

DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS

THIAGO BIZERRA FIDELES



**Tese de Doutorado em Ciência e
Engenharia de Materiais**

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO NA
ENGENHARIA DE TECIDOS

THIAGO BIZERRA FIDÉLES

CAMPINA GRANDE

NOVEMBRO/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO NA
ENGENHARIA DE TECIDOS

THIAGO BIZERRA FIDÉLES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito para à obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Orientador: Prof. Dr. MARCUS VINICIUS LIA FOOK

Agência Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

CAMPINA GRANDE
NOVEMBRO/2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

- F451d Fideles, Thiago Bizerra.
Desenvolvimento de scaffolds de quitosana para aplicação na engenharia de tecidos / Thiago Bizerra Fideles. – Campina Grande, 2014.
121 f. : il.
- Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2014.
- "Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".
Referências.
1. Quitosana – Engenharia de Materiais. 2. Scaffolds.
3. Liofilização. 4. Agregação de Partículas. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Título.

CDU 620.1:677.473(043)

DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO
NA ENGENHARIA DE TECIDOS

THIAGO BIZERRA FIDELES

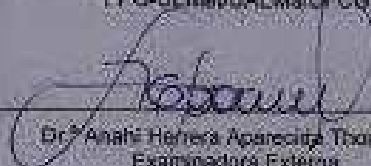
Tese Aprovada em 10/11/2014 pela banca examinadora constituída dos seguintes
membros:



Dr. Marcus Vinícius Lia Fook
Orientador
PPG-CEM&UAEMA/UFCCG



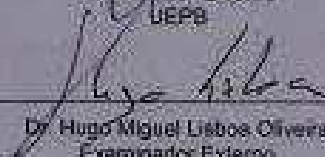
Dr. Belmiro de Araújo Neves
Examinador Interno
PPG-CEM&UAEMA/UFCCG



Dr. Anahí Helena Aparecida Thomazim
Examinadora Externa
UFSCar



Dr. Eduardo Jorge Valadares Oliveira
Examinador Externo
UEFS



Dr. Hugo Miguel Lisboa Oliveira
Examinador Externo
UFCCG

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Maria Danilda** e **José Fidéles**, pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos de minha vida, me fazendo acreditar que a família é a base de tudo.

À minha noiva, Glória Tamiris, pela incondicional compreensão, amizade e apoio em todos os momentos

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre estar presente em minha vida e de minha família, me cobrindo de bênçãos, pelas forças que me foram dadas para superar os desafios.

Ao Professor Dr. **Marcus Vinicius Lia Fook**, pela orientação dada em todas as fases de execução do trabalho, pela confiança a mim dirigida, por todas as oportunidades dadas, e principalmente, por ter acreditado sempre em mim, em todos os momentos. Agradeço por sua honestidade, sinceridade. Agradeço pelo carinho e confiança depositada.

Ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) pela oportunidade e estrutura concedida, que foram essenciais para a execução deste trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, na pessoa do Professor Dr. Romualdo Rodrigues de Menezes.

Ao professor Dr. Gelmires de Araújo Neves, pelo apoio prestado em todas as fases do trabalho.

Ao prof. Dr. Eduardo Jorge Oliveira Valadares, Diretor do Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde, do Ministério da Saúde, e docente da Universidade Estadual de Campina Grande pelo apoio e aprendizado.

Ao Dr. Jorge Vicente Lopes da Silva, Diretor da Divisão de Tecnologias Tridimensionais - DT3D, do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer – CTI.

Ao professor Dr. Hugo Miguel Lisboa Oliveira, pela contribuição científica e acadêmica, ideias propostas e companheirismo.

Ao Ítalo Macedo Freire Pinheiro, Glória Tamiris Farias da Silva Furtado, Luciane da Costa Trindade e Williams Teles Barbosa pela significativa contribuição acadêmica e científica despendida durante toda a realização do trabalho.

Aos pesquisadores do CERTBIO, Daniel Bezerra de Lima e Silvia Maria Pinto Borges, pela contribuição científica prestada no que diz respeito aos ensaios biológicos.

Aos colegas do Grupo de Biomateriais, por todos esses anos de convivência, conquistas e desafios enfrentados.

Ao Ministério da Saúde, Hospital Samaritano de São Paulo, Organização Pan-americana (OPAS) de Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pelos recursos destinados ao CERTBIO, que possibilitaram a execução deste trabalho.

A todos os **Docentes** do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande.

A todos os membros do NGI/CERTBIO.

A todos os funcionários do Laboratório CERTBIO, nomeadamente D. Val, sr. Sérgio, Josilene, Paulinha, Dailma.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Martin Luther King)

SUMÁRIO

SUMÁRIO	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE SÍMBOLOS	XV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1 ENGENHARIA DE TECIDOS.....	24
3.2 MATRIZ EXTRACELULAR	27
3.3 BIOMATERIAIS PARA ENGENHARIA DE TECIDOS	29
3.4 ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS - SCAFFOLDS	32
3.5 PRINCIPAIS MÉTODOS DE FABRICAÇÃO DE SCAFFOLDS	38
3.6 BIOPOLÍMEROS.....	39
3.7 QUITOSANA	41
3.8 SCAFFOLDS DE QUITOSANA.....	47
3.9 AGLOMERAÇÃO DE PARTÍCULAS.....	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 LOCAL DA PESQUISA	53
4.2 REAGENTES	53
4.3 ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	53
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	53
4.4.1 ETAPA I	54
4.4.1.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE QUITOSANA	54
4.4.1.2 OBTENÇÃO DOS SCAFFOLDS PARA ETAPA I.....	54
4.4.1.3 REAÇÃO DE RETICULAÇÃO PARA ETAPA I.....	54
4.4.2 ETAPA II	55
4.4.2.1 OBTENÇÃO DOS SCAFFOLDS PARA ETAPA II	55
4.5 CARACTERIZAÇÕES	57

5.5.1 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR	58
4.5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV	58
5.5.3 ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X ..	59
4.5.4 ANÁLISE TÉRMICA	60
4.5.4.1 TERMOGRAVIMETRIA (TG).....	60
4.5.4.1 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	60
4.5.5 RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO.....	61
4.5.6 GRAU DE INTUMESCIMENTO (%GI)	61
4.5.7 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	62
4.5.8 ENSAIOS DE ADESÃO CELULAR	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 ETAPA I	65
5.1.1 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR	66
5.1.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X – MEV/EDS	69
5.1.3 TERMOGRAVIMETRIA (TG/DTG)	73
5.1.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	78
5.1.5 GRAU DE INTUMESCIMENTO (%GI)	81
5.1.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	84
5.2 ETAPA II	86
5.2.1 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR	87
5.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X – MEV/EDS	90
5.2.3 TERMOGRAVIMETRIA (TG/DTG)	93
5.2.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	95
5.2.5 RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO.....	96
5.2.6 GRAU DE INTUMESCIMENTO (%GI)	98
5.2.7 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	99
5.2.8 ENSAIOS DE ADESÃO CELULAR	99
6. CONCLUSÕES	102

6.1 ETAPA I.....	102
6.2 ETAPA II.....	103
7. PERSPECTIVAS.....	105
8. REFERÊNCIAS.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de transplantes órgãos realizados no Brasil em 2012. Fonte: Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, 2012.....	27
Figura 2. Engenharia de Tecidos e seus componentes. Adaptado de Fisher et al., 2007; Vacanti et al., 2007; Badylak et al., 2009.....	28
Figura 3. Esquema da matriz extracelular. Fonte: Engel & Chiquet, 2001.....	30
Figura 4. Evolução dos biomateriais. Fonte: Holzapel et al., 2012.....	32
Figura 5. Interconectividade de poros. Fonte: HUTMACHER et al., 2008.....	34
Figura 6. Propriedades dos scaffolds. a) A topografia de superfície do scaffold deve direcionar o crescimento celular; b) O material deve possuir resistência mecânica suficiente para proporcionar o desenvolvimento celular; c) A morfologia dos scaffolds tem que correlacionar, de maneira proporcional, a interconectividade, tamanho e forma dos poros. Fonte: MARTINO et al., 2012.	35
Figura 7. Curva típica de tensão-deformação de espumas. Fonte: Adaptada de GIBSON e ASHBY, 1997	37
Figura 8. Relação entre estrutura e desenvolvimento celular. Adaptado de JELL et al., 2009 e HOLZAPFEL et al., 2012.....	38
Figura 9. Estrutura química da quitosana. Fonte: SILVA et al., 2011.....	43
Figura 10. Diversas formas de fabricação e aplicação da quitosana. Adaptado: OSÓRIO, 2007.....	45
Figura 11. Natureza policatiónica da quitosana e interações eletrostáticas. Adaptado de: KARAKEŞILI, et al., 2007; DASH et al., 2011; CROISIER & JÉRÔME, 2013.	46
Figura 12. Fluxograma de execução do trabalho para Etapa I.....	56
Figura 13. Representação esquemática da precipitação de quitosana e metodologia de agregação das partículas. Fonte: Adaptado de BAPTISTA, 2008.	57
Figura 14. Fluxograma de produção da etapa II.....	58
Figura 15. Fase inicial do processo de obtenção dos scaffolds (a) concentração 1,0 (m/v); (b) concentração 3,0% (m/v).....	66
Figura 16. Espectros de FTIR SQNR.	67
Figura 17. Espectros de FTIR SQNR e SQR.	68
Figura 18. MEV dos scaffolds SQNR; (a) 1,5%. 250X; (b) 2,0%. 250X.....	70
Figura 19. MEV dos scaffolds reticulado por 15 minutos; (a) 1,5%. 250X; (b) 2,0%. 250X.	71
Figura 20. MEV dos scaffolds reticulado por 30 minutos; (a) 1,5%. 250X; (b) 2,0%. 250X.....	72
Figura 21. Curvas TG/DTG para SQNR, SQR15 e SQR30. (a) 1,5 % (m/v); (b) 2,0 % (m/v).....	74
Figura 22. Reação de reticulação entre a quitosana e o ácido sulfúrico. Fonte: MUKOMA et al., 2004.	78
Figura 23. Curvas DSC para a) SQNR, (b) SQR15 e (c) SQR30 com concentração de 1,5 % (m/v).....	79
Figura 24. Curvas DSC para a) SQNR, (b) SQR15 e (c) SQR30 com concentração de 2,0 % (m/v).....	80
Figura 25. Grau de intumescimento para SQNR, SQR15 e SQR30 com concentração de 1,5 % (m/v).....	82

Figura 26. Grau de intumescimento para SQNR, SQR15 e SQR30 com concentração de 2,0 % (m/v).....	83
Figura 27. Estrutura química do MTT e do formazan. Fonte: STOCKERT et al., 2012.	85
Figura 28. Atividade metabólica celular em contato com os scaffolds reticulados de quitosana.....	85
Figura 29. Microestrutura do scaffold desenvolvido ao longo da etapa I.....	87
Figura 30. Produção de scaffolds de quitosana pelo método de agregação de partículas.....	88
Figura 31. Espectro de FTIR para o tripolifosfato de sódio (STTP).....	88
Figura 32. Espectro de FTIR para quitosana (CHLMW) e os scaffolds CH/TPP/G.	89
Figura 33. Esquema da reticulação entre a quitosana e o TPP. Fonte: MARTINS et al., 2012.	90
Figura 34. MEV das esferas produzidas pelo método de geleificação ionotrópica. Aumentos de (a) 20X; (b) e (c) 500X; (d) 1000X.	91
Figura 35. MEV dos scaffolds CHI/TPP/G. a) 100X; b) 100X; c) 140X e d) 1000X.....	92
Figura 36. EDX para os scaffolds CHI/TPP/G.	93
Figura 37. Curvas TG/DTG para (a) quitosana em pó e (b) scaffold de quitosana.....	94
Figura 38. DSC da (a) quitosana pura (Q) e (b) scaffold de quitosana (CHI/TPP/G).....	96
Figura 39. Curva Tensão-Deformação para scaffolds de quitosana (CHI/TPP/G).....	97
Figura 40. Grau de intumescimento dos scaffolds de quitosana (CHI/TPP/G). 99	
Figura 41. Viabilidade celular dos scaffolds.	100
Figura 42. Placa de cultura celular.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das principais técnicas de fabricação de scaffolds. Fonte: MURPHY & MIKOS, 2008; HUTMACHER et al., 2008)	40
Tabela 2. Eventos térmicos para os scaffolds de quitosana não reticulados (SQNR 1,5% e SQNR 2,0%) e reticulados por 15 e 30 minutos (SQR15 1,5%, SQR30 1,5%, SQR15 2,0% e SQR30 2,0%).....	75
Tabela 3. Eventos térmicos para quitosana (CHI) e scaffolds de quitosana (CHI/TPP/G).....	95

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
NaAlg	Alginato de Sódio
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
H_2O	Água
ASTM	American Society for Testing and Materials
NH	Amina
Å	Ångström
β	Beta
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-
cm	Centímetro
ε	Deformação
P_r	Densidade relativa
\varnothing	Diâmetro
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X
TCP	Fosfato tricálcico
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
γ	Gama
G	Gelatina
GAGs	Glucosaminoglicanos
g	Grama
$^{\circ}C$	Graus Celcius
GD	Grau de desacetilação
GI	Grau de Intumescimento
h	Hora
IV	Infravermelho
ISO	International Organization of Standardization
OH-	Íon hidroxila
m	massa
ECM	Matriz extracelular
MPa	Megapascal
μL	Microlitro
μm	Micrometro
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
E	Módulo de Young
Mol/L	Mol por Litro
Mw	<i>Molecular weight</i> – Peso Molecular
nm	Nanometro
N	Newton
Pa	Pascal
P	Porosidade
RPM	Rotações por minuto
PBS	Tampão fosfato salino
%	Porcentagem
pH	Potencial de hidrogênio iônico
CHI/TPP/G	Scaffold de quitosana
SQNR	Scaffold de quitosana não reticulado
SQR15	Scaffold de quitosana reticulado por 15 minutos
SQR30	Scaffold de quitosana reticulado por 30 minutos
SUS	Sistema Único de Saúde
TG	Termogravimetria
Θ	Theta
3D	Tridimensional
TPP	Tripolifosfato
v	Volume

RESUMO

O design e produção de *scaffolds* ainda não são suficientes para reproduzir completamente as propriedades dos tecidos naturais. Um dos principais desafios é reproduzir o grau de complexidade estrutural para mimetizar a matriz extracelular (ECM) presente nos tecidos naturais. A quitosana tem sido o foco de pesquisas nos últimos anos, principalmente por ser biodegradável, biocompatível e poder ser produzida em várias formas e tamanhos. Os *scaffolds* de quitosana são amplamente aplicados na engenharia de tecidos e podem ser produzidos por várias técnicas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver *scaffolds* de quitosana reticulados ionicamente para aplicação na engenharia de tecidos. Os *scaffolds* foram caracterizados por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), Porosidade (P) por densidade relativa, Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Citotoxicidade. Para os *scaffolds* liofilizados, o agente reticulado utilizado, o ácido sulfúrico, não causou efeitos citotóxicos considerados relevantes para as células. Contudo, os resultados em termos de microestrutura não foram satisfatórios, pois o seguido processo de obtenção dos *scaffolds* (solução, congelamento, liofilização, neutralização, lavagem, reticulação, congelamento e liofilização) comprometeu a estrutura interna. Assim, uma nova metodologia de obtenção dos *scaffolds* foi proposta, buscando-se a preservação da estrutura tridimensional e tentando diminuir as etapas de produção. Para esta nova metodologia, os *scaffolds* foram caracterizados por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), Porosidade (P) por densidade relativa, Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Resistência à Compressão e Citotoxicidade. Através de resultados de FTIR, observou interações iônicas entre os grupos fosfato e os grupos amino protonados das cadeias de quitosana. Os resultados de MEV mostraram uma estrutura tridimensional, com maior porosidade e interconectividade entre os poros, com os *scaffolds* apresentando uma porosidade na faixa de 89%. Os resultados de TG/DTG e de DSC mostraram um comportamento térmico estável dos *scaffolds*. Os *scaffolds* apresentaram comportamento mecânico de materiais porosos. O grau de intumescimento revelou que os suportes possuem um maior hidrofiliidade, mesmo com a presença da reticulação. Os resultados de citotoxicidade revelaram que os *scaffolds* não mostram efeitos citotóxicos e os valores de viabilidade celular ficaram na faixa de 70 a 90%. Dessa forma, ficou constatado que a técnica de agregação de partículas se mostrou eficiente para a obtenção de *scaffolds*, com estrutura, porosidade e citotoxicidade adequadas para aplicação na Engenharia de Tecidos.

Palavras-chaves: quitosana, *scaffolds*, liofilização, agregação de partículas.

ABSTRACT

The design and production of scaffolds for tissue engineering is still unable to completely reproduce the native tissue properties. A key challenge is to reproduce the degree of complexity needed to mimic the extracellular matrix (ECM) of the human body natural tissue. Preferably, scaffolds would be made of biodegradable polymers whose properties are more similar to the ECM. Chitosan is biodegradable, non-toxic and possesses antibacterial properties and the possibility of being processed in many forms, shapes and size as well. It is an excellent material due to its versatile properties and its scaffolds are one of the widely studied materials for tissue engineering application. The aim of the present work was to produce and characterize chitosan scaffolds through two different methodologies: scaffolds produced by freeze drying and particles aggregation method. The chitosan scaffolds were characterized by Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), Porosity (%P), Thermogravimetric analysis (TG), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Compression Tests, Swelling Degree and Cytotoxicity. The results for freeze-dried scaffolds showed the sulfuric acid caused no significant toxic effects on the cells. However, the results in terms of microstructure were not satisfactory, because the process followed to obtain the scaffolds (solution, freezing, lyophilization, neutralization, washing, halftone, freezing and lyophilization) damaged the internal structure. Through FTIR results, was observed ionic interactions between the negatively charged phosphate groups' chains of the TPP and the protonated amino groups of chitosan chains. The SEM results showed a three-dimensional structure, with higher porosity and interconnectivity between pores. The TG/DTG and DSC results showed a stable thermal behavior of scaffolds. The Swelling Degree revealed that the scaffolds possess a higher hydrophilicity, even with the presence of the crosslinking. The cytotoxicity results proved that the produced scaffolds did not display toxicity effects and cell viability values were enclosed in the range of 70 and 90%.

Keywords: chitosan, scaffolds, freeze drying, aggregation method.

2014

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

THIAGO BIZERRA FIDELES

1 INTRODUÇÃO

Os principais conceitos associados com a pesquisa em engenharia de tecidos são baseados na construção de materiais híbridos obtidos da incorporação de células em scaffolds porosos tridimensionais, que necessitam ser desenvolvidos para permitir a regeneração do tecido mediada por células, tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo*. O foco principal é o crescimento de órgãos e tecidos vivos, através do recrutamento de tecido do próprio paciente, que são dissociados em células e estas cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds*, que são estruturas tridimensionais porosas, para então serem reinseridos no paciente. Entretanto, ainda se buscam métodos de obtenção de um scaffold que mimetize os tecidos biológicos o mais próximo possível do seu estado natural, e o desenvolvimento de um scaffold polimérico com propriedades de biodegradação controlada, arquitetura tridimensional e porosa torna-se o principal objetivo desta pesquisa.

Os scaffolds são considerados um dos elementos essenciais na engenharia de tecidos e a concepção de um scaffold tridimensional tem sido o maior desafio no campo dos biomateriais e engenharia de tecidos, onde o fator chave é reproduzir o grau de complexidade necessária da matriz extracelular presente nos tecidos naturais. Evidências científicas indicam que o ambiente dinâmico natural e tridimensional influencia o comportamento celular, e como consequência, as pesquisas atuais têm dado ênfase em melhorar a biocomplexidade dos scaffolds produzidos, para assim mimetizar de maneira mais fiel possível a matriz extracelular (ECM), do ponto de vista de adesão, degradação e estruturas tridimensionais (CORRELO et al., 2007; JELL et al., 2009; DHANDAYUTHAPANIN et al., 2011; WADE & BURDICK, 2012; WANG et al., 2012; FIDELES et al., 2013).

Diversas técnicas e metodologias diferentes são propostas para produzir uma variedade de scaffolds para aplicações na engenharia de tecidos. Atualmente, ainda não foi desenvolvido um scaffold que atenda todos os pré-requisitos exigidos para aplicação na engenharia de tecidos (MALAFAYA et al., 2005; CRUZ et al., 2008).

Uma metodologia inovadora para desenvolver scaffolds é baseada na tecnologia com esferas, através do chamado método de agregação de partículas. Recentemente, as esferas também são empregadas como suporte para a engenharia de tecidos e novas estratégias têm sido investigadas para se obter scaffolds que mimetizam o ambiente biológico. A técnica baseia-se geralmente no empacotamento aleatório de esferas seguindo por agregação por meios físicos, químicos ou térmicos para criar uma estrutura porosa tridimensional (GOMES et al., 2005; MALAFAYA et al., 2005; CRUZ et al., 2008; MIRANDA et al., 2011).

Nas últimas décadas, os materiais poliméricos tem sido destaque e é cada vez mais crescente suas aplicações na engenharia de tecidos e biomateriais. A quitosana, um polissacarídeo natural, vem sendo um candidato relevante para preparação de biomateriais que podem substituir tecidos e órgãos, por apresentar propriedades tais como ser de origem natural, biocompatível e biodegradável. Além disso, a quitosana é facilmente processável, podendo ser obtida nas mais diversas formas e tamanhos.

2014

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

THIAGO BIZERRA FIDELES

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver scaffolds de quitosana para aplicação na engenharia de tecidos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver scaffolds ionicamente reticulados de quitosana;
- Avaliar os scaffolds quanto as suas propriedades morfológicas, térmicas e mecânicas, avaliando o efeito das reticulações;
- Avaliação *in vitro* dos scaffolds não reticulados e reticulados
- Avaliar e correlacionar as propriedades morfológicas e físico-químicas dos scaffolds, investigando a relação destas propriedades com as propriedades biológicas (citotoxicidade e adesão celular) dos scaffolds obtidos;

2014

CAPÍTULO 3 – REVISÃO



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

THIAGO BIZERRA FIDELES

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Engenharia de Tecidos

O desafio do campo dos biomateriais é produzir materiais que substituam tecidos vivos cujas propriedades físicas são resultados de milhões de anos de evolução, e que têm a capacidade de crescimento, regeneração e reparo. Assim, todos os biomateriais usados para reparo ou restauração do corpo representam um ajuste de características e propriedades. Contínuos avanços nas ciências da vida e dos materiais biomédicos possibilitam a criação de vida fora do corpo/sistema biológico e utilizá-los como tecidos de engenharia para reparar ou repôr tecidos naturais. E entre esses biomateriais, é de grande destaque a utilização de biomateriais poliméricos, devido, principalmente, à grande variedade de propriedades químicas, físicas e mecânicas que esses materiais possuem. São amplamente aplicados na substituição dos tecidos naturais, porque, além de possuírem composição química similar aos tecidos, podem fornecer um ambiente propício para o desenvolvimento celular (HENCH, 2005; HENCH, 2006).

Na era moderna da Medicina, a Engenharia de Tecidos têm se tornado uma opção viável para a reposição das funções perdidas de órgãos e tecidos, transformando-se na interface entre a indústria tradicional de implantes médicos e a revolução biológica. Ao aproveitar os avanços desta revolução, pode-se criar uma nova geração de biomateriais, assim como, estratégias para reparo e regeneração tecidual (NEREM, 2007; MURPHY & MIKOS, 2007).

Uma das razões de se utilizar um biomaterial reabsorvível é mimetizar um tecido lesado, promovendo ainda a formação de um novo tecido, frente ao processo de biodegradação, além de eliminar a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para retirada do implante.

A maioria das espécies presentes no planeta Terra possui a habilidade de regenerar partes do corpo. Mesmo sem nenhuma intervenção terapêutica, os tecidos vivos podem ter uma capacidade extraordinária de regeneração, como por exemplo, o fígado, que pode regenerar em até 50% o seu tamanho natural, e ossos e pele. Por outro lado, mamíferos mais desenvolvidos, incluindo os seres humanos, reduziram esta habilidade de regenerar membros e órgãos vitais. Na

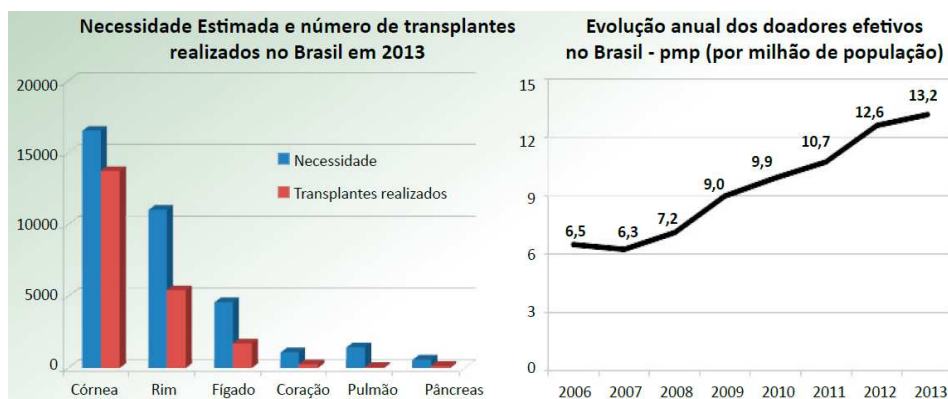
escala evolutiva, o processo de regeneração tecidual foi substituído, em sua maioria, pelo processo inflamatório e formação de tecido fibroso, característico de cicatrizes em formação. De forma específica, o corpo humano possui ainda uma habilidade inerente de regenerar alguns tipos de células e tecidos, tais como a medula óssea, fígado, epiderme e as células que constituem o revestimento intestinal (BADYLAK et al., 2009; PLACE et al., 2009).

Uma ampla gama de doenças e lesões tem afetado tecidos e órgãos de uma maneira que resultam em perda parcial ou total de função. Essencialmente, essas condições são associadas a lesões agudas ou crônicas e mudanças degenerativas. Sem uma intervenção médica, a resposta do corpo é relativamente limitada, se tornando a principal restrição para o processo de cura das partes lesadas. Esse processo pode levar à restauração/restabelecimento da parte afetada, através da síntese da cicatriz, composta primordialmente de tecido cartilaginoso, porém diferente do tecido normal. A cicatrização pode ser uma resposta efetiva à lesão, mas não acarreta um restabelecimento da estrutura e função normal do tecido (WILLIAMS, 2006).

As terapias cirúrgicas que se dispõem atualmente consistem na realização de cirurgias reconstrutivas e transplantes de órgãos e tecidos. Embora não se tenham dúvidas que essas terapias têm salvado e melhorado inúmeras vidas, possuem ainda algumas limitações clínicas. No caso da reconstrução cirúrgica, os componentes biomédicos não podem substituir completamente as funções biológicas de um tecido ou órgão e conseqüentemente não podem prevenir a deterioração progressiva de um órgão ou tecido. Já os transplantes de órgãos e tecidos de um indivíduo para outro, têm sido revolucionários e salvado diversas vidas. Em um passado recente, o transplante de órgãos era a única opção viável de tratamento para os pacientes. Contudo, apesar de todo sucesso obtido, novos problemas surgiram ao longo dos anos. Até os dias atuais, existe uma baixa oferta de doadores de tecidos e órgãos e muitas pessoas morreram quando ainda estavam na lista de espera para transplantes. No Brasil, a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos estabeleceu uma meta a ser atingida no ano de 2013. Entretanto, de acordo com os dados revelados no seu último relatório, o Registro Brasileiro de Transplantes, esta meta não foi alcançada, já que a demanda de pacientes na fila de espera foi maior do que a oferta de órgãos disponíveis (Figura

1)(TABATA, 2005; VACANTI & VACANTI, 2007; SMITH & HAYCOCK, 2011; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2012).

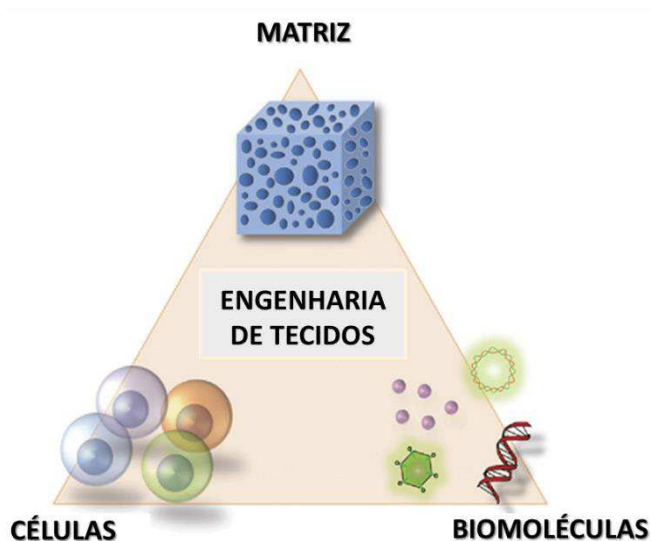
Figura 1. Número de transplantes órgãos realizados no Brasil em 2012. Fonte: Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, 2012.



Neste contexto surgiu o campo da Engenharia de Tecidos para tentar minimizar o problema da demanda insuficiente de doadores, através da produção de materiais de reposição. Através da mimetização da natureza, surgiu com o potencial de confrontar a crise dos transplantes e também atender as necessidades de cada paciente. De maneira essencial, o tecido novo e funcional é fabricado utilizando células vivas, as quais são geralmente associadas com uma matriz ou arcabouço, chamado de scaffold, para guiar o desenvolvimento do tecido (VACANTI & VACANTI, 2007; NEREM, 2007; SMITH & HAYCOCK, 2011).

A Engenharia de Tecidos tem surgido com o potencial de desenvolver a reposição tecidual, se tornando uma alternativa para tratar perda ou má função de tecidos ou órgãos. Além disso, apresenta um importante suporte para utilização de biomateriais, consistindo em um conjunto de conhecimentos e técnicas utilizadas para a reconstrução de novos órgãos e tecidos e do restabelecimento de suas funções. Trata-se de um campo interdisciplinar que combina conhecimentos e tecnologia de células, Engenharia de Materiais e adequados fatores bioquímicos para criar órgãos e tecidos artificiais, ou ainda, para regeneração de tecidos lesados. O material deve fornecer uma estrutura e suporte inicial para a adesão, proliferação e diferenciação celular, além de fornecer um meio para carrear células, fatores de crescimento e outras biomoléculas (Figura 2) (REIS; ROMÁN, 2005; BOCCACCINI; GOUGH, 2007; LANZA et al., 2007; LIU et al., 2007).

Figura 2. Engenharia de Tecidos e seus componentes. Adaptado de Fisher et al., 2007; Vacanti et al., 2007; Badylak et al., 2009.



O crescimento da Engenharia de Tecidos proporcionou novas possibilidades de estudos *in vitro* do complexo processo fisiológico e patofisiológico, através da atual disponibilidade de ferramentas que permite criar modelos de tecidos tridimensionais e funcionais, recrutando materiais biocompatíveis e biodegradáveis com propriedades mecânicas próximas ao tecido alvo do tratamento. Muito embora os metais e cerâmicas sejam importantes biomateriais, os polímeros são comumente aplicados. Adicionalmente, um controle da atividade biológica em nível molecular, que é uma das características primordiais para biomateriais aplicados na Engenharia de Tecidos, pode ser obtido utilizando polímeros naturais (GRIFFITH & SWARTZA, 2006; CHIONO et al., 2008).

Esse novo campo da Engenharia se tornou, de forma literal, a interface entre a indústria tradicional de implantes médicos e a revolução biológica. Ao aproveitar os avanços desta revolução, se permite criar toda uma nova geração de tecidos, órgãos e implantes, assim como estratégias para o reparo e regeneração (NEREM, 2007).

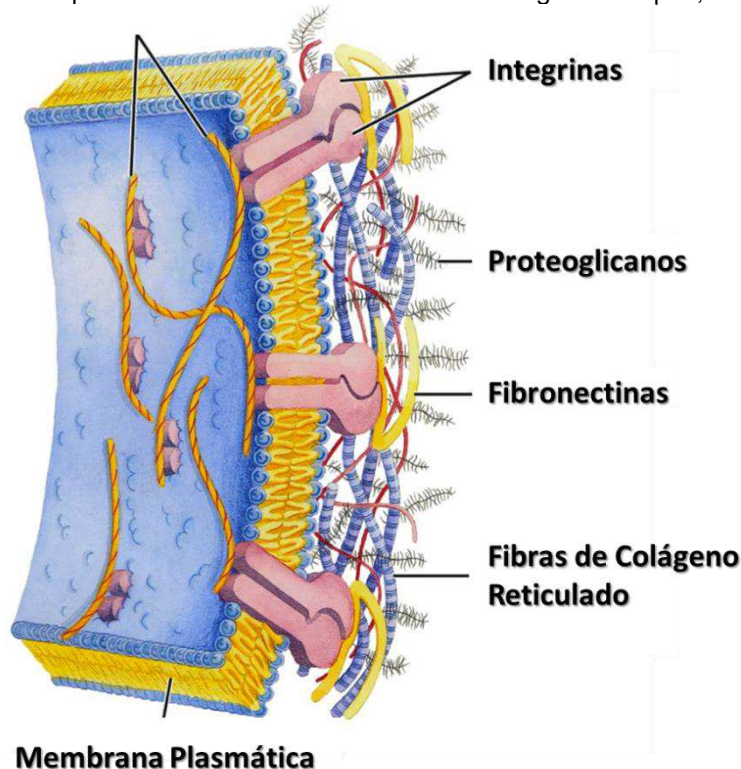
3.2 Matriz Extracelular

In vivo, as células são circundadas e suportadas por uma matriz biológica composta por combinações específicas de materiais, que quando juntos, são conhecidos como matriz extracelular (ECM). São um complexo de redes

heterogêneas de proteínas solúveis e insolúveis, fatores de crescimento e polissacarídeos que fornecem estruturas físicas e bioquímicas para o ambiente celular. De maneira geral, os componentes da matriz extracelular não se dispõem no sistema biológico na forma de moléculas isoladas, principalmente no que diz respeito à estrutura macroscópica. Estas moléculas possuem uma propriedade intrínseca de se auto associarem e formar uma estrutura ordenada, motivada pelas interações multivalentes entre os componentes da matriz, que mesmo em sua grande parte não sendo interações covalentes, possuem uma alta estabilidade. Além disso, algumas enzimas específicas podem formar reticulações covalentes irreversíveis na matriz (JELL et al., 2009; TRONCI, 2010; ENGEL & CHIQUET, 2011).

Estruturalmente, a matriz extracelular é um material compósito, que exerce a função de um scaffold natural, e que fornece um suporte mecânico que permite as interações célula-célula para a formação dos tecidos. É composta por uma malha interligada de proteínas fibrosas e glicosaminoglicanos (GAGs), onde o colágeno é a proteína mais abundante na ECM e a elastina é outra proteína estrutural da matriz. Juntas, desempenham funções complementares, pois o colágeno fornece a rigidez para os tecidos conectivos e órgãos, e a elastina confere a elasticidade, permitindo que os tecidos se alonguem e recuperem sua forma original (Figura 3). Os proteoglicanos também se fazem presentes e são compostos por proteínas e cadeias reticuladas com glicosaminoglicanos sulfatados. Os GAGs são polímeros lineares de unidades repetitivas composta por dissacarídeos. Devido à presença de grupos sulfatos e carboxílicos, as GAGs interagem com a água, resultando na formação de um hidrogel. Também é encontrado ácido hialurônico, composto por D-glucoríco e D-glucosamina. A proteína fibronectina também é encontrada na matriz e tem como função conectar as fibras de colágeno com a superfície celular. (Figura 3). A matriz extracelular possui uma variedade de formas em diferentes estágios no mesmo tecido e esta diversidade surge através de combinações de interações específicas, tais como diversas formas, razão e arranjo geométrico das moléculas de colágeno, elastina, proteoglicanos e proteínas adesivas, que criam um ambiente repleto de sinais informativos (STEVENS & GEORGE, 2005; HARRISON, 2007; TRONCI, 2010).

Figura 3. Esquema da matriz extracelular. Fonte: Engel & Chiquet, 2001.



A matriz extracelular é sintetizada e produzida por células, em um ambiente dinâmico e esta interface entre as células e a matriz extracelular tem efeitos significativos no processo de adesão, migração, proliferação e diferenciação celular. A matriz extracelular natural é degradada enzimaticamente, processo este chamado de degradação proteolítica, e que facilita a migração celular através das redes fibrosas. Os scaffolds tradicionais são projetados de maneira que se degradem hidroliticamente e esta é uma área que tem recebido considerada atenção na Engenharia de Tecidos, pois se busca o desenvolvimento de scaffolds que atendam este importante requisito. Para conseguir tais scaffolds, diversos materiais têm sido estudados e pesquisados, e para incorporar tais propriedades, é necessária uma colaboração entre biólogos, bioengenheiros e engenheiros de materiais para forçar as fronteiras de possibilidades dentro da Engenharia de Tecidos (LU et al., 2012;WADE & BURDICK, 2012).

3.3 Biomateriais para Engenharia de Tecidos

Sem dúvida, os biomateriais têm tido o maior impacto na prática da medicina contemporânea e nos cuidados de pacientes, tanto no tratamento quanto no aumento da qualidade de vida de humanos e animais. Órgãos artificiais

são utilizados para prolongar a vida e assim manter a qualidade de vida de milhares de pacientes, principalmente quando o transplante de órgão torna-se inviável. Além disso, o campo das ciências da vida conquistou avanços de forma tão significativa e acelerada, que não se percebe que este progresso é um fenômeno relativamente recente na história da humanidade (DEE et al., 2002; HENCH, 2005).

Além da bem conhecida e difundida aplicação de substâncias de relativa massa molar baixa, como os fármacos, a aplicação de materiais com maiores pesos moleculares, como polímeros, cerâmicas ou metais no corpo humano se tornou valiosa para tratar, melhorar ou substituir tecidos e órgãos com perda total ou parcial de função. Provenientes de sua aplicação no sistema biológico, esses materiais são chamados de biomateriais, devido à sua habilidade de substituir ou restaurar funções biológicas, exibindo ainda uma compatibilidade com o meio biológico (DROTLEFF et al., 2004).

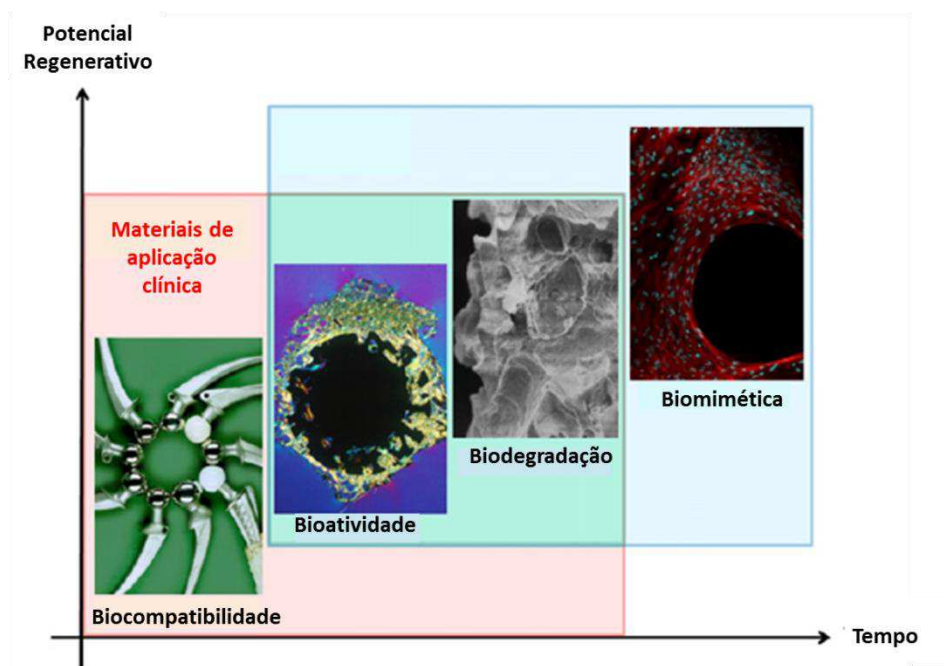
O desenvolvimento de materiais para melhorar a qualidade de vida das pessoas, é contínuo e crescente, visto que com o envelhecimento da população são geradas expectativas mais elevadas com relação à qualidade de vida, surgindo a necessidade de repor e reparar tecidos moles e duros, como ossos, cartilagem, vasos sanguíneos e até mesmo órgãos inteiros (HOLZAPPEL et al., 2012).

Materiais aplicados na Engenharia de Tecidos devem ser projetados com o papel de estimular uma resposta específica das células, em um nível molecular, provocando interações específicas com as células, e deste modo, propiciar adesão, proliferação e diferenciação celular, bem como a produção e organização de matriz extracelular (ARMENTANO et al., 2010).

A seleção de um biomaterial desempenha um importante papel no design e desenvolvimento de materiais aplicados na Engenharia de Tecidos. Enquanto o critério clássico de seleção para um implante estável e seguro, direcionavam para um material passivo e inerte, após intensos estudos e avanços científicos ficou entendido que qualquer dispositivo aplicado deve provocar uma resposta a nível celular. Portanto, atualmente é amplamente aceito que um biomaterial deve interagir com o tecido a ser reparado, em vez de simplesmente atuar como um material estático (PACHENCE et al., 2007 ; HUANG & FU, 2009; ARMENTANO et al., 2010).

Durante as últimas décadas, foi presenciado o desenvolvimento de vários implantes e dispositivos médicos para repôr tecidos danificados de forma irreversível. Os materiais utilizados para aplicações biomédicas podem ser organizados em três principais gerações descritas pelo tipo de resposta provocada no sistema biológico (Figura 4) (HOLZAPEL et al., 2012).

Figura 4. Evolução dos biomateriais. Fonte: Holzapel et al., 2012



Durante as décadas de 60 e 70, a primeira geração de materiais foi especialmente desenvolvida para aplicar no sistema biológico. E este desenvolvimento tornou-se a base do campo dos biomateriais. Uma característica comum da maioria dos biomateriais utilizados nesta geração era a sua atividade biológica limitada, também conhecida como inércia. O princípio básico desta primeira geração era alcançar uma combinação adequada de propriedades físicas, para coincidir com as dos tecidos a serem substituídos, por uma resposta tóxica mínima do hospedeiro, impedindo a rejeição. Para diversos implantes, este paradigma ainda é válido nos dias de hoje (HENCH & THOMPSON, 2010; HOLZAPEL et al., 2012).

Anos mais tarde na década de 80, baseado no melhor entendimento da resposta biológica a materiais estranhos ao corpo, o campo dos biomateriais começou a mudar, com o desenvolvimento da segunda geração, a de componentes bioativos, com o objetivo de provocar uma resposta biológica

específica na interface do biomaterial. Eles provocam um conjunto de reações controladas no sistema fisiológico, encorajando uma ligação com o tecido hospedeiro, reforçando a integração do material, estimulando o crescimento do novo tecido. Nesta geração, ainda faz parte outra categoria, as dos materiais biodegradáveis, que são inicialmente incorporados pelos tecidos circundantes, para dissolver completamente em um dado período de tempo. Esta absorção apareceu como uma solução perfeita para os problemas interfaciais. Como consequência, materiais com taxa de biodegradação e propriedades de absorção controladas se tornaram importantes, oferecendo a possibilidade de superar as desvantagens dos implantes permanentes (HENCH & THOMPSON, 2010; HOLZAPPEL et al., 2012).

Os avanços do conhecimento celular e molecular nos últimos anos propiciaram o desenvolvimento da terceira geração dos biomateriais, que tem como princípio básico estimular uma resposta celular específica. Durante o início do século XXI, os conceitos dos materiais bioativos e biodegradáveis foram convergidos. Para permitir o aperfeiçoamento destas interações específicas com as células, podem ser empregadas modificações moleculares nos materiais. Estes avanços afetaram de maneira significativa a síntese e aplicação dos biomateriais. Tais materiais forneceram uma base científica pra a criação de materiais que mimetizassem as estruturas tridimensionais presentes no corpo, através do processo de biomimética, que pode ser definida como o entendimento dos princípios que regem as funções do sistema biológico e, em seguida, utilizando a mesma estratégia para criar sistemas sintéticos com funções semelhantes ao sistema biológico (HENCH & THOMPSON, 2010; WALDECK & KAO, 2011; HOLZAPPEL et al., 2012).

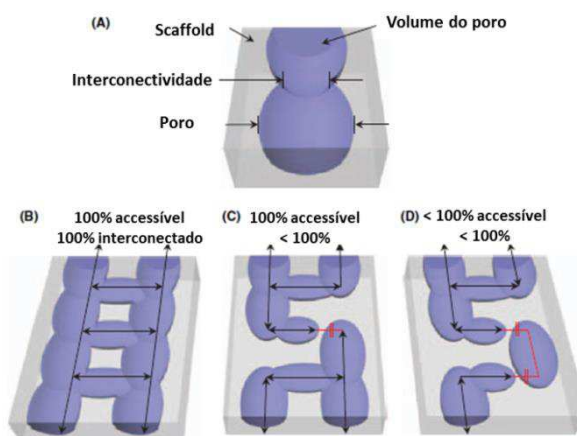
3.4 Estruturas Tridimensionais - Scaffolds

Os tecidos no corpo são organizados em estruturas tridimensionais (3D), como por exemplo, os órgãos funcionais. Para construir tecidos e órgãos funcionais, de maneira satisfatória, o biomaterial deve ser fabricado de maneira a mimetizar ao máximo o ambiente natural, facilitando a distribuição celular e guiar a regeneração dos tecidos em um ambiente 3D. E para satisfazer os requisitos necessários, utiliza-se um scaffold, que pode ser definido como uma estrutura artificial capaz de suportar a formação do tecido, fornecendo um ambiente

tridimensional, que permite a adesão e migração das células, além de permitir o fluxo de fatores bioquímicos vitais para a nutrição celular (ARMENTANO et al., 2010).

O scaffold fornece uma sustentação e suporte inicial para a adesão, proliferação e diferenciação celular. Deve fornecer uma integridade estrutural para o tecido, além de servir como carreador para células, fatores de crescimento e outras biomoléculas. É vital para o scaffold, mimetizar a estrutura e propriedade do tecido natural, para direcionar o processo macroscópico de formação de tecidos. Um scaffold ideal deve possuir as seguintes características: uma extensiva ligação entre os poros interconectados para que as células possam migrar, aderir e se multiplicar profundamente no scaffold e canais que permitam a passagem de oxigênio e nutrientes para as células (Figura 5) (LIU et al., 2007; MURPHY & MIKOS, 2007; JAYAKUMAR et al., 2010).

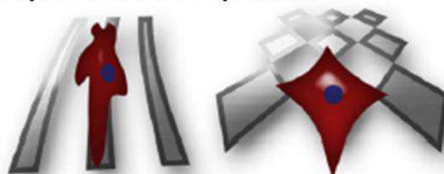
Figura 5. Interconectividade de poros. Fonte: HUTMACHER et al., 2008



Os subprodutos gerados devem ser facilmente liberados; biocompatibilidade, com uma alta afinidade para as células aderirem e proliferarem; uma geometria que direcione a formação de um novo tecido; propriedades de superfície apropriadas para o desenvolvimento celular, propriedades de transporte de massa suficiente para mudança de nutrientes biológicos e resistência mecânica apropriada e perfil biodegradável (Figura 6) (LIU et al., 2007; MURPHY & MIKOS, 2007; JAYAKUMAR et al., 2010).

Figura 6. Propriedades dos scaffolds. a) A topografia de superfície do scaffold deve direcionar o crescimento celular; b) O material deve possuir resistência mecânica suficiente para proporcionar o desenvolvimento celular; c) A morfologia dos scaffolds tem que correlacionar, de maneira proporcional, a interconectividade, tamanho e forma dos poros. Fonte: MARTINO et al., 2012.

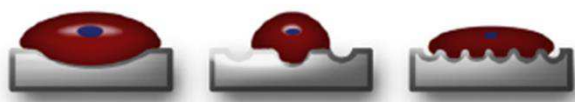
a) Propriedades de Superfície



b) Propriedades Mecânicas



c) Propriedades Morfológicas



Enquanto certos metais são excelentes escolhas para implantes médicos, devido as suas propriedades mecânicas superiores, eles apresentam desvantagens para aplicação como scaffold, motivado pela ausência de degradação no ambiente biológico. Alguns materiais cerâmicos, como por exemplo, a hidroxiapatita ou fosfato de cálcio, possuem osteocondutividade, que é a habilidade que um material possui de permitir o desenvolvimento de tecido ósseo em sua superfície. Contudo, suas aplicações são limitadas, também motivadas pela pobre processabilidade em estruturas altamente porosas, além de se apresentarem pouco dúcteis. De forma contrária, os polímeros possuem grande flexibilidade para serem fabricados, e devido à sua composição e estrutura, podem ser fabricados de acordo com uma necessidade específica (MA, 2008).

Scaffolds compostos de polímeros sintéticos e naturais têm sido componentes essenciais para a Engenharia de Tecidos. Os polímeros são frequentemente utilizados em uma ampla gama de aplicações biomédicas, incluindo aplicações nas quais os polímeros se mantêm em íntimo contato com as células e tecidos por períodos prolongados. Para selecionar um polímero, se torna útil entender o tipo de influência que esses materiais poliméricos vão exercer na

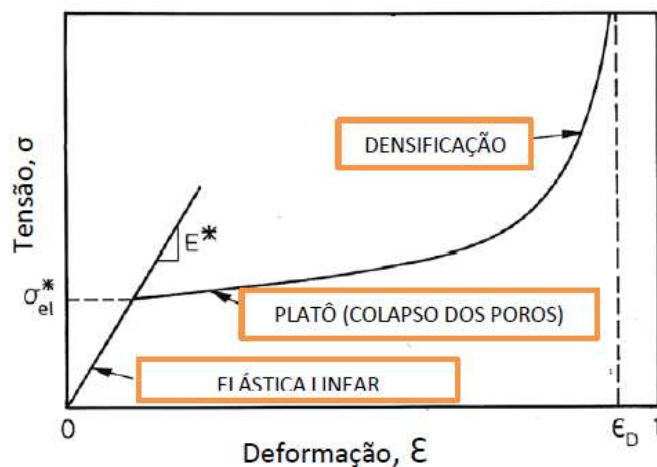
viabilidade, crescimento e função das células (SALTZMAN & KYRIAKIDES, 2007).

A química, arquitetura e porosidade e a razão de biodegradação do scaffold deve permitir uma fácil manipulação, fornecer um ambiente mecânico suficiente, muito embora não necessariamente equivalente às propriedades mecânicas do tecido, mas com rigidez e resistência suficientes para pelo menos suportar e transmitir as forças do tecido hospedeiro; facilitar a adesão, proliferação e migração celular, troca de nutrientes, vascularização e crescimento de um novo tecido (HUTMACHER et al., 2008; HOLZAPEL et al., 2012).

Os scaffolds para engenharia de tecidos são aplicados extensivamente como análogos da matriz extracelular presente em todos os tecidos e células. O scaffold atua como um suporte físico e um regulador da atividade celular. Notavelmente, a microestrutura do scaffold (porosidade, tamanho médio de poros, formato de poros, interconectividade e área superficial específica) e propriedades mecânicas (módulo de Young) têm se mostrado significativamente influentes no comportamento celular, tais como adesão, crescimento e diferenciação. A microestrutura e rigidez do scaffold também tem mostrado afetar a bioatividade do scaffold aplicado *in vivo*. Especialmente para materiais implantáveis que serão submetidos à tensões mecânicas em aplicações clínicas, a caracterização mecânica adequada está entre os testes físicos mais importantes que devem ser realizados, pois possibilitará avaliar a viabilidade da aplicação do material em termos de sua integridade geométrica, seja a curto prazo, determinada pelo módulo de elasticidade e resistência da amostra, ou a longo prazo obtidos a partir de ensaios de stress-relaxação ou fadiga (MANO et al., 2005; HARLEY et al., 2007).

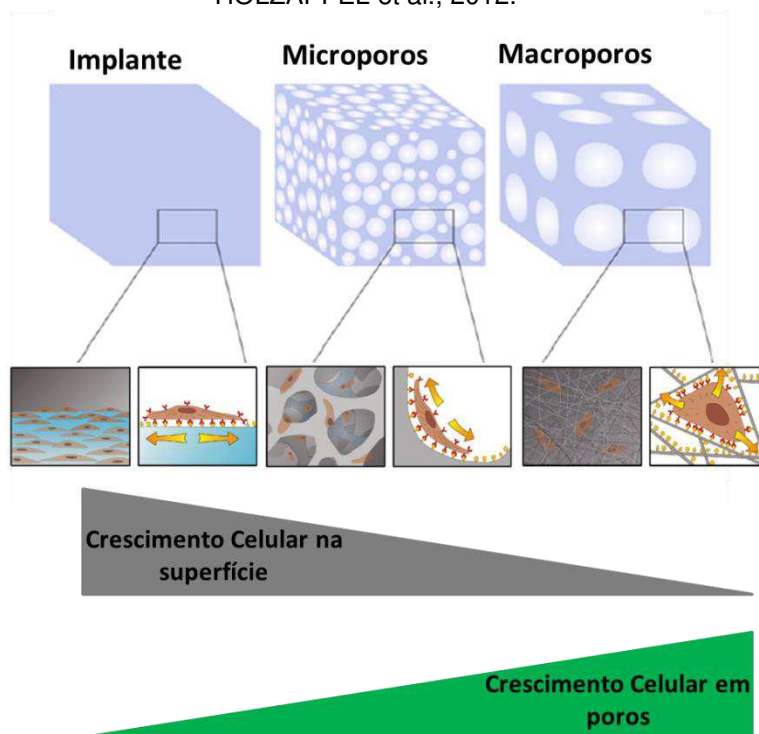
Os scaffolds para engenharia de tecidos, em termos comportamento mecânico, apresentam curvas de tensão-deformação caracterizadas por 3 regimes distintos, conforme a Figura 7 (GIBSON & ASHBY, 1997; FOOK, 2005; HARLEY ET AL., 2007).

Figura 7. Curva típica de tensão-deformação de espumas. Fonte: Adaptada de GIBSON e ASHBY, 1997

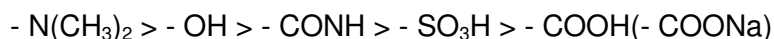


Do ponto de vista da microestrutura de um scaffold, existem dois fatores críticos a serem considerados. O primeiro é a respeito da natureza do scaffolds, se ele possui uma microestrutura de células abertas ou fechadas. Um microestrutura de poros abertos proporciona interconectividade dos poros, enquanto uma microestrutura de células fechadas favorece a formação de camadas entre os poros adjacentes. A interconectividade é desejada principalmente pelo ponto de vista da bioatividade dos scaffolds, porque permite que as células migrem no interior do scaffold e interajam com outras células, mimetizando o ambiente *in vivo* (Figura 8). O segundo fator crítico a ser considerado é com relação à densidade relativa e porosidade do scaffold. A densidade relativa (ρ_r) é dada pela razão da densidade do scaffold pela densidade do material que o scaffold é fabricado e a porosidade é uma medida de quão poroso é o scaffold, ou seja, a fração volumétrica do scaffold. Densidade relativa e porosidade são inversamente proporcionais e a porosidade do scaffold pode ser definida como $(1 - \rho_r)$ (HARLEY & YANNAS, 2014).

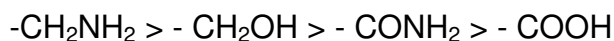
Figura 8. Relação entre estrutura e desenvolvimento celular. Adaptado de JELL et al., 2009 e HOLZAPFEL et al., 2012.



Evidentemente, as interações célula-biomaterial são um ponto chave para todos os biomateriais e o conhecimento dos seus mecanismos se torna bastante útil quando do desenvolvimento de materiais para engenharia de tecidos. A atividade celular depende fortemente das propriedades físico-químicas do scaffold como, por exemplo, hidrofiliicidade, composição química, morfologia, carga eletrostática, topografia e rugosidade. Muitos grupos funcionais, tais como hidroxilas, carbonilas, carboxilas e aminas desempenham importante papel no que diz respeito a adesão celular. Um exemplo é que, a adesão de macrófagos decresce de acordo com a seguinte ordem de grupos funcionais (ALVES et al., 2008; VLADKOVA, 2010):



Interações similares são observadas com a incubação de células em superfícies funcionalizadas, onde a adesão celular decresce de acordo com a seguinte relação:



A adesão celular é um processo crítico no campo dos biomateriais e desempenha um importante papel na formação dos tecidos e órgãos. Na

Engenharia de Tecidos, por exemplo, a adesão celular é um pré-requisito para inúmeros processos subsequentes, como proliferação e migração celular. Também é importante na determinação da biocompatibilidade dos biomateriais, que é a capacidade de um material de provocar uma resposta apropriada do hospedeiro, para uma aplicação específica. Envolve a sequência de quatro etapas: adesão, espalhamento, organização do citoesqueleto e formação da adesão focal (DROTLEFF et al., 2004; HARRISON, 2007).

3.5 Principais métodos de fabricação de scaffolds

Na era moderna da medicina, e de forma consequente, da diminuição da disponibilidade de transplante de órgãos, o campo da engenharia de tecidos se tornou uma opção viável para criar materiais que substituíssem órgãos e tecidos, fornecendo uma esperança aos pacientes que esperam por um doador. A criação de tais materiais requer uma estrutura tridimensional, porosa, biocompatível e preferencialmente biodegradável. Estruturas estas que são chamadas de scaffolds, e devem possuir uma geometria que direcione o crescimento do novo tecido a ser formado, bem como o transplante dos nutrientes e subprodutos gerados pelo metabolismo celular (HUTMACHER, et al., 2008; MURPHY & MIKOS, 2009).

Um grande número de tecnologias de fabricação têm sido aplicadas no processo de fabricação de estruturas tridimensionais. No corpo, as células e tecidos são organizados em uma arquitetura tridimensional e para desenvolver estas estruturas, os scaffolds podem ser fabricados por diferentes metodologias para facilitar a distribuição celular e guiar o novo tecido (HUTMACHER, et al., 2008).

As técnicas de fabricação de scaffolds dependem, em sua maioria, das propriedades dos materiais e função final desejada. Além disso, o custo e tempo de produção devem ser considerados, e diversas técnicas têm sido estudadas e desenvolvidas de modo a atender as propriedades necessárias para uma efetiva aplicação, entretanto, cada método apresenta distintas vantagens e desvantagens. Não existe uma técnica de fabricação que seja dita universal para todas as aplicações. Dependendo do tecido e a extensão do local a ser regenerado, as propriedades do scaffold devem ser priorizadas, de modo a selecionar o método de fabricação mais apropriado (MURPHY & MIKOS, 2009).

A Tabela 1 apresenta algumas das principais técnicas utilizadas na fabricação de scaffolds.

Tabela 1. Descrição das principais técnicas de fabricação de scaffolds. Fonte: MURPHY & MIKOS, 2008; HUTMACHER et al., 2008)

MÉTODO	DESCRIÇÃO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Evaporação de solvente/lixiviação por partículas	Scaffold contendo um agente porogênico é solidificado; depois o agente é retirado.	Controle sobre a porosidade, tamanho de poros e cristalinidade; alta porosidade.	Propriedades mecânicas limitadas; Solvente e material porogênico residual.
Fabricação de compósitos	Fibras ou moléculas são formadas por evaporação de solvente ou técnicas de moldagem a quente.	Controle sobre a porosidade e tamanho de poros; propriedades mecânicas aprimoradas.	Solventes residuais.
Automontagem	Estabelece condições para moléculas se auto montarem em esferas, fibras ou scaffolds de estruturas complexas.	Controle sobre a porosidade, tamanho de poros e diâmetro das fibras.	Alto custo de processamento; parâmetros de design complexos; propriedades mecânicas limitadas.
Electrospinning	Fibras são eletrostaticamente giradas e depositadas em um coletor.	Procedimento simples; porosidade alta; controle sobre o tamanho de poros, porosidade e espessura das fibras.	Baixa propriedades mecânicas; tamanho de poro diminui com o aumento da espessura das fibras.
Freeze drying	Dissolução do material, seguindo de congelamento. Após isso, o material é liofilizado para remoção de água e solvente.	Boa porosidade e interconectividade entre os poros.	Tamanhos de poros limitados; longos tempos de processo.

3.6 Biopolímeros

Os tecidos naturais são reparados de maneira contínua e remodelados de forma que se ajustem às inúmeras mudanças que ocorrem no ambiente fisiológico. Nenhum biomaterial pode mimetizar estas propriedades de maneira 100% efetiva. Um biomaterial ideal para executar a função desejada é aquele que eventualmente desaparece, sendo substituído por tecido natural. Portanto, polímeros biodegradáveis são de grande interesse para a comunidade da engenharia biomédica (BATICH & LEAMY, 2003).

Desde o início das pesquisas na Engenharia de Tecidos, busca-se um desenvolvimento para atingir metas em longo prazo, como por exemplo, controlar e regular o potencial de regeneração de tecidos naturais ou até mesmo a regeneração de estruturas mais complexas, como os órgãos. Apesar de se ter conquistado uma série de avanços tecnológicos até então, novas estratégias se fazem necessárias para ampliar o campo de aplicação clínica da Engenharia de Tecidos (LIAO et al., 2008).

Os biomateriais são componentes centrais de muitas estratégias desenvolvidas pela engenharia de tecidos. Isso por que, eles fornecem uma arquitetura que mimetiza a matriz extracelular, as interações célula-célula e fatores de crescimento, combinados para criar o nicho regenerativo (HUANG & FU, 2009).

O principal componente da matriz extracelular das células são biopolímeros, mais precisamente, o colágeno, que existe de forma geral na forma de fibras e fibrilas. Um objetivo específico no desenvolvimento de um scaffold para a Engenharia de Tecidos é projetar e fabricar um material poroso, composto de um polímero biodegradável, que permita mimetizar a matriz extracelular, dando o suporte necessário para a organização celular. Polímeros naturais podem mimetizar muitas funções da matriz extracelular e podem influenciar diretamente na migração e organização das células durante a regeneração tecidual (LIAO et al., 2008; MA, 2008; HUANG & FU, 2009).

O biomaterial deve não apenas estimular e fornecer suporte para o crescimento do tecido, mas também deve degradar com a mesma razão com a qual o novo tecido se forma. As propriedades de degradação são de fundamental importância para a seleção e desenvolvimento para a Engenharia de Tecidos. O perfil de degradação fornece um impacto crucial nas performances a longo prazo na construção do biomaterial, composto de polímero/células (ARMENTANO et al., 2010).

O emprego de polímeros biodegradáveis como biomaterial oferece pelo menos duas vantagens: (i) eliminação da necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para remoção da prótese, após ter cumprido a função requerida, e (ii) a possibilidade de provocar e guiar a regeneração tecidual via degradação do material (FAMBRI et al., 2002).

Polímeros biodegradáveis podem ser aplicados na medicina como scaffolds temporários, que são suportes temporários aptos para promover regeneração tecidual; barreiras temporárias para prevenção de adesão tecidual; ou ainda, em sistemas de liberação controlada de fármacos, onde esse fármaco pode ser incorporado fisicamente ou através de ligações covalentes, sendo liberado de forma gradual (FAMBRI et al., 2002).

O propósito de se desenvolver materiais poliméricos é a obtenção de suportes temporários, que se degradem no organismo ao mesmo tempo em que um novo tecido é formado, em substituição ao lesado. A razão de degradação é frequentemente afetada pelas propriedades dos componentes do material, fabricação, microestrutura e macroestrutura (FISHER et al., 2007).

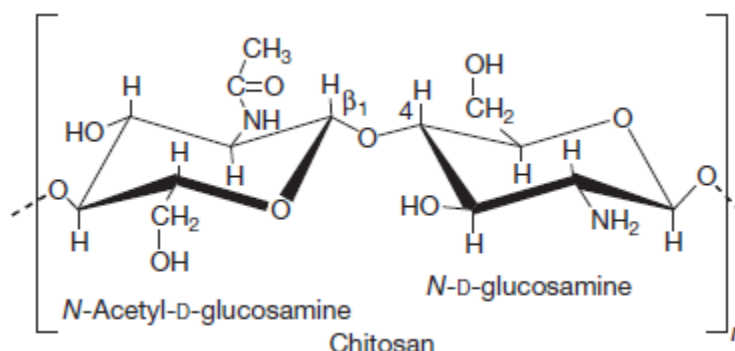
3.7 Quitosana

Ao longo dos últimos anos, diversos materiais têm sido desenvolvidos para substituir os produtos derivados dos petroquímicos por componentes de fontes renováveis. Os polímeros de origem natural, como por exemplo, o amido, colágeno, gelatina, alginato, quitina e quitosana, são abundantes e representam candidatos atrativos no que tangem a estas tentativas. O maior desafio, neste sentido, é a obtenção de materiais com propriedades equivalentes aos produtos já estabelecidos, do ponto de vista funcional. E dentro destes materiais, a quitosana se mostra um polímero com características singulares e valiosas, trata-se de um material, com características tecnológicas e econômicas relevantes, possuindo propriedades biológicas como: biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade, além de ser atóxico e produzido por fontes naturais e renováveis. A biodegradabilidade é devido à metabolização da quitosana por algumas enzimas humanas, como por exemplo, a lisozima. Essa propriedade condiz com um dos requisitos primários de um processo de biodegradação, que é ser susceptível a uma reação de hidrólise enzimática (CAMPANA; SIGNINI, 2001; TRIPLETT et al., 2001; SENEL; MCCLURE, 2004; BETTINI et al., 2008; CROISIER & JÉRÔME, 2013).

A quitina e a quitosana são polissacarídeos formados por uma cadeia linear, composto por unidades repetitivas do tipo β (1 \rightarrow 4) 2-amino-2-deoxi-D-glucosamina (GlcN) e β (1 \rightarrow 4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosamina (GlcNAc) (Figura 9). A quitina contém, ao longo de sua molécula, maiores quantidades de

unidades GlcNAc, enquanto a quitosana é composta por, em sua maioria, unidades GlcN. Uma indicação da quantidade de unidades GlcN ao longo da cadeia é determinada através do cálculo do grau de desacetilação (GD). Para ser chamado de quitosana, o polímero deve conter 50% ou mais unidades GlcN, o que corresponde a um GD = 60. O GD é um dos parâmetros mais importantes da quitosana, pois tem influência direta nas propriedades físico-químicas (cristalinidade, biodegradação, solubilidade, etc.) e propriedades biológicas (antimicrobianas, mucoadesividade, etc.). O grande interesse de cientistas pela quitosana como material polimérico, com aplicações nas áreas biomédicas, se dá pelo fato destes polissacarídeos possuírem características tecnológicas e econômicas relevantes, além de possuir grupos funcionais característicos, que conferem propriedades únicas a esse polímero (CHAVES et al., 2005; DALLAN, 2005; FRAGA et al., 2006; SANTOS et al., 2006; PEDRO et al., 2009; RIVERO et al., 2009; KUMIRKA et al., 2011).

Figura 9. Estrutura química da quitosana. Fonte: SILVA et al., 2011.



A quitosana é um polímero semicristalino e o seu grau de cristalinidade é uma função do grau de desacetilação. A presença de numerosas pontes de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares nas moléculas de quitosana contribuem para o caráter semicristalino do polímero. Além disso, faz com que a quitosana não apresente nenhum ponto de fusão, sendo solúvel apenas em pH ácido (RINAUDO, 2006; FAN et al., 2009; CROISIER & JÉRÔME, 2013).

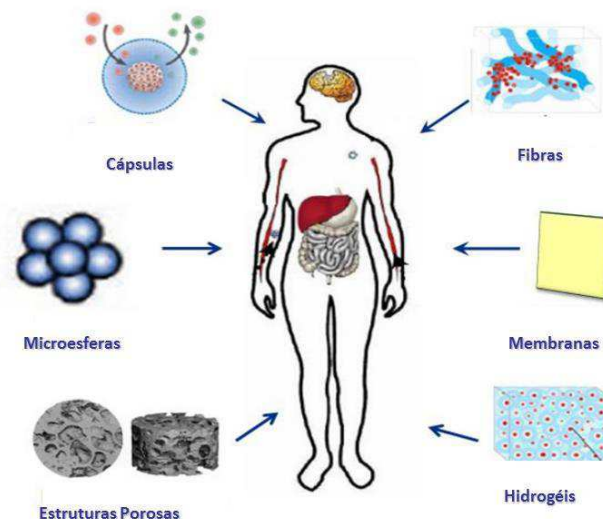
A cristalinidade desempenha um importante papel na determinação das propriedades físico-químicas das superfícies de um polímero, incluindo energia livre, estado químico, rugosidade e molhabilidade, que são fatores que influenciam a resposta celular. Com isso, ao se produzir um scaffold, a cristalinidade pode influenciar não apenas na resposta celular, mas também na

biodegradabilidade, onde regiões mais cristalinas são mais resistentes à penetração de fluidos e conseqüentemente, retardando o processo de biodegradação. Uma maneira de tentar diminuir a cristalinidade da quitosana é através de modificações, pois a quitosana contém grupos amina e hidroxilas ativos que permitem que a quitosana seja modificada quimicamente. (FISHER et al., 2007; TSAI; NORI et al., 2008; WANG, 2008).

A facilidade que a quitosana tem de formar as mais diversas formas, como filmes, membranas e estruturas porosas, que permite aplicações nas mais diversas áreas. Destaca-se como vantagem de se trabalhar e obter membranas de quitosana sua alta permeabilidade em água, habilidade de imobilizar microrganismos, além de acelerar o processo de cura de ferimentos, principalmente quando comparados com outros materiais, como, por exemplo, as membranas de poliuretano (BERGER et al., 2004).

A versatilidade do polímero quitosana permite diversas aplicações na área dos biomateriais, nas mais variadas formas (Figura 10). Mi et al. (MI et al., 2001) desenvolveram uma membrana de quitosana assimétrica para aplicação como curativo de feridas, com as membranas apresentando boa permeabilidade ao oxigênio, nenhuma citotoxicidade e não permitir a penetração bacteriana junto à ferida. Hong et al. (2007) desenvolveram membranas de quitosana para aplicação em regeneração periodontal guiada. As membranas apresentaram boas propriedades de degradação, mantendo a integridade estrutural por um período de 5 a 6 semanas. Além disso, não apresentaram citotoxicidade, indicando assim que as membranas podem ser aplicadas na regeneração óssea guiada.

Figura 10. Diversas formas de fabricação e aplicação da quitosana. Adaptado: OSÓRIO, 2007.



Bachtell et al. (2006) demonstraram a eficiência e segurança dos curativos da HemCon® usados no tratamento de sangramento de feridas pontuais em diálises. Os resultados mostraram que estancamento do sangramento foi conseguido de maneira similar ou mais rápido que com compressas convencionais e o uso de compressão foi reduzido em 50% no grupo de quitosana em comparação com o grupo convencional com nenhum evento adverso relatado.

Burkatovskaya et al. (2006) utilizaram uma bandagem de acetato de quitosana para a prevenção de infecções severas em ratos. Com os resultados, ficou evidenciado que o acetato de quitosana teve ação efetiva na ação contra as infecções, sugerindo que as bandagens rapidamente matavam as bactérias presentes nas feridas.

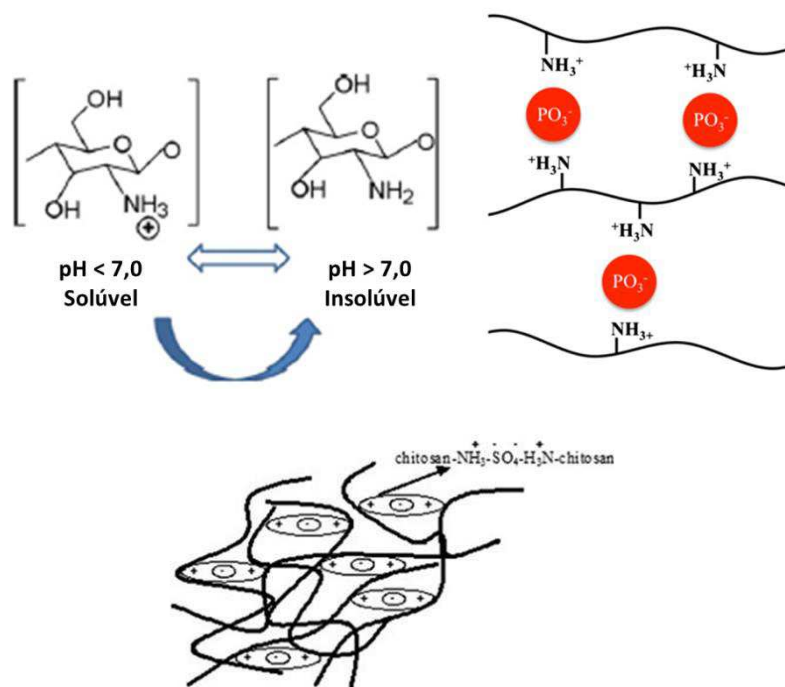
Boucard et al. (2007) desenvolveram um hidrogel bicamadas a base de quitosana para aplicação no tratamento de queimaduras de 3º grau. O objetivo foi obter um material que fosse biocompatível, permitindo a regeneração da pele lesada *in vivo*. O material demonstrou ser viável, pois foi aceito sem nenhuma restrição pelo organismo testado. Entretanto, a porosidade do hidrogel foi considerada pequena para permitir a transferência física entre as células. Estudo similar foi realizado por Alsarra (2009), onde foram desenvolvidos géis de quitosana para o tratamento de queimaduras e resultados histológicos indicaram que a quitosana acelera o processo de regeneração dos tecidos conectivos, induzindo a formação de tecido granular e promovendo a reepitelização da pele.

Aplicações biomédicas da quitosana têm gerado oportunidades de produção de biomateriais especializados, principalmente com novas modificações químicas e físicas, as quais têm promovido novas atividades biológicas para fins específicos. Quitosana e suas modificações encontram aplicações em vários campos biomédicos, incluindo Engenharia de Tecidos e Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos (SUBRAMANIAN et al., 2006; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Além disso, as modificações químicas mantêm as características principais da quitosana, tais como as propriedades físico-químicas e bioquímicas, dependendo da natureza química do grupo introduzido (JAYAKUMAR et al., 2007).

Motivado pela sua natureza policatiónica em condições ácidas, a quitosana pode ser modificada por diversos métodos, como por exemplo, através de interações eletrostáticas, envolvendo poliânions de tamanhos pequenos. As cargas positivas da quitosana interagem com as cargas negativas destas moléculas, tais como íons fosfatos e sulfatos (Figura 11) (CROISIER & JÉRÔME, 2013).

Figura 11. Natureza policatiónica da quitosana e interações eletrostáticas. Adaptado de: KARAKEŞİLI, et al., 2007; DASH et al., 2011; CROISIER & JÉRÔME, 2013.



Os efeitos da reticulação nas propriedades físicas dos polímeros são primariamente influenciados pelo grau de reticulação, a regularidade da rede formada e pela presença e ausência de cristalinidade no polímero. Para polímeros cristalinos, pode haver uma redução na cristalinidade com um baixo grau de reticulação, impedindo a orientação das cadeias. O polímero se torna mais flexível, mais elástico, diminuindo o ponto de fusão. A principal vantagem da reticulação é o aumento da estabilidade dimensional quando aplicada uma carga e em temperaturas elevadas (RUDIN, 1999; BHATTACHARYA et al., 2009).

Pieróg et al. (2009) realizaram um estudo em hidrogéis de quitosana reticulados por três rotas diferentes: ácido sulfúrico (H_2SO_4), citrato de sódio (CIT) e Tripolifosfato de Sódio (NaTPP). Foi avaliado o efeito destas reticulações no intumescimento destes hidrogéis e ficou evidenciado que o grau de intumescimento é dependente do pH do sistema como também do tipo de agente reticulante empregado. Com os resultados, uma relação entre os agentes reticulantes e a hidrofiliabilidade foi estabelecida, onde o grau de intumescimento diminui na seguinte ordem: $TPP < CIT < H_2SO_4$.

De maneira similar, Gierszewsk-Druz e Ostrowska-Czubenko avaliaram o efeito das reticulações com alginato de sódio (NaAlg) e Tripolifosfato penta sódico (TPP) nas propriedades térmicas de membranas de quitosana (CHI). Um sistema triplo também foi desenvolvido com CHI/NaAlg/TPP. Foi observado que o processo de reticulação afeta a estabilidade térmica da quitosana, com mudanças significativas nas transições térmicas. Foi concluído também que a estabilidade térmica das membranas de quitosana aumenta na seguinte ordem: $CHI/NaAlg \approx CHI/NaAlg/TPP \approx CHI/TPP < NaAlg < CHI < TPP$.

Atualmente, os agentes reticulantes mais comumente utilizados são os dialdeídos, tais como glioxal, e particularmente, glutaraldeído (Yang et al., 2005; Neto et al., 2005). Entretanto, a principal desvantagem desses reagentes é que são considerados tóxicos, principalmente se encontrados em traços livres, acarretando o risco de formação de produtos tóxicos por reação entre o substrato e o agente reticulante, durante o processo de biodegradação *in vivo*. O glutaraldeído é conhecido por ser neurotóxico e o glioxal por ser mutagênico. (BEPPU et al., 2007 LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Um método para superar essa desvantagem é a preparação de materiais reticulados ionicamente. As reticulações iônicas são processos simples e rápidos,

o que as torna de grande interesse para aplicações médicas e farmacêuticas. A genipina e o tripolifosfato (TPP) têm sido aplicados neste sentido com bastante ênfase (BERGER et al., 2004; KARAKEÇILI et al., 2007; CHIONO et al., 2008; MUZARELLI, 2009; YANG et al., 2009; ZHANG et al., 2011; PUJANA et al., 2013).

Outro agente reticulante que pode ser empregado é o ácido sulfúrico. Contudo, poucos dados são encontrados na literatura com aplicações biomédicas de filmes de quitosana reticulados com ácido sulfúrico. Fidèles (2010) estudou o efeito dos filmes de quitosana reticulados com ácido sulfúrico em relação à citotoxicidade e propriedades de adesão celular. Os filmes não se apresentaram citotóxicos, porém apresentou baixa ou nenhuma adesão celular frente a fibroblastos humanos e de ratos.

3.8 Scaffolds de quitosana

Durante o processo de fabricação de scaffolds, uma atenção particular deve ser dada à biocompatibilidade, propriedades mecânicas, morfologia e porosidade dos scaffolds, assim como a capacidade de regeneração do tecido a ser substituído. Os principais requisitos para uma efetiva ação dos scaffolds são não induzir nenhuma reação não desejada no corpo, seja ela aguda ou crônica, ser biodegradável até que o novo tecido formado esteja apto a repôr as funções do biomaterial, possuir propriedades de superfícies que permitam o desenvolvimento celular, apresentar propriedades mecânicas suficientes para o manuseio e para mimetizar o tecido a ser substituído, e finalmente, serem produzidos em diversas formas e tamanhos (CROISIER & JÉRÔME, 2013).

Devido às propriedades citadas a quitosana tem sido pesquisada e aplicada com destaque na preparação de biomateriais, nas mais variadas formas. Nos últimos anos, considerável atenção tem sido despendida para os materiais à base de quitosana e suas aplicações na engenharia de tecidos, já que eles possuem propriedades similares ao ácido hialurônico e aos glicosaminoglicanos, presentes naturalmente no organismo (CHUN et al., 2008).

No sentido de tentar produzir um material que possa mimetizar o mais próximo a matriz extracelular e as funções do tecido natural, diversos estudos com scaffolds de quitosana têm sido realizados ao longo dos anos. Nettles et al. (2002) fabricaram matrizes porosas de quitosana pelo método de liofilização, para

aplicação como scaffolds, avaliando o comportamento de condrócitos em sua estrutura, visando uma aplicação como substitutos de cartilagem. Os resultados demonstraram que a estrutura do scaffold permitiu a adesão das células, mostrando ser um material promissor para aplicação na engenharia de tecidos. De maneira similar, Griffon et al. (2006) avaliaram o efeito da interconectividade e tamanho dos poros na proliferação dos condrócitos. Os resultados mostraram que scaffolds com tamanhos de poros maiores continham mais condrócitos do que os com poros menores, assim como com uma maior interconectividade entre estes poros.

Chun et al. (2008) utilizaram o método de separação de fases induzidas termicamente, para produzir scaffolds de quitosana, focando a biocompatibilidade e controle de diâmetro dos poros, através da adição de n-butanol. Em todos os resultados, ficou evidente que os scaffolds com n-butanol obtiveram resultados superiores, quando comparados com scaffolds sem a adição, atestando que este método é eficaz.

Com o passar dos anos, as pesquisas com scaffolds de quitosana foram sendo aprofundadas, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de novas metodologias de fabricação, aliando sempre a biocompatibilidade e funcionalidade ao material, do ponto de vista de desempenhar a função como biomaterial para Engenharia de Tecidos. Um ponto chave na construção de scaffolds é a escolha de materiais que possam ser submetidos ao processo de degradação *in vivo*, permitindo que o novo tecido formado cresça e ocupe o espaço deixado pelo biomaterial. No sistema biológico, a quitosana é passível de biodegradação pela enzima lisozima, que pode ser encontrada no soro do plasma sanguíneo humano, saliva e outros fluidos. A atividade desta enzima é um fator determinante na razão de degradação da quitosana e atividade da lisozima aumenta com o decréscimo do pH e aumento da temperatura do sistema biológico, ambiente tipicamente de situação inflamatória (URAGAMI & TOKURA, 2006; BARBOSA et al., 2011; WEI et al., 2011).

Martins et al. (2009) desenvolveram scaffolds de quitosana com recobrimento de fosfato de cálcio e lisozima, para formação de poros *in vivo*, controlando a degradação do scaffolds e conseqüentemente a formação de poros, simulando condições de pH do sistema biológico sadio (pH 7,4) e com reação inflamatória (pH \approx 5,0). Os resultados mostraram que em pH 7,4 o material se

comportou de maneira estável, justificado pela diminuição da atividade enzimática. Contudo, em pH 5,0, uma estrutura porosa começou a ser formada.

Com o intuito de melhorar as propriedades intrínsecas dos scaffolds de quitosana, modificações podem ser realizadas. Cooney et al. (2009) desenvolveram scaffolds hidrofóbicos de quitosana, por freeze-drying, correlacionando os resultados com a temperatura e razão de congelamento. Os resultados mostraram que as estruturas porosas, com relação ao diâmetro e geometria, tanto para quitosana hidrofóbica quanto para as quitosana não modificadas são mais dependentes da temperatura de congelamento e menos da razão de congelamento.

Li et al. (2010) produziram scaffolds de quitosana com estrutura tridimensional orientada, através da técnica de liofilização. Os resultados mostraram que a estrutura formada possuía melhor interconectividade entre os poros que scaffolds com estruturas assimétricas. Ficou evidenciado também que a concentração de quitosana e o tempo de secagem têm grande influência na microestrutura, porosidade e propriedades mecânicas dos scaffolds. Resultado também comprovado por Yang et al. (2010) que produziram scaffolds de quitosana por freeze-drying, com uma modificação no método, neutralizando a quitosana com hidrogeno fosfato disódico. Os resultados mostraram que diminuindo a concentração de quitosana, a adsorção de água e porosidade aumentam, enquanto a resistência à compressão diminui.

Os scaffolds de quitosana também podem ser produzidos por outros métodos tais como inversão de fase supercrítica assistida (Duarte et al., 2011; Duarte et al., 2012) e eletrospinning (Pakravam et al., 2011; Sencadas et al., 2012). Entretanto, a técnica de eletrospinning possui algumas limitações, principalmente motivados pelas propriedades intrínsecas dos polímeros empregados, como por exemplo, a quitosana possui dificuldades com relação à processabilidade, principalmente devido à sua estrutura molecular e alta viscosidade. Kim e Lee (2011) prepararam scaffolds de quitosana por eletrohidrodinâmica e freeze-drying. A eletrohidrodinâmica uma técnica bastante utilizada para produção de fibras e estruturas tridimensionais na área de liberação controlada de fármacos (Chakraborty et al., 2009), na tentativa de superar possíveis dificuldades com o eletrospinning.

Outras técnicas que também podem ser empregadas na produção de scaffolds de quitosana, como a plotagem tridimensional, criogelificação e agregação de partículas. Nos últimos anos, tem havido uma tendência para o desenvolvimento de materiais de fabricação de scaffolds cada vez mais sofisticados que podem permitir a combinação de várias funções dentro dos mesmos dispositivos. Isto torna-se uma característica muito atrativa para os scaffolds para engenharia de tecidos, uma vez que estes materiais são necessários para executar um papel muito complexo no desenvolvimento de substitutos de tecidos (GOMES et al., 2005; LEE & KIM, 2011; BHAT & KUMAR, 2012; OLIVEIRA & MANO, 2011).

3.9 Agregação de partículas

Uma abordagem inovadora para projetar scaffolds poliméricos é baseado na tecnologia de microesferas, através do chamado método de agregação de partículas por meios físicos ou químicos. A porosidade obtida neste tipo de scaffold pode ser facilmente controlada pelo diâmetro das partículas, devido aos interstícios quando as partículas são agregadas. Além disso, este tipo de scaffold pode apresentar propriedades mecânicas promissoras, dependendo dos materiais utilizados, das condições de processamento e interconectividade entre os poros. A grande vantagem deste tipo de scaffold é a possibilidade de incorporar grandes quantidades de moléculas no interior das partículas, onde estas partículas não seriam aplicadas apenas para fornecer um suporte físico para a adesão celular, mas também podem servir como carreadores para a liberação de agentes bioativos, tais como fatores de crescimento, a fim de manipular processos celulares dentro do microambiente do scaffold, bem como em torno do local de implantação. O tamanho e formato dos poros e propriedades mecânicas podem ser controladas, de acordo com o tipo de célula e o local de aplicação no corpo. (MALAFAYA et al., 2005; GOMES et al., 2005; MIRANDA et al., 2011; PARK et al., 2012).

De maneira particular, o método de fabricação de scaffolds de quitosana por agregação de partículas tem chamado atenção nos últimos anos e está sendo desenvolvido por diversos grupos de pesquisa, baseado na aglomeração de microesferas pré-fabricadas. Esta técnica, geralmente, é baseada no empacotamento aleatório das microesferas com posterior agregação através de

meios físicos ou térmicos. As esferas podem ser produzidas por diversas técnicas como geleificação ionotrópica, inversão de fase e emulsificação (Sinha et al., 2004). Malafaya et al. (2005), Malafaya et al. (2008) e Kucharka et al. (2010) produziram scaffolds de quitosana também pelo método de agregação de partículas para avaliar o potencial de aplicação como biomaterial na engenharia de tecidos. Todos apresentaram estruturas consideradas satisfatórias, com os scaffolds produzidos apresentando morfologia adequada, estabilidade mecânica e biocompatibilidade *in vivo*.

2014

CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

THIAGO BIZERRA FIDELES

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste - CERTBIO, do Departamento de Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campus I, Campina Grande-PB.

4.2 Reagentes

- Quitosana de baixo peso molecular e Grau de Desacetilação entre 75-85% – SIGMA ALDRICH;
- Ácido acético glacial P.A. – VETEC;
- Hidróxido de Sódio P.A. - VETEC;
- Ácido sulfúrico P.A. - VETEC;
- Gelatina Porcina P.A. – SIGMA ALDRICH;
- Tripolifosfato de Sódio – SIGMA ALDRICH;
- Tampão Fosfato Salino - PBS P.A. – SIGMA ALDRICH;
- MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio];
- RPMI 1640-C;

4.3 Etapas de desenvolvimento da pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida em duas etapas:

I – Etapa exploratória;

II – Etapa de desenvolvimento e investigação dos scaffolds.

4.4 Procedimento experimental

A Etapa I foi realizada com o propósito de explorar um método convencional de produção de scaffolds já estabelecido no CERTBIO, através da aplicação de um sistema de liofilização adaptado (Fook, 2012; Sampaio, 2012). Com este sistema, foi observado o comportamento da microestrutura do polímero com relação ao método de obtenção das estruturas tridimensionais, a variação da concentração de quitosana, o tempo de reticulação e a reidratação. Ao final dessa

etapa foram definidos parâmetros experimentais favoráveis, bem como a otimização do processo, a serem aplicados na Etapa II.

4.4.1 Etapa I

4.4.1.1 Preparação das soluções de quitosana

O método de preparação das soluções de quitosana foi o mesmo para as duas etapas. Foram preparadas soluções de quitosana, diluindo o pó de quitosana em ácido acético 2% (v/v), com concentrações finais de 1,0, 1,5, 2,0 e 3,0 % (m/v), para a etapa I e com concentração final de 2,0% (m/v) para a etapa II, sob agitação magnética, em temperatura ambiente até completa dissolução do pó. A solução foi filtrada a vácuo para retirar os materiais insolúveis e acondicionadas em tubos falcon de 50 mL para posterior uso.

4.4.1.2 Obtenção dos scaffolds para etapa I

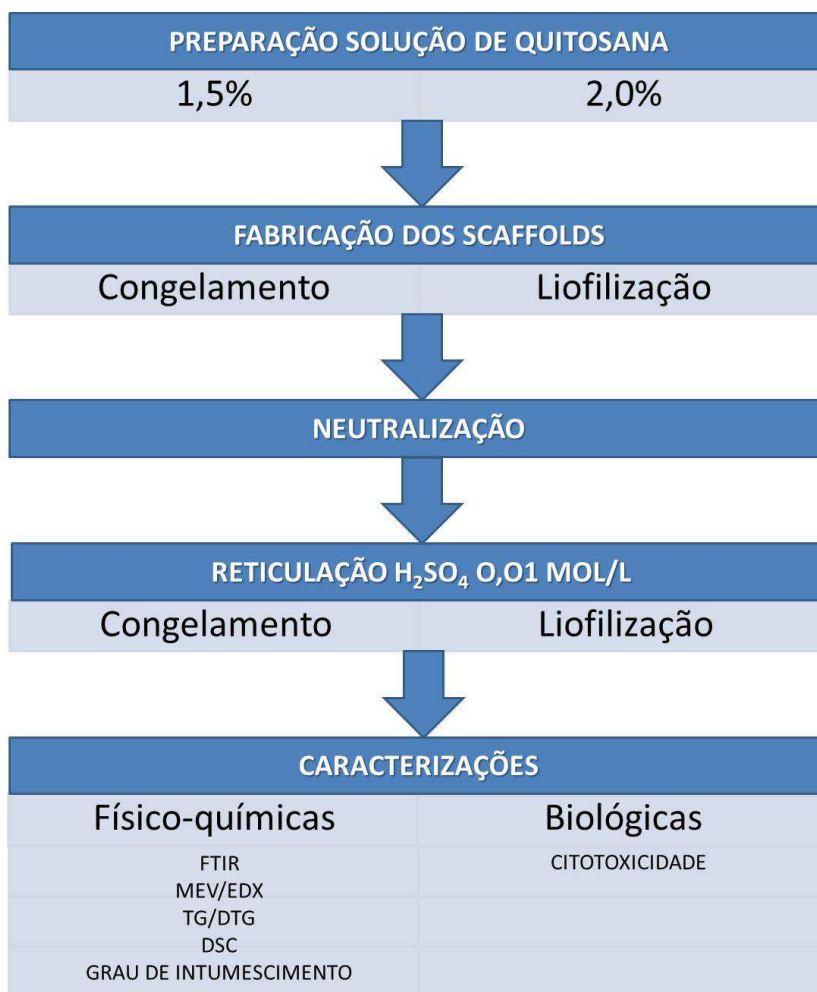
As soluções de quitosana, para ambas as concentrações preparadas (1,5 e 2,0% m/v), foram vertidas em placas petri (90 cm X 15 cm) e por fim submetidas ao congelamento em um freezer (-18 °C) por um período de 48 horas.

Os scaffolds foram preparados pela técnica de liofilização, com procedimento adaptado de Fook (2012) e Sampaio (2012). Após o congelamento das soluções por 48h, as amostras foram submetidas ao processo de liofilização por 48h. Após esse período, os scaffolds foram neutralizados por 1h, imersos em solução de hidróxido de sódio (1 Mol/L) e depois lavados com água destilada até atingir a neutralidade. Estes scaffolds produzidos foram denominados SQNR (Scaffolds de Quitosana Não Reticulados), para ambas as concentrações e considerados como amostra controle.

4.4.1.3 Reação de Reticulação para etapa I

As reticulações foram introduzidas por imersão dos scaffolds em solução de ácido sulfúrico (0,01 Mol/L), com tempos de reação de 15 e 30 minutos, para ambas as concentrações (1,5 e 2,0%), de acordo com método adaptado por Fideles (2010). Após isso, as amostras foram lavadas para retirar o excesso de agente reticulante, congeladas a -18 °C por 24h e liofilizadas por 48 h. As amostras reticuladas com 15 e 30 minutos foram denominadas SQR15 e SQR30, respectivamente, para ambas as concentrações (Figura 12).

Figura 12. Fluxograma de execução do trabalho para Etapa I.



4.4.2 Etapa II

A Etapa II surgiu diante da necessidade de melhorias no processo de obtenção das estruturas tridimensionais porosas. Consistiu no desenvolvimento dos scaffolds pelo método de agregação de partículas, onde a neutralização e reticulação foram reduzidas a uma única etapa.

4.4.2.1 Obtenção dos scaffolds para etapa II

Nesta etapa, o desenvolvimento dos scaffolds de quitosana foi baseado na metodologia adaptada de Baptista (2008), que consiste na agregação de partículas de quitosana através de um empacotamento aleatório de esferas pré-produzidas, seguido por agregação, criando assim uma estrutura tridimensional porosa. Este processo de fabricação consistiu em sete etapas:

- Dissolução do polímero,
- Produção das partículas por extrusão em solução coagulante,
- Neutralização do pH,
- Formação dos scaffolds;
- Centrifugação;
- Congelamento;
- Liofilização

A solução de quitosana com concentração final de 2% (m/v) foi preparada pela dissolução do pó em uma solução de ácido acético com concentração de 1% (v/v) e submetida a um processo de extrusão em uma bomba de infusão, com velocidade constante (25 mL/h) para formar partículas de quitosana com diâmetros regulares, em um banho coagulante de uma solução de tripolifosfato de sódio a 5% (m/v) e agitação. As partículas de quitosana foram coletadas e lavadas repetidamente em PBS (pH 7,4) e água destilada até a neutralidade. As partículas foram subsequentemente colocadas em tubos falcon de 50 mL, seguido da adição de uma solução de gelatina 5% (m/v), centrifugadas a 3500 RPM por 5 minutos, congeladas a $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e submetidas ao processo de liofilização (Figura 13 e 14).

Figura 13. Representação esquemática da precipitação de quitosana e metodologia de agregação das partículas. Fonte: Adaptado de BAPTISTA, 2008.

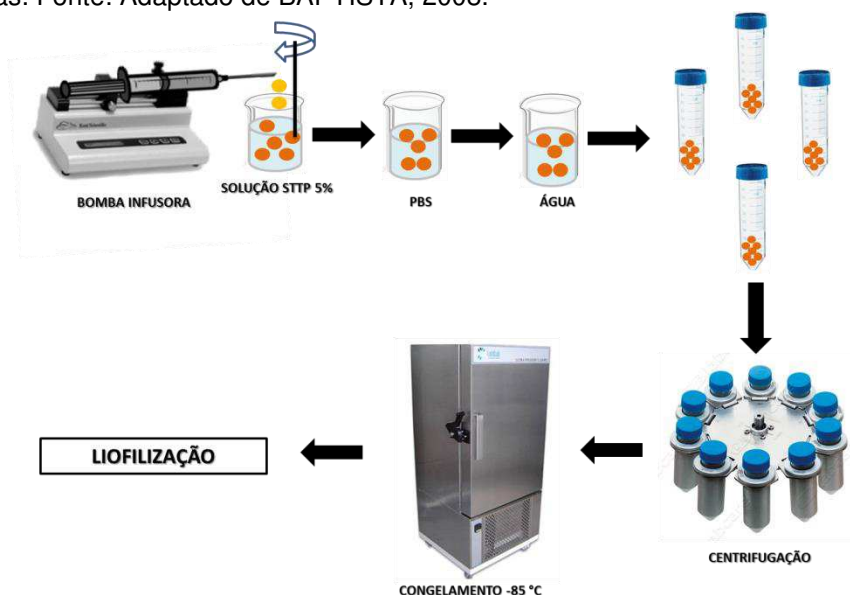
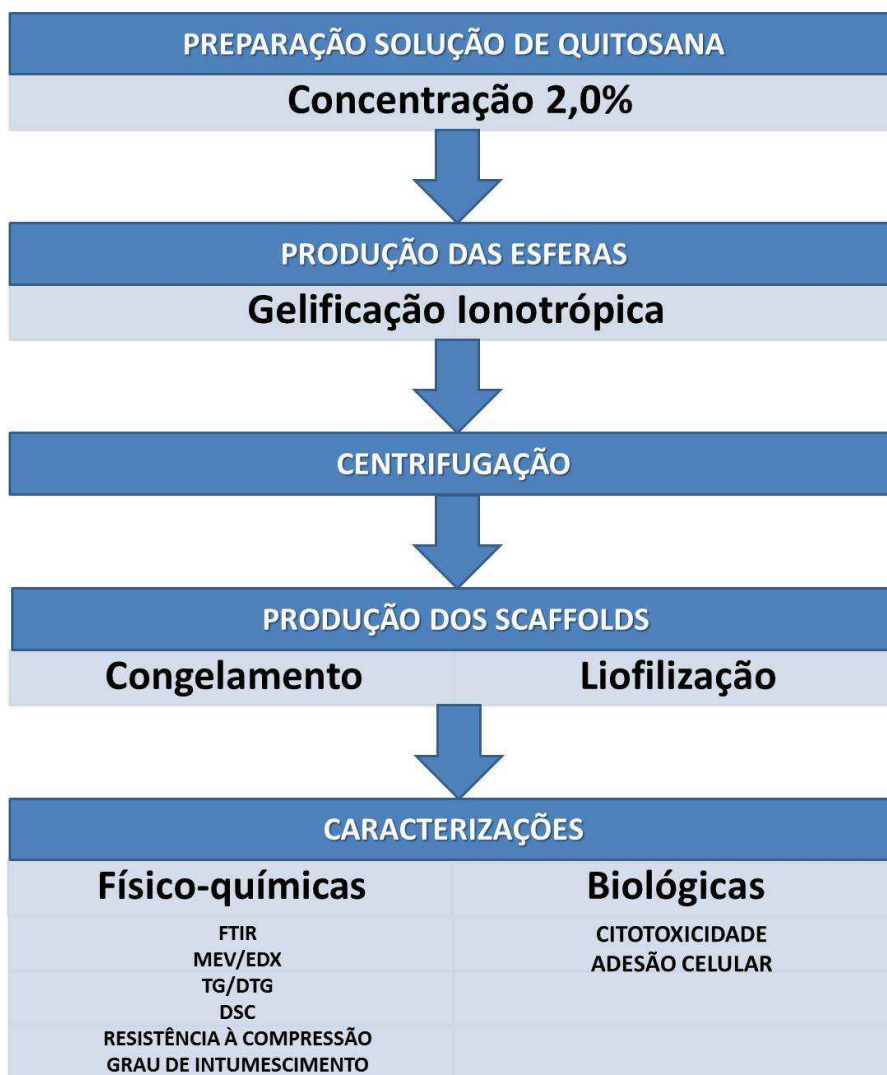


Figura 14. Fluxograma de produção da etapa II



4.5 Caracterizações

As caracterizações das matérias-primas e scaffolds foram realizadas de acordo com as seguintes normas:

- ASTM D570 - 98(2010)e1: Standard Test Method for Water Absorption of Plastics;
- ASTM F2027 – 08: Standard Guide for Characterization and Testing of Raw or Starting Biomaterials for Tissue-Engineered Medical Products;
- ASTM D1621 – 10: Standard Test Method for Compressive Properties Of Rigid Cellular Plastics;
- ASTM F2450 – 10: Standard Guide for Assessing Microstructure of Polymeric Scaffolds for Use in Tissue Engineered Medical Products;

- ASTM F2900 – 11: Standard Guide for Characterization of Hydrogels used in Regenerative Medicine;
- ASTM F2150 – 13: Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products;
- ISO 10993-5:2009: Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity;
- ISO 10993-18:2005: Biological evaluation of medical devices - Part 18: Chemical characterization of materials;
- ISO/TS 10993-19:2006: Biological evaluation of medical devices - Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials.

4.5.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Com a técnica de espectroscopia de infravermelho, foi observada a interação quitosana/ácido sulfúrico, através de mudanças significativas no espectro dos filmes. Scaffolds de quitosana foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier em um espectrômetro. Os espectros na região do infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro Spectrum 400, FT-IR/ FT-NIR Spectrometer Perkin Elmer (CERTBIO/UFCG, com resolução de 4 cm^{-1} e 20 varreduras, e com varredura de $4000\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$. Utilizou-se o dispositivo ATR (attenuated total reflectance), que se traduz por um emissor de infravermelho na ponta de um diamante que é comprimido no material, dispensando assim a produção de pastilhas de KBr.

4.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 X) e resolução. A microscopia eletrônica fornece informação morfológica e topográfica sobre superfícies de sólidos, necessária para se entender o comportamento de superfícies. Os scaffolds reticulados e não reticulados de quitosana foram caracterizados morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura utilizando um

microscópio eletrônico de bancada, modelo TM 1000 HITACHI e MICROSCOPIO ELETRÔNICO PHENOM PROX e as imagens foram tratadas com o software de análise de rugosidade 3D e FIBERMETRIC (CERTBIO/UFCG). Não houve a necessidade de recobrimento adicional com partículas de ouro, uma vez que se trata de um equipamento de baixa voltagem.

Diferentes métodos são propostos para avaliar a porosidade dos scaffolds e alguns autores utilizam cálculos a partir da densidade (ρ) da quitosana, densidade e volume dos scaffolds fabricados. Hsieh et al. (2007) utilizaram a seguinte equação:

Equação 1. Cálculo da Porosidade (%).

$$P(\%) = \frac{V_m - V_P}{V_m} \times 100$$

$$P(\%) = \frac{V_m - (W_m/\rho)}{V_m} \times 100$$

Onde,

V_m = Volume total dos scaffolds (cm^3)

V_P = Volume atual da quitosana (cm^3)

W_m = Massa do scaffold (g)

ρ = Densidade da quitosana (0.3 g/cm^3 – SIGMA ALDRICH)

4.5.3 Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)

O EDS é um acessório essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais, no qual os elementos químicos presentes numa amostra podem ser identificados através do espectro de raios X emitido pela amostra. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição mineral em amostras de tamanhos muito reduzidos ($< 5 \mu\text{m}$), permitindo uma análise quase que pontual. Os scaffolds reticulados e não reticulados de quitosana foram caracterizados utilizando um microscópio eletrônico de bancada, modelo TM 1000 HITACHI MICROSCOPIO ELETRÔNICO PHENOM PROX (CERTBIO/UFCG).

4.5.4 Análise Térmica

A análise térmica é uma ferramenta bastante útil na caracterização das propriedades dos Biomateriais durante seu processamento, assim como durante aplicação clínica. Em qualquer aplicação de um biomaterial, o estudo da composição e estrutura do material candidato deve ser avaliada, pois as caracterizações térmicas fornecem informações gerais sobre a estabilidade, encolhimento, expansão, efeito de métodos de esterilização e armazenagem. Além disso, o comportamento térmico de um material constitui uma parte importante de caracterizar as propriedades de um biomaterial, uma vez que está intrinsecamente ligada à morfologia e, portanto, tem efeito direto sobre seu desempenho clínico (NAZHAT, 2008).

4.5.4.1 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas (TG) dos scaffolds de quitosana não reticuladas e reticuladas foram obtidas em um módulo termogravimétrico TG modelo Q600 (TA - Instruments), com uma faixa de temperatura de 25 a 400 °C, com uma razão de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 20 mL/min. Foram utilizadas amostras com massa de $5,00 \pm 0,05$ mg acondicionada em cadinho de alumínio para cada amostra. A calibração do SDT TG/DTA Q600 foi realizada com padrão de oxalato de cálcio. As curvas TG foram analisadas pelo programa TA Instruments Universal Analysis 2000, versão 4.7A, da TA Instruments, a fim de caracterizar as transições de fase, etapas de decomposição e perda de massa das mesmas.

4.5.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises por DSC, das amostras não reticuladas e reticuladas, foram realizadas em um equipamento DSC PerkinElmer modelo 8500, com uma faixa de temperatura de 0 a 300 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 20 mL/min. Foi utilizada massa de $3,00 \pm 0,05$ mg acondicionada em cadinho de alumínio para cada amostra. As curvas DSC foram analisadas com o software Pyris R10 Data Analysis.

4.5.5 Resistência à compressão

Os testes de compressão pela aplicação de uma carga axial compressiva e foram realizados em uma máquina universal de ensaios eletromecânicos (INSTRON, modelo 3366) com uma célula de carga de 500N, em amostras com formato cilíndrico com razão diâmetro/espessura de aproximadamente 2 com taxa de deformação constante de 1,3 mm/min. A resistência à compressão foi calculada a partir da divisão entre a tensão máxima e a área original. Três amostras foram testadas e o valor médio do Módulo de Young com o seu respectivo desvio foi calculado para 10% de deformação.

4.5.6 Grau de Intumescimento (%GI)

As propriedades de intumescimento dos scaffolds de quitosana não reticulados e reticulados foram investigados de acordo com a norma ASTM D1056-07, como mais um fator para avaliar a possibilidade de uma aplicação biomédica. As amostras secas (M_0) foram cortadas em pequenos pedaços de 2,5 cm x 1,5 cm, precisamente pesados e submersos em solução de PBS (pH 7,4) durante diferentes períodos de tempo à temperatura ambiente até que o equilíbrio fosse atingido. A cada 1 minuto de imersão, as amostras intumescidas foram removidas solução de PBS, retirado o excesso de água sobre a superfície do filtro com papel de seda e imediatamente pesados. O peso molhado dos scaffolds (M_w) foi determinado utilizando-se uma balança eletrônica. O Grau de Intumescimento dos scaffolds é expresso em termos de porcentagem e foram calculadas pela seguinte equação:

Equação 2. Grau de Intumescimento.

$$\text{Grau de Intumescimento} = \frac{M_w - M_0}{M_0} \times 100 (\%)$$

Onde,

M_w = Peso úmido do scaffold;

M_0 = Peso seco do scaffold.

4.5.7 Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade dos scaffolds foi avaliada seguindo a norma ISO 10993-5, através da determinação da porcentagem da viabilidade celular, utilizando o método da redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], que estabelece uma correlação entre a atividade metabólica celular e o número de células viáveis em cultura *in vitro* (PERROT et al., 2003; SANTOS, 2009).

Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazan de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas, o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente como ensaio de viabilidade celular.

Para avaliação da citotoxicidade dos scaffolds de quitosana reticulados, foi utilizado o método direto de contato entre o substrato do material e as células. Os macrófagos foram obtidos através da injeção intraperitoneal de Tioglicolato de Sódio (3,0%) em camundongos Swiss Mus Musculus, três dias antes dos experimentos. Após este período, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ (5%) para retirada dos macrófagos. A remoção foi realizada através da exposição da cavidade peritoneal, seguido de injeção intraperitoneal de 5 mL de PBS (pH 7,4), refrigerado e estéril, e de massagem vigorosa na cavidade e suspensão das células. As células foram transferidas para um tubo estéril e centrifugadas a 3500 RPM por 15 minutos, em três ciclos. O sobrenadante foi retirado e as células suspensas em 1 mL de RPMI 1640 – C.

Foi utilizada uma concentração de 5×10^5 células/mL RPMI e adicionados 100 µL em uma placa de 96 poços. A placa foi transferida para a estufa de CO₂ (5%) a 37 °C por 1 hora. Após este período, foram adicionadas as amostras e mais 200 µL de RPMI 1640-C. RPMI 1640-C foi utilizado como controle negativo. A placa foi incubada novamente em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C por 24 horas.

Após as 24 horas, foram adicionados 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) em RPMI 1640-C. Novamente, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C por 3 horas. Depois disso, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de álcool isopropílico.

A leitura da densidade ótica foi determinada em um leitor de microplacas (Victor3 – PerkinElmer), a 540 nm com filtro de referência de 620 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando o controle negativo com 100% de viabilidade.

4.5.8 Ensaio de Adesão Celular

Para os ensaios de adesão celular, as células NIH 3T3 foram cultivadas diretamente sobre os filmes em uma placa de 48 poços, com uma densidade celular de 10^5 células/poço, por 72h. A adesão celular foi avaliada através da determinação da porcentagem da viabilidade celular, utilizando o método da redução da rezasurina, que estabelece uma correlação entre a atividade metabólica celular e o número de células viáveis em cultura (PERROT et al., 2003; SANTOS, 2009). Células L929 foram cultivadas diretamente sobre a superfície da placa de cultura celular foram utilizadas como referência. Seguido de cada tempo de contato, o meio foi removido, seguido de lavagem com PBS estéril, para remoção das células não aderidas à superfície polimérica, e 600 μ L de RPMI + resazurina foi adicionado em cada poço, seguido de incubação por 3 horas a 37 °C / 5% CO₂. Passado o período de 3 horas, 100 μ L do meio foi retirado e a fluorescência da resofurina foi medida em um leitor modelo Victor3 1420, PerkinElmer.

2014

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

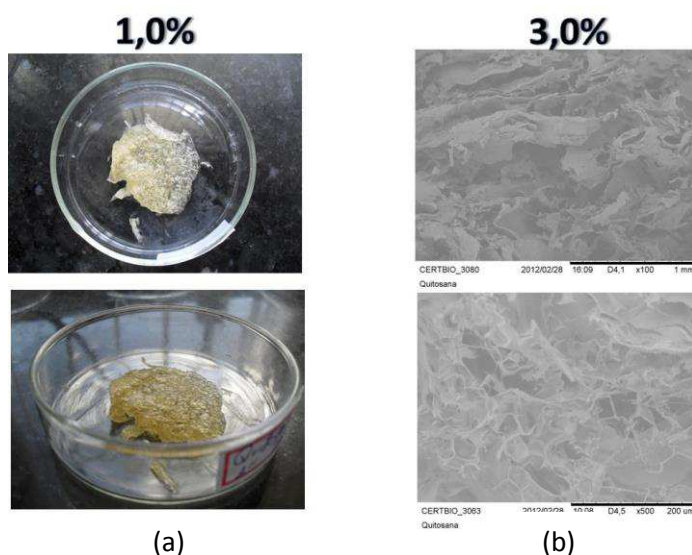
THIAGO BIZERRA FIDELES

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ETAPA I¹

Esta etapa da pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de estabelecer os melhores parâmetros experimentais no processo de fabricação dos scaffolds de quitosana. De maneira inicial, além das concentrações de 1,5% e 2,0% (em massa) descritas no capítulo anterior, foram testadas também scaffolds com concentrações de 1,0% e 3,0% (em massa). Entretanto, com o desenvolver dos trabalhos experimentais, foi observado que as amostras geradas não eram ideais para a continuidade da pesquisa. Os scaffolds com concentração de 1,0% de quitosana se apresentaram frágeis, a ponto de se desintegrarem estruturalmente já na etapa de neutralização, não permitindo a sequência dos experimentos. Já para os scaffolds produzidos com 3,0% de quitosana foram bem sucedidos no que diz respeito a todas as etapas do processamento, contudo, ao ser analisada a microestrutura do material ficou constatado que o material possuía baixa porosidade, conforme ilustrado na Figura 15. Sendo assim, para efeitos de apresentação e discussão dos resultados a seguir, só foram consideradas as caracterizações para as concentrações em massa de 1,5% e 2,0%.

Figura 15. Fase inicial do processo de obtenção dos scaffolds (a) concentração 1,0 (m/v); (b) concentração 3,0% (m/v).



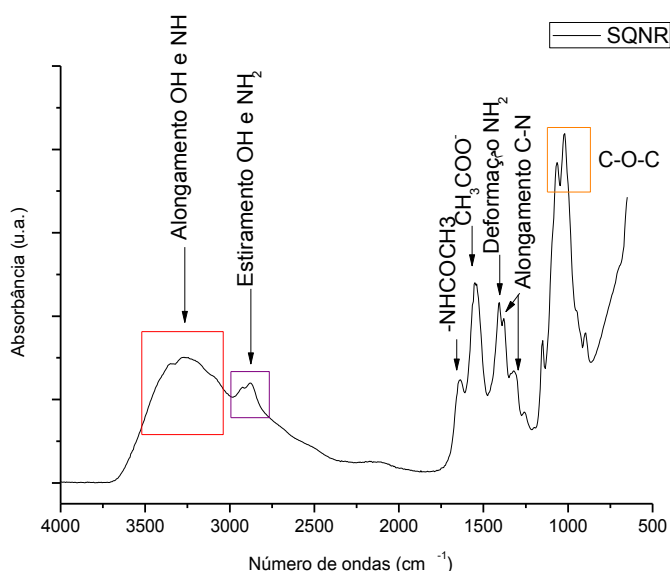
¹ Esta etapa foi baseada na seguinte publicação:

Fideles, T.B.; Furtado, G.T.F.S.; Lima, D.B.; Borges, S.M.P.; Pinheiro, I.M.F.; Fook, M.V.L. Evaluation of Ionic Crosslinked Chitosan Scaffolds for biomedical Applications. Journal of Chitin and Chitosan Science, v. 1, p. 1-7, 2013.

5.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho dos scaffolds de quitosana não reticulados (SQNR) está ilustrado na Figura 16. Como os resultados não apresentaram diferenças significativas entre as duas concentrações e os tempos das reticulação trabalhados, para efeito de apresentação dos resultados, foi apresentado um gráfico que ilustra os resultados para ambas as concentrações de quitosana produzidas. As interações químicas entre os scaffolds de quitosana e o ácido sulfúrico foram analisadas através dos resultados de FTIR.

Figura 16. Espectros de FTIR SQNR.

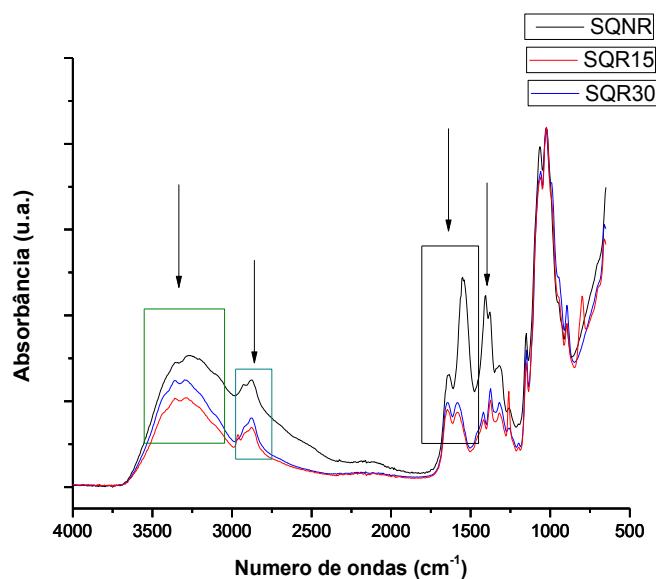


Para os scaffolds não reticulados, em ambas as concentrações, aparecem bandas largas na região de 3354 cm^{-1} e pode ser atribuída ao alongamento na vibração dos grupos O–H e N–H encontrados na quitosana. Exibe também uma banda forte e larga nas regiões entre 3000 e 3500 cm^{-1} , com aparecimento de um ombro aproximadamente em 3250 cm^{-1} e em 2900 cm^{-1} , atribuídas a sobreposição no estiramento dos grupos funcionais OH e NH_2 , provocado pela formação de pontes de hidrogênio. Foram encontradas também bandas de absorção do C=O relativas ao alongamento dos grupos carbonilas ($-\text{NHCOCH}_3$), atribuída à desacetilação parcial da quitosana e a flexão N-H dos grupos amina ($-\text{NH}_2$), observados claramente em 1638 cm^{-1} e 1592 cm^{-1} . Bandas fortes localizadas em 1592 e 1400 cm^{-1} são atribuídas aos alongamentos assimétricos e

simétricos do ânion carboxilado, indicando que uma interação ocorreu entre o ácido acético e os nitrogênios doadores da quitosana, produzindo acetato de quitosana. Outras bandas foram observadas nos scaffolds de quitosana nas regiões de 1407 cm^{-1} (vibração N-H da deformação em $-\text{NH}_2$), 1376 cm^{-1} e 1324 cm^{-1} (vibração do alongamento C-N) e 1159 cm^{-1} (vibração assimétrica do alongamento da ligação C-O-C) (AIMOLI, et al., 2006; SUBRAMANIAN, A. et al., 2006; KARAKEŞILI, et al., 2007; TSAI & WANG, 2008; TANASE et al., 2011). Estes resultados são similares aos resultados encontrados por Osman e Arof (2003), Hemant e Shivakumar (2010) e Cavalcanti (2013).

Após as reações de reticulação, algumas mudanças foram observadas nos espectros de infravermelho dos scaffolds de quitosana, para os scaffolds reticulados por 15 minutos (SQR15) e 30 minutos (SQR30), para as concentrações de 1,5 e 2,0%, conforme ilustrado na Figura 17.

Figura 17. Espectros de FTIR SQNR e SQR.



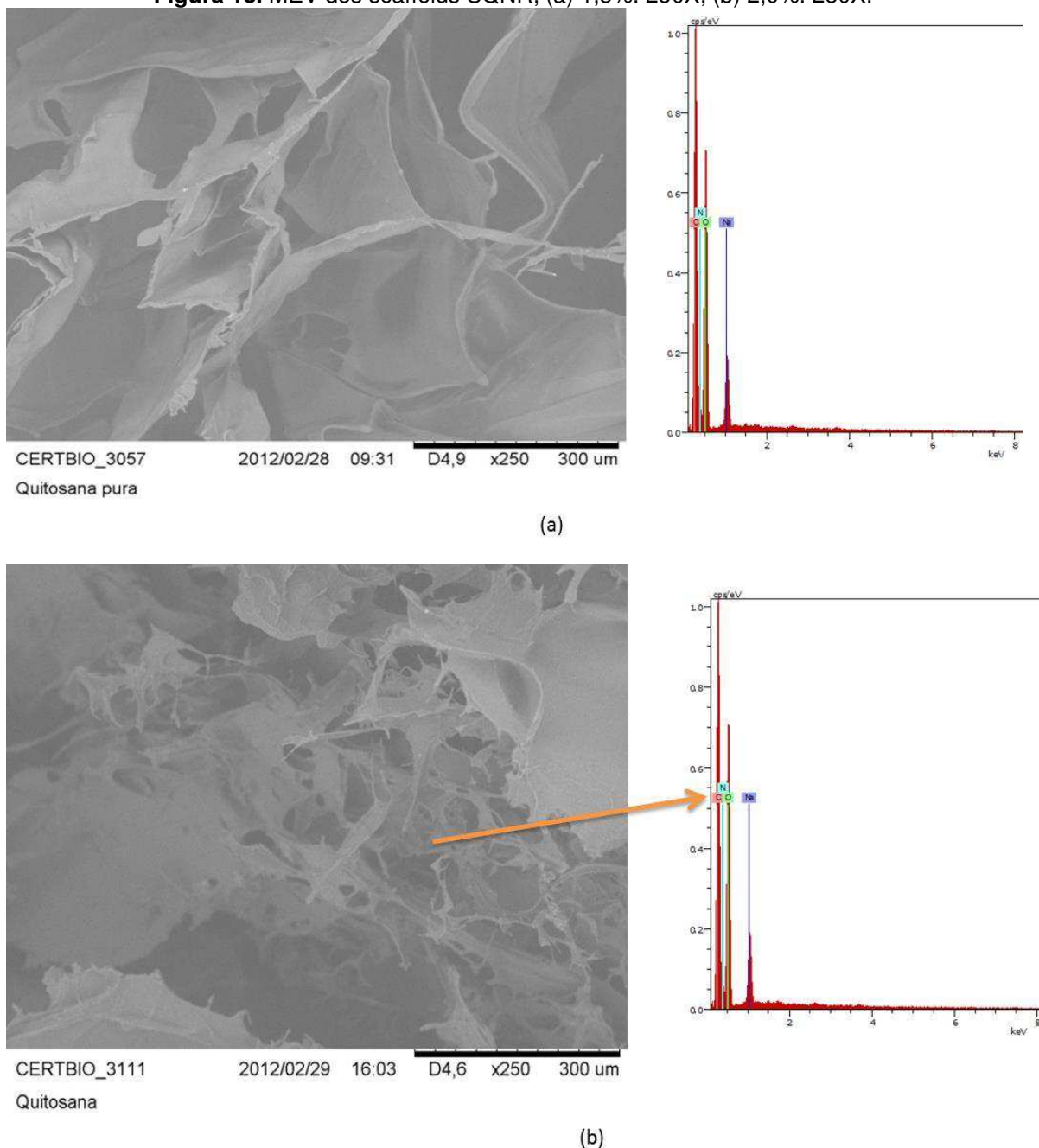
A banda relativa ao grupo NH_2 (1592 cm^{-1}) se tornou fraca, devido à protonação do grupo amino, fruto da reação com os íons H^+ liberados pelo ácido sulfúrico. Também foi notado que, após as reações de reticulação, a banda relativa aos íons carboxilado foram completamente removidas, possivelmente devido a reação de reticulação. As bandas largas relativas ao alongamento do OH e NH_2 , em 3500 e 3000 cm^{-1} se tornaram fracas, com um alargamento na banda na região de 2900 cm^{-1} . Podemos assumir que este evento ocorre devido a um

decaimento na intensidade das pontes de hidrogênio, que é causada tanto pela protonação dos grupos $-NH_2$, a banda mais ampla que apareceu representa o alongamento da vibração do íon amônio protonado ($-NH_3^+$), como também pode ser relacionada à presença de reticulações no sistema, já que as pontes de hidrogênio são diretamente relacionadas à estrutura cristalina da quitosana. Além disso, a presença de novas bandas formadas também pôde ser observada, em 940 e 892 cm^{-1} que representam também as vibrações $-NH_3^+$. Estas mudanças comprovam que diversos grupos aminos ao longo da cadeia polimérica foram protonados. Igualmente, houve uma redução na intensidade do alongamento da vibração C-N, encontrada na região de 1374 cm^{-1} . E por fim, o envolvimento dos íons SO_4^{2-} no processo de reticulação também foi comprovado, com a presença da banda de absorção em 1194 cm^{-1} , que representa os grupos sulfatos. Além desta, as bandas encontradas nas regiões de 1055 e 614 cm^{-1} também são atribuídos à presença dos íons SO_4^{2-} nos scaffolds reticulados. Resultados similares foram encontrados por Cui et al. (2008) e Ngah et al. (2011). (CUI et al., 2008; PIERÓG et al., 2009; FIDÉLES, 2010; FIDELES, 2013).

5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (MEV/EDS)

As morfologias da secção transversal dos scaffolds de quitosana não reticulados (SQNR) foi analisada por MEV acoplado com EDS e estão apresentadas na Figura 18.

Figura 18. MEV dos scaffolds SQNR; (a) 1,5%. 250X; (b) 2,0%. 250X.

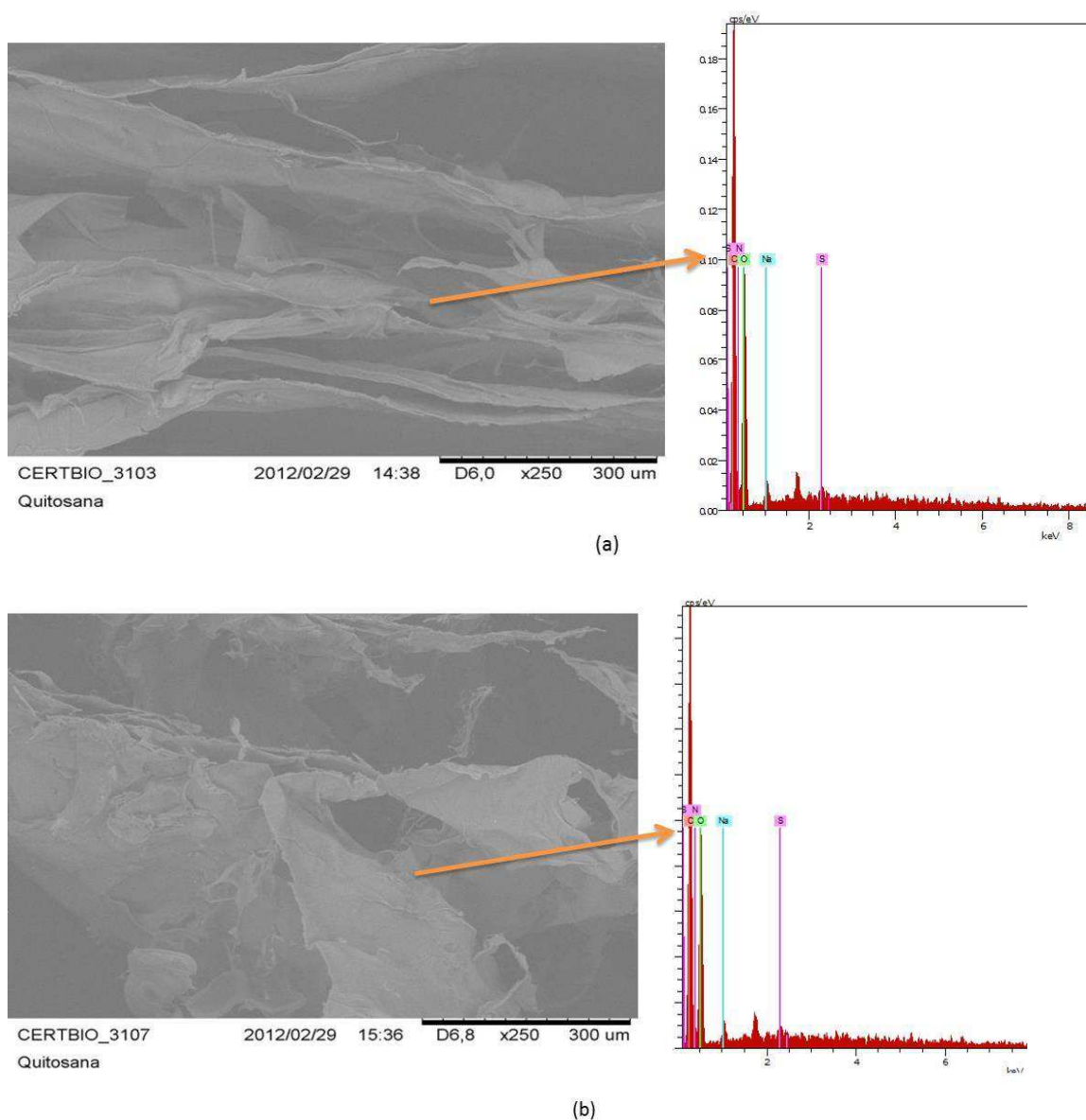


Observando a microestrutura dos scaffolds de quitosana, não reticulados, houve uma mudança na morfologia, com o aumento da concentração (1,5 para

2,0 %). Os scaffolds não reticulados apresentaram uma estrutura desordenada, com camadas paralelas, quase lamelares, e com a presença de poros no interior do scaffolds. Com o aumento da concentração de quitosana houve uma diminuição no tamanho e na distribuição dos poros, motivado principalmente pelo aumento de massa de quitosana, e conseqüente maior dificuldade de migração e formação de cristais de gelo durante o congelamento, variação que também foi observada por Yang et al. (2010).

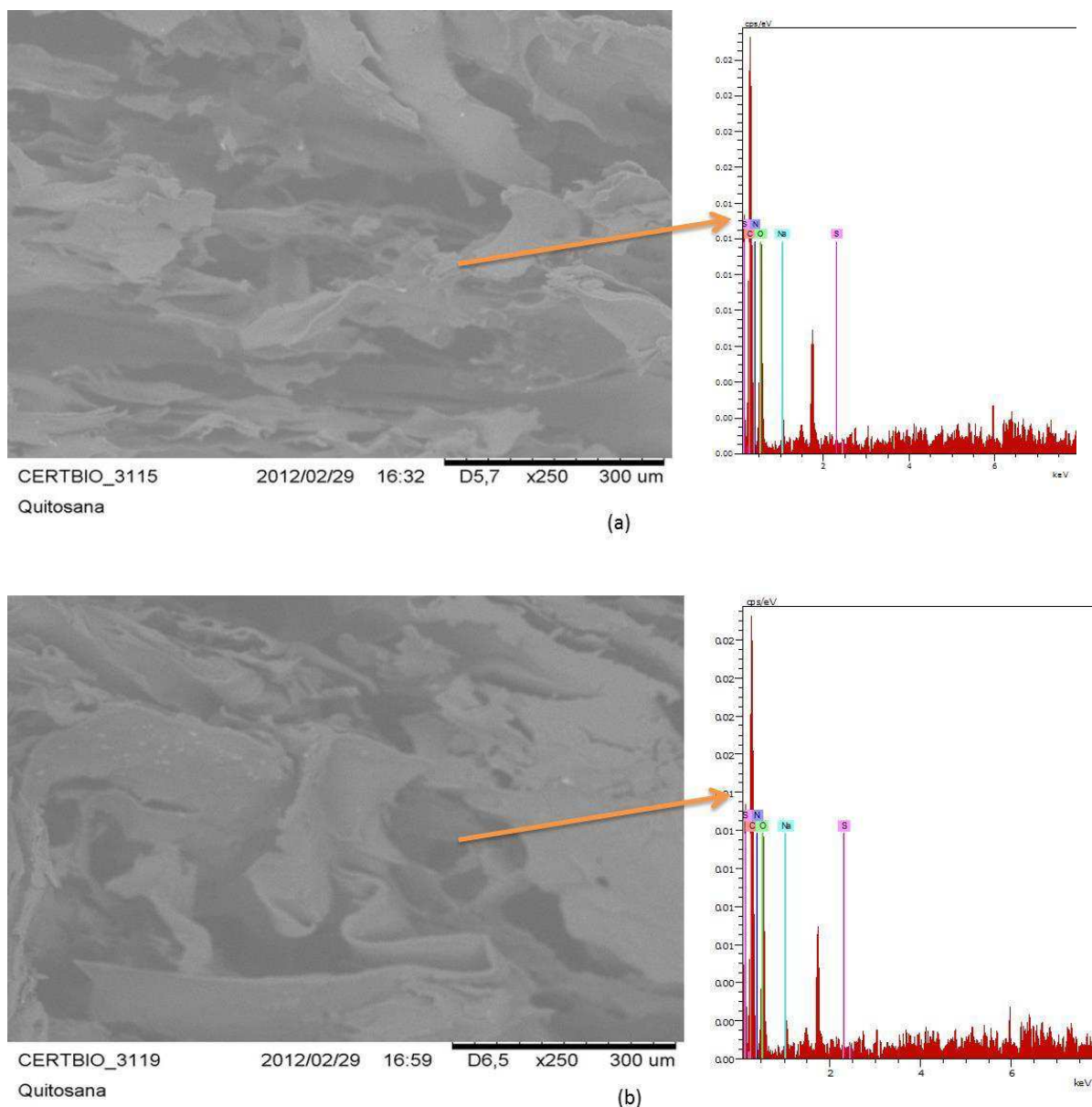
A morfologia da secção transversal e análise química foram analisadas dos scaffolds de quitosana reticulados por MEV acoplado com EDS para 15 minutos e estão apresentadas na Figura 19.

Figura 19. MEV dos scaffolds reticulado por 15 minutos; (a) 1,5%. 250X; (b) 2,0%. 250X.



A morfologia da secção transversal dos scaffolds de quitosana reticulados por 30 minutos, e análise química foi analisada por MEV acoplado com EDS e estão apresentadas na Figura 20.

Figura 20. MEV dos scaffolds reticulado por 30 minutos; (a) 1,5%. 250X; (b) 2,0%. 250X.



Após as reações de reticulação, a microestrutura dos scaffolds foi modificada a ponto de diminuir a porosidade do scaffold, muito provavelmente devido às reações do agente reticulante com a quitosana, assim como observado por Tsai et al. (2007) e Lee & Kim (2011). Essa mudança foi mais intensa para as reações de reticulação por 30 minutos, tanto para as concentrações de 1,5 como pra 2,0%. As lamelas formadas nos scaffolds ficaram mais compactas, mas ainda,

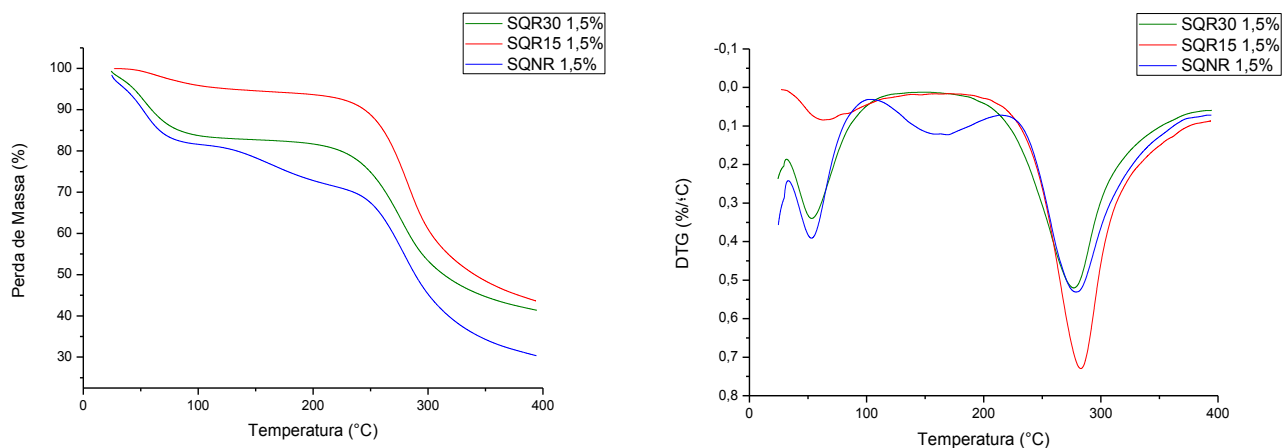
é possível encontrar poros ao longo da microestrutura dos scaffolds. Outros fatores que, associado com a reticulação possam ter afetado a morfologia dos scaffolds foram as reidratações e as liofilizações empregados após a reação de reticulação. Além disso, no congelamento a água tem tendência para se concentrar em cristais desordenados na estrutura. Com a reticulação e consequente organização macromolecular, essa difusão ficou dificultada obrigando a água a concentrar-se em camadas. Ma et al. (2003) encontraram resultados similares ao produzirem scaffolds de quitosana/colágeno reticulados com glutaraldeído.

Com os resultados de EDS, ficou comprovada a presença do agente reticulante (íons SO_4^{2-}) nos scaffolds de quitosana, com o surgimento do pico de enxofre (S) para as amostras reticuladas tanto por 15 quanto por 30 minutos de reação, corroborando com os resultados obtidos por FTIR. Os picos de sódio (Na) que apareceram nos resultados são provenientes de algum resíduo de solução de NaOH que ficaram impregnados nos scaffolds.

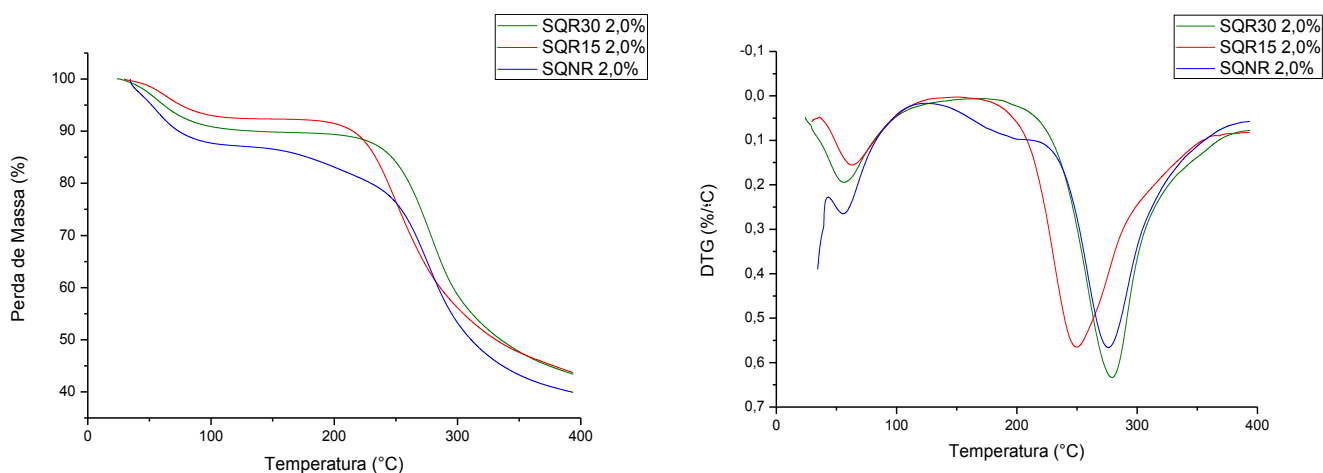
5.1.3 Termogravimetria (TG/DTG)

As Figuras 21a e 21b e a Tabela 2 ilustram os resultados de TG para os scaffolds de quitosana não reticulados e reticulados, para ambas as concentrações 1,5 e 2,0% (w/v) e tempos de reticulação (15 e 30 minutos), respectivamente. Para melhor visualização dos eventos térmicos, os resultados de TG foram analisados também pelo do cálculo da derivada (DTG).

Figura 21. Curvas TG/DTG para SQNR, SQR15 e SQR30. (a) 1,5 % (m/v); (b) 2,0 % (m/v).



(a)



(b)

Tabela 2. Eventos térmicos para os scaffolds de quitosana não reticulados (SQNR 1,5% e SQNR 2,0%) e reticulados por 15 e 30 minutos (SQR15 1,5%, SQR30 1,5%, SQR15 2,0% e SQR30 2,0%).

ETAPAS	PERDA (%)	TEMPERATURA (°C)
SQNR 1,5% (m/v)	14,41	52,5
	10,21	159
	32,21	279
SQNR 2,0 % (m/v)	11,2	56,7
	5,5	192
	37,7	276
SQR15 1.5% (m/v)	4,55	63
	39,29	282
SQR30 1.5% (m/v)	12,88	52,5
	50,16	276
SQR15 2,0% (m/v)	6,97	62,8
	48,45	249
SQR30 2,0% (m/v)	8,0	56,7
	40,54	279

Nos resultados de TG para os scaffolds de quitosana não reticulados, com uma concentração de 1,5% (m/v), foi identificado que a perda de massa ocorreu em três etapas. A primeira etapa apresentou uma perda de massa de cerca de 14,42% e atinge um máximo a temperatura 52,5 ° C. A segunda etapa apresentou uma perda de massa de cerca de 10,21% e atinge um máximo a 159 °C e por fim, a terceira etapa apresentou uma perda de massa de cerca de 32,21%, com um máximo a 279 ° C.

Para os scaffolds de quitosana não reticuladas com uma concentração de 2,0% (m/v), também foram identificados uma perda de massa em três etapas. A primeira etapa exibiu uma perda de massa em torno de 11,2%, com um máximo de 56,7 ° C. A segunda etapa possui uma perda de massa de cerca de 5,5% e atinge um máximo a 192 ° C e a terceira etapa tem uma perda de peso de cerca de 37,7%, com um máximo a 276 ° C.

Analisando os resultados de TG/DTG para os scaffolds de quitosana não reticulados, em ambas as concentrações, pode-se afirmar que o primeiro evento identificado representa a volatilização da matéria volátil e/ou à evaporação de água absorvida residual, já que os polissacarídeos tem a tendência de absorver água. O segundo evento é provável que esteja relacionada com a presença dos grupos acetato nos scaffolds, tal como confirmado nos resultados de FTIR. O terceiro evento mostrou uma perda de massa em temperaturas superiores a 200 ° C e este evento está relacionado à decomposição térmica dos materiais. Este resultado é semelhante aos encontrados por Osman e Arof (2003), Nunthanid et al. (2004) e Osman (2005), Fideles et al. (2013).

Para os scaffolds de quitosana reticulados por 15 minutos, com concentração de 1,5% (m/v), a perda de massa ocorreu em apenas duas etapas. A primeira etapa apresenta uma perda de massa de cerca de 4,55% e atinge um máximo de 63 ° C. A segunda etapa apresenta uma perda de massa de cerca de 39,29% e atinge um máximo de 282 ° C.

Para os scaffolds de quitosana reticulados por 30 minutos, com uma concentração de 1,5% (m/v), a perda de massa também ocorreu em apenas duas etapas. A primeira etapa apresentou uma perda de massa em torno de 12,88% e atinge um máximo de 52,5 ° C. A segunda etapa tem uma perda de peso de cerca de 50,16% e atinge um máximo a 276 ° C.

Para os scaffolds de quitosana reticulados por 15 minutos, com uma concentração de 2,0% (m/v), a perda de massa ocorreu também em apenas duas etapas. A primeira etapa exibiu uma perda de massa em torno de 6,97% e atinge um máximo de 62,8 ° C. A segunda etapa apresentou tem uma perda de massa de cerca de 48,45% e atinge um máximo a 249 ° C.

Para os scaffolds de quitosana reticulados por 30 minutos, com uma concentração de 2,0% (m/v), a perda de massa também ocorreu em apenas duas etapas. A primeira etapa exibiu uma perda de peso em torno de 8,0% e atinge um

máximo de 56,7 ° C. A segunda etapa apresentou uma perda de peso de cerca de 40,59 % e atinge um máximo a 279 °C.

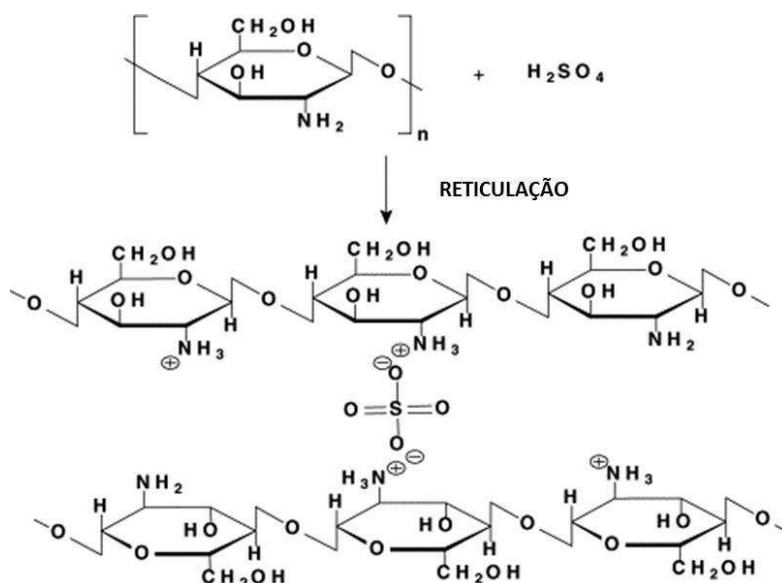
Uma análise dos resultados, para os scaffolds de quitosana reticulados em ambos os tempos e concentrações estudadas, revela que existem diferenças na posição do pico de decomposição, especialmente quando são comparados aos resultados obtidos para os scaffolds não reticulados. Estas diferenças podem ser atribuídas à capacidade de reter água pelos scaffolds e também à força de interações água-polímero. Além disso, o evento relativo a presença dos grupos acetato nos scaffolds não foi identificado. Estes grupos possivelmente foram removidos durante a reação de reticulação.

Os polissacarídeos geralmente são polímeros que possuem forte afinidade com água e conseqüentemente podem ser facilmente hidratados, resultando em macromoléculas com estruturas desordenadas e estas propriedades de hidratação dependem da estrutura primária e supramolecular dos polissacarídeos. Como consequência, variações nos resultados de análise térmica, no que diz respeito à posição e área dos picos relativos à perda de água, podem fornecer informações a respeito de mudanças físicas e moleculares causadas por reticulações (NETO et al., 2005).

Na quitosana, as moléculas de água que são absorvidas podem ser ligadas pelos dois grupos polares de quitosana, hidroxila e amina. Rueda et al. (1999) investigaram este fenômeno e verificaram que a interação da água com os grupos hidroxila é mais forte do que com os grupos amina. Conseqüentemente, poderia pensar-se que as moléculas de água ligadas a grupos amina podem ser removidas facilmente (a temperaturas mais baixas).

Observando as curvas TG/DTG para os scaffolds reticulados, especialmente aqueles submetidos a reações de reticulação por 15 minutos, pode-se observar que há um pico com um máximo em torno de 63 °C. Considerando-se que as reticulações com o ácido sulfúrico (H₂SO₄), os íons SO₄²⁻ são formadas através de ligações aos grupos aminas protonados (Figura 22), pode presumir-se que, os scaffolds reticulados apresentam um menor número de grupos amina disponíveis para interagir com as moléculas de água e, portanto, algumas moléculas de água que seriam vinculados a grupos amina irão se ligar aos grupos hidroxila e esta poderia ser a razão para uma mudança no primeiro estágio de temperatura e menor percentual de perda de massa.

Figura 22. Reação de reticulação entre a quitosana e o ácido sulfúrico. Fonte: MUKOMA et al., 2004.



De maneira geral, um aumento na quantidade da reticulação conduz a um aumento da temperatura de decomposição. Neste sentido, Neto et al. (2005) verificaram que a estabilidade térmica da quitosana está diretamente relacionada com o grau de reticulação e mostraram que um grau de reticulação muito baixo tende a reduzir a estabilidade da quitosana e quando as concentrações do agente de reticulação foram aumentadas, verificou-se um aumento da temperatura de decomposição. Com os resultados obtidos durante esta pesquisa, foram observados resultados semelhantes, porém com variações não significativas.

Quando comparados entre si, os scaffolds reticulados, houve uma pequena diminuição na temperatura dos scaffolds reticulados por 30 minutos, em comparação com os scaffolds reticulados por 15 minutos, muito embora esta diferença não se apresentou de forma significativa. Para a concentração de 2,0 % (m/v), os resultados foram observados de maneira oposta, pois os scaffolds de quitosana reticulado durante 15 minutos mostraram uma diminuição da temperatura de decomposição e aos 30 minutos mostraram um aumento da temperatura de decomposição, quando comparados com os scaffolds não reticulado, como também encontrado por Neto et al. (2005).

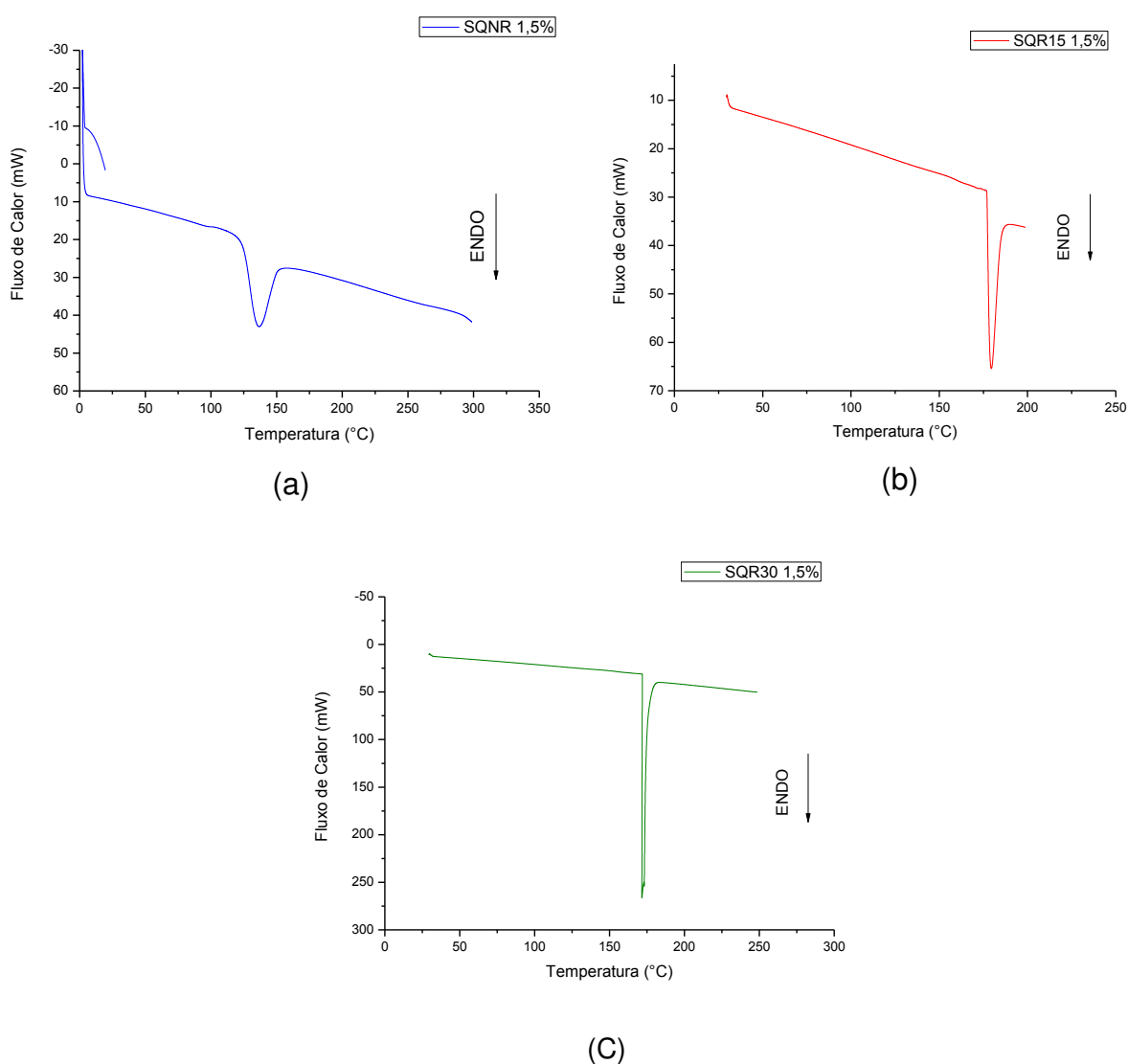
Uma possível explicação para estes resultados é a reação de reticulação ser heterogênea e as distribuições de ligação transversal ao longo da cadeia de quitosana são aleatórias, resultando em diferenças no grau de reticulação. Além disso, resultados anteriores encontrados por Fidèles (2010) evidenciaram que como as reticulações iônicas são características em produzir ligações reversíveis,

com um tempo superior a 15 minutos de reação, possivelmente provoca um deslocamento no sentido do equilíbrio químico da reação, com os íons H^+ capturando os íons SO_4^{2-} .

5.1.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As Figuras 23 e 24 ilustram os resultados de DSC para os scaffolds de quitosana não reticulados e reticulados, para ambas as concentrações 1,5 e 2,0% (w/v) e tempos de reticulação (15 e 30 minutos), respectivamente.

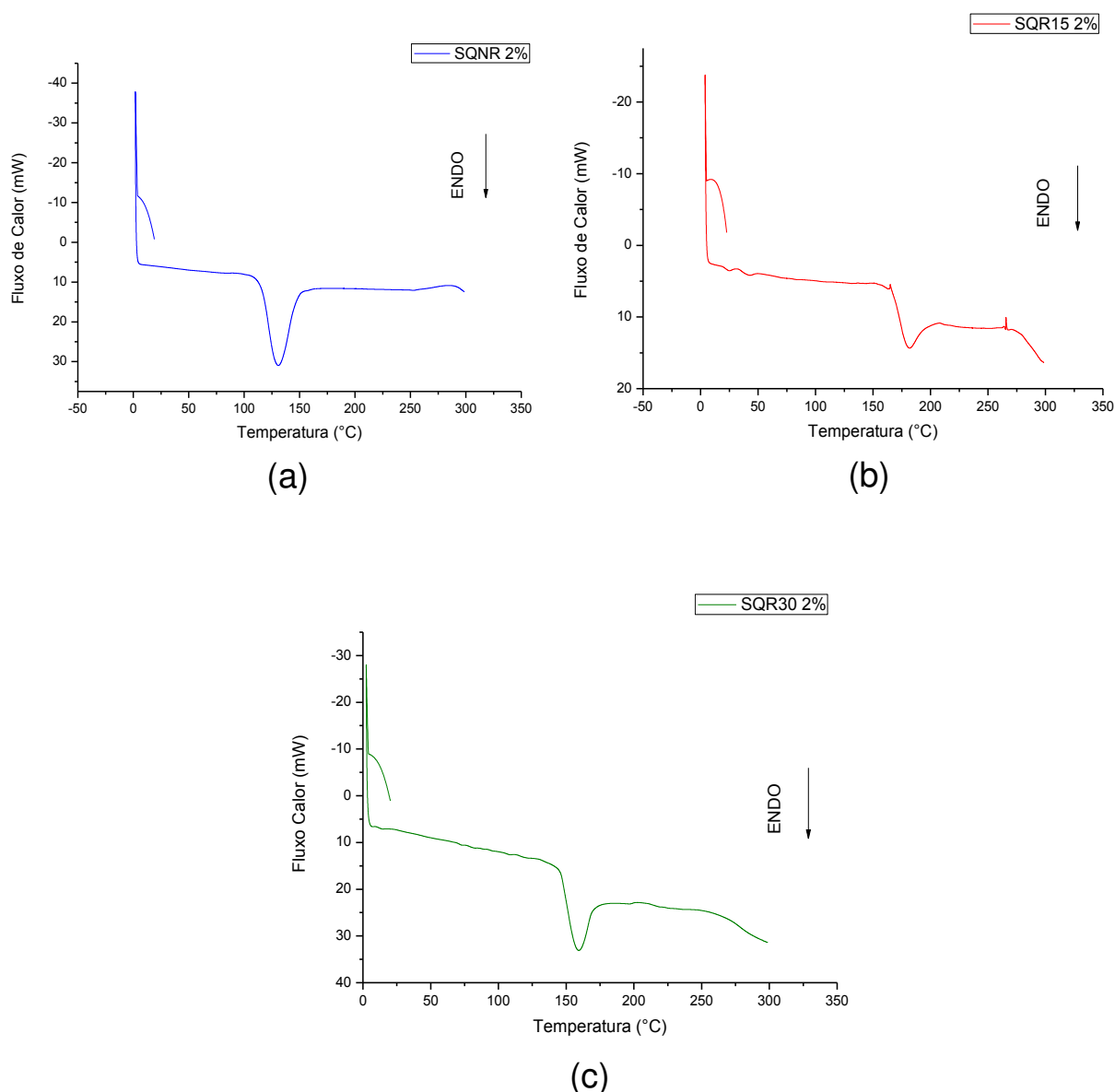
Figura 23. Curvas DSC para a) SQNR, (b) SQR15 e (c) SQR30 com concentração de 1,5 % (m/v).



Nos resultados de DSC para os scaffolds de quitosana não reticulados, com uma concentração de 1,5% (m/v) foi identificado um pico endotérmico em 136,5 °C, possivelmente devido à presença dos grupos acetatos, como

identificado por FTIR. Para os scaffolds de quitosana reticulado por 15 minutos foi identificado um pico endotérmico em 179,6 °C e para scaffolds de quitosana reticulado por 30 minutos foi identificado um pico endotérmico em 172 °C. Estes picos endotérmicos apareceram possivelmente devido à presença do enxofre, dos íons sulfatos, caracterizando também a presença das reticulações. Assim como identificado nos resultados de FTIR e TG/DTG, não houve picos referentes aos íons carboxilados.

Figura 24. Curvas DSC para a) SQNR, (b) SQR15 e (c) SQR30 com concentração de 2,0 % (m/v).



Já nos resultados de DSC para os scaffolds de quitosana não reticulados, com uma concentração de 2,0% (m/v) foi identificado um pico endotérmico em 130,9 °C, possivelmente devido à presença dos grupos acetatos, como

identificado por FTIR. Para os scaffolds de quitosana reticulado por 15 minutos foi identificado um pico endotérmico em 180,5 °C e para scaffolds de quitosana reticulado por 30 minutos foi identificado um pico endotérmico em 159,3 °C. Estes picos endotérmicos apareceram possivelmente devido à presença do enxofre, dos íons sulfatos, caracterizando também a presença das reticulações.

Analisando ambos os resultados, observa-se que a vaporização da água não foi identificada como já ilustrado nos resultados por análise termogravimétrica, onde os scaffolds apresentaram teor de água entre 6 e 14% e de acordo com a literatura, com este teor de água, apenas a água não congelável se faz presente. A água se faz presente em 3 formas nas macromoléculas: água congelável livre e fracamente ligada, água congelada com ponto de fusão abaixo da água pura e água fortemente ligada a grupos hidrofílicos e que não congelam. Além disso, os resultados revelaram diferenças nas áreas e posições dos picos endotérmicos, indicando que os scaffolds de quitosana, não reticulados e reticulados, diferem na capacidade de reter água e na força das interações água-polímero e habilidade de um scaffolds em preservar a água é um importante aspecto para avaliar suas propriedades visando uma futura aplicação na Engenharia de Tecidos (NETO et al., 2005; DHAWADE E JAGTUP, 2012; SECONDAS et al., 2012).

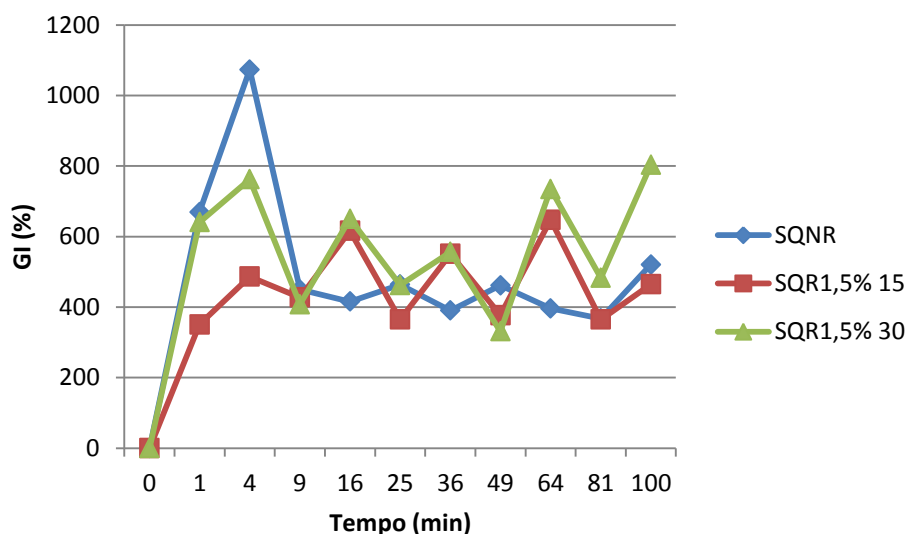
No caso dos scaffolds reticulados, a posição dos picos foi mudada para temperaturas mais altas, indicando que a interação da água com estes scaffolds é mais forte que nos scaffolds não reticulados, e estão de acordo com os resultados obtidos por TG e por está razão, a explicação pode ser a mesma dada na seção anterior. As reações de reticulação ocorrem com os grupos amino da quitosana. Então, o scaffolds reticulado irão ter menos grupos amina disponíveis para formar pontes de hidrogênio com as moléculas de água e conseqüentemente, a maioria das moléculas de água irão se ligar aos grupos hidroxila da quitosana, em vez dos grupos amina e, sendo as pontes de hidrogênio com os grupos hidroxila da quitosana mais fortes que quando ligadas aos grupos amina, é de se esperar que maiores temperaturas sejam necessárias para remover as moléculas de água (NETO et al., 2005).

5.1.5 Grau de Intumescimento (%GI)

Para avaliar a possibilidade de aplicação biomédica, os scaffolds de quitosana não reticulados e reticulados foram submetidos a um processo de intumescimento em solução de PBS (pH 7,4). O comportamento do intumescimento de qualquer rede polimérica depende de alguns fatores como a natureza química do polímero, a compatibilidade polímero-solvente e do grau de reticulação. Além disso, medidas de intumescimento são métodos apropriados para demonstrar a presença de reticulações (QU et al., 2004; SECONDAS et al., 2012).

A Figura 25 ilustra os resultados de Grau de Intumescimento (%GI) para os scaffolds de quitosana não reticulados e reticulados, para as concentrações de 1,5% (m/v) e tempos de reticulação (15 e 30 minutos), respectivamente.

Figura 25. Grau de intumescimento para SQNR, SQR15 e SQR30 com concentração de 1,5 % (m/v).



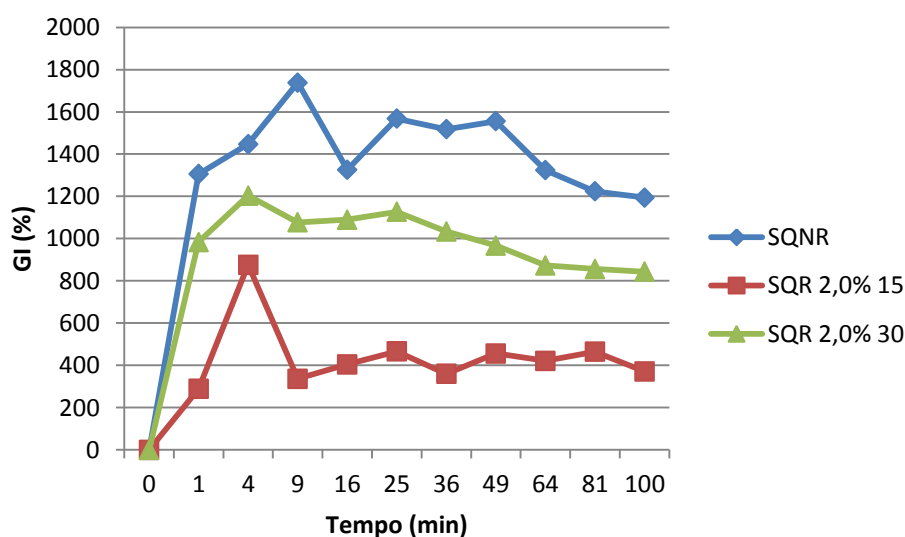
Nota-se nos resultados que os scaffolds, não reticulados e reticulados, apresentaram alta capacidade de absorção e habilidade de retenção da solução de PBS, uma vez que absorveram mais líquido do que seus próprios pesos, com valores acima de 100%.

Observando os resultados com 1 minuto de contato com a solução de PBS, pode ser visto que os scaffolds não reticulados (SQNR), com concentração de 1,5% (m/v) apresentaram valores quase 8 vezes superior quando comparados

com o peso seco do scaffold, chegando a 669%. O mesmo scaffold apresenta um pico máximo de 1073% em 4 minutos, depois uma queda e uma estabilidade durante os minutos seguintes. Para os scaffolds reticulados por 15 minutos (SQR 1,5% 15), houve uma diminuição no grau de intumescimento no primeiro minuto, com os valores caindo quase que pela metade em relação ao não reticulado. Observa-se também que a partir de 9 minutos, há uma oscilação até 100 minutos, quando ocorreu a desintegração da estrutura. Nos scaffolds reticulados por 30 minutos (SQR 1,5% 30), para o primeiro minuto percebe-se que os valores de intumescimento subiram para próximo dos valores obtidos em SQNR, em 640%. Entretanto, apresentou o mesmo perfil de oscilação que os SQR 1,5% 15 até a desintegração da estrutura.

A Figura 26 ilustra os resultados de Grau de Intumescimento (%GI) para os scaffolds de quitosana não reticulados e reticulados, para as concentrações 2,0% (m/v) e tempos de reticulação (15 e 30 minutos), respectivamente.

Figura 26. Grau de intumescimento para SQNR, SQR15 e SQR30 com concentração de 2,0 % (m/v).



Assim como os scaffolds não reticulados e reticulados, com concentração de 1,5%, nota-se nos resultados que os scaffolds com concentração de 2,0%, apresentaram alta capacidade de absorção e habilidade de retenção da solução de PBS, uma vez que absorveram mais líquido do que seus próprios pesos, com valores acima de 100% e esta capacidade pode ser atribuídas a dois fatores: a hidrofiliabilidade do sistema e a presença de uma estrutura tridimensional e porosa

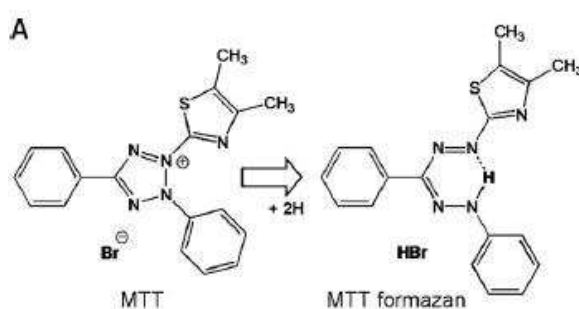
no scaffolds. Pode ser visto que os scaffolds não reticulados (SQNR), com concentração de 2,0% (m/v) apresentou peso 14 vezes maior quando comparado com o peso seco do scaffolds, chegando a 1305%. Apresenta um pico máximo de 1738%, em 9 minutos, uma oscilação entre 25 e 49 minutos, uma queda subsequente e estabilidade do comportamento. Para os scaffolds reticulados por 15 minutos (SQR 2,0% 15), houve uma diminuição no grau de intumescimento no primeiro minuto, com os valores bem abaixo em relação ao não reticulado, com 289%. Observa-se também que a partir de 9 minutos, há uma oscilação até 100 minutos, quando ocorreu a desintegração da estrutura. Nos scaffolds reticulados por 30 minutos (SQR 2,0% 30), para o primeiro minuto percebe-se que os valores de intumescimento subiram para próximo dos valores obtidos em SQNR, em 640%. Entretanto, apresentou o mesmo perfil de oscilação que os SQR 1,5% 15 até a desintegração da estrutura.

Quando os scaffolds de quitosana são colocados em contato com a solução de PBS, o líquido se difunde na estrutura polimérica, causando o intumescimento, ou seja, ocorre a migração da solução de PBS nos espaços pré-existentes, tanto nas cadeias dos scaffolds como na estrutura tridimensional. O intumescimento dos scaffolds, não reticulados e reticulados, pode ser atribuído a dois fatores: tanto ao caráter hidrofílico como também à manutenção da estrutura tridimensional dos scaffolds. Em outras palavras, a quitosana contém grupos aminos primários (-NH₂) e hidroxilas (-OH) e estes grupos são responsáveis por aumentar a afinidade com a água e soluções aquosas, mas também forma pontes de hidrogênio. É sabido que quando as cadeias macromoleculares de um polímero são fixas por reticulações, sejam elas iônicas ou químicas, a habilidade de intumescer da rede polimérica é reduzida. Além disso, outros fatores podem ter contribuído para que os scaffolds reticulados apresentassem menor %GI, como por exemplo, a microestrutura mais densa, conforme já discutido nos resultados de MEV. Resultados similares foram encontrados por Ma et al. (2003), Mi et al. (2003), Jiankang et al. (2009), Yang et al. (2010), Fideles et al. (2013).

5.1.6 Citotoxicidade

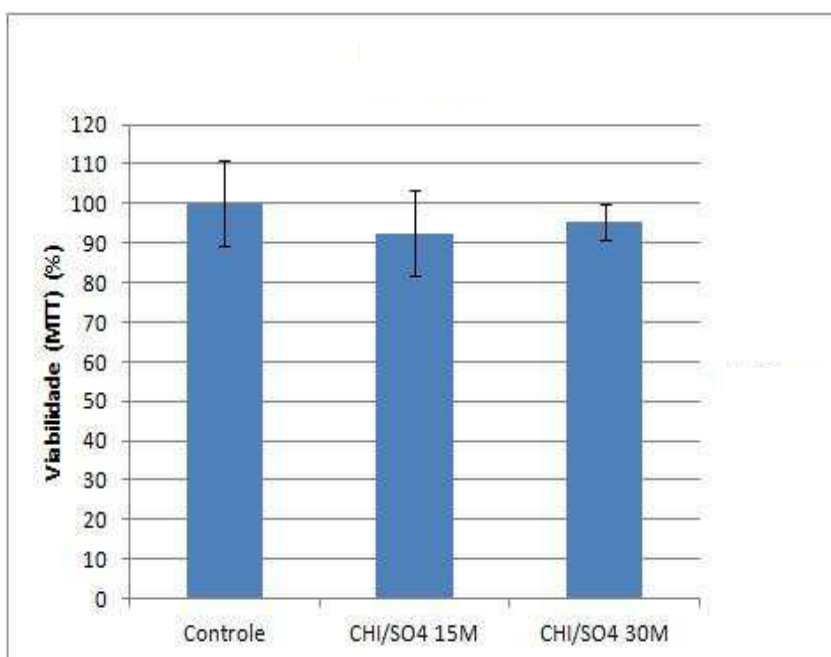
Os testes de citotoxicidade são um importante aspecto dos biomateriais. Um biomaterial ideal não deve liberar nenhum produto tóxico ou produzir reações adversas, as quais podem ser avaliadas por testes citotóxicos *in vitro* (LI et al., 2009). A redução do MTT (Figura 27) é um método colorimétrico rápido, frequentemente usado para medir proliferação celular e citotoxicidade (FERRARI et al., 1990; CIAPETTI et al., 1993; STOCKERT et al., 2012).

Figura 27. Estrutura química do MTT e do formazan. Fonte: STOCKERT et al., 2012.



A Figura 28 apresenta o resultado da viabilidade dos macrófagos cultivados em contato com os scaffolds reticulados. As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100 % de viabilidade e estão representadas na primeira coluna (CN=controle negativo).

Figura 28. Atividade metabólica celular em contato com os scaffolds reticulados de quitosana.

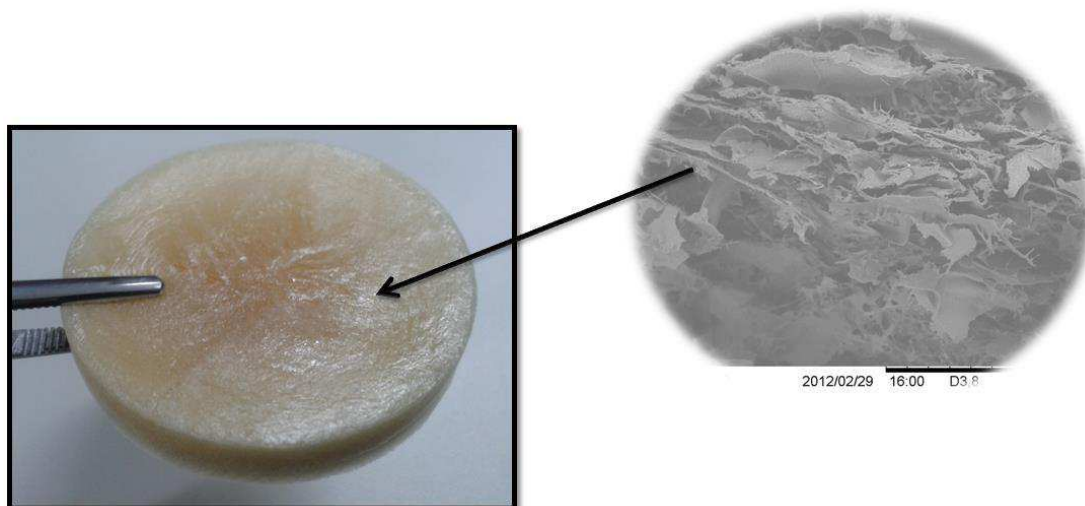


A viabilidade celular foi avaliada utilizando o método da redução do MTT. Ao observar o gráfico, a atividade metabólica celular para todas as amostras apresentou valores acima de 80%, e que estatisticamente ($p < 0,05$), não houve diferenças significativas. Com isso, pode ser considerado que nenhuma amostra apresentou caráter citotóxico em contato com os macrófagos. Isso permite afirmar que, nenhuns dos scaffolds de quitosana reticulados liberam produtos que se apresentem tóxicos em contato com as células. Fideles (2010) encontrou resultados similares.

5.2 ETAPA II

A segunda etapa foi desenvolvida buscando-se aperfeiçoar o processo de produção de scaffolds com estrutura tridimensional porosa, através de modificações no processo inicial. Muito embora os resultados obtidos durante a etapa I tenham sido satisfatórios do ponto de vista do sucesso da reticulação iônica dos scaffolds de quitosana e mais ainda, o agente reticulado utilizado, o ácido sulfúrico, não tenha causado efeitos citotóxicos considerados relevantes para as células, os resultados em termos de microestrutura não foram satisfatórios, pois o seguido processo de obtenção dos scaffolds (solução, congelamento, liofilização, neutralização, lavagem, reticulação, congelamento e liofilização) comprometeu a estrutura interna (Figura 29).

Figura 29. Microestrutura do scaffold desenvolvido ao longo da etapa I.



Baseado nisto, foi pensado em uma nova metodologia de obtenção dos scaffolds, buscando-se a preservação da estrutura tridimensional e tentando diminuir as etapas de produção. Sendo assim, foram preparadas esferas de quitosana em um banho coagulante com uma solução de tripolifosfato, e desta maneira, poderia coagular e reticular a quitosana ao mesmo tempo. Inicialmente, foi pensado apenas na possibilidade de tentar agregar as esferas por adesão mecânica, por centrifugação. Entretanto, após a liofilização, as esferas se separavam, não preservando a estrutura tridimensional. Neste sentido, foi adicionada uma solução de gelatina às esferas para agrega-las e assim preservar a estrutura tridimensional e porosa dos scaffolds, conforme ilustrado na Figura 30.

Figura 30. Produção de scaffolds de quitosana pelo método de agregação de partículas.

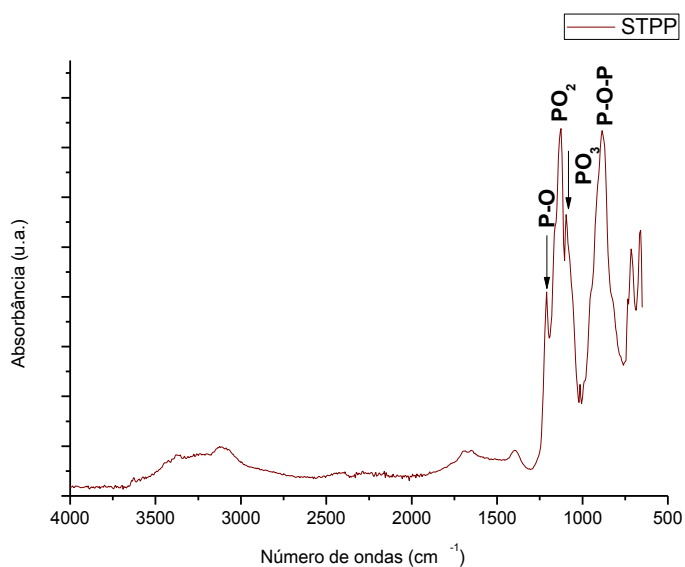


A quitosana se torna solúvel em ácidos fracos devido à protonação dos grupos aminos presente na quitosana, tornando assim um polissacarídeo catiônico. Poliânions são utilizados amplamente para obter scaffolds de quitosana reticulados ionicamente. Soluções de quitosana são coaguladas com a presença do poliânion tripolifosfato através da formação de um par iônico.

5.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 31 está ilustrado o espectro de FTIR para o tripolifosfato de sódio (STTP).

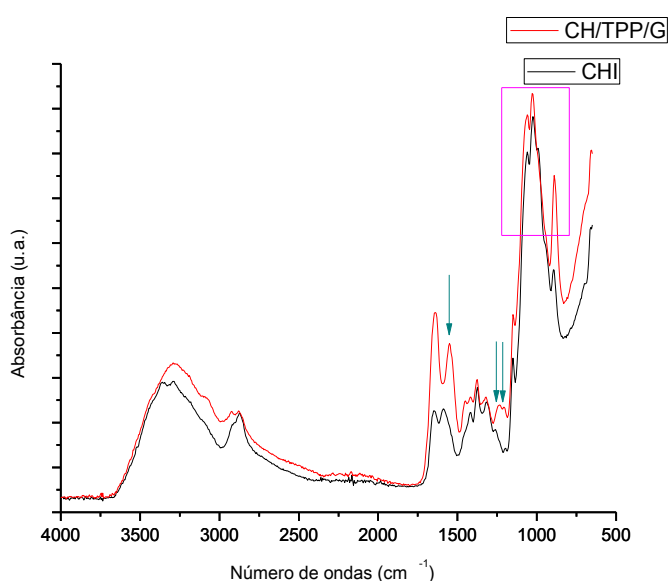
Figura 31. Espectro de FTIR para o tripolifosfato de sódio (STTP)



O espectro de FTIR do tripolifosfato de sódio puro apresentou bandas na em 1207 cm^{-1} , característica do alongamento P-O, em 1128 cm^{-1} , característica da vibração simétrica e assimétrica de alongamento dos grupos PO_2 , em 1092 cm^{-1} relativa à vibração simétrica e assimétrica de alongamento dos grupos PO_3 e 885 cm^{-1} , característica do alongamento assimétrico da ligação P-O-P (MARTINS et al., 2012).

A Figura 32 ilustra os resultados de FTIR para a quitosana (CHI) e para os scaffolds de quitosana/TPP (CHI/TPP/G).

Figura 32. Espectro de FTIR para quitosana (CHLMW) e os scaffolds CH/TPP/G.

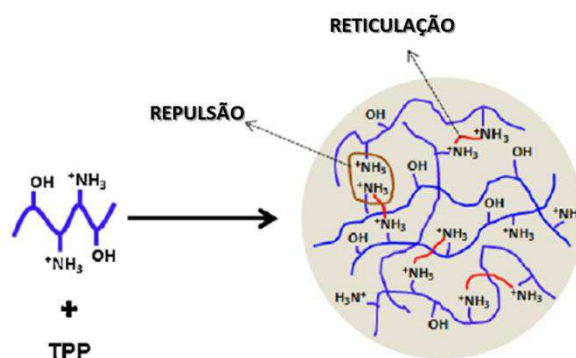


Após a obtenção dos scaffolds, algumas mudanças significativas nos espectros podem ser encontradas, quando comparadas com o espectro da quitosana. As bandas fracas em 1237 e 1207 cm^{-1} , podem ser atribuídas ao alongamento P=O, a vibração da banda em 893 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico da ligação P-O-P. A presença destas bandas indica a presença de grupos de fosfato nas partículas CHI/TPP/G. A banda a 1064 cm^{-1} atribuída ao alongamento de ligações C-O de álcoois primários apresentou diferenças significativas na comparação com os espectros de FTIR do quitosana. A banda a 1591 cm^{-1} que aparece no espectro de quitosana pura, atribuída à deformação N-H dos grupos amina, está ausente no espectro dos scaffolds de quitosana/TPP, surgindo uma nova banda localizada em 1549 cm^{-1} , relativo ao grupo amina protonada (NH_3^+). A partir destes resultados, pode-se afirmar que a reticulação foi

eficaz através de interações iônicas entre os grupos fosfatos carregados negativamente ($P-O^-$) das cadeias do TPP e os grupos amino protonados (NH_3^+) das cadeias de quitosana (SHU e ZU, 2002; MARTINS et al., 2012; PATI et al., 2012).

Em meio ácido, os grupos amino da molécula de quitosana que estão protonados (NH_3^+) interagem instantaneamente com o ânion tripolifosfato (PO_4^{2-}) através de uma interação eletrostática (Figura 33), sendo transformada em gel composto por quitosana/TPP. Esta capacidade de geleificação através da presença do TPP é importante devido à simultânea reticulação e coagulação da quitosana durante a formação das partículas, e esta extensiva e imediata reticulação se dá pela alta densidade de carga presente no TPP (PATI et al., 2011; KIECHEL & SCHAUER, 2013).

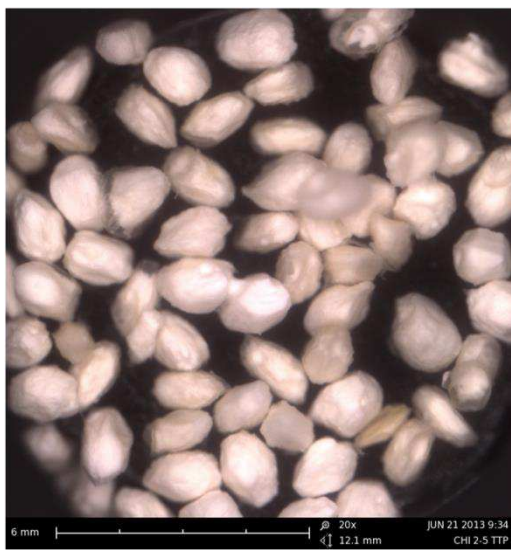
Figura 33. Esquema da reticulação entre a quitosana e o TPP. Fonte: MARTINS et al., 2012.



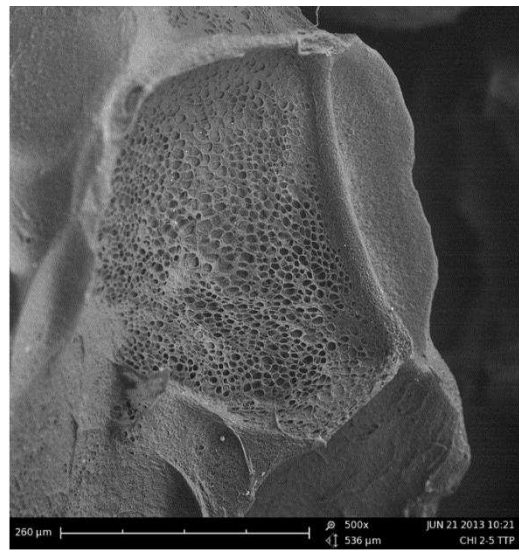
5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (MEV/EDS)

As esferas de quitosana foram caracterizados através de MEV e os resultados são apresentados na Figura 34. Utilizando o processo de geleificação ionotrópica e agregação de partículas, foi possível obter esferas e consequentemente scaffolds com tamanho de poros variados e bem definidos.

Figura 34. MEV das esferas produzidas pelo método de geleificação ionotrópica. Aumentos de (a) 20X; (b) e (c) 500X; (d) 1000X.



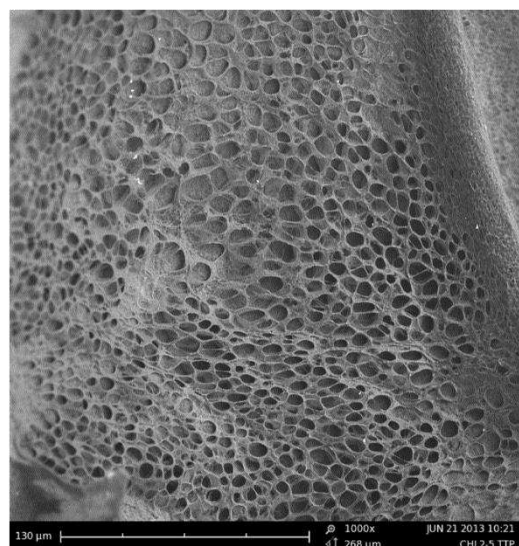
(a)



(b)



(c)

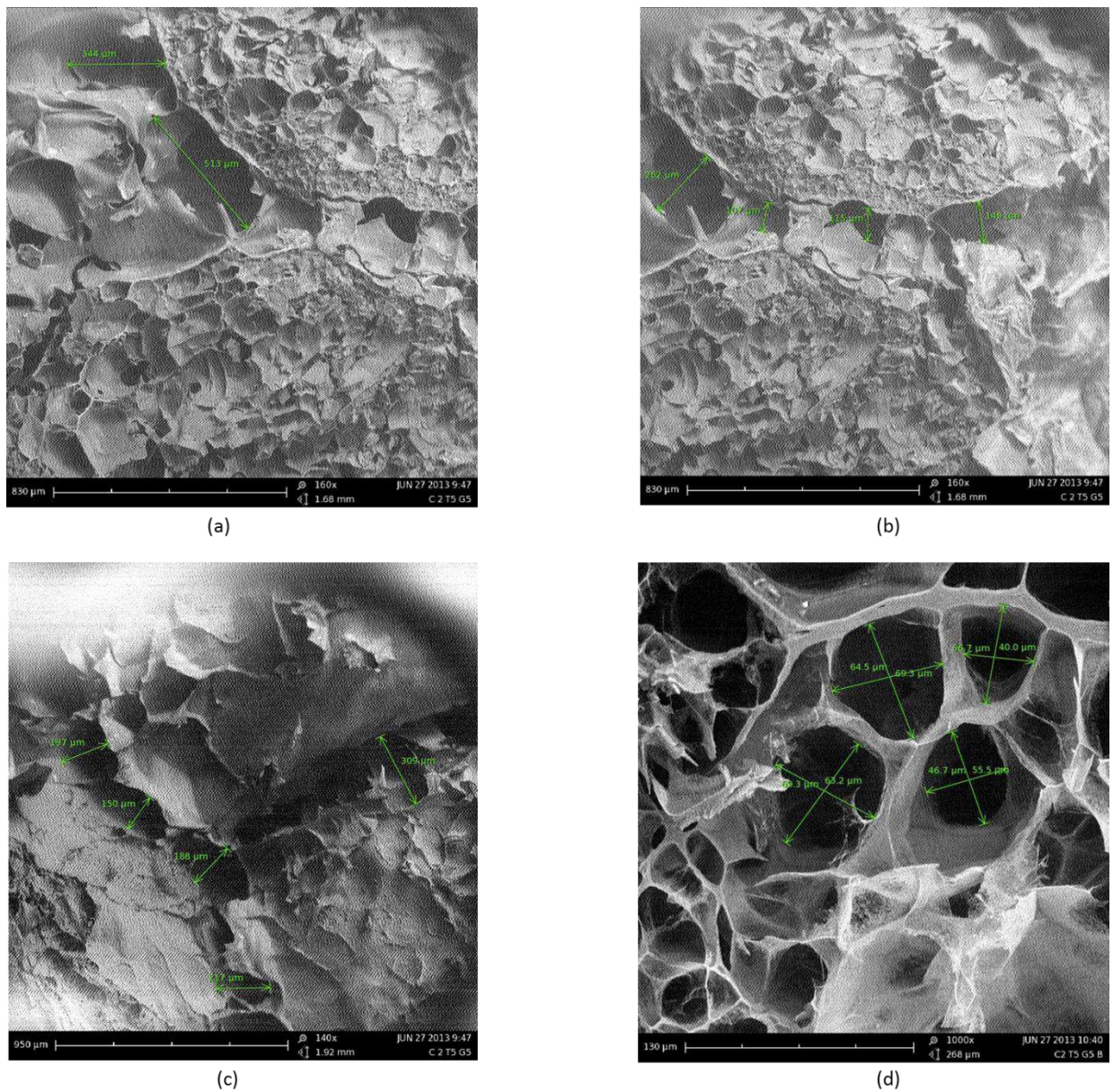


(d)

Analisando os resultados de MEV para as esferas obtidas pelo processo de geleificação ionotrópica, observa-se que elas se apresentam sem agregação entre elas sem a presença da gelatina, com tamanhos e formatos regulares (Figura 34a). As esferas apresentaram também uma superfície rugosa, o que poderá favorecer uma futura adesão e proliferação celular, pois a arquitetura, composição química e topografia de um scaffold são parâmetros críticos para uma adesão e proliferação celular.

Os scaffolds CHI/TPP/G foram caracterizados através de MEV e os resultados são apresentados na Figura 35.

Figura 35. MEV dos scaffolds CHI/TPP/G. a) 100X; b) 100X; c) 140X e d) 1000X

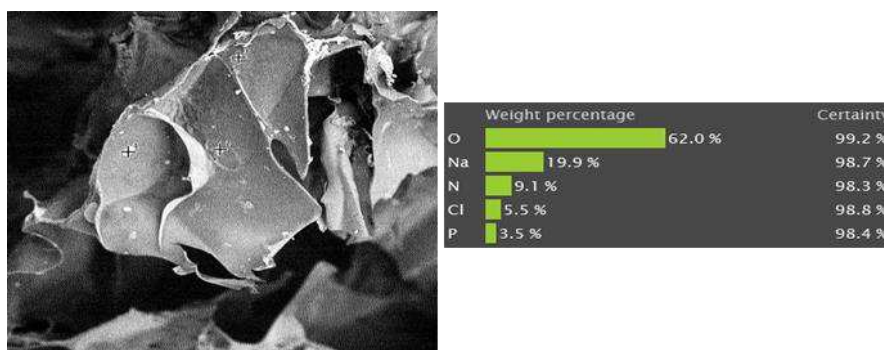


Os scaffolds obtidos possuem uma superfície rugosa e com maior porosidade confirmada pelas imagens de MEV. Este tipo de superfície foi formada devido, principalmente à liofilização dos scaffolds. Os scaffolds de quitosana foram obtidos com diâmetros de poro que variam de 40-262 μm e com a morfologia dos poros bem definidas (Fig. 35a e 35b). Com os resultados por MEV, é possível observar que os poros estão interconectados em padrões irregulares. Para confirmar esta observação, a porosidade dos scaffolds foi estimada. De acordo com os cálculos realizados, os scaffolds apresentaram uma porosidade média de 55%. Kucharska et al. (2010) produziram scaffolds de quitosana pelo método de agregação de partículas e encontraram valores médios de porosidade de 40%. Malafaya et al. (2008) também produziram scaffolds de quitosana pelo método de agregação de partículas e encontraram valores médios de porosidade de 28%.

Além disso, pelas imagens é possível identificar as partículas de quitosana agregadas foi conseguida devido ao caráter bioadesivo do polímero de gelatina, que resultou na união de partículas adjacentes nos seus pontos de contato para formar o scaffold de quitosana/TPP (Fig. 34c).

A análise elementar por EDS foi realizada para a estimativa quantitativa do Nitrogênio (N), Fósforo (P), presentes nos scaffolds de quitosana/TPP scaffolds produzidos. Os resultados são apresentados na Figura 36.

Figura 36. EDX para os scaffolds CHI/TPP/G.



Através dos resultados de EDS também pôde ser confirmada a reação de reticulação entre o TPP e a quitosana, com a presença do pico de fósforo (P) para as amostras reticuladas, como mostrado nos resultados do FTIR. Os picos de sódio (Na) e cloro (Cl), que apareceram nos resultados estão provavelmente

relacionados aos resíduos da solução de PBS, que ficaram impregnados nos scaffolds.

5.2.3 Termogravimetria (TG/DTG)

A Figura 37 ilustra os resultados de TG/DTG para a quitosana (CHI) e para os scaffolds de quitosana (CH/TPP/G). Para melhor visualização dos eventos térmicos, os resultados de TG foram analisados também através do cálculo da derivada (DTG).

Figura 37. Curvas TG/DTG para (a) quitosana em pó e (b) scaffold de quitosana.

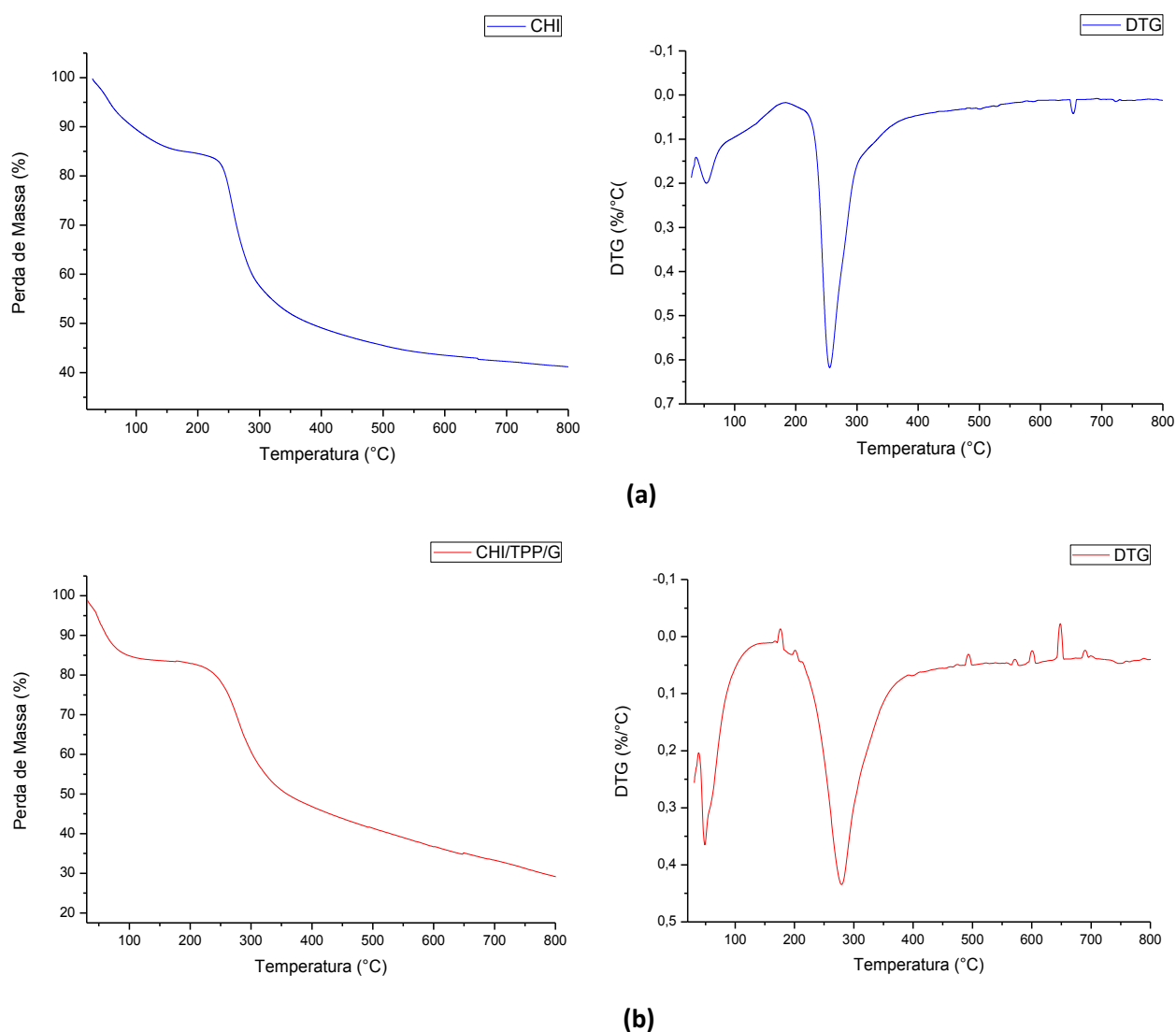


Tabela 3. Eventos térmicos para quitosana (CHI) e scaffolds de quitosana (CHI/TPP/G).

ETAPAS	PERDA (%)	TEMPERATURA (°C)
	14,84	54,18
CHI	38,72	254,58
	14,82	47,35
CHI/TPP/G	38,56	278,88

Nos resultados de TG/DTG para a quitosana pura (CHI) foi identificado que a perda de massa ocorreu em duas etapas. A primeira etapa apresentou uma perda de massa de cerca de 14,84% e atinge um máximo de temperatura em 54,18 °C. A segunda etapa apresentou uma perda de massa de cerca de 38,56%, com um máximo a 254,58 °C.

Já para os resultados de TG/DTG para os scaffolds de quitosana (CHI/TPP/G) foi identificado que a perda de massa ocorreu também em duas etapas. A primeira etapa apresentou uma perda de massa de cerca de 14,82% e atinge um máximo de temperatura em 47,35 °C. A segunda etapa apresentou uma perda de massa de cerca de 38,56%, com um máximo a 278,88 °C.

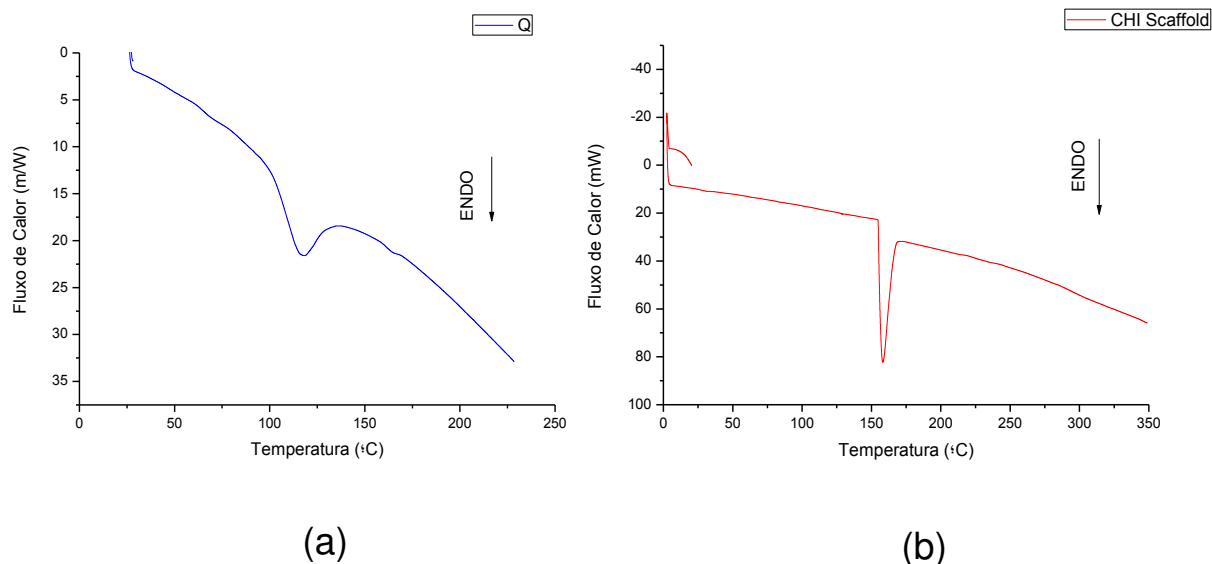
Analisando os resultados de TG/DTG para para a quitosana (CHI) pode-se afirmar que o primeiro evento identificado representa a volatilização de moléculas pequenas e/ou à evaporação de água absorvida residual, já que é sabido que os polissacarídeos tem a tendência de absorver água. O segundo evento mostrou uma perda de massa em temperaturas superiores a 200 °C e este evento pode estar relacionado a um complexo processo que envolve a desidratação dos anéis sacarídicos, assim como decomposição térmica das unidades acetiladas e desacetiladas da quitosana (LIU et al., 2014).

Assim, o aumento da temperatura de decomposição da quitosana obtida após reticulação com TPP, pode ser justificado pelas ligações criadas por esta reticulação, aumentando a energia necessária para decompor a macromolécula.

5.2.4 Calorimetria Exploratória Experimental (DSC)

A Figura 38 ilustra o resultados de DSC para os scaffolds de quitosana.

Figura 38. DSC da (a) quitosana pura (Q) e (b) scaffold de quitosana (CHI/TPP/G)

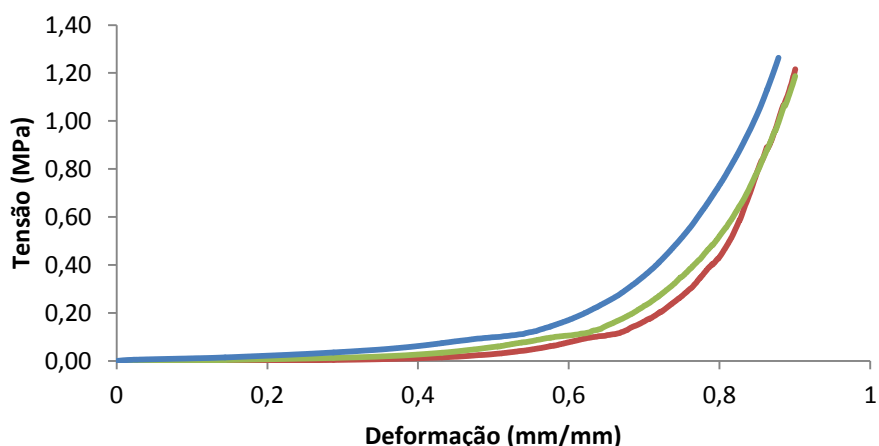


Nos resultados de DSC para quitosana pura foi identificado um pico endotérmico em 116,7 °C. Para os scaffolds de quitosana foi identificado um pico endotérmico em 158 °C. O pico endotérmico muda de posição para temperaturas maiores possivelmente devido à presença de reticulações, que são introduzidas pelo íons fosfatos do TPP, conforme já discutido nos resultados obtidos por FTIR. Isto indica que a interação da água com estes scaffolds é mais forte que na quitosana pura, e estão de acordo com os resultados obtidos por TG e por esta razão, a explicação pode ser a mesma dada na seção anterior. Como as reações de reticulação ocorrem com os grupos amina da quitosana, os scaffolds reticulados irão ter menos grupos amina disponíveis para formar pontes de hidrogênio com as moléculas de água e consequentemente, a maioria das moléculas de água irão se ligar aos grupos hidroxila da quitosana, em vez dos grupos amina e, sendo as pontes de hidrogênio com os grupos hidroxila da quitosana mais fortes que quando ligadas aos grupos amina, é de se esperar que maiores temperaturas sejam necessárias para remover as moléculas de água (NETO et al., 2005; TSAI & WANG, 2008; FIDELES, 2013).

5.2.5 Resistência à Compressão

Ensaio de compressão foram realizados para gerar a curva tensão-deformação e calcular o módulo de Young (E). A inclinação inicial da curva foi usada para calcular o módulo a 10% de deformação, uma vez que as curvas apresentaram uma região elástica em valores muito baixos de tensão. A Figura 39 ilustra a curva tensão-deformação dos scaffolds de quitosana/TPP.

Figura 39. Curva Tensão-Deformação para scaffolds de quitosana (CHI/TPP/G).



As curvas obtidas mostram que os três scaffolds estudados apresentaram características similares a esponjas poliméricas. Os valores médios para o módulo de Young (E) foram de 0,0529 Mpa, e indicam que os scaffolds apresentaram uma estrutura bastante elástica e facilmente moldável, uma vez que a tensão necessária para deformar o scaffold é pequena. Sabe-se que a quitosana é um polímero semi-cristalino e os valores de módulo e tensão baixos podem ser atribuídos ao baixo grau de cristalinidade, conforme descrito por Wan et al. (2008). Yao et al. (2012) produziram scaffolds de quitosana e encontraram valores do módulo (E) de 0.0387 MPa. Outro fator que pode influenciar no comportamento mecânico dos scaffolds de quitosana é o Grau de Desacetilação (GD), que possui influência em diversas propriedades da quitosana, incluindo cristalinidade, degradação e resistência mecânica.

No estágio inicial de compressão, os scaffolds apresentaram baixa resistência à tensão, onde a identificação da região elástica linear é quase imperceptível. Esta região elástica linear ocorre devido à flexão das paredes dos poros. Após isto, a partir de 20% de deformação pode ser observado um longo

platô na curva e se inicia a compactação dos poros. Esta região corresponde a uma alta absorção de energia, em que os espaços ocupados pelos poros são preenchidos pelo material comprimido. Em seguida ao regime platô, claramente há um aumento gradual da tensão a partir de 50%. Este comportamento da curva tensão-deformação é chamado de densificação. Neste ponto, as paredes dos poros se tocam umas nas outras, proporcionando uma maior resistência à tensão. Como a região elástica linear é difícil de identificar, é provável que ocorra a flambagem e o colapso dos poros ao mesmo tempo. Perfis similares foram encontrados por Fook (2012), Wan et al. (2008) e Zhu et al. (2014).

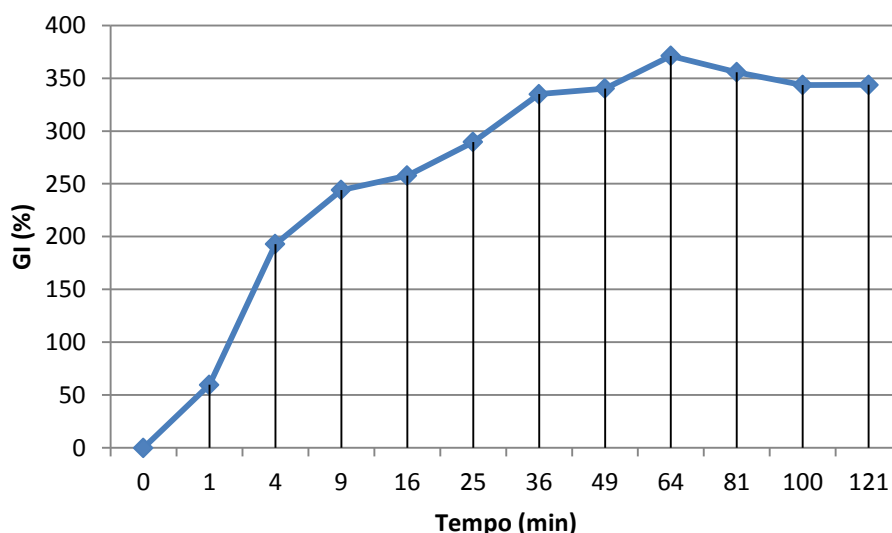
As propriedades mecânicas dos scaffolds porosos não dependem apenas do tipo de material a ser utilizado na fabricação, mas também está diretamente relacionado à microestrutura, porosidade e tamanho dos poros e em como estes poros estão distribuídos ao longo do scaffold. De maneira particular, uma alta porosidade, que é desejada para facilitar a infiltração celular e crescimento do novo tecido, resulta em uma redução das propriedades mecânicas. Como os scaffolds desenvolvidos apresentaram uma média de porosidade acima de 55%, este pode ser um dos fatores que estejam influenciando diretamente na resistência mecânica obtida, uma vez que tende a aumentar a flexão das paredes dos poros e assim, uma instabilidade durante o ensaio de compressão. O que deve ser enfatizado é o fato de todas as amostras submetidas ao ensaio permanecerem resistentes e não sofreram quebra durante o ensaio, principalmente devido ao caráter praticamente amorfo dos constituintes. As propriedades mecânicas dos scaffolds podem ser melhoradas através da introdução de reticulações ou formação de compósitos com incorporação de cerâmicas (MALAFAYA et al., 2005; SALERNO, A & NETTI, P.A., 2014).

Cabe ressaltar ainda, que um scaffold não necessita apresentar propriedades mecânicas equivalentes do tecido a ser reposto, mas sim fornecer um ambiente mecânico suficiente.

5.2.6 Grau de Intumescimento (%GI)

A Figura 40 ilustra os resultados de Grau de Intumescimento (%GI) para os scaffolds de quitosana (CHI/TPP/G).

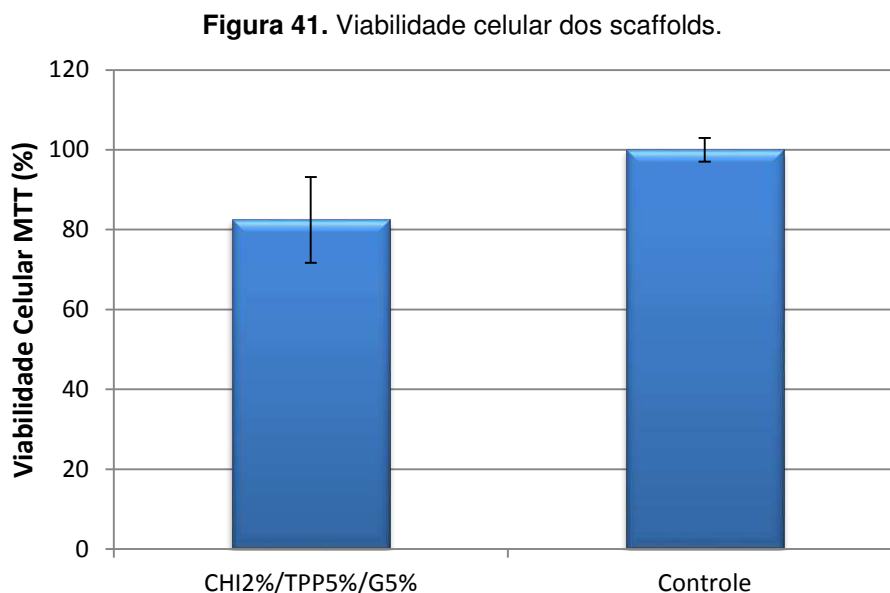
Figura 40. Grau de intumescimento dos scaffolds de quitosana (CHI/TPP/G).



As proporções de intumescimento dos scaffolds quitosana/TPP estão acima de 50% após imersão em PBS durante 1 min e aumenta com o tempo, o que indica que os scaffolds apresentam elevada hidrofiliicidade. Aos 49 minutos, a curva de grau de intumescimento tem uma pequena queda e entra em equilíbrio até a dissolução e/ou desagregação dos scaffolds. Mesmo com a presença de reticulações no sistema, que já foi visto que diminui a capacidade de intumescer, outros fatores que podem ter influenciado a absorção de água são os tamanhos dos poros e a porosidade dos scaffolds e consequentemente, provocou um aumento na área superficial dos scaffolds. Além disso, a presença da gelatina pode ter contribuído para o aumento do grau de intumescimento, já que além dos grupos amina e hidroxilas da quitosana, a gelatina apresenta grupos hidrofílicos ao longo de sua estrutura.

5.2.7 Citotoxicidade

A Figura 41 apresenta o resultado da viabilidade dos macrófagos cultivados em contato com os scaffolds reticulados. As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade e estão representadas na segunda coluna (controle negativo).



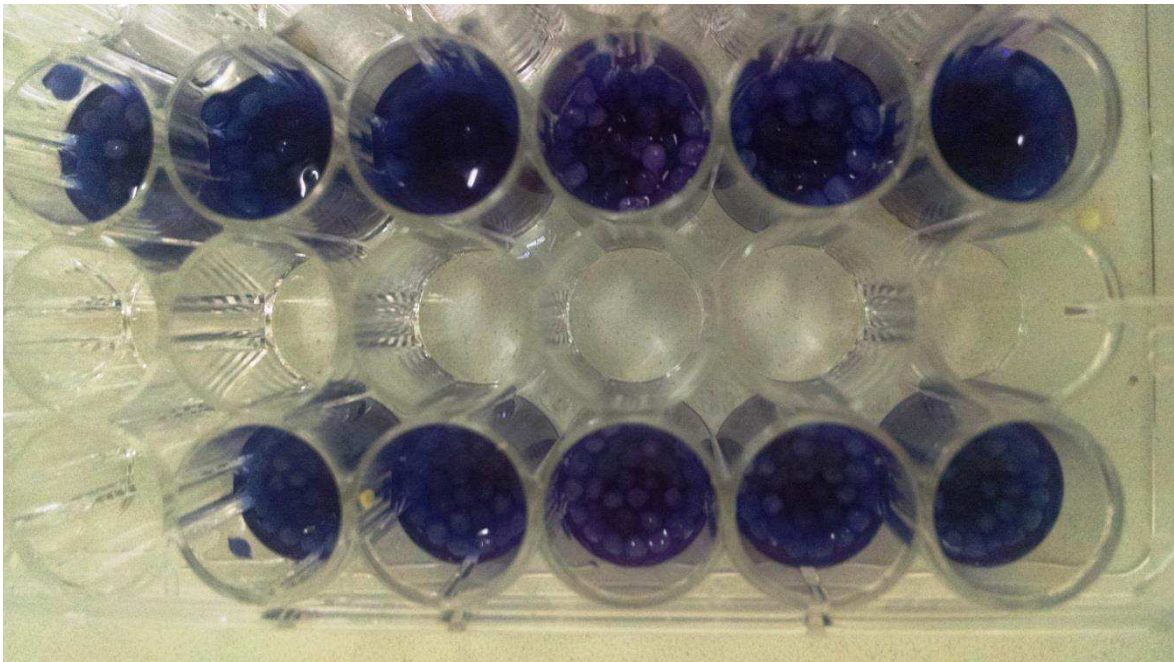
A viabilidade celular foi avaliada utilizando o método da redução do MTT. Ao observar o gráfico, a atividade metabólica celular para todas as amostras apresentou valores acima de 80%, e que estatisticamente ($p < 0,05$), não houve diferenças significativas. Com isso, pode ser considerado que nenhuma amostra apresentou caráter citotóxico em contato com a linha celular L929. Isso permite afirmar que, nenhuns dos scaffolds de quitosana reticulados liberam produtos que se apresentem tóxicos em contato com as células.

5.2.8 Ensaios de Adesão Celular

Os ensaios de adesão celular foram realizados com o objetivo de cumprir o último dos requisitos para que um scaffolds seja considerado apto a ser aplicado na engenharia de tecidos. O objetivo final de um scaffolds é substituir a matriz extracelular natural até que as células do hospedeiro possam novamente crescerem e se desenvolverem, criando um novo tecido. Para tanto, os scaffolds devem permitir a adesão, proliferação e diferenciação celular.

Os ensaios de adesão celular foram realizados com a linha celular L929, com as células sendo cultivadas diretamente nos scaffolds, em placas de 48 poços. Entretanto, não foi possível dar prosseguimento aos ensaios porque após as primeiras horas de contato, a gelatina foi dissolvida, fazendo com o que o scaffold perdesse sua estrutura tridimensional e as esferas ficando soltas dentro dos poços, conforme ilustrado na Figura 42.

Figura 42. Placa de cultura celular.



2014

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

THIAGO BIZERRA FIDELES

6 CONCLUSÕES

Esta tese teve como objetivo dar uma visão em várias questões importantes relativas à concepção de um scaffold e quais são os parâmetros envolvidos, para fornecer estratégias distintas, projetar e fabricar scaffolds de quitosana com aplicação na engenharia de tecidos. Considerando os objetivos propostos neste trabalho, pode-se concluir que:

6.1 Etapa I

- O processo de produção convencional utilizado pelo CERTBIO, a técnica de liofilização foi bem sucedida na obtenção de estruturas tridimensionais, porém com algumas ressalvas;
- A formação das estruturas deu-se por meio de camadas lamelares não por poros e o tamanho e distribuição destas camadas está diretamente ligada à concentração de quitosana, do processo de congelamento e reidratação, liofilização e reticulação;
- As reações de reticulação com ácido sulfúrico provocaram mudanças significativas nas estruturas, induzindo a formação de camadas mais compactas nos scaffolds, independente das concentrações utilizadas;
- O processo de reticulação influenciou diretamente na capacidade de retenção de água e estabilidade térmica por parte dos scaffolds, quando comparados com os não reticulados;
- Os scaffolds reticulados ionicamente de quitosana não produziram efeitos citotóxicos prejudiciais às células, o tornando apto para aplicação como biomaterial. Contudo, com as mudanças verificadas na microestrutura, pode-se prever uma dificuldade em permitir uma futura adesão celular e conseqüentemente, permitir um desenvolvimento saudável das células dentro dos scaffolds.

6.2 Etapa II

- Com os resultados obtidos na etapa II, conclui-se que o método empregado para a obtenção dos scaffolds reticulados de quitosana e o método de agregação de partículas se mostrou eficiente quanto a obtenção de uma estrutura porosa e tridimensional;
- A utilização do método de coagulação química, com o tripolifosfato de sódio, desenvolvido nesta pesquisa permitiu uma otimização na produção dos scaffolds;
- A dispersividade nos tamanhos de poros, porosidade, agregado com a presença da gelatina, influenciaram diretamente no comportamento de absorção dos scaffolds e propriedades mecânicas;
- A metodologia desenvolvida indica uma importante alternativa para o cultivo *in vitro* de células, motivados principalmente pela microestrutura dos scaffolds produzidos;
- A adesão celular é uma das funções biomiméticas mais importantes na concepção de um scaffold. Uma vez que o material não promove a adesão celular, eles têm de ser modificados para permitir a sua utilidade na engenharia de tecidos.

A pesquisa descrita nesta tese descreveu vários aspectos no que diz respeito à produção de scaffolds de quitosana, destacando três pontos principais: propriedades do material produzido, características morfológicas e estrutura tridimensional.

De maneira geral, o presente trabalho ofereceu uma nova metodologia de fabricação de scaffolds de quitosana, produzindo materiais tridimensionais de maneira satisfatória, com uma estratégia simples baseada na aplicação de um material adesivo para obtenção dos scaffolds de quitosana. Com isto, permite-se que os scaffolds produzidos possam ser utilizados em diversas aplicações biomédicas, como por exemplo, enxertos, curatibos, carreador para um sistema de liberação controlada de fármacos e scaffolds para engenharia de tecidos.

2014

CAPÍTULO 7 - PERSPECTIVAS



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

THIAGO BIZERRA FIDELES

7 PERSPECTIVAS

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de um scaffold para aplicação na engenharia de tecidos. Com isto, foi proposta uma metodologia inovadora baseada no princípio de agregação de partículas produzidas com quitosana e aplicando a gelatina como agente agregador. Aplicando estes dois componentes, se buscou mimetizar, em termos de composição, o tecido biológico.

Com os resultados encontrados, novas questões foram levantadas, criando a necessidade de continuação da pesquisa, focando não apenas no contínuo desenvolvimento do scaffold e da metodologia, mas também pensando em expandir o campo de aplicação, como por exemplo na construção de sistemas de liberação controlada de fármacos.

Pensando em futuras melhorias dos scaffolds produzidos nesta tese, pode-se focar na melhoria das propriedades mecânicas, através de variações no processo de fabricação, sem afetar a porosidade. Para isto, sugere-se:

- Adição de uma fase cerâmica nos scaffolds, como por exemplo Beta Fosfato Tricálcico (β -TCP) e/ou Hidroxiapatita (Hap) produzindo um scaffold compósito;
- Reticular a gelatina com algum agente não tóxico, como por exemplo a genipina;
- Testar variações em termos de concentração da solução de gelatina aplicada pra aglomerar as partículas;
- Formar uma blenda, em solução, de quitosana/gelatina para melhor o empacotamento e adesão das partículas de quitosana;
- Variar o tamanho das partículas de quitosana.

2014

CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

THIAGO BIZERRA FIDELES

8 REFERÊNCIAS

AIMOLI, C.G.; TORRES, M.A.; BEPPU, M.M. Investigations into the early stages of “in vitro” calcification on chitosan films. *Materials Science & Engineering C*, v. 26, p.78-86, 2006.

ALSARRA, I.A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 45, p. 16-21, 2009.

ALVES, N.M.; SHI, J.; ORAMAS, E.; SANTOS, J.L.; TOMÁS, H.; MANO, J.F. Bioinspired superhydrophobic poly(L-lactic acid) surfaces control bone marrow derived cells adhesion and proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2008). Doi: 10.1002/jnm.a.32210.

APARECIDA, A. H. In: *Recobrimento de apatitas empregando-se o método biomimético: estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e HCO_3^- na formação de hidroxiapatita*. 2005. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

ARMENTANO, I.; DOTTORI, M.; FORTUNATI, E.; MATTIOL, S.; KENNY, T.M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polym Degrad Stab* (2010), doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.06.007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2012.

ASTM D570 - 98(2010)e1: Standard Test Method for Water Absorption of Plastics. 2010.

ASTM F2027 – 08: Standard Guide for Characterization and Testing of Raw or Starting Biomaterials for Tissue-Engineered Medical Products. 2008.

ASTM D1621 – 10: Standard Test Method for Compressive Properties Of Rigid Cellular Plastics. 2010.

ASTM F2450 – 10: Standard Guide for Assessing Microstructure of Polymeric Scaffolds for Use in Tissue Engineered Medical Products. 2010.

ASTM F2900 – 11: Standard Guide for Characterization of Hydrogels used in Regenerative Medicine. 2011.

ASTM F2150 – 13: Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products. 2013.

BACHTELL, N., GOODELL, T., GRUNKEMEIER, G., JIN, R. GREGORY K., Treatment of dialysis access puncture wound bleeding with chitosan dressing, *Dyalysis & Transplantation*, 35: 672 - 681 (2006)

BADYLAK, S.F.; RUSSELL, A.J.; SANTIN, M. Introduction: History of Regenerative Medicine. In: SANTIN, M. *Strategies in Regenerative Medicine*. Springer: New York, 2009.

BAPTISTA, P.B.A.M. Osteochondral tissue engineering constructs combining particle aggregated scaffolding and bioactive delivery strategies. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica). Escola de Engenharia. Universidade do Minho, Braga, 2008.

BARBOSA, M.A.; PÊGO, A.P.; AMARAL, I.F. Chitosan. In: DUCHEYNE, P. (Ed). *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier: Amsterdam, 2011.

BHAT, S.; KUMAR, A. Cell proliferation on three-dimensional chitosan-agarose-gelatin cryogel scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.114, p. 663-670, 2011.

BHATTACHARYA, A; RAY, P. Introduction. In: BHATTACHARYA, A.; RAWLINS, J.W.; RAY, P. *Polymer Grafting and Crosslinking*. Wiley: New Jersey. 2009.

BEPPU, M.M.; VIEIRA, R.S.; AIMALI, C.G.; SANTANA, C.C. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: effect on ion permeability and water absorption. *Journal of Membrane Science*, V. 301, p. 126-130, 2007.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.35-52, 2004.

BETTINI, R.; ROMANI, A.A.; MORGANTI, M.M.; BORGHETTI, A.F. Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.68, p.74-81, 2008.

BOCCACCINI, A.R.; GOUGH, J.E. *Tissue engineering using ceramics and polymers*. Boca Raton: CRC PRESS, 2007. 604p.

BOUCARD, N.; VITON, C.; AGAY, D.; MARI, E.; ROGER, T.; CHANCERELLE, Y.; DOMARD, A. The use of physical hydrogel of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*, v. 28, p. 3478-3488, 2007.

BURKATOVSKAYA, M.; TEGOS, C.; SWIETLIK, E.; DEMIDON, T.N.; CASTANO, A.P.; HAMBLIN, M.R. Use o chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. *Biomaterials*, v. 27, p. 4157-4164, 2006.

CAMPANA, S.P.; SIGNINI, R. Efeitos de aditivos na desacetilação de quitina. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 11, n. 4, p.169-173, 2001.

CAVALCANTI, M.E.R.R.M. In: Desenvolvimento e Avaliação de Arcabouços Tridimensionais de Quitosana-Gelatina para Regeneração Tecidual da Pele. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2013.

CHAVES, E.L., MAGADÁN, J.M.M.; ROA, R.O.; GUZMAN, J.; SALGADO, J.R., CRUZ, J.M. Molecular modeling and simulation of ion-conductivity in chitosan membranes. *Polymers*, v. 45, p. 7519-7527, 2005.

CHAKRABORTY, S.; LIAO, I.; Adler, A.; Leong, K.W. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, p. 1043-1054, 2009.

CHIONO, V.; PULIERI, E.; VOZZI, G.; CIARDELLI, G.; AHLUWALIA, A.; GIUSTI, P. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, p. 889-898, 2008.

CHUN, J.H.; KIM, G.W.; KIM, C.H. Fabrication of porous chitosan scaffolds in order to improve biocompatibility. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 69, p. 1573-1576, 2008.

CIAPETTI, G.; CENNI, E.; PRATELLI, L; PIZZOFRERATO, A. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*, v.14, p. 359-364, 1993.

COONEY, M.J.; PETERMANN, J.; LAU, C.; MINTEER, S.D. Characterization and evaluation of hydrophobically modified chitosan scaffolds: toward design of enzymes immobilized flow-through electrodes. *Carbohydrate Polymers*, v. 75, p. 428-435, 2009.

CORRELO, V.M.; GOMES, M.E.; TUZLAKOGLU, K.; OLIVEIRA, J.M.; MALAFAYA, P.B.; MANO, J.F.; NEVES, N.M. Tissue engineering using natural polyers. In: Jenkins, M. Biomedical Polymers. CRC Press: Boca Raton, 2007.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, v. 49, p.780-792, 2013.

CRUZ, D.M.G.; IVIRICO, J.L.E.; GOMES, M.M.; RIBELLES, J.L.G.; SANCHES, M.S.; REIS, R.L.; MANO, J.F. Chitosan microparticles as injectable scaffolds for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v.2, p. 378-380, 2008.

CUI, Z.; XIANG, Y.; XIANG, Y.; SI, J.; YANG, M.; ZHANF, Q.; ZHANG, T. Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, p. 111-116, 2008.

DALLAN, P.R.M. In: *Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da Pele*. 2005. 194p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2005.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 981-1014, 2011.

DHANDAYUTHAPNI, B.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, D.S. Polymeric scaffolds in tissue engineering applications: a review. *International Journal of Polymers Science*, v. 11, p. 1-19, 2011.

DEE, K.C.; PULEO, D.A.; BIZIOS, R. *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*. John Wiley & Sons: New Jersey, 2002.

DROTTLEFF, S.; LUNGWITZ, U.; BREUNIG, M.; DENNIS, L.; BLUNK, T.; TESSMAR, J.; GÖPFERICH, A. Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 385-407, 2004.

DUARTE, A.R.C.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Novel 3D scaffolds of chitosan-PLLA blends for tissue engineering applications: Preparation and characterization. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 54, p. 282-289, 2010.

DUARTE, A.R.C.; MANO, J.F.; REIS, R.L. The role of organic solvent on the preparation of chitosan scaffolds by supercritical assisted phase inversion. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 72, p.326-332, 2012.

ENGEL, J.; CHIQUET, M. *An overview of extracellular matrix structure and function*. In: Mecham, R.P. (Ed.) *The extracellular matrix: an overview*. Springer: Berlim, 2011

FAMBRI, L. MIGLIARES, C.; KESENCI, K.; PISKINE, E. Biodegradable Polymers. In: BARBUCCI, R. *Integrated Biomaterials Science*. Kluwer Academic Publishers: New York, 2002.

FAN, M.; HU, Q.; SHEN, K. Preparation and structure of chitosan soluble in wide pH range. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, p. 66-71, 2009.

FERRARI, M.; FORNASIERO, M.C.; ISETTA, A.M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of Immunological Method*, v. 131, p. 165-172, 1990.

FIDÉLES, T.B. In: *Filmes Reticulados de Quitosana para Aplicação como Biomaterial*. 2010. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2010.

FIDELES, T.B.; FURTADO, G.T.F.S.; LIMA, D.B.; BORGES, S.M.P.; PINHEIRO, I.M.F.; FOOK, M.V.L. Evaluation of Ionic Crosslinked Chitosan Scaffolds for biomedical Applications. *Journal of Chitin and Chitosan Science*, v. 1, p. 1-7, 2013.

FISHER, J.P.; MIKOS, A.G.; BRONZINO, J.D. *Tissue Engineering*. Boca Raton: CRC Press, 2007.

FOOK, A.C.B.M. In: *Desenvolvimento de biocerâmicas porosas para regeneração óssea*. 2008. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2008.

FOOK, A.C.B.M. In: *Desenvolvimento de Arcabouços Compósitos Hidroxiapatita-Biopolímero para Engenharia de Tecidos*. 2012. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2012.

FRAGA, A.F.; MARTINS, F.B.; RIGO, E.C.S; BOSCHI, A.O. *Ensaio de membranas de quitosana recobertas com hidroxiapatita: efeito da adição de hidróxido de sódio*. *Anais. 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*. p. 2715-2725, 2006.

GIBSON, L.J.; ASHBY, M.F. *Cellular solids: structure and properties*. 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1997.

GIERSZEWSKA-DRUZYNSKA, M.; OSTROWSKA-CZUBENKO, J. The effect of ionic crosslinking on thermal properties of hydrogel chitosan membranes. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its derivatives*, v. XV, p. 25-32, 2010.

GRIFFITH, L.G.; SWARTZA, M.A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Focus on modelling cellular systems*. V. 7, p. 211-224, 2006.

GOMES, M.E.; MALAFAYA, P.B.; REIS, R.L. Fiber bonding and particle aggregation as promising methodologies for the fabrication of biodegradable scaffolds for hard-tissue engineering. In: Reis, R.L.; Román, J.S. *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. CRC Press: Boca Raton, 2005.

GRIFFON, D.J.; SEDIGHI, M.R.; SCHAEFFER, D.V.; EURELL, J.A.; JONHSON, D.V. Chitosan scaffolds interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomaterialia*, v.2; p. 313-320, 2006.

GORCZYCA, G.; TYLINGO, R.; SZWEDA, P.; AUGUSTIN, E.; SADOWSKA, M.; MILEWSKI, S. Preparation and characterization of genipin cross-linked

porous chitosan-collagen-gelatin scaffolds using chitosan-CO₂ solution. *Carbohydrate Polymers*, v. 102, p. 901-911, 2014.

HARLEY, B.A.; LEUNG, J.H.; SILVA, E.C.C.M.; GIBSON, L.J. Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Acta Biomaterialia*, v.3, p.463-474, 2007.

HARLEY, B.A.C; YANNAS, I. In vivo synthesis of tissue and organs. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. *Principles of Tissue Engineering* (4ed.). Elsevier: Amsterdam, 2014.

HARRISON, K. Introduction to polymeric scaffolds for tissue engineering. In: Jenkins, M. *Biomedical polymers*. CRC Press: Boca Raton, 2007

HENCH, L.L.; JONES, J.R. *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*. CRC PRESS: Boca Raton, 2005.

HENCH, L.L. Biomateriais: Uma Introdução, 2006. In: Oréfice, R.; Pereira, M.M.; Mansur, H.S. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p. 538, 2006.

HENCH, L.L.; THOMPSON, I. Twenty-first century challenge for biomaterial. J.R. *Soc. Interface*, v.7, p. S379-S391, 2010.

HEMANT, K.S.Y.; SHIVAKUMAR, H.G. Development of chitosan acetate films for transdermal delivery of propranolol hydrochloride. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 9, p. 197-203, 2010.

HOLZAPPEL, B.M.; REICHERT, J.C.; SCHANTZ, J.; GBURECK, U.; RACKWITZ, L.; NÖTH, U.; JAKOB, F.; RUDERT, M.; GROLL, J.; HUTMACHER, D.W. How smart do biomaterials need to be? A translational Science and clinical point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews*, doi: 10.1016/j.addr.2012.07.009, 2012.

HONG, H.; WEI, J.; CHANGSHENG, L. Development of asymmetric gradational-changed porous chitosan membrane for guided periodontal tissue regeneration. *Composites Part B*, v.38, p. 311-316, 2007.

HSIEH, W.; CHANG, C.; LIN, S. Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering. *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*, v. 57, p. 250-255, 2007.

HSIEH, F.; HUANG, C.; LIN, T.; CHEN, Y.; LIN, J. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 83-92, 2008.

HUANG, S.; FU, X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *Journal of Controlled Release* (2009), doi: 10.1016/j.conrel.2009.10.018.

HUTMACHER, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, v.21, p.2529-2543, 2000.

HUTMACHER, D.; WOODFIELD, T.; DALTON, P.; LEWIS, J. Scaffolds design and fabrication. In: Blitterswijk, C.V. *Tissue Engineering*. Elsevier: Amsterdam. 2008.

JAYAKUMAR, R.; NWE, N.; TOKURA, S.; TAMURA, H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Journal of Biological Macromolecules*, v. 40, p. 175-181, 2007.

JAYAKUMAR, R.; MENON, D.; MANZOOR, K. NAIR, S.V.; TAMURA, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials – A short review. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p. 227-232, 2010.

JELL, G.; MINELLI, C.; STEVENS, M.M. Biomaterials-Related Approaches: Surface Structure. In: Meyer, U.; Meyer, T.; Hanschel, J.; Wiesman, H.P. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Springer: Berlin, 2009.

JIANKANG, H.; DICHEN, L.; YAXIONG, L.; BO, Y.; HANXIANG, Z.; QIN, L.; BINGHENG, L.; YI, L. Preparation of chitosan-gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 453-461, 2009.

JI, C.; SHI, J. Thermal-crosslinked porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, p. 3780-3785, 2013.

KARAKEÇILI, A.G.; SATRIANO, C.; GÜMÜSDERELIOĞLU, M.; MARLETTA, G. Surface characteristics of ionically crosslinked chitosan membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 106, p. 3884-3888, 2007.

KHARE, A.R.; PEPPAS, N.A. Swelling/deswelling of anionic copolymer gels. *Biomaterials*, v. 16, p. 559-567, 1995.

KIECHEL, M.A.; SHAUER, C.L. Non-covalent crosslinkers for electrospun chitosan fibers. *Carbohydrate Polymers*, v. 95, p.123-133, 2013.

KIM, M.Y.; LEE, J. Chitosan fibrous 3D networks prepared by freeze drying. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 1329-1336, 2011.

KUCHARSKA, M.; WALENKO, K.; BUTRUK, B.; BRYNK, T.; HELJAK, M.; LIANCH, T. Fabrication and characterization of chitosan microspheres

agglomerated scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Letter*, v. 64, p. 1059-1062, 2010.

KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M.X.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. *Polymers*, v.3, p. 1875-1901, 2011.

LANZA, R.P.; LANGER, R.; VACANTI, J. *Principle of Tissue Engineering*. San Diego: Academic Press. 3^a ed. 2007.

LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, v. 32, p. 672-678, 2009.

LI, Y.; WANG, Y.; WU, D.; ZHANG, K. A facile approach to construct three-dimensional oriented chitosan scaffolds with in-situ precipitation method. *Carbohydrate Polymers*, v.80, p. 408-412, 2010.

LIAO, S.; CHAN, C.K.; RAMAKRISHNA, S. Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, v. 28, p. 1189-1202, 2008.

LI, Q.; YANG, D.; MA, G.; XU, Q.; CHEN, X.; LU, F.; NIE, J. Synthesis and characterization of chitosan-based hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 44, p. 121-127, 2009.

LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J.T. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Trans IChemE, Part A, Chemical Engineering Research and Design*, vol. 85, p. 1051-1064, 2007.

LIU, L.; WANG, B.; BAI, T.; DONG, B. Thermal behavior and properties of chitosan fibers enhanced polysaccharide hydrogels. *Thermochimica Acta*, v. 583, p. 8-14, 2014.

LU, P.; WEAVERE, V.M.; WERB, Z. The extracellular Matrix: A dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology*, v. 196, p. 395-406, 2012.

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

MA, P.X. Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced DRUG DELIVERY Review*, v. 60, p. 184-198, 2008.

MALAFAYA, P.B.; PEDRO, A.J.; PETERBAUER, A.; GABRIEL, C.; REDL, H.; REIS, R.L. Chitosan particle agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem

cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 16, p. 1077-1085, 2005.

MALAFAYA, P.B.; SANTOS, T.C.; GRIENSVEN, M.V.; REIS, R.L. Morphology, mechanical characterization and in vivo neo-vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures. *Biomaterials*, v. 29, p. 3914-3926, 2008.

MANO, J.F.; NEVES, N.M.; REIS, R.L. Mechanical characterization of biomaterials. In: REIS, R.L.; ROMÁN, J.S. *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. CRC Press: Boca Raton, 2005.

MARTINO, S.; D'ANGELO, F.; ARMENTANO, I.; KENNY, J.M.; ORLACCHIO, A. Stem cell-biomaterial interaction for regenerative medicine. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 338-351, 2012.

MARTINS, A.M.; PEREIRA, R.C.; LEONOR, I.B.; AZEVEDO, H.S.; REIS, R.L. Chitosan scaffolds incorporating lysozyme into CaP coating produced by a biomimetic route: A novel concept for tissue engineering combining a self-regulated degradation system with in situ pore formation. *Acta Biomaterialia*, v.5, p. 3328-3336, 2009.

MARTINS, A.; OLIVEIRA, D.M.; PEREIRA, A.G.B.; RUBIRA, A.K.; MUNIZ, E.C. Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 51, p. 1127-1133, 2012.

MI, F.L.; SHY, S.S.; WU, Y.B.; LEE, S.T.; SHYONG, J.; HUANG, R.N. Fabrication and characterization of sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*, v. 22, p.165-173, 2001.

MI, F.; SUNG, H.; SHYU, S.S.; SU, C.; PENG, C. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. *Polymers*, v.44, p. 6521-6530, 2003.

MIRANDA, E.S.; SILVA, T.H.; REIS, R.L.; MANO, J.F. Nanostructured natural-based polyelectrolyte multilayers to agglomerate chitosan particles into scaffolds for tissue engineering. *Tissue Engineering: Part A*, v. 17, p. 2663-2674, 2011.

MUKOMA, P.; JOOSTE, B.R.; VOSLOO, H.C.M. Synthesis and characterization of cross-linked chitosan membranes for application as alternative proton exchange membrane materials in fuel cells. *Journal of Power Sources*, v. 136, p. 16-23, 2004.

MURPHY, M.B.; MIKOS, A.G. Polymer Scaffold Fabrication. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier Academic Press: San Diego, 2007.

MUZZARELLI, R.A.A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 1-9, 2009.

NAZHAT, S.N. Thermal analysis of biomaterials. In: GABBOT, P. *Principles and applications of thermal analysis*. Blackwell Publishing: Oxford, 2008.

NEREM, R.N. The challenge of imitating nature. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier Academic Press: San Diego, 2007.

NETO, C.G.T.; GIACOMETTI, J.A.; JOB, A.E.; FERREIRA, F.C.; FONSECA, J.L.C.; PEREIRA, M.R. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 97-103, 2005.

NETTLES, D.L.; ELDER, S.H. GILBERT, J.A. Potencial use of chitosan as cell scaffold material for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering*, v. 8, p. 1009-1016, 2002.

NGAH, W.S.W.; FATINATHAN, S.; YOSOP, N.A. Isotherm and kinetic studies on the adsorption of humic acid onto chitosan-H₂SO₄ beads. *Desalination*, v. 272, p. 292-300, 2011.

NORI, A.; YIM, E.K.F.; CHEN, S.; LEONG, K.W. Cell – Substrate Interactions. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier Academic Press: San Diego, 2007.

NUNTHANID, J.; LAUNGTANA-ANAN, M.; SRIAMORNSAKA, P. Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets. *Journal of Controlled Release*, v. 99, p. 15-26, 2004.

OLIVEIRA, M.B.; MANO, J.F. Polymer-based microparticles in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Biotechnology Process*, v. 00, p. 2-16, 2011.

OSMAN, Z.; AROF, A.K. FTIR studies of chitosan acetate based polymers electrolytes. *Electrochimica Acta*, v.48, p. 993-999, 2003.

OSMAN, Z. Thermal and conductivity studies of chitosan acetate-based polymers electrolytes. *Ionics*, v.11, p.397-401, 2005.

OSORIO, S.M.L. *Novel polymeric systems based on natural materials: development and biological performance*. 2007, 146p. Dissertação (Mestrado em Processamento e Caracterização de Materiais), Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2007.

PACHENCE, J.M.; BOHRER, M.P.; KOHN, J. Biodegradable Polymers. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier Academic Press: San Diego, 2007.

PARK, S.J.; KIM, C. Chitin and chitosan for tissue engineering application. In: KHANG, G. Handbook of Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerate Medicine. CRC Press: Boca Raton, 2012.

PAKRAVAN, M.; HEUZEY, M.C.; AJJI, A. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. *Polymers*, v.52, p. 4813-4824, 2011.

PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S. Development of chitosan-tripolyphosphate fibers through pH dependent ionotropic gelation. *Carbohydrate Polymers*, v. 346, p. 2582-2588, 2011.

PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S. Development of chitosan-tripolyphosphate non-woven fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 23, p. 1085-1096, 2012.

PEDRO, A.S.; ALBUQUERQUE, E.C.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B. Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care?. *Carbohydrate Polymers*, 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2008.12.016.

PETER, M.; GANESH, N.; SELVAMURUGAN, W.; NAIR, S.V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, p. 687-694, 2010.

PIERÓG, M.; GIERSZEWSKA-DRUZYNska, M.; OSTROWSKA-GZUBENKO, J. Effect of ionic crosslinking agents on swelling behavior of chitosan hydrogel membranes. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its derivatives*, v. XIV, p. 75-82, 2009.

PLACE, E.S.; EVANS, N.D.; STEVENS, M.M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature Materials*, v. 8, p. 457-470, 2009.

PUJANA, M.A.; PÉREZ-ÁLVAREZ, L.; ITURBE, L.C.C.; KATIME, I. Biodegradable chitosan nanogel crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.01.082, 2013.

QU, X.; WIRSÉN, A.; ALBERTSSON, C. Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and state of water. *Polymers*, v. 41, p. 4589-4598, 2000.

REIS, R.L.; ROMÁN, J.S. *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Boca Raton: CRC PRESS, 2005.

REVES, B.T.; JENNINGS, J.A.; BUMGARDNER, J.D.; HAGGARD, W.O. Preparation and functional assessment of composite chitosan-nanohydroxyapatite scaffolds for bone regeneration. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 3, p.114-130, 2012.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, p. 603-632, 2006.

RIVERO, S.; GARCIA, M.A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, v.90, p.531-539, 2009.

RUDIN, A. *The Elements of Polymers Science and Engineering: An Introductory Text and Reference for Engineers and Chemists*. San Diego: Academic Press, 1999.

RUEDA, D.R.; SECALL, T.; BAYER, R.K. Differences in the interaction of water with starch and chitosan films as revealed by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, v.40, p. 49-56, 1999.

SALERMO, A.; NETTI, P.A. Optimal design and manufacture of biomedical foam pore structure for tissue engineering. In: NETTI, P.A. *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*. Elsevier: Amsterdam, 2014.

SALTZMAN, W.M.; KYRIAKIDES, T.R. Cell interactions with polymers. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier Academic Press: San Diego, 2007.

SAMPAIO, G.Y.H. In: *Desenvolvimento de Arcabouços Biodegradáveis para Regeneração de Tecidos Cartilagosos*. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2012.

SANTOS, C.; SEABRA, P.; VELEIRINHO, B.; DELGADILLO, I.; SILVA, J.A.L. Acetylation and molecular mass effect on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. *European Polymer Journal*, v. 42, p. 3277-3285, 2006.

SANTOS, J.L.S. *Functionalization of Dendrimers for Improved Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells*. 2009, 161p. Tese (Doutorado em Química dos Materiais). Universidade da Madeira, Centro de Química da Madeira, Funchal, Portugal, 2009.

SENCADAS, V.; CORREIA, D.M.; RIBEIRO, C.; MOREIRA, S.; BOTELHO, G.; RIBELLES, J.L.G.; LANCERO-MENDES, S. Physical-chemical properties of cross-linked chitosan electrospun fiber mats. *Polymers Testing*, v. 31, p.1062-1069, 2012.

SENEL, S.; MCCLURE, S.J. Potential application of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.1467-1480, 2004.

SHU, X.Z.; ZHU, K.J. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 54, p. 235-243, 2002.

SILVA, S.S.; OLIVEIRA, J.M.; SÁ-LIMA, H.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Polymers of Biological Origin. In: DUCHEYNE, P. (Ed). *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier: Amsterdam, 2011.

SINHA, V.R.; SINGLA, H.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, P.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potencial carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, p. 1-33, 2004.

SMITH, K.H.; HAYCOCK, J.W. Modifying biomaterial surfaces to control stem cell growth and differentiation. In: WILLIAMS, R. *Surface modification of biomaterials: Methods, analysis and applications*. Woodhead Publishing: Oxford, 2001.

STEVENS, M.M.; GEORGE, J.H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Materials and Biology*, v. 310, p. 1135-1138, 2005.

STOCKERT, J.C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R.W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan products is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, v.114, p. 785-796, 2012.

SUBRAMANIAN, A.; RAU, A.V.; KALIGOTLA, H. Surface modification of chitosan for selective surface protein interaction. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 321-332, 2006.

TABATA, Y. Significance of release technology in tissue engineering. *Drug Discovery Today*, v. 10, p. 1639-1646, 2005.

TANASE, C.E.; POPA, M.I.; VERESTIUC, L. Biomimetic bone scaffolds based on chitosan and calcium phosphates. *Materials Letters*, v. 65, p. 1681-1683, 2011.

TSAI, H.S.; WANG, Y.Z. Properties of hydrophilic chitosan network membranes by introducing binary crosslink agents. *Polymer Bulletin*, v. 60, p. 103-113, 2008.

TREMEI, A.; CAI, A.; TIRTAATMADJA, N.; HUGHES, B.D.; STEVENS, G.W.; LANDMAN, K.A.; O'CONNOR, A.J. Cell migration and proliferation during monolayer formation and wound healing. *Chemical Engineering Science*, v. 64, p. 247-253, 2009.

TRIPLETT, R. G.; SCHOW, S.R.; FIELDS, R.T. Bone augmentation with and without biodegradable and nonbiodegradable microporous membranes. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. Noth Am.*; Vol. 13, no.3, p. 411-22, 2001.

TRONCI, G. Synthesis, *Characterization and Biological Evaluation of Gelatin-based Scaffolds*. Dissertação (Doutorado em Ciências Naturais em Materiais para as Ciências da Vida) Portsdam, 2010

TSAI, H.S.; WANG, Y.Z. Properties of hydrophilic chitosan network membranes by introducing binary crosslink agents. *Polymer Bulletin*, v. 60, p. 103-113, 2008.

TSAI, S.; HSIEH, C.; HSIEH, C.; WANG, D.; HUANG, L.L.; LAI, J.; HIEH, H. Preparation and cell compatibility evaluation of chitosan/collagen composite scaffolds using amino acids as crosslinking bridges. *Journal of Applied Polymers Science*, v. 105, p. 1774-1785, 2007.

URAGAMI, T.; TOKURA, S. *Materials Science of Chitin and Chitosan*. Japan: Kodansha Ltd., 2006.

VACANTI, J.; VACANTI, C.A. The History and Scope of Tissue Engineering. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier Academic Press: San Diego, 2007.

VIMAL, S.; NAMBI, K.S.N.; MAJEED, S.A.; BABU, S.; RAVI, M.; HAMEED, A.S.S Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticle for oral delivery of gene in fish. *Aquaculture*, v. 358-359, p. 14-22, 2012.

VLADKOVA, T.G. Surface engineered polymeric biomaterial with improved biocontact properties. *International Journal of Polymer Science*, v. 2010, p. 1-22, 2010.145-150, 2009.

YANG, B.; LI, X.; SHI, S.; KONG, X.; GUO, G.; HUANG, M.; LUO, F.; WEI, Y.; ZHAO, X.; QIN, Z. Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, p.860-865, 2010.

YANG, C.H.; LIN, Y.S.; HUANG, K.; HUANG, Y.C.; WANG, E.C.; JHONG, J.Y.; KUO, C.Y. Microfluidic emulsification and sorting assisted preparation of monodisperse chitosan microparticle. *Lab on a Chip*, v. 9, p. 145-150, 2008.

YAO, C.; LIAO, J.; CHUNG, C.; SUNG, W.; CHANG, N. Porous chitosan scaffolds cross-linked and nature procedure applied to investigate cell regeneration. *Applied Surface Science*, v. 262, p.218-221, 2012.

WADE, R.J.; BURDICK, J.A. Engineering ECM Signals into Biomaterials. *Materials Today*, v. 15, p.454-459, 2012.

WALDECK, H.M.; KAO, W.J. Extracellular Matrix: Inspired Biomaterials. In: Ducheyne, P. (Ed). *Comprehensive Biomaterials*. Elsevier: Amsterdam, 2011.

WANG, C.; LI, J.; YAO, F. Application of chitosan-based biomaterials in tissue engineering. In: Yao, K.; Li, J.; Yao, F.; Yin, Y. Chitosan-based hydrogels functions and applications. CRC Press: Boca Raton, 2012.

WEI, L.; CAI, C.; LIN, J.; WANG, L.; ZHANG, Y. Degradation controllable biomaterials constructed from lysozyme loaded Ca-alginate microparticle/chitosan composites. *Polymers*, v. 52, p. 5139-5148, 2011.

WILLIAMS, D.F. To engineer is to create: the link between engineering and regeneration. *TRENDS in Biotechnology*, v. 24, p. 4-8, 2006.

ZENG, W.; HUANG, J.; HU, X.; XIAO, W.; RONG, M.; YUAN, Z.; LUO, Z. Ionically cross-linked chitosan microspheres for controlled release of bioactive nerve growth factor. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 421, p.283-290, 2011.

ZHU, Y.; WAN, Y.; ZHAN, J.; YIN, D.; CHENG, W. Manufacture of layered collagen/chitosan-polycaprolactone scaffolds with biomimetic microarchitecture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 113, p. 352-360, 2014.