Vacuum, modelo Desk V). Após a adesão e metalização, os *stubs* foram levados ao Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL, modelo JSM6610LV), onde as amostras foram avaliadas.

Espectroscopia Raman

Para a leitura Raman, o biomaterial foi posicionado sob papel alumínio, material responsável por reduzir o ruído e intensificar o sinal. A leitura do espalhamento foi realizada em espectrômetro Raman (Metrohm Instant Raman Analyzers – Mira, Metrohm®) ajustado com baixo nível de potência. As amostras foram submetidas a sensibilização por laser de 785 nm, para na sequência serem detectados os componentes estruturais investigando as frequências vibracionais entre 400-1600 cm^{-1} , consideradas regiões de impressão digital para materiais orgânicos. Os dados brutos foram analisados no software Origin Pro 8.5 (Origin Lab Corporation®, versão trial).

Resultados e Discussão

O alginato e o colágeno destacam-se como biomateriais amplamente utilizados na engenharia de tecidos devido às suas propriedades únicas. O alginato, um polissacarídeo aniônico derivado de algas marrons, é valorizado pela biocompatibilidade, custo reduzido e capacidade de formar hidrogéis em condições suaves, características que o tornam ideal para suporte celular em regeneração tecidual e entrega de fármacos. No entanto, limitações mecânicas restringem seu uso isolado. O colágeno, por sua vez, mimetiza a matriz extracelular nativa, promovendo adesão celular e regeneração, mas também apresenta desafios relacionados à estabilidade mecânica. A combinação de ambos em scaffolds híbridos tem se mostrado promissora, melhorando a estabilidade estrutural e criando um ambiente propício à regeneração de tecidos, como observado em estudos sobre regeneração dérmica e óssea (Farshidfar *et al.*, 2023).

No presente estudo, a síntese dos biomateriais conforme descrito nos métodos, resultou em duas amostras distintas: uma contendo apenas alginato (AL), outra contendo colágeno e alginato (AL-CO) (**Fig. 5**). Ambos os biomateriais foram reticulados com adição de cloreto de cálcio (CaCl_2), que por sua vez apresenta vantagens em relação ao glutaraldeído e outros métodos.

O CaCl_2 promove a formação de ligações iônicas entre os grupos carboxílicos do alginato e os íons de cálcio, garantindo biocompatibilidade e estabilidade sem a introdução de elementos citotóxicos. Estudos também apontam que materiais reticulados com CaCl_2 , além de atóxicos, mantêm maior funcionalidade em aplicações biomédicas, como liberação controlada de fármacos, devido à sua capacidade de formar redes estáveis e biocompatíveis (Abasalizadeh *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021).

Figura 5 – Visão macroscópica e aspectos físicos do biomaterial produzido.



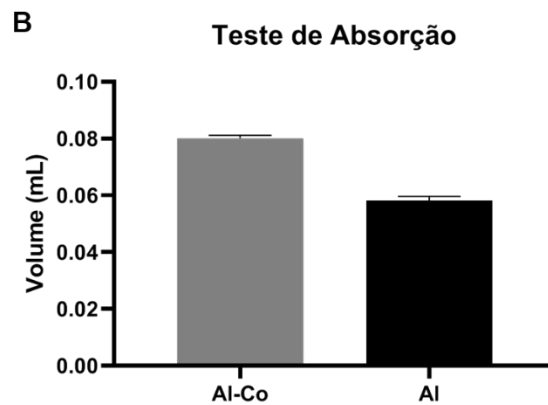
Estudos apontam que a reticulação de biomateriais à base de colágeno e alginato de sódio utilizando os agentes EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e NHS (N-hidroxi-succinimida), embora eficazes para melhorar a resistência do material e a porosidade, apresentam efeito citotóxico (Yan *et al.*, 2022). Há uma crescente preocupação quanto à sua citotoxicidade e aos possíveis efeitos adversos sobre a viabilidade celular, especialmente em aplicações de longo prazo *in vivo*. E nesse contexto, alguns estudos buscam alternativas que visem mitigar esses efeitos tóxicos enquanto mantêm as propriedades desejadas para aplicações em engenharia tecidual.

Neste estudo, a análise macroscópica dos *scaffolds* produzidos revelou diferenças significativas nas características físicas dos biomateriais. O *scaffold* composto por alginato e colágeno (AL-CO) apresentou uma maior sustentação e firmeza, conforme observado na Figura 5, na contramão do biomaterial composto apenas por alginato (AL), que exibiu uma textura mais flexível e com menor resistência estrutural.

Embora benéfica em contextos como liberação controlada de fármacos e cicatrização de feridas, a textura flexível e menor resistência estrutural do alginato pode torná-lo inadequado para aplicações que exigem maior integridade estrutural, como reparo ósseo ou cartilaginoso (Zhang *et al.*, 2023). Para contornar essa questão, o polímero pode ser modificado por meio de reticulação com outros materiais para aprimorar suas propriedades mecânicas, como a incorporação com colágeno, ácido hialurônico ou outros polímeros sintéticos (Sun *et al.*, 2013).

Em relação ao teste de absorção, os resultados mostraram que o biomaterial AL-CO foi capaz de reter água de forma mais eficaz (**Fig.6**). A diferença observada na retenção de água pode ser atribuída à conformação tridimensional do *scaffold*, que facilita a incorporação e retenção de líquidos, bem como as suas propriedades físico-químicas.

Figura 6 – Resultados do teste de absorção de água. One-way ANOVA, $P < 0,0001$.



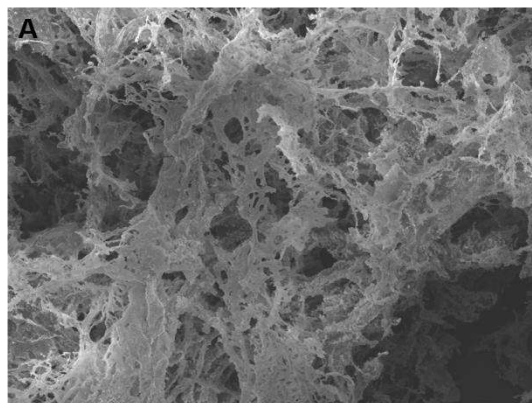
A maior capacidade de absorção de água do biomaterial à base de alginato e colágeno, em comparação ao biomaterial exclusivamente de alginato, pode ser explicada por vários fatores físico-químicos. O alginato, por si só, possui grupos carboxílicos que, em contato com a água, formam interações iônicas, o que confere ao material uma capacidade limitada de retenção de água (Zhang *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2013). No entanto, quando combinado com o colágeno, as interações entre as fibras de colágeno e os grupos do alginato podem aumentar a capacidade de atração

e retenção de moléculas de água devido à formação de uma rede tridimensional mais complexa e com mais pontos de ligação para a água.

Além disso, o colágeno, uma proteína com propriedades hidrofílicas, também contribui para o aumento da absorção de água, pois interage com a água por meio de ligações de hidrogênio, o que pode resultar em uma maior capacidade de retenção hídrica em comparação ao alginato isolado (Ho *et al.*, 2021). A presença do colágeno também pode alterar a estrutura do gel, tornando-o mais flexível e capaz de manter mais água dentro de sua matriz, o que é um comportamento típico em materiais híbridos que combinam componentes naturais com propriedades hidrofílicas, como o colágeno e o alginato (Wierzbicka *et al.*, 2024).

A caracterização ultraestrutural do biomaterial AL-CO, observada por microscopia eletrônica de varredura, revelou uma reticulação considerável, formando uma estrutura tridimensional bem definida, como mostrado na Figura 7. Essa organização estrutural sugere que o *scaffold* de alginato e colágeno foi capaz de formar uma rede interconectada, o que pode ser vantajoso para aplicações biomédicas que requerem uma matriz estável para o suporte celular, como mencionado em um estudo, os *scaffolds* à base de alginato com atividade física adequada e características bioativas oferecem grandes oportunidades para aplicações e estes incluem o tecido epitelial, ósseo e cartilaginoso (Farshidfar *et al.* 2023 *apud* Yan *et al.* 2016).

Figura 7– Padrão ultraestrutural do *scaffolds* associando alginato e colágeno.



Em contraste, o biomaterial composto exclusivamente por alginato (AL), quando submetido ao protocolo de processamento para microscopia de varredura, foi solubilizado devido à sua sensibilidade ao tratamento, o que sugere que a reticulação

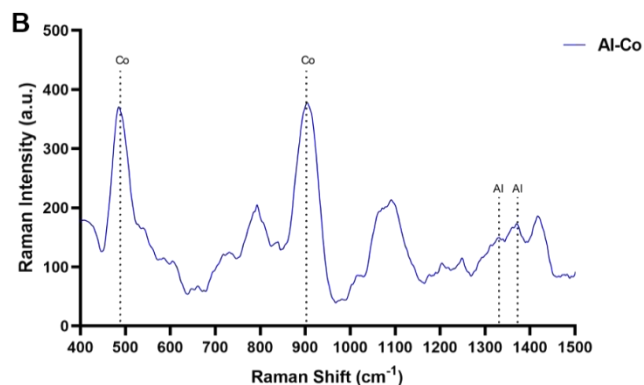
não foi eficaz ou que suas propriedades físico-químicas se apresentam instáveis quando isoladas.

Embora o alginato seja biocompatível e amplamente utilizado em engenharia de tecidos, ele carece de sítios de adesão celular intrínsecos, essenciais para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular em culturas tridimensionais. Isso limita a sua capacidade de replicar o ambiente da matriz extracelular natural, resultando em uma estrutura mecânica frágil, o que representa um desafio em aplicações que exigem maior resistência estrutural, como na regeneração de tecidos (Lee *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2023).

Além disso, a degradação descontrolada do alginato pode interferir negativamente na formação de novo tecido, comprometendo a eficácia do biomaterial em terapias regenerativas (Farjaminejad *et al.*, 2024). Esses fatores destacam as limitações do uso do alginato isolado em biomateriais para regeneração tecidual, evidenciando a necessidade de estratégias para melhorar sua estabilidade e funcionalidade, como a reticulação com outros polímeros ou agentes bioativos

A análise dos biomateriais produzidos por espectroscopia Raman revelou picos característicos associados ao alginato e ao colágeno, conforme ilustrado na Tabela 3. As bandas vibracionais do alginato foram observadas em $1330 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ e $1370 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$, (**Fig. 8**) o que é consistente com os achados reportados por Campos-Vallette *et al.* (2010). Já as bandas associadas ao colágeno apareceram em $900 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ e $490 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$, de acordo com Timchenko *et al.* (2017).

Figura 8 – Perfil espectroscópico evidenciando picos característicos do colágeno e alginato.



O espalhamento Raman é uma técnica essencial para a caracterização detalhada de biomateriais, especialmente no estudo de compostos como os biomateriais à base de alginato e colágeno. Ela permite a análise não destrutiva das interações moleculares e da organização estrutural desses materiais, oferecendo dados sobre a formação de redes tridimensionais e a estabilidade das ligações químicas (Zhou *et al.*, 2020). No contexto dos biomateriais, a espectroscopia Raman pode identificar e monitorar alterações na estrutura do colágeno e do alginato, fornecendo informações cruciais sobre os grupos funcionais, como as bandas amida I, II e III do colágeno e os picos de estiramento do alginato, que são fundamentais para avaliar a eficácia do material para aplicações biomédicas (Muñoz-Ruiz *et al.*, 2019; Bergholt *et al.*, 2019).

Os resultados encontrados neste estudo confirmam a presença dos dois polímeros no biomaterial produzido, corroborando sua composição e estrutura conforme observado nas análises anteriores (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequências vibracionais das principais bandas evidenciadas pela espectroscopia de espalhamento Raman nos biomateriais produzidos. A frequência vibracional em biomateriais compactos pode sofrer sobreposição, portanto, considera-se variabilidade de $\pm 1-5 \text{ cm}^{-1}$.

Polímero	Frequência	Autor
Alginato	1330 \pm 5, 1370 \pm 5	Campos-Vallette <i>et al.</i> , (2010)
Colágeno	900 \pm 5 e 490 \pm 5	Timchenko <i>et al.</i> , (2017)

Conclusão

Os resultados obtidos destacam a sinergia entre esses biomateriais: enquanto o alginato contribui com sua estrutura hidrofílica e suporte mecânico, o colágeno se distingue por sua bioatividade e capacidade de promover a adesão celular. A combinação de ambos proporcionou benefícios notáveis, como a alta retenção de líquido, organização porosa uniforme e espectros Raman consistentes, evidenciando a eficácia do método desenvolvido.

Quando comparado a outros métodos, o processo empregado neste estudo se destaca pela integração de técnicas de reticulação química e física, resultando em *scaffolds* estáveis e atóxicos. Esses avanços indicam que o biomaterial tem um grande

potencial para aplicação na regeneração tecidual e engenharia biomédica, oferecendo uma solução inovadora para contextos clínicos e terapêuticos diversos.

Este estudo representa uma contribuição significativa para o campo da medicina regenerativa, fornecendo uma base sólida para pesquisas futuras e ampliando as possibilidades de utilização clínica de *scaffolds* híbridos, o que pode potencializar tratamentos em diversos contextos terapêuticos.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio do nosso orientador Prof. Dr. Gabriel Henrique Taufner, que foi crucial na pesquisa e seu incentivo sobre nós, que foi de extrema importância no processo de produção do trabalho. Além de prestar agradecimentos à nossa instituição de ensino “Escola Superior São Francisco de Assis” por nos proporcionar conhecimento e aprendizado nesses 4 anos para podermos finalizar com uma pesquisa promissora, juntamente com toda disponibilidade dos laboratórios. No mesmo sentido, agradecemos ao técnico de laboratório da Escola Superior São Francisco de Assis, Joaquim Marcelino, que esteve presente na organização dos equipamentos e no auxílio com reagentes. Prestamos também, nosso imenso agradecimento ao laboratório Carlos Alberto Redins da Universidade Federal do Espírito Santo, onde as amostras foram submetidas às análises estruturais.

Referências

ABASALIZADEH, F. *et al.* Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. *Journal of Biological Engineering*, v. 14, art. 8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13036-020-0227-7>. Acesso em: 3 dez. 2024.

BERGHOLT, M. S. *et al.* Raman spectroscopy: guiding light for the extracellular matrix. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, 2019. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00303.

CAMPOS-VALLETTE, M.M. *et al.* Characterization of sodium alginate and its block fractions by surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.*, 41: 758-763, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jrs.2517>. Acesso em: 15 nov. 2024.

FARJAMINEJAD, S. *et al.* Advances and Challenges in Polymer-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Path Towards Personalized Regenerative Medicine. **Polymers**, v. 16, n. 23, p. 3303, 26 nov. 2024.

FARSHIDFAR, N. *et al.* Alginate-Based Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Marine Drugs*, v. 21, n. 3, p. 189, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md21030189>. Acesso em: 3 dez. 2024.

HO, T. C.; PARK, J. S.; KIM, S. Y.; LEE, H.; LIM, J. S.; KIM, S. J.; CHOI, M. H.; NAM, S. Y.; CHUN, B. S. Influences of molecular weights on physicochemical and biological properties of collagen-alginate scaffolds. *Mar. Drugs*, v. 19, n. 2, p. 85, 2021. DOI: 10.3390/md19020085.

HU, T.; LO, A. C. Y. Collagen–Alginate Composite Hydrogel: Application in Tissue Engineering and Biomedical Sciences. *Polymers*, v. 13, n. 11, p. 1852, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym13111852>. Acesso em: 5 dez. 2024.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.*, v.221, p. 1-22, 2001.

MUÑOZ-RUIZ, A. et al. Synthesis and characterization of a new collagen-alginate aerogel for tissue engineering. *Journal of Nanomaterials*, v.10, n.1, 10 p. DOI: 10.1155/2019/2875375.

PALOMINO-DURAND, C.; PAUTHE, E.; GAND, A. Fibronectin-enriched biomaterials, biofunctionalization, and proactivity: a review. *Applied Sciences*, [S.I.], v. 11, n. 24, p. 12111, 2021. DOI: 10.3390/app112412111. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app112412111>. Acesso em: 5 dez. 2024.

SUN, J.; TAN, H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials*, v. 6, n. 4, p. 1285-1309, 2013. DOI: 10.3390/ma6041285.

TIMCHENKO, E. V. et al. Assessment ou decellularization ou heart bioimplants usina a Ramon spectroscopy método. *Journal of Biomedical Optics* 22(9), 091511 (18 April 2017). Disponível em: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.9.091511>. Acesso em: 2 dez. 2024.

TRUJILLO, S. et al. Dynamic mechanical control of alginate-fibronectin hydrogels with dual crosslinking: covalent and ionic. *Polymers*, v. 13, n. 3, p. 433, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym13030433>. Acesso em: 2 dez. 2024.

WIERZBICKA, A.; BARTNIAK, M.; WAŚKO, J.; KOLASIŃSKA, B.; GRABARCZYK, J.; BOCIAGA, D. The impact of gelatin and fish collagen on alginate hydrogel properties: A comparative study. *Gels*, v. 10, n. 8, p. 491, 2024. DOI: 10.3390/gels10080491.

ZHANG, S. et al. Structures, properties, and bioengineering applications of alginates and hyaluronic acid. *Polymers*, v. 15, n. 9, p. 2149, 2023. DOI: 10.3390/polym15092149.

ZHOU, H. et al. Raman spectroscopy methods to characterize the mechanical response of soft biomaterials. *Biomacromolecules*, v. 21, n. 9, 2020. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00954.

ZUMBO, Bianca *et al.* Fibronectin functionalization: a way to enhance dynamic cell culture on alginate/hydroxyapatite scaffolds. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 15, n. 8, p. 222, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jfb15080222>. Acesso em: 2 dez. 2024

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

A pesquisa sobre *scaffolds* híbridos de alginato e colágeno proporciona diversas possibilidades para estudos futuros. A produção direcionada desses biomateriais para usos clínicos específicos, como a regeneração óssea ou dérmica, representa um avanço promissor, que pode ser aprimorado com a utilização de fatores de crescimento, como a fibronectina e impressão em 3D. É necessário também aprimorar a estabilidade mecânica, especialmente para aplicações que requerem suporte sólido, como a regeneração óssea, o que pode ser obtido através da incorporação de novos materiais. A combinação desses *scaffolds* com sistemas de liberação controlada de medicamentos, empregando técnicas como o CaCl₂ (Cloreto de cálcio) para reticulação, pode melhorar a efetividade desses dispositivos. Além disso, a realização de testes *in vivo* e a análise clínica serão fundamentais para confirmar os resultados alcançados *in vitro*. Por fim, a sustentabilidade e os métodos de fabricação eficientes também devem ser considerados nas futuras pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASALIZADEH, F. *et al.* Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. *Journal of Biological Engineering*, v. 14, art. 8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13036-020-0227-7>. Acesso em: 3 dez. 2024.

AKHUNDOV, M.; *et al.* Fibronectin in tissue engineering: Applications and current challenges. *Biotechnology Advances*, v. 37, n. 5, p. 754-766, 2019.

AN, M.; AN, X.; JIANG, Z.; DUAN, S.; WANG, D.; ZHAO, X.; LI, Y. Effects of crosslinking with EDC/NHS and genipin on the characterization of self-assembled fibrillar gel prepared from collagen and tilapia alginate. *Polymer Degradation and Stability*, v. 200, p. 109929, June 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2022.109929>. Acesso em: Dezembro. 5, 2024.

ANSELME, K.; *et al.* Surface influence on cell behavior: a review. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, v. 34, n. 3, p. 131-148, 2000.

ATALA, A.; *et al.* Engineering organs for transplantation. *Science Translational Medicine*, v. 10, n. 423, p. eaaf9315, 2018.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. V. 15 nº 1, p. 13-21, 2005.

BÁRTOLO, P. J. *et al.* Foaming alginate for tissue engineering. In *Virtual and Rapid Manufacturing*. CRC Press, 2007. p. 383-388.

BERGHOLT, M. S. *et al.* Raman spectroscopy: guiding light for the extracellular matrix. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, 2019. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00303.

BRANCO, M. P. Biomateriais para regeneração tecidual. São Paulo: Editora Fapesp, 2014.

CAMPOS-VALLETTE, M.M. *et al.* Characterization of sodium alginate and its block fractions by surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.*, 41: 758-763, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jrs.2517>. Acesso em: 15 nov. 2024.

CANCEDDA, R. *et al.* Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol*, v.22, n.1, p.81-91, 2003.

CARVALHO *et al.* Estratégias regenerativas da bioengenharia tecidual e aspectos éticos. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/bitstream/ri/1558/1/3501.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2024.

FACHINELLI, Aldo. Avaliação qualitativa e quantitativa do colágeno total, tipo I e III da linha alba em pacientes portadores de hérnia da parede abdominal anterior. 2005.

FAN, Y.; *et al.* Fibronectin functionalized scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 104, n. 5, p. 1269-1278, 2016.

FARJAMINEJAD, S. *et al.* Advances and Challenges in Polymer-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Path Towards Personalized Regenerative Medicine. **Polymers**, v. 16, n. 23, p. 3303, 26 nov. 2024.

FARSHIDFAR, Nima; IRAVANI, Siavash; VARMA, Rajender S. Alginate-Based Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Marine Drugs*, v. 21, n. 3, p. 189, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md21030189>. Acesso em: 3 dez. 2024.

FORMULARIUM. Fatores de crescimento. Disponível em: <https://www.formularium.com.br/inform/fatores-de-crescimento/>. Acesso em: 04 abr. 2024.

FREITAS, J.; DESTEFANI, S. *Bioengenharia e suas aplicações: conceitos e práticas na medicina regenerativa*. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo, 2022.

FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 45 (2), p. 113-136, 1998.

HARRIS, J. P.; *et al.* Cell behavior on fibronectin-functionalized alginate-collagen scaffolds for tissue regeneration. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, v. 8, n. 6, p. 352-362, 2015.

HO, T. C.; PARK, J. S.; KIM, S. Y.; LEE, H.; LIM, J. S.; KIM, S. J.; CHOI, M. H.; NAM, S. Y.; CHUN, B. S. Influences of molecular weights on physicochemical and biological properties of collagen-alginate scaffolds. *Mar. Drugs*, v. 19, n. 2, p. 85, 2021. DOI: 10.3390/md19020085.

HU, T.; LO, A. C. Y. Collagen–Alginate Composite Hydrogel: Application in Tissue Engineering and Biomedical Sciences. *Polymers*, v. 13, n. 11, p. 1852, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym13111852>. Acesso em: 5 dez. 2024.

HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science (New York, N.Y.)*, v. 326, n. 5957, p. 1216–9, 27 nov. 2009.

HYNES, R. O.; NABA, A. Overview of the matrisome-An inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2012.

JAYADEV, R.; SHERWOOD, D. R. Basement membranes. *Curr. Biol.* 27, R207 - R211 (2017).

KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. *Journal of dental education*, v. 65, n. 5, p. 456-462, 2001.

KEANE, Timothy J.; BADYLAK, Stephen F. - Biomaterials for tissue engineering applications. *Seminars in Pediatric Surgery*. ISSN 15329453. 23:3 (2014) 112–118.

KIERSZENBAUM, Abraham L. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. 4 Rio De Janeiro: Elsevier Science - Contents Direct, 2016.

LANGER, R. S.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci. Am.*, v.280, n.4, p.86-89, 1999.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.*, v.221, p. 1-22, 2001.

LUCCHESI, M. S.; *et al.* Use of alginate scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 29, n. 26, p. 3576-3583, 2008.

MANABE, R.; OHE, N.; MAEDA, T.; FUKUDA, K.; SEKIGUCHI. Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *J Cell Biol.* v, 139. P. 295-307, 1997.

MASI, E.C.D.J. A influência de fatores de crescimento na cicatrização de feridas cutâneas em ratas. 2015. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Curitiba - PR: Universidade Federal do Paraná, 2015, 104 p.

MEZZENGA, R.; MITSU, M. The Molecular Dance of Fibronectin: Conformational Flexibility Leads to Functional Versatility. *Biomacromolecules*, v. 20, n. 1, p. 55–72, 2019.

MITCHELL, D. A.; *et al.* The Erf4 subunit of the yeast Ras palmitoyl acyltransferase is required for stability of the Acyl-Erf2 intermediate and palmitoyl transfer to a Ras2 substrate. *J Biol Chem.* vol. 287, n. 41, 2012, p. 34337-34348.

MUÑOZ-RUÍZ, A. *et al.* Synthesis and characterization of a new collagen-alginate aerogel for tissue engineering. *Journal of Nanomaterials*, v.10, n.1, 10 p. DOI: 10.1155/2019/2875375.

NARDIN, J. M.; Atividades biológicas da uleína. Dissertação. Universidade Federal do Paraná, 2006.

OLIVEIRA, V. M. *et al.* Colágeno: função, classificação e produção de peptídeos bioativos a partir da pele de peixes. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, v. 5, n. 2, p. 56–68, 2017.

PALOMINO-DURAND, C.; PAUTHE, E.; GAND, A. Fibronectin-enriched biomaterials, biofunctionalization, and proactivity: a review. *Applied Sciences*, [S.I.], v. 11, n. 24, p.

12111, 2021. DOI: 10.3390/app112412111. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app112412111>. Acesso em: 5 dez. 2024.

RAVI, M; SAH , S; BHAMMAR ,R. Differences of SiHa (human cancer of cervix) and BMG-1 (brain glioma) cell lines as 2D and 3D cultures. J Cell Physiol. 2014 Feb;229(2):127-31. doi: 10.1002/jcp.24433. PMID: 23881600.

ROBERTS, G.A.F. (1992) Chitin Chemistry. Macmillan Press Ltd., Hong Kong, 368 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-349-11545-7>

SCHEPERS, E.; BARBIER, L.; DUCHEYNE, P. Implant placement enhanced by bioactive glass particles of narrow size range. Int. Oral Maxillofac. Implants, v.13, n.5, p.655-665, 1998.

SILVA, W. W. *et al.* Quantificação e classificação automática de fibras colágenas tipos I e III. ResearchGate, 2016.

SPEZZIA S. Implantes osseointegrados na adolescência. Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba. Disponível em: <https://revistas.pucsp.br/index.php/RFCMS/article/view/39317>. Acesso em: 16 abr. 2024.

SUN, J.; TAN, H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. Materials, v. 6, n. 4, p. 1285-1309, 2013. DOI: 10.3390/ma6041285.

SZWED, D. N.; SANTOS, V. L. P. dos. Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de pele. Cadernos Da Escola De Saúde, 1(15). Disponível em: <https://portaldeperiodicos.unibrasil.com.br/index.php/cadernossaude/article/view/2450>. Acesso em: 20 set. 2024

THEOCHARIS, A. D. *et al.* Extracellular matrix structure. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 97, p. 4–27, fev. 2016.

WIERZBICKA, A.; BARTNIAK, M.; WAŚKO, J.; KOLASIŃSKA, B.; GRABARCZYK, J.; BOCIAGA, D. The impact of gelatin and fish collagen on alginate hydrogel properties: A comparative study. Gels, v. 10, n. 8, p. 491, 2024. DOI: 10.3390/gels10080491.

Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(30):5897-909. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027. Epub 2009 Aug 3. PMID: 19651435.

ZHANG, S. et al. Structures, properties, and bioengineering applications of alginates and hyaluronic acid. *Polymers*, v. 15, n. 9, p. 2149, 2023. DOI: 10.3390/polym15092149.

ZHOU, H. et al. Raman spectroscopy methods to characterize the mechanical response of soft biomaterials. *Biomacromolecules*, v. 21, n. 9, 2020. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00954.

ZUMBO, Bianca *et al.* Fibronectin functionalization: a way to enhance dynamic cell culture on alginate/hydroxyapatite scaffolds. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 15, n. 8, p. 222, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jfb15080222>. Acesso em: 2 dez. 2024