

Maria Pinto de Figueiredo Catarino

**Mecanismos de degradação das esponjas hemostáticas em cirurgia oral – Revisão
sistemática**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2023

Maria Pinto de Figueiredo Catarino

**Mecanismos de degradação das esponjas hemostáticas em cirurgia oral – Revisão
sistemática**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2023

**Mecanismos de degradação das esponjas hemostáticas em cirurgia oral – Revisão
sistemática**

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Dentária

Resumo

Objetivo: Identificar os métodos utilizados nos estudos da degradação dos materiais de colagénio ou gelatina e as possíveis falhas associadas.

Metodologia: Pesquisa bibliográfica de artigos publicados nas bases de dados eletrónicas PubMed, B-On e Cochrane Library. A identificação e exclusão da evidência seguiu os critérios PRISMA, tendo sido estipulados fatores de inclusão e de exclusão específicos. A avaliação metodológica dos estudos foi realizada através da Escala de QUIN.

Resultados: Dos 11926 estudos identificados, 9 foram incluídos. Identificaram-se como limitações as concentrações e tipos de colagenase utilizados e os períodos de avaliação da degradação escolhidos. Evidenciou-se ainda a falta de uniformidade nos protocolos empregados, que variaram entre cada estudo.

Conclusão: Futuramente, os estudos *in-vitro* da biodegradação enzimática dos biomateriais de colagénio e gelatina devem usar uma concentração de 0,02 U de colagenase (MMP-8)/mL de saliva humana a 37 °C e realizar momentos de avaliação a cada 24 h, de forma a produzir resultados mais fidedignos que possam ser traduzidos para conclusões clínicas.

Palavras-chave: biodegradação; colagenase; degradação enzimática; materiais de colagénio; materiais de gelatina; testes de biodegradação *in-vitro*.

Abstract

Objective: To identify the methods used in the studies of the degradation of collagen or gelatin materials and the possible associated flaws.

Methodology: Bibliographic search of articles published in the electronic databases PubMed, B-On and Cochrane Library. The identification and exclusion of evidence followed the PRISMA criteria, with the stipulation of specific inclusion and exclusion factors. The methodological evaluation of the studies was performed using the QUIN Scale.

Results: Of the 11926 identified studies, 9 were included. The concentrations and types of collagenase used and the chosen degradation evaluation periods were identified as limitations. The lack of uniformity in the protocols used, which varied between each study, was also evident.

Conclusion: In the future, *in-vitro* studies of the enzymatic biodegradation of collagen and gelatin biomaterials should use a concentration of 0.02 U of collagenase (MMP-8)/mL of human saliva at 37 °C and perform evaluation moments every 24 h, so to produce more reliable results that can be translated into clinical conclusions.

Key words: biodegradation; collagenase; collagen materials; enzymatic degradation; gelatin materials; *in-vitro* biodegradation assays.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, por acreditar em mim desde o início, pela motivação que me deu e pelo seu sacrifício ao longo destes anos.

Às minhas irmãs, Isabel e Rosa, por serem um exemplo a seguir, pelo seu apoio e pelos ótimos conselhos que me foram dando.

Aos meus irmãos, Jorge e Joaquim, por me apoiarem à sua maneira.

Ao meu gato, Elvis, por se sentar no meu teclado, obrigando-me a fazer pausas regulares na redação da dissertação

À minha binómia, Antea, por se ter tornado uma amiga tão importante para mim e por ter sido imprescindível no meu sucesso.

À Carlota e à Leonor, por terem estado comigo, em trinómio, no primeiro ano de clínica, e por permanecerem amigas que tanto valorizo.

A todos os meus colegas na universidade, por terem feito parte da grande primeira etapa do meu percurso em Medicina Dentária

À Perla e à Carolina, pelos nossos cafés e jantares para desanuviar da pressão académica e por tudo o que nos espera daqui para a frente.

Ao Domingos, pelo seu apoio e ajuda, por me deixar sempre tranquila e por me ter acompanhado com tanto carinho nesta etapa da minha vida.

Não seria possível terminar este ciclo sem vos ter comigo!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Fernando Pessoa e a todos os seus docentes e funcionários por me terem acolhido durante estes 5 anos.

Ao meu orientador, Professor Doutor Filipe Castro, pela sua disponibilidade e paciência, assim como por ter marcado o meu percurso académico e ter sido fundamental para a conclusão deste ciclo.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Jorge Pereira, pela sua colaboração neste trabalho e também pelo seu papel ao longo da minha formação.

À Carlota, que para além de ser uma excelente colega sempre mostrou ser uma verdadeira amiga. Sem o teu apoio, ajuda e constante boa disposição, não seria a mesma coisa.

À Antea, minha binómia, pelas memórias na Box 31 e pelo incentivo que sempre senti para dar o meu melhor nestes 2 anos de clínica.

A todos os meus colegas, em particular os da turma 1, pelas memórias que levo comigo.

O meu sincero agradecimento a todos!

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	1
II. METODOLOGIA.....	4
III. RESULTADOS.....	8
1. Estudo 1.....	8
2. Estudo 2.....	9
3. Estudo 3.....	9
4. Estudo 4.....	11
5. Estudo 5.....	12
6. Estudo 6.....	12
7. Estudo 7.....	13
8. Estudo 8.....	14
9. Estudo 9.....	14
IV. DISCUSSÃO	18
1. Características desejáveis num estudo in-vitro de biomateriais em Medicina Dentária	18
i. Saliva humana.....	18
ii. Concentração fisiológica de colagenase	19
2. Solução de degradação utilizada.....	19
i. Solução-tampão	19
ii. Colagenase.....	19
3. Intervalo de avaliação.....	20
4. Métodos de medição da degradação.....	21
5. Fatores que influenciaram a taxa de degradação enzimática	21
6. Comparação de resultados dos testes de degradação	24
V. CONCLUSÃO.....	26
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

AuNP – nanopartícula de ouro

BCA – método do ácido bicinconínico para identificação colométrica de proteínas

CDU – unidades digestivas de collagenase

CG – esponja de colagénio

CP – cloranfenicol

DCol-S – amostras de atelocolagénio após *crosslinking* físico desidrotérmico

DHT – *crosslinking* físico desidrotérmico

DMS – *crosslinking* químico com dimetil suberimidato

EDC – *crosslinking* químico com carbamida

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

FA – *crosslinking* químico com formaldeído

GA – *crosslinking* químico com glutaraldeído

GP – *crosslinking* químico com genipina

HLC – *human-like collagen*

ICP-OES – espectrometria de emissão ótica de plasma acoplado indutivamente

Micro-CT – microtomografia de raios-X

MMP – metaloproteinase de matriz

MTGase – transglutaminase microbiana

MTGH – hidrogel de *human-like collagen* com transglutaminase microbiana

NHS – N-hidroxissuccinimida

NT – não tratado

PBS – solução tampão fosfato-salino

SEM – microscopia eletrónica de varrimento

Tris-HCL – solução tampão tris-hidroximetilaminometano

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de fluxo PRISMA.....	5
--	---

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Risco de viés – Escala QUIN.....	7
Tabela 2. Sistematização dos resultados dos artigos selecionados.....	17

I. INTRODUÇÃO

O colagénio tipo I é um colagénio fibrilar cuja molécula é composta por três cadeias alfa com mais de mil aminoácidos cada e é o principal componente da matriz extracelular. A gelatina é um produto decorrente da hidrólise parcial do colagénio. O colagénio e a gelatina são das substâncias mais comuns para aplicação em cirurgia oral pelo seu efeito extenso na hemóstase, pela sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, assim como por serem matrizes naturais para a migração de osteoblastos, e auxiliarem a cicatrização de tecidos moles e reconstrução de tecidos duros. Os principais procedimentos em cirurgia oral que utilizam os formatos de esponja, *scaffold* e hidrogel dos materiais de colagénio e gelatina são as extrações dentárias e a preservação alveolar, pelo seu efeito de proteção e estabilidade do coágulo assim como pelo seu efeito de barreira. Adicionalmente, as esponjas e os scaffolds são cada vez mais utilizados nas técnicas de regeneração tecidual pela sua estrutura tridimensional porosa que permite a adesão celular (Parenteau-Bareil *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2017; Salvatore *et al.*, 2021).

Apesar da sua biodegradabilidade ser vantajosa, a sua degradação enzimática ocorre rapidamente, limitando a sua estabilidade e performance a longo prazo. Como tal, a taxa de degradação dos biomateriais de colagénio e gelatina frequentemente necessita de ser regulada através de diversos mecanismos, tais como as técnicas de *crosslinking*. Estas incluem a utilização de agentes químicos como o glutaraldeído, a exposição a radiação ultra-violeta, a inclusão de inibidores enzimáticos como a transglutaminase na estrutura dos materiais e o tratamento com várias substâncias que permitam o aumento da resistência dos materiais à biodegradação (Parenteau-Bareil *et al.*, 2010; Egorikhina *et al.*, 2021).

A biodegradação é de importância crucial para o sucesso do processo regenerativo ou terapêutico resultante da implantação de um biomaterial em tecidos danificados, pelo que é fundamental aquando da sua seleção que as características de biodegradação sejam apropriadas, de forma que permitam a sincronização da degradação do material com a formação de novo tecido (Calciolari *et al.*, 2018; Egorikhina *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2023).

A seleção de um material inapropriado poderá implicar complicações clínicas. Por um lado, uma degradação precoce está associada à perda de força mecânica e de suporte, bem como das suas propriedades terapêuticas, afetando a sua função e viabilidade. Por outro

lado, uma degradação tardia poderá desencadear reações imunológicas e encapsulamento fibroso, afetando a regeneração e cicatrização e podendo resultar em inflamação crônica (Calciolari *et al.*, 2018; Egorikhina *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2023).

Conseqüentemente, é extremamente importante caracterizar as propriedades de biodegradação dos potenciais materiais na fase de estudos *in-vitro*, pois a avaliação da dinâmica de degradação dos materiais implantáveis é um meio importante para prever e avaliar os efeitos clínicos expectáveis (Calciolari *et al.*, 2018; Egorikhina *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2023).

Durante o processo de cicatrização, a matriz extracelular é sujeita a degradação enzimática por ação das metaloproteínases de matriz (MMP). As MMP compõem um grupo de mais de 25 endopeptidases cálcio-dependentes zinco-contentoras que têm um importante papel nas dinâmicas da matriz extracelular. Dependendo da preferência de substrato, podem ser agrupadas em collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MMP do tipo de membrana, e outras (Helling *et al.*, 2017; Elgezawi *et al.*, 2022).

As collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) são responsáveis pela grande parte da degradação do colagénio *in-vivo*. A atividade colagenolítica das MMP é crítica no catabolismo do colagénio fibrilar, que representa o principal constituinte do periodonto e do osso alveolar (Checchi *et al.*, 2020). São também responsáveis pela degradação dos biomateriais de colagénio e gelatina, sendo as enzimas preferidas para utilização em estudos de degradação. Dois outros aspetos relevantes são que os biomateriais de colagénio estimulam uma maior atividade colagenolítica do que o colagénio nativo, e que todas as collagenases têm uma taxa de colagenólise diferente (Hutmacher *et al.*, 1996; Parenteau-Bareil *et al.*, 2010).

A biodegradação neste contexto, é definida como o processo da destruição gradual dos componentes do biomaterial mediada pela atividade biológica do ambiente em que este é colocado. A degradação dos biomateriais no corpo pode ocorrer como resultado de processos físicos, químicos e biológicos, nomeadamente a degradação enzimática e a interação com células do sistema imunitário (Egorikhina *et al.*, 2021).

A atividade colagenolítica das collagenases depende de três princípios: a capacidade de se ligarem às moléculas de colagénio, a capacidade de desenrolar as três cadeias alfa e a capacidade de clivar cada cadeia da tripla hélix. O mecanismo da biodegradação enzimática dos biomateriais é mediado por uma série de ações, tais como a difusão de

enzimas até ao substrato, a adsorção das enzimas pelo substrato seguida da formação de um complexo enzima-substrato, a hidrólise e por fim, a difusão dos produtos solúveis da degradação. Como resultado deste mecanismo, os biomateriais irão perder volume e massa, evidenciando-se assim a sua degradação. Por este motivo, o método mais frequentemente utilizado de medição da degradação é caracterizado pela examinação da massa residual do material após incubação numa solução semelhante a um fluido corporal. Para este propósito, são comumente utilizadas soluções tampão fosfato ou soluções enzimáticas. Um dos outros métodos mais comuns de medição da biodegradação é a determinação da concentração dos componentes do biomaterial libertados no meio em que o material foi incubado e posteriormente degradado, sendo utilizada a concentração da hidroxiprolina no caso do colagénio (Egorikhina *et al.*, 2021).

Os resultados dos estudos *in-vitro* são limitados pelas metodologias utilizadas, nomeadamente na simulação das condições fisiológicas. A forma mais exata de simular o meio oral implica a utilização de saliva humana, uma vez que a saliva artificial não replica exatamente os componentes e contaminantes da saliva, impedindo a tradução dos resultados para conclusões clínicas. Os biomateriais atualmente desenvolvidos para utilização em medicina dentária são desenhados de forma que as suas propriedades interajam de forma biologicamente favorável com os tecidos orais. Uma vez que a interação da saliva com estes materiais é inevitável e acarreta alterações nas suas características, é necessário que os estudos adequem as suas metodologias considerando o seu efeito (Kunrath e Dahlin, 2022).

Diante do exposto, a presente revisão tem como objetivo procurar na literatura os mecanismos associados à degradação dos biomateriais de colagénio e gelatina em estudos laboratoriais e identificar as possíveis falhas associadas.

Desta forma, durante esta Revisão Sistemática, pretende-se responder às seguintes questões de investigação:

1. "Quais serão os mecanismos associados à degradação enzimática do colagénio em biomateriais de colagénio e gelatina em estudos laboratoriais?"
2. "Quais serão as principais falhas na avaliação laboratorial dos mecanismos associados à degradação enzimática do colagénio em biomateriais de colagénio e gelatina?"

II. METODOLOGIA

Para a elaboração desta revisão sistemática foi efetuada uma pesquisa de artigos científicos nas seguintes bases de dados eletrônicas: PubMed, B-On e Cochrane Library entre Setembro de 2022 e Março de 2023.

A pesquisa foi realizada mediante a combinação dos seguintes termos de pesquisa: *collagen, gelatin, sponge, scaffold, hydrogel, biodegradability, degradation* e *collagenase* associados através dos operadores booleanos AND e OR, dispostos na seguinte chave de pesquisa (((collagen) AND ((sponge) OR (scaffold) OR (hydrogel))) OR ((gelatin) AND ((sponge) OR (scaffold) OR (hydrogel)))) AND ((biodegradability) OR (degradation) OR (collagenase))

A pesquisa narrativa foi restrita a artigos publicados em idioma Inglês e não foi aplicada uma restrição temporal.

Os critérios de inclusão foram: (1) estudos experimentais *in-vitro*, (2) estudos nos quais a degradação ocorre em $\geq 6h$, (3) estudos que descrevam a metodologia usada na degradação assim como na sua medição (4) estudos que utilizem a enzima colagenase (5) idioma inglês

Os critérios de exclusão foram: (1) estudos secundários, (2) estudos em humanos e *in-vivo*, (3) outros idiomas que não o inglês, (4) estudos nos quais a degradação ocorre em $<6h$, (5) estudos que não utilizem a enzima colagenase, (6) estudos nos quais os materiais não sejam compostos majoritariamente por colagénio ou gelatina, (7) estudos que utilizem métodos subjetivos de medição e (8) estudos que não apresentem os seus resultados.

Foi formulada a questão de investigação da revisão sistemática a partir do método definido pela sigla PCC, que representa a população (P) – (esponjas, hidrogéis e *scaffolds* de colagénio ou gelatina), conceito (C) – (degradação enzimática das esponjas, hidrogéis e *scaffolds* de colagénio ou gelatina e contexto (C) – (efeito da ação enzimática no tempo de degradação das esponjas, hidrogéis e *scaffolds* de colagénio ou gelatina). A pesquisa está contextualizada de acordo com as recomendações PRISMA.

A estratégia de pesquisa encontra-se representada na figura 1 (diagrama de fluxo PRISMA), onde de uma pesquisa inicial que compreendia 11926 artigos após eliminação dos duplicados, leitura pelo título, leitura pelo *abstract* e leitura integral por 2

investigadores M.C. e F.C. em que em caso de dúvida um terceiro investigador (J.P.) foi selecionado para rever de forma independente estes resultados, foram obtidos 9 artigos que constituem os resultados desta revisão sistemática.

Neste trabalho foi avaliada a qualidade metodológica dos 9 estudos incluídos utilizando a escala QUIN para estudos *in-vitro* na área da Medicina Dentária, representada na tabela 1 (Risco de viés – Escala QUIN).

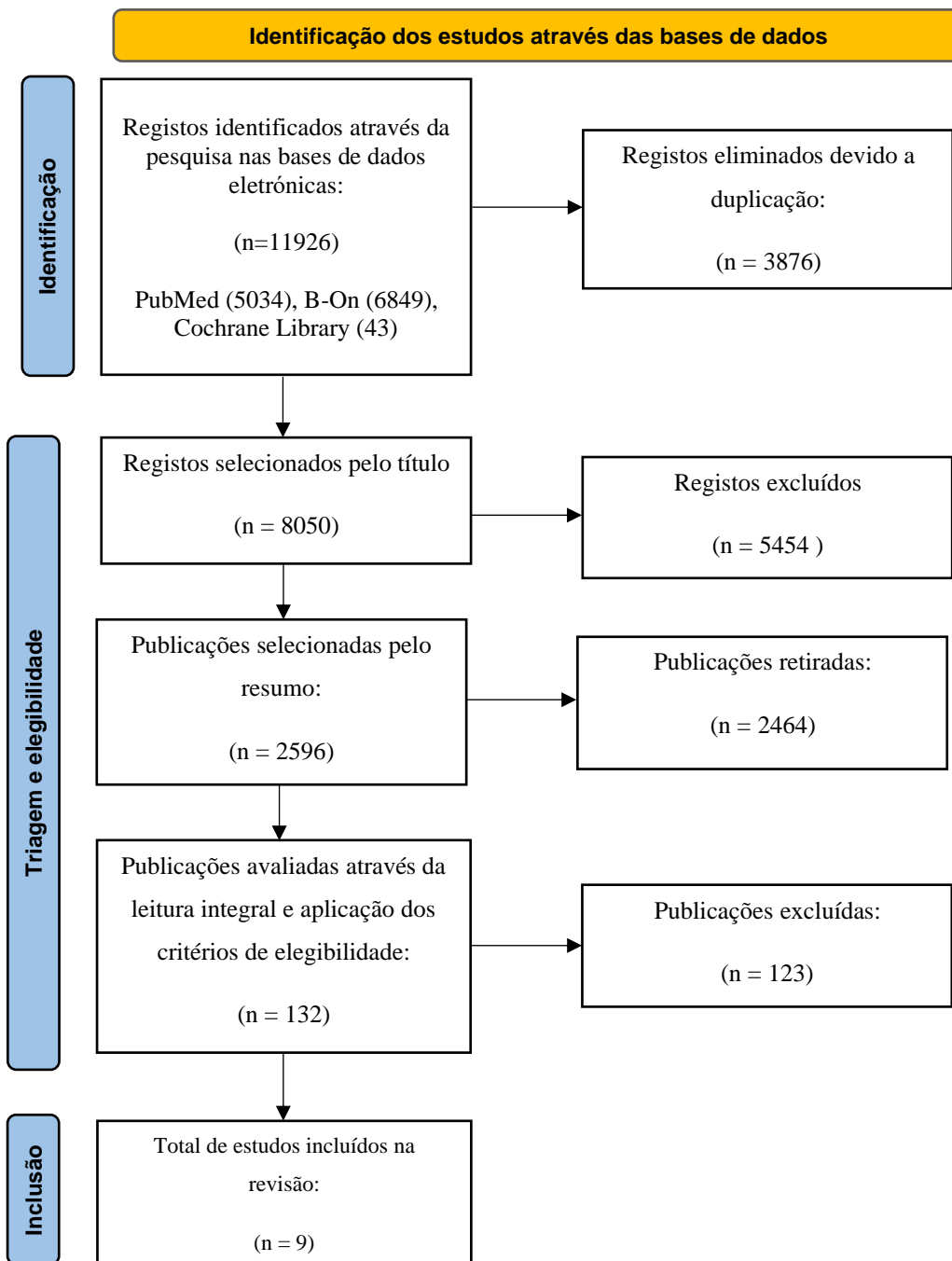


Figura 1. Diagrama de fluxo PRISMA.

Mecanismos de degradação das esponjas hemostáticas em cirurgia oral – Revisão sistemática

Nº do critério	Critério	Detalhes	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
1	Metas e objetivos indicados claramente	O estudo deve indicar, claramente as metas e objetivos, que devem então ser seguidos.	2	1	2	2	1	2	2	1	1
2	Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra	Devem ser claramente indicados os detalhes sobre o método pelo qual foi determinado o tamanho da amostra. Devem também ser especificados detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	Explicação detalhada da técnica de amostragem	Detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. Os detalhes da técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	Detalhes do grupo de comparação	Os detalhes do grupo de comparação (controlo positivo, controlo negativo ou padrão) devem ser claramente especificados.	0	0	1	0	2	0	2	2	0
5	Explicação detalhada da metodologia	Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer padrões universais usados (se aplicável) devem ser claramente declarados.	2	2	2	2	2	2	2	2	2
6	Detalhes do operador	O número de operadores e os detalhes relativos ao treinamento e calibração do(s) operador(es) (confiabilidade entre operadores e intra-operadores) devem ser claramente especificados.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	Randomização	Detalhes sobre geração de sequência e ocultação de alocação devem ser claramente declarados.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	Método de medição do outcome	A clareza do procedimento e a justificação para a escolha do método devem ser indicadas. O	2	2	2	1	2	2	2	2	2

Mecanismos de degradação das esponjas hemostáticas em cirurgia oral – Revisão sistemática

		método de padronização junto com os detalhes de quaisquer padrões universais usados (se aplicável) também devem ser claramente especificados.									
9	Detalhes assessores do outcome	O número de avaliadores de resultados e os detalhes relativos ao treino e calibração do(s) avaliador(es) (confiabilidade dos avaliadores inter e intra-resultados) devem ser claramente especificados.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10	Cegagem	Detalhes sobre o cegamento do(s) operador(es), avaliador(es) de resultado e estatístico devem ser claramente especificados.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	Análise estatística	Detalhes sobre o programa de software utilizado e análise estatística devem ser claramente especificados	1	NA	2	2	1	1	2	1	2
12	Apresentação dos resultados	O resultado deve ser baseado nas metas e/ou objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados com dados de base claramente especificados (se aplicável).	2	2	2	1	2	2	1	2	1
Total:	-	-	75%	70%	91,67%	66,67%	83,33%	75%	91,67%	83,33%	66,67%
RISCO DE VIÉS	-	-	Baixo	Baixo	Baixo	Médio	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Médio

2 = especificado adequadamente; 1 = especificado inadequadamente; 0 = não especificado; NA = não aplicável

Tabela 1. Risco de viés – Escala QUIN

III. RESULTADOS

1. Estudo 1.

No estudo de Zhao e seus colaboradores (2016), foi avaliada a degradação enzimática de hidrogéis de *human-like collagen* (HLC) com transglutaminase microbiana (MTGase) com diferentes rácios de MTGase/HLC, pelas enzimas colagenase I (100 U/mL) e colagenase II (100 U/mL) numa solução tampão a 37 °C. A preparação das amostras foi realizada através da dissolução do HLC numa solução tampão fosfato (PBS) para obter uma solução com 10% de concentração de HLC e depois foi adicionada uma quantidade de MTGase (20, 30, 40, 50, 60 U/g HLC) à solução. Após misturar completamente as amostras, estas foram incubadas a 37 °C durante 12 h e depois transferidas para um ambiente a 4 °C durante 12 h adicionais até consolidarem. Por fim, os géis preparados foram colocados a 90 °C durante 5 minutos para interromper a interação enzimática. A estrutura das amostras de hidrogel de HLC com MTGase (MTGH) foi registada com microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e foi calculada a porosidade pelo método de deslocamento líquido com etanol. Após pesagem e esterilização com irradiação de Co⁶⁰, três tipos de amostras de MTGH (MTGH3 (5 mL HLC/75 mg MTGase); MTGH4 (5 mL HLC/100 mg MTGase) e MTGH5 (5 mL/125 mg MTGase)) foram imersas em tubos contendo 2 mL de solução tampão enzimática fresca a 37 °C, num incubador. As amostras foram removidas da solução enzimática e depois lavadas com água ultra-pura três vezes após serem imersas diferentes vezes. Os pesos secos foram medidos após liofilização. A taxa de peso residual foi calculada em função do peso inicial e final. As estruturas do hidrogel após degradação foram visualizadas por SEM. A taxa de degradação dos hidrogéis diminuiu com o aumento da proporção de MTGase/HLC devido à maior densidade de *crosslinking*. A degradação dos hidrogéis pela colagenase II foi mais rápida do que com colagenase I. Os hidrogéis com colagenase II degradaram-se completamente após 10 h, 11 h e 12 h, respetivamente, comparativamente a 12 h, 14 h e 15 h com colagenase I. Em relação à estrutura dos hidrogéis após degradação enzimática, concluiu-se que a estrutura final dos hidrogéis degradados com colagenase I era menos irregular que a estrutura final das amostras degradadas com colagenase II. Esta alteração ao nível da estrutura comprovou ainda a ligação e degradação do hidrogel pela enzima colagenase.

2. Estudo 2.

No estudo de Tihan e seus colaboradores (2015), foi avaliada a degradação enzimática de esponjas de colagénio (CG) *crosslinked* com glutaraldeído (GA) e carregadas com cloranfenicol (CP). As esponjas de colagénio foram confeccionadas através do uso de géis de colagénio preparados como uma solução aquosa a 1% com pH 7,4. A estes foi acrescentada a solução a 1% de GA para permitir o *crosslinking*, e realizou-se a mistura das soluções durante 10 minutos. A mistura homogénea obtida na forma de gel foi então colocada num frigorífico durante 24 h. O passo final no método de preparação foi a liofilização das amostras. As esponjas de colagénio resultantes tiveram uma concentração de 4% de CP e uma concentração de glutaraldeído variável entre 0,25, 0,5, 0,75 e 1%. O teste de degradação enzimática foi efetuado com recurso a colagenase bacteriana (*Clostridium histolyticum*) e solução tampão fosfato-salino (PBS) com pH de 7,4. Cada esponja (CG-CP; CG-CP GA 0,25 %; CG-CP GA 0,50 %; CG-CP GA 0,75 %; CG-CP GA 1 %), com um peso conhecido, foi imersa em PBS e incubada a 37 °C durante a noite. De seguida, a colagenase (10 mg/mL) foi adicionada e o tubo de ensaio foi recolocado a 37 °C. Em intervalos impostos (1 h; 2 h; 4 h; 8 h; 24 h; 48 h) a degradação foi interrompida pela remoção das esponjas da solução de degradação, sendo pesada novamente a esponja. A percentagem de perda de peso foi calculada, em função do peso inicial, peso final e tempo. A esponja de colagénio CG-CP, demonstrou degradação enzimática completa após 1 h, enquanto as esponjas de colagénio CG-CP GA 0,25 %, CG-CP GA 0,50 %, CG-CP GA 0,75 %, CG-CP GA 1 % demonstraram degradação completa após 4 h, 8 h, 48 h e 48 h, respetivamente. O estudo pode concluir que um maior grau de *crosslinking* (% , CG-CP GA 0,75 % e CG-CP GA 1 %) resultou num aumento à resistência enzimática de até 48 h. Por outro lado, uma menor quantidade de GA (CG-CP GA 0,25 % e CG-CP GA 0,50 %) favoreceu uma perda de peso mais lenta que nas esponjas com maior quantidade de agente de *crosslinking*, e como tal mostrou um melhor comportamento à degradação pela colagenase. Os resultados indicaram que todas as esponjas com *crosslinking* com GA foram mais estáveis que as sem *crosslinking*.

3. Estudo 3.

No estudo de Tihãuan e seus colaboradores (2022), foi avaliada a degradação enzimática de *scaffolds* de colagénio não tratados (NT) e *scaffolds* de colagénio desidrotermicamente *crosslinked* (DHT) pela colagenase bacteriana (*Clostridium hystolyticum*). O colagénio tipo I foi isolado a partir de um tendão de Aquiles bovino com recurso a um método de

solubilização enzimática por ação da enzima pepsina solubilizada em 0,02 M Tris-HCL, seguida de purificação. O colagénio é obtido por hidrólise química e hidrólise enzimática. O tendão foi limpo com água destilada, cortado em porções de 1 cm, congelado e depois triturado. Antes da hidrólise acídica, o tendão foi descongelado. A hidrólise acídica foi então realizada com a adição do tendão triturado numa solução de 0,2 M de ácido acético, na qual foi mantido durante 24 h a 4 °C. Nesta etapa, dá-se início a hidrólise química e o tendão duplica, passando de opaco a transparente. Para a extração do colagénio por hidrólise enzimática, a matéria-prima da hidrólise acídica é adicionada a 0,5 M de solução de ácido acético com pepsina solubilizada em 0,02 m de ácido clorídrico. A mistura foi então mexida continuamente durante 48 h a 15 °C seguida de filtração afim de obter um colagénio solúvel em ácido. Foi então realizada ultrafiltração e liofilização para obter o *scaffold* de colagénio final, referido como NT. A reticulação desidrotérmica foi realizada com a colocação do *scaffold* de colagénio num forno em vácuo com temperaturas entre os 60 °C e 135 °C seguida do seu arrefecimento até a temperatura ambiente sob vácuo. O *scaffold* obtido passou a ser referido como DHT. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento biomimético dos *scaffolds* de colagénio num ambiente tecidual simulado *in vitro*. Foram pesadas 5 mg da amostra dos *scaffolds*, e imersas em 0,1 M de solução tampão tris-hidroximetilaminometano (Tris-HCL) com pH de 7,49, a 37 °C por 1 h. Depois, a biodegradação foi realizada a 37 °C por 24 h após a adição de 200 U de colagenase. A digestão foi completa e terminada pela adição de 0,25 M de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e por arrefecimento em gelo. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4 °C, e foi determinada a hidroxiprolina nos sobrenadantes de forma a identificar o colagénio. A biodegradabilidade foi expressa como uma % da hidrólise da esponja de colagénio exposta à colagenase bacteriana e foi analisada pelo conteúdo de hidroxiprolina libertado no suco digestivo. Ao fim de 24 h, a esponja de colagénio não modificada estava totalmente degradada, enquanto a esponja de colagénio após *crosslinking* (DHT) demonstrou apenas uma degradação de $58,36 \pm 2,86$ %, tendo a redução sido significativa ($p < 0,0001$). Como tal, a esponja com tratamento DHT foi mais resistente à degradação pela colagenase, devido à retenção da sua integridade estrutural graças ao *crosslinking* e a sua menor capacidade de absorção de fluidos.

4. Estudo 4.

No estudo de Salvatore e seus colaboradores (2021), foi avaliada a degradação de *scaffolds* de colagénio com diversas técnicas de *crosslinking*, tendo este estudo por objetivo descobrir a influência dos *crosslinks* intramolecular e intermolecular nas diversas propriedades dos *scaffolds*. As amostras foram preparadas através da hidratação lenta de flocos de colagénio desidratados com água destilada durante 5 a 6 h. A temperatura da suspensão foi controlada e mantida abaixo de 10 °C a agitação, de forma a prevenir a desnaturação proteica. A suspensão foi centrifugada (6000 rpm, 5 min, 4 °C) para remover as bolhas de ar. Por fim, foram obtidos os *scaffolds* porosos de colagénio, com uma espessura de cerca de 5 mm, através da liofilização de 35 mL da suspensão de colagénio. Os *scaffolds* foram submetidos a um total de seis técnicas de *crosslinking*, começando pela técnica de DHT, seguida ou não de *crosslinking* químico com glutaraldeído (GA), formaldeído (FA), dimetil suberimidato (DMS), carbamida (EDC) ou genipina (GP). O teste da degradação iniciou-se pela incubação de amostras de cerca de 6 mg em 6 mL de PBS com 0,1 mg/mL de colagenase bacteriana (*Clostridium histolyticum*) a 37 °C. Em momentos fixos de tempo (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 e 6 h), a degradação foi interrompida pelo congelamento da solução sobrenadante a -40 °C. A perda de peso (%) dos *scaffolds* foi avaliada em cada momento como a quantidade de colagénio solubilizado na solução incubada, medida por meio do ensaio do ácido bicinconínico (BCA). Para cada amostra, foram realizadas 3 medições independentes em cada momento de tempo. Enquanto as amostras sem *crosslinking* desintegraram-se totalmente em 5 minutos de incubação, a solubilização completa dos *scaffolds* tratados por DHT ocorreu em 1 h. O uso de *crosslinking* químico, em adição ao DHT, influenciou a cinética de degradação de forma proporcional à densidade de *crosslinking* obtida. A amostra com *crosslinking* químico com genipina (GP) dissolveu-se em 2 h. Os tratamentos mais eficientes com *crosslinking* químico com dimetil suberimidato (DMS) e *crosslinking* químico com carbamida (EDC) induziram uma perda de peso de aproximadamente 90 % e 50 % após 8 h, respetivamente. Os *scaffolds* que foram *crosslinked* com aldeídos, exibiram a degradação mais lenta, com uma perda de massa menor que 5 % após 7 h de incubação para as amostras de DHT + GA e uma perda de massa menor que 3 % após 24 h para as amostras de DHT+FA. Os resultados foram apresentados na forma de tempo de semi-vida em minutos como 12.6, 26.6, 57.7 e 173.2,

correspondentes às amostras com *crosslinking* DHT, DHT+GP, DHT+DMS e DHT+EDC, respetivamente.

5. Estudo 5.

No estudo de Kishan e seus colaboradores (2015), a degradação enzimática das redes de gelatina foi realizada com recurso a colagenase I (349 U/mg). O *crosslinking* foi realizado através da eletrofiação *in situ* da gelatina. A proporção do *crosslinking* foi variada de forma a avaliar o seu efeito na retenção da morfologia das fibras, na taxa de degradação e nas propriedades mecânicas. As amostras Gelatina não-*crosslinked*, Gelatina 1 (32 % *crosslinked*), Gelatina 5 (61 % *crosslinked*) e Gelatina 10 (91 % *crosslinked*) foram colocadas em tubos contendo 2 mL de 0,02 U de colagenase/mL de PBS e incubadas a 37 °C com agitação. As soluções foram trocadas a cada 3 dias. Em cada ponto de tempo (1 semana, 2 semanas e 4 semanas), as amostras foram colhidas com centrifugação e cuidadosamente enxaguadas 3 vezes com água destilada, sendo subsequentemente congeladas durante a noite e depois liofilizadas e observadas com SEM. A perda de massa da amostra degradada foi determinada após a liofilização dividindo a perda de massa pela massa seca inicial. A dissolução total da gelatina não *crosslinked* foi observada em 12 h de imersão na solução de colagenase. As redes de Gelatina 1 sofreram uma perda de integridade mecânica em 4 dias e sofreram dissolução completa em 10 dias. As redes de Gelatina 5 e de Gelatina 10 perderam a integridade mecânica em 16 e 22 dias, com dissolução total em 24 e 35 dias, respetivamente. Conforme esperado pelos investigadores, um aumento da proporção do *crosslinking* e como tal da densidade do *crosslinking* resultou na diminuição das taxas de degradação.

6. Estudo 6.

No estudo de Finamore e seus colaboradores (2019), a degradação dos *scaffolds* de colagénio foi efetuada pela sua conjugação com nanopartículas de ouro, seguida de incubação a 37 °C em PBS por 24 h, e posterior colocação de diferentes concentrações de colagenase bacteriana (0,3 mg/mL e 0,5 mg/mL) no meio. A cinética de degradação do *scaffold* de colagénio foi medida longitudinalmente em meios contendo 0, 0.3 e 0.5 mg/ml de colagenase pelo volume segmentado do *scaffold*, com recurso à microtomografia de raios-X (micro-CT) com contraste melhorado por nanopartículas de ouro (AuNP), à libertação cumulativa de nanopartículas de ouro no meio usando espectrometria de emissão ótica de plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e à massa do *scaffold* usando

análise gravimétrica. As amostras foram colocadas em tubos Eppendorf individuais contendo solução de incubação. Em cada momento de tempo longitudinal, a solução foi separada do *scaffold* e/ou dos fragmentos do *scaffold* por centrifugação a 500 g durante 1 minuto e recolhida para análise por espectrometria de emissão ótica de plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). O peso hidratado do *scaffold* remanescente foi medido, foi adicionada ao tubo solução tampão fresca sem colagenase e posteriormente, o *scaffold* foi fotografado com micro-CT, sendo adicionada depois solução tampão fresca com colagenase ao tubo de forma a continuar a degradação. A cada 24 h, foi realizada uma medição pelos três métodos, até que o *scaffold* estivesse totalmente degradado. Os resultados foram apresentados em tempo de semi-vida, no qual as amostras em solução com 0,3 mg/mL de colagenase tiveram um tempo de semi-vida de 3.34, 3.71 e 2.27 dias conforme medição por micro-CT, ICP-OES ou análise gravimétrica, respetivamente, e as amostras em solução com 0,5 mg/mL de colagenase tiveram um tempo de semi-vida de 1.22, 1.50 e 1.00 dias conforme medição por micro-CT, ICP-OES ou análise gravimétrica, respetivamente. Estes resultados mostraram que o aumento da concentração de colagenase levou a um aumento da cinética de degradação do *scaffold*. Em relação aos métodos de medição, foram comparadas as cinéticas de degradação dos *scaffolds* de colagénio medidas pelo micro-CT, ICP-OES e análise gravimétrica, tendo-se concluído que as medições através de micro-CT e ICP-OES exibiram uma variabilidade semelhante e significativamente inferior à da análise gravimétrica. Porém, as diferenças entre as medições dos três métodos diferentes não foram estatisticamente significativas ($p = 0.48$). No entanto, o tempo de semi-vida medido através de ICP-OES foi 11 e 23% superior que o tempo de semi-vida medido pela micro-CT para as concentrações de colagenase de 0,3 e 0,5 mg/mL, respetivamente. Adicionalmente, o estudo verificou que os *scaffolds* não demonstraram degradação mensurável na ausência de colagenase, durante um período de avaliação de nove dias.

7. Estudo 7.

No estudo de Kuo e seus colaboradores (2016), a degradação enzimática das esponjas de gelatina (Spongostan®) foi realizada através da imersão de discos de esponja numa solução de 10 ng pepsina/mL PBS ou de 1 µg colagenase/mL de PBS, a 37 °C. Não foi feita recarga de solução enzimática. Após a imersão na solução de pepsina, as esponjas diminuíram em peso até apenas $6,8 \pm 4,6$ % do seu peso original em 144 h. Após 96 h na solução de colagenase, as esponjas pesavam apenas $0,93 \pm 0,67$ % do seu peso original.

Foi também avaliada a degradação em solução PBS durante 8 semanas, tendo-se verificado a estabilidade da estrutura da esponja na ausência de enzimas.

8. Estudo 8.

No estudo de Long e seus colaboradores (2017), foi estudada a degradação enzimática de esponjas de gelatina.

As esponjas de gelatina são um produto liofilizado do hidrogel de gelatina. Como tal, em primeiro lugar, foi preparado o gel. O hidrogel de gelatina *crosslinked* com MTGase foi preparado através da dissolução de gelatina em pó em água destilada com uma temperatura de 50 °C para obter uma solução com 4 % de concentração. A MTGase em pó foi dissolvida em solução PBS para alcançar uma solução com concentração de 10 %. O hidrogel de gelatina foi então obtido pela mistura da solução de gelatina e de MTGase com uma proporção de cerca de 40 µL de MTGase por mL de solução de gelatina. A mistura foi incubada a 37 °C para gelatinização. O hidrogel resultante foi congelado a uma temperatura de -20 °C durante 8 h e liofilização durante 48 h para produzir as esponjas com MTGase. Foram também confeccionadas esponjas sem crosslinking através do arrefecimento da solução de 4 % de gelatina durante 2 h a 4 °C, congelamento a -20 °C durante 8 h e liofilização durante 48 h.

O teste de degradação enzimática das esponjas de gelatina foi realizado pela colocação das esponjas hidratadas previamente pesadas em 0,1 % colagenase I (>125 unidades digestivas de colagenase (CDU)/mg) a 37 °C durante 6 h num agitador horizontal. As esponjas resultantes foram pesadas em pontos de tempo específicos. A extensão da degradação enzimática foi determinada pelo cálculo da % de peso remanescente. Foram utilizadas esponjas imersas em PBS como controlo. As esponjas expostas à colagenase a 0,1 % degradaram-se completamente em cerca de 6h, enquanto não ocorreu perda de massa no grupo controlo. Foi demonstrado que as esponjas de gelatina podem ser degradadas pela ação da colagenase.

9. Estudo 9.

No estudo de Borrego-González *et al.* (2021), foi realizada a degradação enzimática de esponjas de atelocolagénio com diferentes graus de *crosslinking* através da imersão de amostras de colagénio de 0,6 a 0,7 mg previamente tratadas com 0,1 M de glicina durante 1 h e lavadas três vezes com solução tampão (0,1 M Tris- HCl e 5 mM CaCl₂, pH 7,4)

em tubos com 0,5 mL de 0,5 CDU/mL de colagenase tipo I/solução tampão, a 37 °C. Para as medições, foram retiradas amostras de 20 µL de cada tubo em determinados pontos de tempo (0,5; 1,5; 3; 6; 24; 72 e 120 h) para quantificar os níveis detetáveis de colagénio solúvel libertado durante a digestão da colagenase. A solução de colagenase foi substituída a cada 48 h. Foi usada uma quantificação direta, medindo a absorção da ligação peptídica em 205 nm com um espectrofotômetro UV-Vis de gotículas (NanoDrop™ 2000). Os padrões de calibração foram medidos em duplicado e repetidos para cada análise e todas as amostras foram medidas em triplicado. A degradação enzimática das esponjas de atelocolágeno após *crosslinking* DHT (DCol-S) foi próxima a 80 % após 1,5 h na solução de colagenase, e as amostras foram quase completamente degradadas após 3 h. As esponjas tratadas adicionalmente com qualquer uma das concentrações de GA desde 0,0015 a 0,3% (g/v) (DCol-S0,0015G, DCol-S0,015G, DCol-S0,03G e DCol-S0,3G) não tiveram nenhuma degradação significativa após 1,5 h. Após 24 h, DCol-S0,0015G atingiu cerca de 8% de degradação, enquanto as esponjas tratadas com maiores concentrações de GA foram degradadas em torno de 1,5 %. Além disso, foram necessárias 72 h de incubação para que DCol-S0,0015G se degradasse completamente, enquanto as esponjas DCol-S0,015G, DCol-S0,03G e DCol-S0,3G registaram apenas 8,4, 7,0 e 6,5 % de degradação, respetivamente, após 120 h de incubação.

A sistematização dos principais resultados encontra-se representada na tabela 2.

Mecanismos de degradação das esponjas hemostáticas em cirurgia oral – Revisão sistemática

Estudo	Material	Solução de degradação	Intervalo de avaliação	Método de medição	Resultados	Análise Estatística	Referência Bibliográfica
1	Hidrogel de <i>human-like collagen</i> (HCL) com transglutaminase microbiana (MTGase)	Degradação com colagenase I (100 U) e II (100 U), separadamente, em solução-tampão a 37 °C	Colagenase I – 18 h Colagenase II – 14 h	Análise gravimétrica: perda de massa percentual	Tempo até degradação total: MTGH3: colagenase I – 12 h; colagenase II – 10 h MTGH4: colagenase I – 14 h; colagenase II – 11 h MTGH5: colagenase I – 15 h; colagenase II – 12 h	Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo	Zhao <i>et al.</i> (2016)
2	Esponjas de colagénio tipo I (CG) <i>crosslinked</i> por glutaraldeído (GA) com cloranfenicol (CP)	Degradação com colagenase (10 mg/mL) em solução tampão fosfato-salino (PBS) a 37 °C (pH 7,4).	1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h	Análise gravimétrica: Perda de massa percentual	Tempo até degradação total: <ul style="list-style-type: none"> CG-CP = 1 h; CG-CP GA 0,25 % = 4 h; CG-CP GA 0,50 % = 8h; CG-CP GA 0,75 % = 48h; CG-CP GA 1 % = 48 h 	Não foram apresentados dados.	Tihan <i>et al.</i> (2015)
3	<i>Scaffolds</i> de colagénio tipo I não tratados (NT) e <i>scaffolds</i> de colagénio tipo I desidrotermicamente <i>crosslinked</i> (DHT)	Degradação com colagenase (200 U) em solução tampão Tris-HCl a 37 °C (pH 7,49)	24 h	% de hidrólise, medida pela libertação de hidroxiprolina pelas esponjas	Em 24 h, a esponja NT encontrava-se completamente degradada, enquanto a esponja DHT demonstrou uma degradação de $58,36 \pm 2,86$ %	Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo	Tihãuan <i>et al.</i> (2022)
4	<i>Scaffolds</i> de colagénio submetidos a vários tipos de <i>crosslinking</i>	Degradação com colagenase (0,1 mg/mL) em solução tampão fosfato-salino (PBS) a 37 °C	24 h	Análise gravimétrica	Tempo até degradação total: <i>Scaffold</i> sem <i>crosslinking</i> – 5 minutos <ul style="list-style-type: none"> DHT – 1 h DHT + GP – 2 h Perda de massa após 7 h: <ul style="list-style-type: none"> DHT-GA – 5 % Perda de massa após 8 h: <ul style="list-style-type: none"> DHT + DMS – 90 % GHT + EDC – 50 % Perda de massa após 24 h: <ul style="list-style-type: none"> DHT + FA – 3 % Tempos de semi-vida: <ul style="list-style-type: none"> DHT – 12,6 minutos DHT + GP – 26,6 minutos DHT + DMS – 57,7 minutos 	Um valor probabilístico de 95 % ($p < 0,05$) foi utilizado como critério de seleção. O tratamento com GP não aumentou significativamente a resistência dos <i>scaffolds</i> ($p = 0,6$)	Salvatore <i>et al.</i> (2021)

Mecanismos de degradação das esponjas hemostáticas em cirurgia oral – Revisão sistemática

					<ul style="list-style-type: none"> DHT + EDC – 173,2 minutos 		
5	<i>Scaffolds</i> de gelatina <i>crosslinked in situ</i>	Degradação com colagenase (0,02 U/mL) em solução tampão fosfato-salino (PBS) a 37 °C	35 dias	Análise gravimétrica: Perda de massa	Tempo até degradação total: <ul style="list-style-type: none"> Gelatina não-<i>crosslinked</i> – 12h Gelatina 1 – 10 dias Gelatina 5 – 24 dias Gelatina 10 – 35 dias 	Todos os testes foram realizados com um intervalo de confiança de 95 % (p<0,05)	Kishan <i>et al.</i> (2015)
6	<i>Scaffolds</i> de colagénio <i>crosslinked</i> por EDC/NHS com nanopartículas de ouro	Degradação com colagenase (0,3 mg/mL ou 0,5 mg/mL) em solução tampão fosfato-salino (PBS) a 37 °C	A cada 24 h até degradação total	Micro-CT, ICP-OES e análise gravimétrica	Tempo de semi-vida das amostras: Micro-CT: <ul style="list-style-type: none"> 0,3 mg/mL: 3.34 dias 0,5 mg/mL: 1.22 dias ICP-OES: <ul style="list-style-type: none"> 0,3 mg/mL: 3.71 dias 0,5 mg/mL: 1.50 dias Análise gravimétrica: <ul style="list-style-type: none"> 0,3 mg/mL: 2.27 dias 0,5 mg/mL: 1.00 dias 	O grau de significância para todos os testes foi de p<0,05 O aumento da concentração da colagenase aumentou a taxa de degradação (p<0,0001) A diferença entre os diferentes métodos não foi estatisticamente significativa (p = 0,48)	Finamore <i>et al.</i> (2019)
7	Esponja de gelatina (Spongostan®)	Degradação com colagenase (0,001 mg/mL) ou com pepsina (1,0 × 10 ⁻⁵ mg/mL) em solução tampão fosfato-salino (PBS) a 37 °C	12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h	Análise gravimétrica	Após 144 h na solução de pepsina, as esponjas encontravam-se reduzidas a 6,8 ± 4,6 % do seu peso inicial. Após 96 h na solução de colagenase, as esponjas encontravam-se reduzidas a 0,93 ± 0,67 % do seu peso inicial.	Um valor de p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo	Kuo <i>et al.</i> (2016)
8	Esponja de gelatina	Degradação numa solução de 0,1 % de colagenase a 37 °C	6h	Análise gravimétrica	Tempo até degradação total: 6 h	Um valor de p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo	Long <i>et al.</i> (2017)
9	Esponja de atelocolagénio com diferentes tipos de <i>crosslinking</i>	Degradação numa solução de 0,5 mL de 0,5 CDU/mL de colagenase tipo I/solução tampão (0,1 M Tris- HCl e 5 mM CaCl ₂ , pH 7,4), a 37 °C.	0.5 h, 1.5 h, 3h, 6 h, 24 h, 72 h e 120 h	Análise gravimétrica	<ul style="list-style-type: none"> DCol-S: degradação completa em 3 h DCol-S0.0015G: degradação completa em 72 h Ao fim de 120 h: <ul style="list-style-type: none"> DCol-S0.015G: 8,4, % degradada DCol-S0.03G : 7,0 % degradada DCol-S0.3G: 6,5 % degradada 	Não foram apresentados dados	Borrego-González <i>et al.</i> (2021)

Tabela 2. Sistematização dos resultados dos artigos selecionados

IV. DISCUSSÃO

1. Características desejáveis num estudo *in-vitro* de biomateriais em Medicina Dentária

Um biomaterial desenvolvido para aplicação em Medicina Dentária deve ser estudado num meio semelhante ao intra-oral de forma a produzir resultados fidedignos que possam ser traduzidos para conclusões clínicas. Como tal, a saliva humana com uma concentração de colagenase próxima da fisiológica deve ser a solução de eleição para os estudos da degradação dos materiais.

i. Saliva humana

A saliva está presente em todos os tecidos expostos ao meio oral, incluindo o sangue quando presente na boca, os tecidos moles quando acedidos para tratamentos gengivais e os tecidos ósseos quando expostos durante procedimentos cirúrgicos. Assim, é praticamente inerente ocorrer uma interação mínima com a saliva.

A interação da saliva com os biomateriais acarreta alterações das suas características, formando-se quase imediatamente uma película de saliva na superfície dos biomateriais após contacto, podendo afetar as suas propriedades terapêuticas ou regeneradoras. Por este motivo, é imprescindível utilizar a saliva humana na fase de estudos *in vitro* dos biomateriais para aplicação em Medicina Dentária, de forma a melhor compreender a interação dos biomateriais com o meio-oral e adequar as suas características para se obter a melhor relação entre os materiais e os tecidos orais possível.

De acordo com os autores Kunrath e Dahlin (2022), podem surgir duas limitações num estudo *in-vitro* que use saliva.

A primeira é relativa à escolha entre saliva artificial e saliva humana. A saliva artificial não traduz com completa acuidade a saliva humana, dado que não pode ser replicada com precisão a presença de contaminantes, impurezas e células. Logo, ainda que a composição da solução seja semelhante esta não deverá ser utilizada nos estudos.

A segunda limitação ocorre aquando da escolha do método de recolha da saliva. Existem várias técnicas como a recolha direta em clínica sem armazenamento nem tratamento, o uso de técnicas de estimulação salivar, a filtração da saliva e diversos métodos de armazenamento. A preocupação neste caso é que certas características salivares possam ser perdidas, o que pode prevenir a translação das conclusões para a clínica.

Do ponto de vista dos autores, a metodologia mais apropriada é a recolha da saliva em clínica e aplicação direta. Por outro lado, os autores reconhecem que vários estudos demonstraram a estabilidade da composição salivar em temperaturas baixas, pelo que esta alternativa pode ser considerada para facilitar os estudos laboratoriais.

ii. Concentração fisiológica de colagenase

Presentemente, não existe uma concentração de colagenase conhecida como correspondente à concentração fisiológica.

Num paciente saudável, os níveis de colagenase são relativamente baixos. Porém a presença de processos inflamatórios, como a doença periodontal ou a pulpíte crónica, aumenta exponencialmente a concentração da colagenase (Uitto *et al.*, 1990, Evrosimovska *et al.*, 2012).

Dos estudos analisados, apenas o estudo 5 apresentou um tempo de degradação comparável ao tempo de degradação em boca. Como tal, a concentração 0,02 U de colagenase/mL poderá ser adequada para simular a concentração de colagenase em meio oral.

A razão pela qual os estudos não procuram utilizar uma concentração próxima da fisiológica, deve-se ao facto de apenas terem como objetivo comprovar que o material é biodegradável. Porém, isto pode ser visto como uma limitação, devido à importância de conhecer o tempo de biodegradação fisiológica de um material.

2. Solução de degradação utilizada

i. Solução-tampão

Dos nove estudos que constituem esta revisão sistemática, cinco (2, 4, 5, 6 e 7) utilizaram a solução tampão fosfato-salino (PBS), dois (3 e 9) utilizaram a solução Tris-HCl e dois (1 e 8) não especificaram a solução tampão utilizada.

Uma vez que apenas o estudo 2 trata de um material desenvolvido especificamente para aplicação em meio-oral, apenas neste estudo podemos considerar como limitação o facto de não ter sido utilizada a saliva humana como solução.

ii. Colagenase

i. Concentração

Os artigos 2, 4, 6, 7 e 8 não especificaram as unidades digestivas de colagenase (CDU) presentes na solução de degradação.

Além disso, nenhum dos estudos utilizou a mesma concentração de colagenase, o que explica, em parte, a disparidade dos resultados.

O estudo 6 utilizou duas concentrações diferentes de colagenase (0,3 e 0,5 mg/mL) tendo-se verificado que uma maior concentração de colagenase, resultou num menor tempo de degradação.

ii. Tipo de colagenase

Em relação ao tipo de colagenase, nenhum dos estudos selecionados especificou a metaloproteinase de matriz (MMP) utilizada, sendo que três (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) correspondem à colagenase. De acordo com os autores Helling *et al.* (2017), apesar de maior parte dos estudos utilizar a MMP-1, a mais prevalente na cicatrização e mais eficiente na degradação é a MMP-8. Para além disso, no seu estudo, a utilização da MMP-1 ou da MMP-8 resultou em diferentes tempos de degradação. Como tal, a MMP-8 deve ser utilizada nos estudos de degradação enzimática.

O estudo 1 especificou que utilizou a colagenase I e II, enquanto os estudos 5 e 9 utilizaram apenas a colagenase I, sendo estes termos relativos à purificação da enzima.

No estudo 1, verificou-se que as amostras colocadas na solução de degradação com colagenase II degradaram-se mais rápido que as colocadas na solução com colagenase I. Esta conclusão aponta para a necessidade de especificar com clareza a colagenase que se empregou num teste de degradação, de forma a adequar a interpretação dos resultados obtidos e comparação com outros estudos.

3. Intervalo de avaliação

Os intervalos de tempo selecionados para avaliar a degradação foram diferentes em todos os estudos.

Adicionalmente, com exceção do estudo 5, nenhum outro estudo apresentou um tempo de degradação próximo do fisiológico.

Considerando que os biomateriais de colagénio e de gelatina nos formatos de esponja, *scaffold* e hidrogel têm um tempo de degradação fisiológico entre os 21 dias e as 12 semanas, recomenda-se um momento de avaliação a cada 24 h até ocorrer a degradação total, de forma a se obterem resultados fidedignos.

4. Métodos de medição da degradação

O método de avaliação mais prevalente foi a análise gravimétrica, tendo sido utilizada em oito dos estudos (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9). A análise gravimétrica consiste na...

O estudo 3 utilizou a libertação de hidroxiprolina na solução de degradação como método de medição. A hidroxiprolina é abundante no colagénio e como tal a medição da sua concentração é frequentemente utilizada para quantificar indiretamente o colagénio presente numa solução de degradação.

O estudo 6 utilizou, para além da gravimetria, a medição através de micro-CT e ICP-OES, sendo, portanto, o mais completo ao nível da metodologia de medição. Este estudo constatou que as diferenças entre as medições dos três métodos diferentes não foram estatisticamente significativas ($p = 0.48$), mas, no entanto, o tempo de semi-vida medido através de ICP-OES foi 11 e 23% superior que o tempo de semi-vida medido pela micro-CT para as concentrações de colagenase de 0,3 e 0,5 mg/mL, respetivamente. A micro-CT convencional fornece uma resolução espaciotemporal elevada e imagem de tecidos profundos, porém tem baixo contraste tecidual. A microtomografia de contraste melhorado permite ultrapassar esta limitação. As nanopartículas de ouro podem ser usadas como agente de contraste, devido à sua elevada atenuação de raios-X, a sua biocompatibilidade e facilidade de se ligar covalentemente aos biomateriais à base de proteínas. A degradação do *scaffold* foi medida pela diferença entre o volume segmentado do *scaffold* e o volume inicial do *scaffold*, assim como pela atenuação média dos raios-X. A espectrometria de emissão ótica de plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)

5. Fatores que influenciaram a taxa de degradação enzimática

Os estudos selecionados referiram diversos fatores que influenciaram a cinética da degradação enzimática tais como o valor de pH da solução de degradação e a sua temperatura, a origem do colagénio ou gelatina, a porosidade dos materiais e o seu tipo e grau de *crosslinking* assim como a presença de inibidores enzimáticos. Adicionalmente, a concentração e tipo de colagenase utilizada foi também identificada como fator que influenciou a taxa de degradação.

i. Origem do colagénio ou da gelatina

A origem do colagénio ou da gelatina empregados influencia não só a taxa de degradação, como poderá influenciar a medição desta. Como tal, é importante que os estudos clarifiquem sempre a origem dos materiais.

O estudo 1 utilizou *human like collagen*, obtido através da multiplicação bacteriana de mRNA humano.

Relativamente ao colagénio de origem animal, o estudo 2 utilizou colagénio tipo I extraído da derme bovina, assim como o estudo 4. O estudo 3 usou o colagénio tipo I de origem bovina, extraído e purificado de tecido do tendão de Aquiles bovino. O estudo 6 utilizou o colagénio tipo I de origem bovina, sem especificar a natureza do tecido. O estudo 9 utilizou atelocolagénio bovino purificado.

Em relação à gelatina de origem animal, o estudo 5 utilizou gelatina de origem bovina, enquanto o estudo 7 utilizou a Spongostan, que é composta por gelatina de origem suína, e o estudo 8 não especificou a origem da gelatina preparada.

ii. Preparação das amostras

Cada estudo seguiu um protocolo diferente para a preparação dos biomateriais, e foi considerado que este foi adequadamente descrito em todos os estudos selecionados. No entanto, as variações entre estes também constituem um fator capaz de influenciar a taxa de degradação dos materiais resultantes.

iii. Técnica de *crosslinking*

As técnicas de *crosslinking* permitem melhorar as propriedades mecânicas e a resistência enzimática dos materiais biodegradáveis.

O estudo 1 realizou *crosslinking* com um inibidor da proteólise, a transglutaminase microbiana. A transglutaminase microbiana (MTGase) é um agente enzimático de *crosslinking* que melhora a força tênsil e a resistência enzimática dos materiais de colagénio. Esta enzima catalisa reações de transferência do grupo acilo entre grupos λ -carboxiamida de resíduos de glutamina e grupos ϵ -amino de resíduos de lisina, resultando na formação de proteínas *crosslinked* intra e intermolecularmente por lisina ϵ -(λ -glutaminil). A maior vantagem desta técnica deve-se a não deixar resíduos químicos nem subprodutos na estrutura do *scaffold*, eliminando assim o risco de induzir efeitos citotóxicos.

O estudo 2 realizou *crosslinking* com glutaraldeído (GA). O GA é o agente químico mais empregado e mais estudado para realizar o *crosslinking* dos materiais de colagénio.

O estudo 3 recorreu à técnica de *crosslinking* físico desidrotérmico (DHT). Este método utiliza temperaturas elevadas num forno a vácuo (120 a 135 °C, dependendo do protocolo seguido) para induzir a formação de ligações amida entre os grupos carboxilo e amina, assim como ligações éster entre os grupos carboxilo e hidroxilo, através de reações de condensação, conferindo melhores propriedades mecânicas aos materiais.

O estudo 4 aplicou 6 técnicas de *crosslinking* variando entre amostras. Foi realizado o *crosslinking* DHT em todas as amostras. De seguida, foram aplicadas outras técnicas dependendo da amostra. O *crosslinking* com aldeídos (GA e FA) reage com os grupos amina do colagénio, e é das técnicas mais comuns, porém está associado à citotoxicidade devido aos agentes químicos, o que afeta o crescimento celular e pode levar à apoptose celular. O *crosslinking* DMS é menos citotóxico que o *crosslinking* com aldeídos, formando ligações cruzadas entre os seus grupos *imidoester* e os grupos amina livres do colagénio. O *crosslinking* com carbamida (EDC) foi realizado pela imersão das amostras hidratadas de colagénio numa solução aquosa com 12 mM de EDC e 5,5 mM de N-hidroxissuccinimida (NHS), a temperatura ambiente durante 2 h. O *crosslinking* com genipina (GP) reage com os grupos primários de amina do colagénio ao formar ligações cruzadas intramoleculares e intermoleculares, e tendo vindo a ser estudado como possível substituído dos aldeídos devido à sua baixa toxicidade.

O estudo 5 recorreu à técnica de eletrofiação *in situ*.

O estudo 6 utilizou o *crosslinking* com EDC e NHS.

O estudo 7 não indicou o *crosslinking*, uma vez que utilizou as esponjas de gelatina de nome comercial Spongostan.

O estudo 8 aplicou como agente de *crosslinking* a transglutaminase microbiana.

O estudo 9 utilizou o *crosslinking* DHT assim como quantidades variáveis do agente de *crosslinking* químico GA.

Em suma, a técnica com GA foi utilizada em 3 estudos (2, 4 e 9), a técnica com DHT foi utilizada em 3 estudos (3, 4 e 9), a técnica com transglutaminase microbiana foi utilizada em 2 estudos (1 e 8), a técnica com EDC + NHS foi utilizada em 2 estudos (4 e 6). O

estudo 5 foi o único a utilizar a eletrofiação *in situ*, e o estudo 7 foi o único que não mencionou a técnica de *crosslinking*.

Foi possível concluir-se em todos os estudos que uma maior densidade de *crosslinking* levou a uma maior resistência enzimática. Conforme referido nos resultados, determinadas técnicas de *crosslinking* demonstraram ser mais eficazes que outras. No entanto, uma vez que neste trabalho não se pretendeu avaliar as diferentes técnicas de *crosslinking* e dado que a grande diferença de protocolos entre estudos não permite efetuar comparações entre os que usaram as mesmas técnicas, a exposição das técnicas de *crosslinking* utilizadas é meramente informativa.

6. Comparação de resultados dos testes de degradação

Uma vez que os testes de degradação diferiram entre cada estudo, desde a origem, tamanho e tratamento das amostras, o protocolo do teste, os períodos de observação e o método de medição, é necessário averiguar quais os fatores que podem ter influenciado os resultados, antes de traçar comparações.

Os estudos 2 e 9 estudaram a degradação das esponjas de colagénio. Porém, os resultados obtidos nos testes de degradação, ambos medidos através da gravimetria, diferiram bastante, devido às diferentes metodologias utilizadas. O estudo 2 utilizou uma maior concentração de colagenase, e como tal a sua amostra sem *crosslinking* degradou-se completamente após 1 h, enquanto no estudo 9, a amostra sem *crosslinking* se degradou em 3 h.

Os estudos 3, 4 e 6 estudaram a degradação dos *scaffolds* de colagénio. O estudo 3 só realizou um momento de avaliação, ao fim de 24 h, nos quais verificou que o *scaffold* não-tratado se tinha degradado completamente, e o *scaffold* com *crosslinking* tinha perdido $58,36 \pm 2,86$ % da sua massa inicial, não apresentando o seu tempo de degradação completa. O estudo 4 apresentou os seus resultados de cinco formas diferentes (tempo de degradação total, degradação após 7, 8 e 24 h e tempo de semi-vida) para as diferentes amostras, o que por si só se revela como uma limitação, não permitindo comparar os resultados dentro do próprio estudo. O estudo 6 utilizou a metodologia mais precisa, tendo recorrido a três tipos de métodos de medição da degradação (micro-CT, ICS-OEP e análise gravimétrica) e duas concentrações de colagenase, e apresentou os resultados em tempo de semi-vida para cada um dos métodos de medição, tendo a análise gravimétrica determinado os menores valores de tempo de semi-vida de ambas as

amostras e o ICS-OEP os maiores, sendo o intervalo entre 2,27 a 3,71 dias para a menor concentração de colagenase e de 1 a 1,5 dias para a maior concentração.

Os estudos 7 e 8 estudaram a degradação das esponjas de gelatina. Os estudos utilizaram uma concentração de colagenase diferente, e como expectável, obtiveram diferentes resultados. Ambos utilizam o mesmo método de medição, a análise gravimétrica, e enquanto no estudo 7, ao fim de 96 h as amostras da esponja preservavam cerca de 0,93 % do seu peso original, no estudo 8, as amostras degradaram-se completamente em apenas 6 h.

Uma vez que apenas o estudo 1 estudou o hidrogel de colagénio e apenas o estudo 5 estudou o *scaffold* de gelatina, não poderão ser traçadas comparações para estes materiais.

V. CONCLUSÃO

A presente revisão sistemática identificou uma lacuna na literatura, pois a pesquisa evidenciou a ausência de estudos *in-vitro* que utilizassem a saliva humana e uma concentração de colagenase próxima da fisiológica para simular a dinâmica do meio-oral. Porém, foi possível, com base na literatura existente, compreender os mecanismos associados à degradação enzimática do colagénio em biomateriais de colagénio e gelatina, respondendo assim à primeira questão de investigação. Foi ainda possível estabelecer um protocolo adequado para aplicação futura.

Tendo em consideração os vários pontos apresentados ao longo da discussão, sugere-se que em estudos futuros da biodegradação *in-vitro* dos biomateriais desenvolvidos para uso na Medicina Dentária, se utilize uma concentração de 0,02 U de colagenase (MMP-8)/mL de saliva humana a 37° C, e que se efetuem momentos de medição a cada 24h até que ocorra a degradação total. Relativamente ao método de medição da degradação, apesar dos diferentes métodos influenciarem os resultados, não é possível afirmar que um seja superior aos restantes. Como tal, a análise gravimétrica, pela sua acessibilidade, poderá ser utilizada.

Em resposta à segunda questão de investigação, as principais falhas identificadas na avaliação laboratorial dos mecanismos associados à degradação enzimática do colagénio em biomateriais de colagénio e gelatina foram a falta de uniformização dos protocolos utilizados nos testes de biodegradação, pois limitou as comparações entre estudos, as concentrações e tipos de colagenase empregados, uma vez que influenciaram a taxa de degradação do colagénio e os intervalos de avaliação escolhidos, pois quando inadequados, não permitiram identificar o tempo de degradação total.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borrego-González, S. *et alli.* (2021) Sponge-like processed D-periodic self-assembled atelocollagen supports bone formation in vivo. *Materials Science and Engineering: C*, 120, p. 111679.
- Calciolari, E. *et alli.* (2018) Degradation pattern of a porcine collagen membrane in an in vivo model of guided bone regeneration. *Journal of Periodontal Research*, 53(3), pp. 430–439.
- Checchi, V. *et alli.* (2020) The Role of Matrix Metalloproteinases in Periodontal Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(14), p. 4923.
- Egorikhina, M.N. *et alli.* (2021) Aspects of In Vitro Biodegradation of Hybrid Fibrin–Collagen Scaffolds. *Polymers*, 13(20), p. 3470.
- Elgezawi, M. *et alli.* (2022) Matrix Metalloproteinases in Dental and Periodontal Tissues and Their Current Inhibitors: Developmental, Degradational and Pathological Aspects, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), p. 8929.
- Evrosimovska, B. *et alli.* (2012) Concentration of collagenases (MMP-1, -8, -13) in patients with chronically inflamed dental pulp tissue. *Prilozi*, 33(2), pp. 191–204.
- Finamore, T.A. *et alli.* (2019) Nondestructive, longitudinal measurement of collagen scaffold degradation using computed tomography and gold nanoparticles. *Nanoscale*, 11(10), pp. 4345–4354.
- Gao, J. *et alli.* (2023) Evaluating the Degradation Process of Collagen Sponge and Acellular Matrix Implants In Vivo Using the Standardized HPLC-MS/MS Method. *Separations*, 10(1), p. 47.
- Helling, A.L. *et alli.* (2017) In Vitro Enzymatic Degradation of Tissue Grafts and Collagen Biomaterials by Matrix Metalloproteinases: Improving the Collagenase Assay. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(9), pp. 1922–1932.
- Hutmacher, D., Hürzeler, M.B. and Schliephake, H. (1996) A Review of Material Properties of Biodegradable and Bioresorbable Polymers and Devices for GTR and GBR Applications. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 11(5), pp. 667-78.
- Kishan, A.P. *et alli.* (2015) In situ crosslinking of electrospun gelatin for improved fiber morphology retention and tunable degradation. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(40), pp. 7930–7938.
- Kunrath, M.F. and Dahlin, C. (2022) The Impact of Early Saliva Interaction on Dental Implants and Biomaterials for Oral Regeneration: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), p. 2024.
- Kuo, Z.-K. *et alli.* (2016) Osteogenic differentiation of preosteoblasts on a hemostatic gelatin sponge. *Scientific Reports*, 6(1), p. 32884.
- Long, H. *et alli.* (2017) Preparation and characteristics of gelatin sponges crosslinked by microbial transglutaminase. *PeerJ*, 5, p. e3665.
- Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R. and Berthod, F. (2010) Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 3(3), pp. 1863–1887.
- Salvatore, L. *et alli.* (2021) Exploring the effects of the crosslink density on the physicochemical properties of collagen-based scaffolds. *Polymer Testing*, 93, p. 106966.
- Tihan, G.T. *et alli.* (2015) Chloramphenicol collagen sponges for local drug delivery in dentistry. *Comptes Rendus Chimie*, 18(9), pp. 986–992.
- Tihăuan, B.-M. *et alli.* (2022) Crosslinked Collagenic Scaffold Behavior Evaluation by Physico-Chemical, Mechanical and Biological Assessments in an In Vitro Microenvironment. *Polymers*, 14(12), p. 2430.

Uitto, V.-J., Suomalainen, K. and Sorsa, T. (1990) Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health, *Journal of Periodontal Research*. 25(3), pp. 135–142.

Zhao, L. *et alli*. (2016) A novel smart injectable hydrogel prepared by microbial transglutaminase and human-like collagen: Its characterization and biocompatibility. *Materials Science and Engineering: C*, 68, pp. 317–326