



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ELEICY NATHALY MENDOZA HERNÁNDEZ

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA
(*SCAFFOLD*) DE PELE DE TILÁPIA COMO NOVO BIOMATERIAL PARA
APLICAÇÃO EM MEDICINA REGENERATIVA**

FORTALEZA

2020

ELEICY NATHALY MENDOZA HERNÁNDEZ

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA
(*SCAFFOLD*) DE PELE DE TILÁPIA COMO NOVO BIOMATERIAL PARA APLICAÇÃO
EM MEDICINA REGENERATIVA**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Co-orientador: Dr. Carlos Roberto Koscky Paier

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M1d MENDOZA HERNANDEZ, ELEICY NATHALY.
DESENVOLVIMENTO DE MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA (SCAFFOLD) DE
PELE DE TILÁPIA COMO NOVO BIOMATERIAL PARA APLICAÇÃO EM MEDICINA
REGENERATIVA / ELEICY NATHALY MENDOZA HERNANDEZ. – 2020.
86 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho .

Coorientação: Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier.

1. Engenharia de tecidos. 2. Pele de tilápia. 3. Scaffold. 4. Matriz extracelular descelularizada. 5. Biomaterial. I. Título.

CDD 615.1

ELEICY NATHALY MENDOZA HERNANDEZ

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA
(SCAFFOLD) DE PELE DE TILÁPIA COMO NOVO BIOMATERIAL PARA APLICAÇÃO
EM MEDICINA REGENERATIVA**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Co-orientador: Dr. Carlos Roberto Koscky Paier

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
(Orientador)

Universidade Federal do Ceará

Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves

Universidade Federal do Ceará

Dr. Felipe Augusto Rocha Rodrigues

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE

Dedico esta dissertação a Deus, por ser o inspirador e dar-me força para continuar neste processo de obtenção do mestrado; aos meus pais Eleicy e José pelo amor, carinho, apoio, paciência e exemplo que permitiram que eu realizasse outro sonho hoje. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por sempre iluminar minha vida e por me permitir realizar tantos sonhos. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por sua eterna compreensão e tolerância, por seu infinito amor, por me dar a força para não desistir naqueles momentos de dificuldade e fraqueza. E principalmente por ter me dado uma família tão especial.

Aos meus pais, **Eleicy** e **Jose Ramón** por serem os principais promotores dos meus sonhos, por confiar e acreditar nas minhas expectativas, pelos conselhos, valores e princípios que me inculcaram. Por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, abnegação, compreensão e perdão que vocês me dão a cada novo dia. Esta dissertação é mais uma conquista que eu levo a cabo e, sem dúvida, foi em grande parte graças a vocês; não sei onde estaria se não fosse pela sua ajuda, sua dedicação e seu amor.

A toda **minha família**, por todo o carinho, amor e força pelo apoio em todas minhas decisões e incentivo aos estudos. Sinto-me orgulhosa e privilegiada por ter uma família tão especial.

Ao **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes**, meu Orientador, por todos os conhecimentos transmitidos, por ter um papel fundamental para a minha formação profissional. Pela amizade, incentivo e sábias sugestões sempre presentes. Por me receber de braços abertos no NPDM e por me dar a oportunidade de aprender uma linha de pesquisa totalmente inovadora e fascinante.

Ao **Dr. Carlos Paier**, meu coorientador, por ter me guiado e ter colaborado durante o desenvolvimento da pesquisa, por me ajudar a levantar quando tudo parecia ter dado errado, pelo conhecimento repassado, paciência, dedicação e disponibilidade, **Dr. Felipe Rocha**, pela orientação e ajuda imprescindível para o desenvolvimento da pesquisa, pelo conhecimento compartilhado e sábias sugestões.

Aos **meus amigos**, obrigado pelos inúmeros conselhos e frases de motivação. Agradeço por todo amor, força, incentivo e apoio incondicional inclusive na distância.

À **Maria Fernanda** minha amiga querida, pois os momentos vivenciamos juntas nos tornaram família. Por me ouvir nos momentos difíceis, pelo apoio constante, e por ser uma incentivadora. Por todos os momentos compartilhados, tristezas e alegrias, sem alguma dúvida a sua companhia durante o mestrado foi muito importante para mim.

À Dra. **Ana Paula**, pelo conhecimento, ensino e colaboração que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. **Paulo Goberlanio**, pelo ensino compartilhado, estando sempre disponível e de portas abertas para trocar ideias e compartilhar seu conhecimento.

A minhas colaboradoras no laboratório de histopatologia **Debóra e Dayrine**, pela paciência, dedicação e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

Meus sinceros agradecimentos à **Universidade Federal do Ceará e ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos** por abrir as portas, permitir-me realizar todo o processo de pesquisa e me permitir crescer a cada dia como profissional. Agradeço a cada um de **meus professores** pela paciência, dedicação, apoio incondicional e amizade.

Aos funcionários do **Departamento de Fisiologia e Farmacologia**, pela ajuda indispensável em questões relacionadas à coordenação do programa de pós-graduação. Principalmente, gostaria de expressar meus maiores e sinceros agradecimentos ao **Prof. Dr. Pedro Magalhães**, pela ajuda durante todo este processo, pela disposição de resolver qualquer dúvida.

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP

RESUMO

Os *scaffolds* são biomateriais compostos por matriz extracelular (MEC) descelularizada, amplamente utilizados em países desenvolvidos. Na produção dos *scaffolds*, a MEC é isolada de suas células nativas e de material genético para produzir um biomaterial com características estruturais, bioquímicas e biomecânicas semelhantes às do tecido original. O colágeno é um dos principais componentes dos *scaffolds*. Nesse contexto, a pele da Tilápia do Nilo surge como um novo biomaterial útil à bioengenharia, devido às suas propriedades mecânicas satisfatórias e similaridade à pele humana quanto à composição e arranjo das fibras colagênicas. O objetivo deste trabalho é desenvolver uma matriz extracelular descelularizada a partir da pele da tilápia como novo biomaterial para aplicação em medicina regenerativa. Foram estudados diferentes métodos físicos, químicos e enzimáticos para a descelularização da pele de tilápia, com a finalidade de se obter um *scaffold* com a melhor qualidade possível. Foram desenvolvidos e experimentados doze (12) protocolos de descelularização, que usaram surfactantes iônicos e não iônicos, como o Dodecil sulfato de sódio, Deoxicolato de sódio, Triton X-100, Tween 20, CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato) e Nonidet P-40, com a finalidade de eliminar remanescentes celulares (avaliados pela coloração de DAPI), manter a estrutura morfológica (avaliada pela técnica de hematoxilina-eosina ou HE) e não causar citotoxicidade. Os melhores protocolos experimentados foram o Tween 20 por 24h, CHAPS 8,0 mM por 4h e o Triton X-100 a 1% por 6h, com porcentagens de descelularização de 100%, $96,35\% \pm 3,65\%$ e $97,83\% \pm 2,17\%$, respectivamente. Esses métodos também foram aprovados no teste de citotoxicidade indireta por apresentarem viabilidade celular de $86,71\% \pm 2,24\%$, $108,3\% \pm 6,49\%$ e $95,63\% \pm 3,62\%$; respectivamente. A dose ideal de irradiação para radioesterilização foi determinada usando os *scaffolds* produzidos pelo protocolo CHAPS 8,0 mM e experimentando doses de 15 kGy, 25 kGy, 30 kGy e 50 kGy. Com estes resultados concluímos que os *scaffolds* produzidos a partir de Tween 20 por 24h, CHAPS 8 mM por 4h e Triton X-100 a 1% por 6h têm potencial de aplicação como materiais biomédicos, por serem os melhores na descelularização, mantendo a estrutura das fibras e não causando citotoxicidade. Por sua vez, a irradiação com raios gama na dose de 25 kGy foi considerada como a melhor para a esterilização de *scaffolds* produzidos pelo método do CHAPS.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos. Pele de tilápia. *Scaffold*. Matriz extracelular descelularizada. Biomaterial. Descelularização.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A DECELLULARIZED EXTRACELLULAR MATRIX FROM TILÁPIA SKIN (SCAFFOLD) AS NEW BIOMATERIAL FOR APPLICATION IN REGENERATIVE MEDICINE

Scaffolds are biomaterials composed of decellularized extracellular matrix (MEC), widely used in developed countries. During the production of scaffolds, MEC is isolated from its native cells and genetic material to produce a biomaterial with structural, biochemical and biomechanical characteristics of the original tissue. Collagen is a major component of scaffolds. In this context, Nile Tilapia skin appears as a new biomaterial useful for bioengineering, due to its mechanical properties and similarity in histological composition. The objective of this work was to develop a decellularized extracellular matrix from the tilapia skin as a new biomaterial for application in regenerative medicine. In this work, different physical, chemical and enzymatic methods were studied for the decellularization of tilapia skin, in order to obtain a scaffold with the best possible quality. Twelve (12) decellularization protocols were developed and tested, using ionic and non-ionic surfactants, such as sodium Dodecyl sulfate, sodium deoxycholate, Triton X-100, Tween 20, CHAPS and Nonidet P-40, with the purpose of eliminate cells (evaluated by DAPI staining), maintain the structure (evaluated by HE) and do not cause cytotoxicity. The best protocols tried were Tween 20 for 24h, CHAPS 8 mM for 4h and Triton X-100 at 1% for 6h, with decellularization percentages of 100%, $96.35\% \pm 3.65\%$ and $97.83\% \pm 2.17\%$ and were approved in the indirect cytotoxicity test for having cell viability of $86.71\% \pm 2.24\%$, $108.3\% \pm 6.49\%$ and $95.63\% \pm 3.62\%$; respectively. The ideal irradiation dose for radio-sterilization was determined using the scaffolds produced by the CHAPS 8 mM protocol and testing with doses of 15 25, 30 and 50 kGy. With these results we conclude that the scaffolds produced from Tween 20 for 24h, CHAPS 8 mM for 4h and Triton X-100 at 1% for 6h have potential for application as biomedical materials, as they are the best in decellularization, maintaining the structure of fibers and not causing cytotoxicity. Additionally, the 25 kGy dose was considered the best for irradiation.

Keywords: Tissue Engineering. Tilapia skin. Scaffold. Decellularized extracellular matrix. Biomaterial. Decellularization.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Fotomicrografia da pele de tilápia e pele humana sem e com polarização de luz (<i>Picrosirius Red</i> , 400X)..... | 21 |
| Figura 2 Avaliação do perfil de colágeno em tecido conjuntivo de tilápia e humano..... | 22 |
| Figura 3 Método de descelularização de tecidos e órgãos..... | 28 |
| Figura 4 Estrutura simplificada dos surfactantes..... | 28 |
| Figura 5 Estruturas típicas das micelas..... | 29 |
| Figura 6 Estágios da dissolução da membrana biológica com surfactantes | 32 |
| Figura 7 Ilustração esquemática do processo de fusão da micela e da ruptura da bicamada | 33 |
| Figura 8 Estrutura química do dodecil sulfato de sódio | 33 |
| Figura 9 Estrutura química do deoxicolato de sódio | 33 |
| Figura 10 Estrutura química do Triton X-100..... | 34 |
| Figura 11 Estrutura química do Tween 20 | 34 |
| Figura 12 Estrutura química do CHAPS | 34 |
| Figura 13 Estrutura química do Nonidet P-40..... | 35 |
| Figura 14 Esquema de protocolos de descelularização com fins médicos revisados nesta introdução | 37 |
| Figura 15 Pele <i>in natura</i> e após tratamento químico..... | 48 |
| Figura 16 Fotomicrografia de HE dos <i>scaffolds</i> e da pele de tilapia <i>in natura</i> (aumento de 200X) | 53 |
| Figura 17 Fotomicrografia da coloração de DAPI dos <i>scaffolds</i> e da pele de tilapia <i>in natura</i> (aumento de 400X)..... | 55 |
| Figura 18 Porcentual de descelularização vs. Protocolos de descelularização..... | 56 |
| Figura 19 Fotomicrografia do cultivo celular de L929 uma concentração de $1,0 \times 10^6$ após 24 horas de contato indireto com os <i>scaffolds</i> e a pele <i>in natura</i> (200X)..... | 60 |
| Figura 20 Viabilidade Celular da L929 vs. Protocolos de descelularização | 62 |
| Figura 21 Fotomicrografia de HE do <i>scaffold</i> liofilizado de pele de tilápia submetida ao protocolo CHAPS 8 mM não irradiado e irradiado em diferentes doses..... | 65 |
| Figura 22 Viabilidade celular vs. <i>Scaffolds</i> submetidos a diferentes doses de irradiação..... | 66 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Fases de avaliação de segurança de dispositivos médicos..... | 25 |
| Tabela 2. Lista de reagentes utilizados, procedência e pureza..... | 41 |
| Tabela 3. Protocolos de descelularização de <i>scaffolds</i> de pele da tilápia..... | 42 |
| Tabela 4. Porcentagem de descelularização dos <i>scaffolds</i> | 55 |
| Tabela 5. Avaliação da atividade citotóxica da pele da tilápia e dos <i>scaffolds</i> após 24h de contato com o extrato pelo método do MTT..... | 61 |
| Tabela 6. Resumo dos resultados obtidos para cada protocolo de produção de <i>scaffolds</i> testado..... | 63 |

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| ANOVA | Análise de Variância |
| CHAPS | 3-[(3-colamidpropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato |
| CI ₅₀ | Concentração Inibitória Média capaz de causar 50% do efeito máximo |
| CMC | Concentração Micelar Crítica |
| DAMPs | Padrões moleculares associados a danos |
| DAPI | 4', 6'-diamino-2-fenilindol |
| DC | Deoxicolato de sódio |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| DNase | Desoxiribonuclease |
| dsDNA | DNA de cadeia dupla |
| EDTA | <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido Etilenodiaminotetracético) |
| EGTA | <i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática) |
| EPM | Erro Padrão da Média |
| HE | Hematoxilina-Eosina |
| GAG | Glicosaminoglicanos |
| ISO | Organização Internacional de Padronização |
| IV | Infravermelho |
| kGy | QuiloGray |
| MEC | Matriz Extracelular |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-tetrazólio |
| NPDM | Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimentos de Medicamentos |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PBS | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Salina de tampão Fosfato) |
| PIPES | <i>piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)</i> |
| RGB | <i>red, green, blue</i> (vermelho, verde, azul) |
| Tris-HCl | Hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1.1 Engenharia de tecidos e desenvolvimento de biomateriais para medicina regenerativa | 16 |
| 1.2 Composição dos Scaffolds | 18 |
| 1.3 Tipos de scaffolds e seu uso na clínica..... | 19 |
| 1.4 Pele de tilápia como biomaterial na produção de scaffolds | 20 |
| 1.5. Quando um tecido é considerado descelularizado? | 22 |
| 1.6 Importância do conteúdo de colágeno nos scaffolds..... | 23 |
| 1.7 Importância dos testes de citotoxicidade nos biomateriais | 24 |
| 1.8 Radioesterilização de scaffolds | 26 |
| 1.9 Métodos de descelularização de tecidos | 27 |
| 1.10 Descelularização por métodos químicos | 28 |
| 1.11 Descelularização com fins médicos..... | 35 |
| 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA | 38 |
| 3 OBJETIVOS | 40 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 40 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 40 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 4.1 Materiais | 41 |
| <i>4.1.1 Obtenção da pele.....</i> | <i>41</i> |
| <i>4.1.2 Reagentes e soluções</i> | <i>41</i> |
| 4.2 Metodologia | 42 |
| <i>4.2.1 Protocolos para a produção de scaffolds</i> | <i>42</i> |
| <i>4.2.2 Análise Histológica</i> | <i>43</i> |
| <i>4.2.3 Citotoxicidade</i> | <i>45</i> |
| 4.2.4 Liofilização | 47 |
| 4.2.5 Radioesterilização | 47 |
| 5 RESULTADOS | 48 |
| 5.2 Análise histológica dos scaffolds de pele de Tilápia pela coloração de Hematoxilina-Eosina e do conteúdo de material nuclear pelo DAPI..... | 49 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.2.1 | <i>Pele in natura</i> | 49 |
| 5.2.2 | <i>Dodecil sulfato de sódio 0,5% por 2h (Protocolo A)</i> | 49 |
| 5.2.3 | <i>Deoxicolato de sódio a 4% por 1h seguido de DNase por 4h (Protocolo B.D)</i> | 49 |
| 5.2.4 | <i>Deoxicolato de sódio a 4% por 1h (Protocolo B.S)</i> | 49 |
| 5.2.5 | <i>Triton X-100 a 1% por 6h (Protocolo C 6H)</i> | 50 |
| 5.2.6 | <i>Triton X-100 a 1% por 3h (Protocolo C 3H)</i> | 50 |
| 5.2.7 | <i>Tween 20 a 3% por 24h (Protocolo D 24H)</i> | 50 |
| 5.2.8 | <i>Tween 20 a 6% por 4h (Protocolo D 4H)</i> | 51 |
| 5.2.9 | <i>CHAPS 8mM por 4h (Protocolo E 4H)</i> | 51 |
| 5.2.10 | <i>Nonidet P-40 0,5% por 16h seguido de DNase por 16h (Protocolo I)</i> | 51 |
| 5.2.11 | <i>Triton X-100 a 1% por 3h e tripsina 0,05% por 1,5h (Protocolo C.T)</i> | 52 |
| 5.2.12 | <i>Tween 6% por 4h e tripsina 0,05% por 1,5h (Protocolo D.T)</i> | 52 |
| 5.2.13 | <i>Nonidet P-40 0,5% por 16h seguido de DNase por 16h e tripsina 0,05% por 1,5h (Protocolo I.T)</i> | 52 |
| 5.3 | Avaliação da atividade citotóxica | 56 |
| 5.3.1 | <i>Controle negativo</i> | 57 |
| 5.3.2 | <i>Pele in natura</i> | 57 |
| 5.3.3 | <i>Dodecil sulfato de sódio 0,5% por 2h (Protocolo A)</i> | 57 |
| 5.3.4 | <i>Deoxicolato de sódio a 4% por 1h seguido de DNase por 4h (Protocolo B.D)</i> | 57 |
| 5.3.5 | <i>Deoxicolato de sódio a 4% por 1h (Protocolo B.S)</i> | 57 |
| 5.3.6 | <i>Triton X-100 a 1% por 6h (Protocolo C 6H)</i> | 57 |
| 5.3.7 | <i>Triton X-100 a 1% por 3h (Protocolo C 3H)</i> | 58 |
| 5.3.8 | <i>Tween 3% por 24h (Protocolo D 24H)</i> | 58 |
| 5.3.9 | <i>Tween 6% por 4h (Protocolo D 4H)</i> | 58 |
| 5.3.10 | <i>CHAPS 8 mM por 4h (Protocolo E 4H)</i> | 58 |
| 5.3.11 | <i>Nonidet P-40 0,5% por 16h seguido de DNase por 16h (Protocolo I)</i> | 58 |
| 5.3.12 | <i>Triton X-100 a 1% por 3h e tripsina 0,05% por 1,5h (Protocolo C.T)</i> | 58 |
| 5.3.13 | <i>Tween 6% por 4h e tripsina 0,05% por 1,5h (Protocolo D.T)</i> | 58 |
| 5.3.14 | <i>Nonidet P-40 a 0,5% por 16h seguido de DNase por 16h e tripsina 0,05% por 1,5h (Protocolo I.T)</i> | 59 |
| 5.4 | Determinação de dose de irradiação para radioesterilização | 63 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.4.1 | <i>Análise histológica pelo HE dos scaffolds do protocolo CHAPS 8 mM irradiados</i> | 64 |
| 5.4.1.1 | <i>Scaffold obtido pelo protocolo CHAPS 8 mM não irradiado</i> | 64 |
| 5.4.1.2 | <i>Scaffold obtido pelo protocolo CHAPS 8 mM irradiado a 15 kGy</i> | 64 |
| 5.4.1.3 | <i>Scaffold obtido pelo protocolo CHAPS 8 mM irradiado a 25 kGy</i> | 64 |
| 5.4.1.4 | <i>Scaffold obtido pelo protocolo CHAPS 8 mM irradiado a 30 kGy</i> | 64 |
| 5.4.1.5 | <i>Scaffold obtido pelo protocolo CHAPS 8 mM irradiado a 50 kGy</i> | 64 |
| 5.4.2 | Análise indireta de citotoxicidade dos scaffolds irradiados pelo método do MTT | 65 |
| 6 | DISCUSSÃO | 67 |
| 6.1 | Pele in natura | 67 |
| 6.2 | Protocolos reprovados | 68 |
| 6.2.1 | Protocolo A (Dodecil sulfato de sódio 0,5% por 2h) | 68 |
| 6.2.2 | Protocolo B.D (Deoxicolato de sódio a 4% por 1h seguido de DNase por 4h) | 68 |
| 6.2.3 | Protocolo B.S (Deoxicolato de sódio a 4% por 1h) | 69 |
| 6.2.4 | Protocolo C 3H (Triton X-100 a 1% por 3h) | 69 |
| 6.2.5 | Protocolo C.T (Triton X-100 a 1% por 3h e tripsina 0,05% por 1,5h) | 70 |
| 6.2.6 | Protocolo D 4H (Tween 20 a 6% por 4h) | 71 |
| 6.2.7 | Protocolo D.T (Tween 6% por 4h e tripsina 0,05% por 1,5h) | 71 |
| 6.2.8 | Protocolo I (Nonidet P-40 a 0,5% por 16h seguido de DNase por 16h) | 72 |
| 6.2.9 | Protocolo I.T (Nonidet P-40 a 0,5% por 16h seguido de DNase por 16h e tripsina 0,05% por 1,5h) | 72 |
| 6.3 | Protocolos Aprovados | 73 |
| 6.3.1 | <i>Protocolo C 6H (Triton X-100 a 1% por 6h)</i> | 73 |
| 6.3.2 | <i>Protocolo E 4H (CHAPS 8mM por 4h)</i> | 74 |
| 6.3.3 | <i>Protocolo D 24H (Tween 20 a 3% por 24h)</i> | 74 |
| 6.4 | Definição de doses de irradiação dos scaffolds do protocolo CHAPS 8 mM | 75 |
| 7 | CONCLUSÃO | 77 |
| 8 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 78 |
| 9 | REFERÊNCIAS | 79 |