

FABIO ALESSANDRO SIMÕES

**CARACTERÍSTICAS MECÂNICAS
DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA
E XANTANA POROSAS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

São Paulo

2018

FABIO ALESSANDRO SIMÕES

**CARACTERÍSTICAS MECÂNICAS
DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA
E XANTANA POROSAS**

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lydia Masako Ferreira

Coorientador: Prof. Antonio Carlos Aloise

São Paulo

2018



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIRURGIA TRANSACIONAL**



Coordenação: Prof^a. Dr^a. Lydia Masako Ferreira

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Lydia Masako Ferreira

COORIENTADOR: Prof. Antonio Carlos Aloise

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **ADAIR e MARIA REGINA**, pelo amor incondicional e pela criação sólida, com valores éticos e morais muito bem fundamentados.

À minha esposa, **MARIA CAROLINA**, pelo apoio neste momento importante, compreensão pelas noites mal dormidas, ausências e pelo estímulo para que continuasse adiante, sem desanimar.

À minha filha, **MARIA JULIA**, por me fazer querer ser um ser humano melhor a cada dia e por entender minhas ausências nos momentos em que o que ela mais queria era ficar junto aos pais.

Aos meus sogros, **MANOEL e ELIZABETH** e a meu cunhado **PEDRO** pelo apoio e pelo suporte em ficar com minha filha quando não podíamos estar com ela.

Aos meus irmãos, **FABRÍCIO e FABIANO**, e cunhadas **CINARA e SABRINA** pelo apoio e incentivo, além de ter me dado meus sobrinhos, **THIAGO, FERNANDA e LUÍSA**.

AGRADECIMENTOS

À **Prof.a. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica e Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Cirurgia Translacional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), orientadora deste projeto, um exemplo de pesquisadora, pela oportunidade e confiança depositada em minha pessoa para a execução deste trabalho.

Ao **Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE**, Afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica – UNIFESP – Escola Paulista de Medicina, que foi um verdadeiro mestre e amigo neste projeto, sendo paciente e determinado em nos guiar, sempre nos motivando com seu conhecimento e sua paixão pela ciência.

Aos meus amigos, colegas de pesquisa e parceiros de viagem **ANDRÉA CRISTINA BAPTISTA COELHO DE FARIA, ELLEN CRISTINA FAGNANI e FERNANDO BIOLCATI CHIANTIA**, pela amizade, incentivo apoio, compreensão, dedicação, paciência e motivação para que este trabalho se tornasse realidade.

Aos colegas de laboratório e PÓS GRADUAÇÃO **MATEUS ABREU PEREIRA, ANDREA CASTILHO SOARES DE AZEVEDO, FÁBIO SCHEMANN-MIGUEL, MARCO ANTONIO MATTAR** (*in memoriam*), pela convivência, aprendizado e pelos bons momentos compartilhados durante as apresentações nas reuniões do Laboratório de Cultura de Células as segundas-feiras.

À todos os professores e demais alunos do Programa de PÓS GRADUAÇÃO em Cirurgia Translacional da UNIFESP pelas colaborações durante as apresentações nas reuniões da PG.

Às secretarias da disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP - **MARTA REJANE DOS REIS SILVA, SANDRA DA SILVA e SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS,** pelo carinho, empenho e paciência com que tratam os pós graduandos deste programa.

EPÍGRAFE

Na verdade, só sabemos quão pouco sabemos – com o saber, cresce a
dúvida.

(GOETHE – 1826)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XI
RESUMO.....	XIII
<i>ABSTRACT</i>.....	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVO.....	04
3 LITERATURA.....	06
4 MÉTODO.....	28
5 RESULTADOS.....	44
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÕES.....	60
8 REFERÊNCIAS.....	62
NORMAS ADOTADAS.....	72
APÊNDICE.....	74
ANEXO.....	78
FONTES CONSULTADAS.....	82

Lista de tabelas

- Tabela 1- Espessura das membranas do grupo controle (GC) (n=14) e grupo experimental (GE) (n=14). Valores expressos em *milímetros* (mm)46
- Tabela 2- Absorção em solução de água ultra-pura (H₂O) e solução aquosa de NaCl 0,9% (SS) das membranas secas do grupo controle (GC) (n=14) e grupo experimental (GE) (n=14). Valores expressos em gramas (g)47
- Tabela 3- Variação de massa após exposição a solução de água ultra-pura (H₂O) e solução aquosa de NaCl 0,9% (SS) das membranas secas do grupo controle (GC) (n=14) e grupo experimental (GE) (n=14). Valores expressos em percentual de perda de massa (%).....48
- Tabela 4- Tensão máxima nas membranas do grupo controle (GC) (n=14) e grupo experimental (GE) (n=14). Valores expressos em *megapascal* (MPa).....49
- Tabela 5- Alongamento na ruptura nas membranas do grupo controle (GC) (n=14) e grupo experimental (GE) (n=14). Valores expressos em *porcentagem* (%)50

Lista de figuras

Figura 1 – Solução de quitosana 1%.....	31
Figura 2 – Solução de xantana 1%.....	33
Figura 3 – Solução de quitosana/xantana.....	33
Figura 4 – Placas de poliestireno com solução quitosana/xantana.....	34
Figura 5 – Placas na estufa e lavagem das membranas.....	35
Figura 6 – Adição do Pluronic F127®.....	38
Figura 7 – Solução de quitosana/xantana/Pluronic®	39
Figura 8 – Placas de poliestireno com quitosana/xantana/Pluronic®.....	39
Figura 9 – Conjunto fotográfico.....	41
Figura 10 – Medidor de espessura Mainard.....	41
Figura 11 – Software DynaView Pro.....	43
Figura 12 – Morfologia das membranas em foto digital.....	45

Lista de abreviaturas e símbolos

BSA	Albumina de soro bovino
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Ch	Quitosana
Ch-Xn	Quitosana-Xantana
FBS	Soro fetal bovino
FGF	Fibroblast growth factor
FTIR-ATR	Titulação potenciométrica e espectroscopia por infra-vermelho
HCl	Ácido clorídrico
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL-1 β	Interleucina 1 beta
Lyz	Lisozima
MSC	Célula tronco mesenquinal
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscopia de força atômica
MM-DBSA	Mecânica molecular da área de superfície de Poisson-Boltzmann
MTT	<i>3-(4,5-dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H bromide</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PRP	Plasma rico em plaquetas
p/v	Relação peso / volume
PBS	Tampão fosfato salino
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
RPM	Rotações por minutos
SGF	Fluido gástrico simulado

SIF	Fluido intestinal simulado
TEM	Microscopia eletrônica de luz e transmissão
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSA	Meio de cultura <i>Tryptose Soy Agar</i>
v/v	Relação volume / volume
Xn	Xantana
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
%	Porcento
°C	Graus centígrados
μ L	Microlitro
μ m	Micrometro
mL	Mililitro
μ M	Micromolar
MPa	Mega Pascal

RESUMO

Introdução: Materiais poliméricos são frequentemente utilizados na engenharia de tecidos de forma a viabilizar o desenvolvimento e/ou a cicatrização dos mais diversos tipos de tecido e órgãos. Características do tecido a ser regenerado e algumas propriedades físicas são desejáveis, para que este biomaterial possa substituir enxertos autógenos ou a impossibilidade de cirurgia devido a escassez tecidual. **Objetivo:** Analisar as propriedades físico-químicas das membranas de quitosana e xantana porosas. **Método:** Todas as membranas foram preparadas por complexação dos polissacarídeos Quitosana (Ch) e Xantana (Xn) em solução, na proporção de massa 1:1, e posterior modelagem em placas de poliestireno. As membranas porosas foram obtidas por adição de Pluronic® F127 aos complexos de polissacarídeos antes da sua modelagem. A caracterização das membranas deu-se por meio da análise da morfologia, espessura, capacidade de absorção e degradação em soluções aquosa e de NaCl 0,9%, e resistência mecânica.(tensão máxima e alongamento na ruptura) dos grupos controle (membrana densa) e grupo experimental (membrana porosa). **Resultados:** Espessura úmida das membranas variou entre 1,75 e 3,40 mm; a capacidade de absorção de soluções aquosas ficou entre 14,13 e 77,01 g/g de membrana; variação de massa entre 6,46 e 26,53%; a tensão máxima na ruptura variou de 0,01 a 0,11 MPa e o alongamento no momento da ruptura variou de 30,89 a 92,03%. **Conclusão:** As membranas de quitosana/xantana porosas apresentaram características mecânicas adequadas, com resistência maior ao rasgamento quando comparadas às densas, podendo ser utilizadas como arcabouços e coberturas em estudos experimentais *in vitro* de engenharia tecidual.

Palavras-chave: Quitosana, Xantana, Membranas, Engenharia tecidual.

ABSTRACT

Introduction: Polymeric materials are often used in tissue engineering to enable the development and/or healing of various tissue types and organs. Characteristics of the tissue to be regenerated and some physical properties are desirable, so that this biomaterial can substitute autogenous grafts or the impossibility of surgery due to tissue shortage. **Objective:** To analyze the physicochemical properties of porous chitosan and xanthan membranes. **Method:** All membranes were prepared by complexing the polysaccharides Chitosan (Ch) and Xanthan (Xn) in solution in the ratio of 1: 1 mass, and later modeling in polystyrene plates. The porous membranes were obtained by addition of Pluronic® F127 to the polysaccharide complexes prior to their modeling. Membrane characterization was performed by analyzing the morphology, thickness, absorption and degradability in aqueous solutions and NaCl 0.9%, and mechanical strength (maximum tension and elongation at break) of control groups (dense membrane) and experimental group (porous membrane). **Results:** Wet membrane thickness ranged from 1.75 to 3.40 mm; the absorbability of aqueous solutions ranged from 14.13 to 77.01 g/g of membrane; mass variation between 6.46 and 26.53%; the maximum stress at break ranged from 0.01 to 0.11 MPa and the elongation at the moment of rupture ranged from 30.89 to 92.03% **Conclusion:** The porous chitosan/xanthan membranes presented adequate mechanical properties, with greater resistance to tearing when compared to dense ones, and could be used as scaffolds and coatings in in vitro experimental studies of tissue engineering.

Key-words: Chitosan, Xanthan, Membranes, Tissue engineering.

1 INTRODUÇÃO

Introdução

Biomateriais destinados a aplicações regenerativas deveriam imitar a estrutura histológica dos tecidos humanos. Idealmente um bom biomaterial deve cumprir uma série de requisitos incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade e consistência, além de permitir que células epiteliais sejam capazes de se aderir e crescer sobre e dentro dele (VAN VLIERBERGHE *et al.*, 2011; DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; BADDOUR *et al.*, 2012). Vários enxertos de mucosa e pele têm sido testados incluindo os de origem biológica (autógenos, homogêneos e xenógenos) e os polímeros de origem natural e de origem sintética. Embora materiais autógenos possam proporcionar um ambiente fisiológico para adesão e proliferação celular, eles possuem desvantagens, tais como propriedades mecânicas limitadas, morbidade, presença de anexos indesejáveis, hiperqueratinização entre outros (TOFT *et al.*, 2000; CAPITO & SPECTOR, 2003; PABBRUWE *et al.*, 2009). Materiais sintéticos são utilizados devido às suas características de fácil modelagem, produção facilitada e sua capacidade de controle da dissolução e degradação (CAPITO & SPECTOR, 2003). A principal desvantagem dos materiais sintéticos é que eles não possuem locais naturais para a adesão celular (GETGOOD *et al.*, 2009; Dhandayuthapani *et al.*, 2011; Szymanska & Winnicka, 2015).

O desenvolvimento de substitutos biológicos dos tecidos humanos por meio da biotecnologia podem contribuir com a solução destes problemas e complicações. Com a engenharia tecidual, tem sido possível desenvolver substitutos com finalidade terapêutica para diferentes órgãos e tecidos, entre eles a pele (MEANA *et al.*, 1998; LLAMES *et al.*, 2004 e 2006.), córnea (NISHIDA, 2003; ALAMINOS *et al.*, 2006), urotélio (WUNSCH, 2005) e vasos sanguíneos (PASCUAL *et al.*, 2004). Neste sentido, tem sido proposto diferentes técnicas de biotecnologia para o desenvolvimento de substitutos

organotípicos à mucosa oral (LAUER & SCHIMMING, 2001; SCHULTZEMOSGAU *et al.*, 2004; SONG, 2004).

Estudos têm apontado para o uso de polímeros biorreabsorvíveis de origem natural como quitosana, alginato, gelatina, celulose e seus derivados (MENG *et al.*, 2010; WITTAYA-AREEKUL & PRAHSARN, 2006; ZHAO, 2002), separadamente ou combinados, para aplicações na biotecnologia. Assim, sistemas à base de polissacarídeos como a quitosana e a xantana podem representar uma alternativa para a produção destes arcabouços.

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, formado por dois monômeros, a D- glicosamina e a N-acetil-D-glicosamina (MENG *et al.*, 2010). Características como elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades de absorção e adsorção, aliados à sua capacidade de acelerar a cicatrização e a sua atividade antimicrobiana (CAMPOS & RAWLS, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2008; MI *et al.*, 2001), possibilitam sua utilização na confecção de curativos dérmicos, substitutos dérmicos e arcabouços celulares.

Assim como a quitosana, a xantana é um polissacarídeo atóxico, sendo obtido por fermentação pela bactéria *Xanthomonas campestris*, podendo apresentar atividade emulsificante, estabilizante e flocculante, formando géis, filmes e membranas (BEJENARIU *et al.*, 2008). Sua complexação com quitosana, através de interações entre os grupos amino da quitosana e carboxil da xantana, possibilita a obtenção de matrizes que apresentam elevada absorção de soluções aquosas e com estabilidade comprovada em fluidos biológicos (VEIGA & MORAES, 2012). Tais características são fundamentais na aplicação como curativos e suportes tridimensionais para o cultivo celular na área de engenharia tecidual.

2 OBJETIVO

Objetivo

Analisar as propriedades físico-químicas das membranas de quitosana e xantana porosas.

3 LITERATURA

Literatura

NEEDLEMAN *et al.* (1998) constataram que poucos artigos examinaram as propriedades físicas de géis e formulações semi-sólidas que favorecem a retenção e a bioadesão *in situ*. Hidratação e propriedades reológicas parecem ser de primordial importância neste contexto e este estudo teve como objetivo correlacionar a medida destas propriedades com a bioadesão observada, tanto *in vitro* e *in vivo*. Três candidatos bioadesivos foram selecionados a partir de experimentos anteriores que utilizaram modelos de cultura de órgãos *in vitro*. Estas foram formulações aquosas de quitosana, goma xantana e poli (óxido de etileno). Taxas de hidratação com vários meios foram determinadas em células especialmente construídas. As propriedades reológicas foram medidas usando um reômetro de estresse controlado sob condições cuidadosamente reguladas. Essas alterações também foram correlacionadas com as avaliações *in vivo* na bolsa periodontal e na mucosa bucal. Os resultados demonstraram que três formulações com diferentes propriedades bioadesivas também possuíam características físicas muito diferentes. Experimentos de hidratação indicaram uma relação direta entre a taxa de hidratação e bioadesão ou retenção. Estudos reológicos sugeriram que uma estrutura em gel pode ser um determinante importante para retenção onde forças de deslocamento de cisalhamento estão presentes *in vivo*, por exemplo, a mucosa oral. Além disso, esses estudos indicaram que formulações que poderiam demonstrar resistência a alterações nas propriedades reológicas na hidratação poderiam também favorecer a retenção *in situ*.

BEPPU *et al.* (1999) apresentaram um trabalho sobre a preparação e caracterização de membranas de quitosana porosas e densas. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA), titulação potenciométrica e

Literatura

espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR). A síntese das estruturas foi realizada através da secagem total ou parcial de uma solução acética de quitosana a 2,5% (v/v) seguida de coagulação em meio alcalino. Glutaraldeído foi utilizado para modificar quimicamente as membranas, tornando-as mais hidrofóbicas. A extensão deste processo pôde ser observada por FTIR-ATR, utilizando-se um plano fatorial onde foram variados o tempo de fixação e a concentração de glutaraldeído na solução de tratamento. Concluiu-se que é possível formar membranas de porosidade muito bem controladas; quanto maior a concentração do meio coagulante (NaOH) e quanto menor a concentração de quitosana na solução a ser coagulada, maior o tamanho dos poros formados. As membranas formadas por secagem total mostraram uma superfície muito plana, conforme mostrada por MFA.

CHELLAT *et al.* (1999) investigaram a biocompatibilidade do complexo quitosana-xantana usando modelos *in vitro* e *in vivo*. Os efeitos citotóxicos das microesferas Ch-Xn, bem como seus produtos de degradação em diferentes concentrações, foram avaliados em fibroblastos (linha celular de fibroblastos L-929) usando 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-trifenil tetrazólio) (MTT). O teste é baseado na atividade celular da desidrogenase mitocondrial como um indicador de viabilidade celular. As citocinas interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos (linha celular de macrófagos J-774) foram examinadas como indicadores de ativação celular. A avaliação de biocompatibilidade *in vivo* foi realizada por 1 a 12 semanas. Este estudo foi realizado utilizando comprimidos obtidos após a compressão de partículas de quitosana-xantana implantadas ao nível subcutâneo em ratos Wistar

Literatura

machos. A biocompatibilidade e degradação polimérica foram investigadas usando estudos histológicos. Análises de microscopia eletrônica de luz e transmissão (TEM) foram utilizadas para determinar a reação de corpo estranho e a fagocitose dos implantes por macrófagos. A exposição de fibroblastos às partículas de quitosana-xantana e produtos de degradação não mostrou efeitos citotóxicos, conforme medido pelo teste de MTT. A produção de TNF- α foi dependente da concentração de partículas dos polímeros, enquanto a produção de IL-1 β foi considerada independente da dose. Os produtos do extrato quitosana-xantana estimularam a secreção de TNF- α quando utilizados na concentração mais alta (10 mg/mL), notadamente após 28 dias de tempo de degradação. Nenhum efeito foi observado na produção de IL-1 β quando os extratos foram usados em comparação com o controle. Os efeitos das partículas de quitosana-xantana na secreção de óxido nítrico foram semelhantes aos do TNF- α . Estudos histológicos mostraram que os comprimidos se dividiram em partículas que se degradaram progressivamente em fragmentos menores. Uma fração significativa dos fragmentos foi ingerida pelos macrófagos após 12 semanas de implantação. Estudos de microscopia de luz mostraram uma reação de corpo estranho fraco em função do tempo e a espessura da camada fibrosa diminuiu com o tempo de implantação. Estudos *in vivo* baseados em observações microscópicas de luz mostraram um recrutamento de populações celulares específicas responsáveis pela preparação de reparo de feridas e deposição de novas matrizes. A diminuição da espessura da camada fibrosa e a ausência de necrose indicaram uma boa tolerância *in vivo* do hidrogel. Estudos de TEM não mostraram sinais de dano celular, ou seja, mitocôndrias inchadas e retículo endoplasmático rugoso, após ingestão de

Ch-Xn. A grande quantidade de fragmentos de Ch-Xn fagocitados não levou à morte celular ou à liberação de material celular.

CHELLAT *et al.* (2000) utilizaram microesferas preparadas a partir de quitosana (6,5 g quitosana em 250 mL de HCl, 650 mL de água e 100 mL de NaOH) e xantana (6,5 g de xantana em 1 L de água) após interação entre os dois polímeros poliônicos, para fabricação de um sistema de liberação de drogas. Sua biodegradação foi comparada à da quitosana. Utilizou-se fluido gástrico simulado (SGF, pH 1,2) e líquido intestinal (SIF, pH 7,5), ambos como meio de biodegradação e solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) como controle negativo. Os estudos de degradação foram realizados a 37 °C a 240 RPM de agitação permanente para imitar as condições fisiológicas. Cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada para quantificar os produtos de degradação de quitosana usando glucosamina e N-acetil-D-glucosamina como referências. O método de integração da área dos picos foi utilizado para determinar a quantidade de cada produto de degradação em função do tempo de incubação no meio. O efeito dos meios na estrutura morfológica das microesferas foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura. De estudos de cromatografia líquida de alta eficiência, pareceu que em SGF e SIF os principais produtos de degradação foram glucosamina e N-acetil-D-glucosamina. Nos primeiros 15 dias, as frações de oligocitose foram liberadas do complexo, enquanto a N-acetil-D-glucosamina foi detectada no meio após esse período. A cinética de degradação foi avaliada pela medida dos produtos de degradação cumulativa, que mostraram degradação mais rápida da quitosana do que o complexo em SGF e SIF. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura mostraram um aumento da porosidade das microesferas em função do tempo de incubação no meio fisiológico simulado. Estes resultados

sugeriram um melhor controle da cinética de degradação quando a quitosana é complexada à xantana.

RODRIGUES *et al.* (2008) avaliaram a preparação e caracterização de membranas obtidas pela complexação de quitosana e alginato e projetadas para uso como curativos. A influência de diferentes taxas de agitação, variando de 100 a 500 RPM, e taxas de adição de solução de quitosana, vazões entre 20 e 40 mL/h, à solução de alginato nas características finais do biomaterial foi analisada em detalhe, visando um protocolo de produção de membrana simples e facilmente escalável. Em geral, um aumento na taxa de fluxo e uma diminuição na taxa de agitação aumentaram a espessura quando úmida. Além disso, a intensidade de agitação teve efeito significativo na capacidade máxima de absorção de água, com baixa agitação, resultando em aumento da resposta. Os outros efeitos não foram significativos no nível de confiança considerado. Os resultados mostraram espessura das membranas secas entre 66 e 80 μm , espessura das membranas úmidas de 106 a 633 μm , resistência à tração variando de 6,86 a 31,14 MPa, alongamento na ruptura de 3,97 a 8,42% e máxima absorção de água até 19 g de água/g de membrana e que foram capazes de impedir a permeação de bactérias podem ser obtidos de uma forma bastante reprodutível pelo procedimento estabelecido. As membranas preparadas a uma razão de fluxo de 40 mL/h e uma agitação igual a 100 RPM mostraram um alto potencial para uso em feridas altamente exsudativas.

UYGUN *et al.* (2010) relataram que as respostas celulares e teciduais aos materiais poliméricos são orquestradas em parte pelas conformações das proteínas plasmáticas adsorvidas. Neste estudo exploraram o papel da espessura da membrana como um fator que influencia a adesão e a

Literatura

proliferação celular em membranas de quitosana com e sem glicosaminoglicanos colocados. Células-tronco mesenquimais (MSCs), isoladas da medula óssea de rato, foram cultivadas em membranas de quitosana de várias espessuras demonstraram adesão celular, disseminação e proliferação significativamente melhores à medida que a espessura da membrana foi aumentada. Os hepatócitos de rato exibiram um aumento do espalhamento no substrato com o aumento da espessura da membrana, semelhante às MSCs. A espessura aumentada reduziu a cristalinidade global da membrana, e os dados indicaram que as respostas celulares melhoradas eram provavelmente devidas à adsorção aumentada da vitronectina sérica, presumivelmente devido à redução da cristalinidade da membrana. Esses resultados demonstraram que a espessura é uma importante variável que pode ser manipulada em membranas de quitosana para alcançar maior proliferação, proliferação e função celular.

BUENO & MORAES (2011) desenvolveram membranas porosas de quitosana-alginato lamelar sem o uso de métodos de liofilização ou outras abordagens baseadas em vácuo. Os efeitos de dois diferentes surfactantes, Tween® 80 e Pluronic® F68, nas propriedades das membranas foram avaliados, visando à produção de espumas estáveis e consistentes com melhor dispersão de polissacarídeos. As membranas preparadas com Tween® 80 apresentaram resistência à tração em torno de 1,5 MPa, alongamento na ruptura de 2,1%, medidas em máquina de ensaio universal Tinius Olsen, modelo H5K-S; e absorção de líquido de 590 a 1370% em soluções distintas (água, solução aquosa de NaCl 0,9%, fluido corporal simulado e soro fetal bovino), aumentando sua espessura em até 3,9 vezes quando imersas em água (micrômetro Digimess). As membranas obtidas

Literatura

com Pluronic® F68 apresentaram uma resistência à tração de 1,0 MPa, alongamento na ruptura de 2,0% e absorção de líquidos de 774 a 1380%, mostrando um aumento na espessura em torno de 3,2 vezes após a exposição à água. As propriedades antimicrobianas de ambas as membranas também foram avaliadas, Amostras esterilizadas de 2,5 cm², dentro de uma unidade de fluxo laminar, foram hidratadas em água esterilizada por 30 s e mantidas no centro de placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 20 a 25 mL de meio de cultura TSA estéril solidificado. Em seguida, 100 µl de uma suspensão aquosa de *Pseudomonas aeruginosa* (a 5,0 x 10⁸ unidades formadoras de colônia por mililitro, UFC/mL) ou *Staphylococcus aureus* (a 4,3 x 10⁸ UFC/mL) foram adicionados à superfície das membranas e as placas foram incubadas a 35 ° C. por 48 h. Os meios ao redor das membranas, a superfície das amostras em contato com a atmosfera e também o lado das membranas em contato com o meio de cultura foram avaliados quanto ao crescimento bacteriano, mostrando que, apesar de serem porosas, as membranas podem fornecer alguma proteção contra a permeação bacteriana. Membranas produzidas com Tween® 80 e Plurônico® F68 foram consideradas de alto potencial para uso na produção de curativos e arcabouços para engenharia de tecidos.

BELLINI *et al.* (2012) prepararam e testaram membranas lamelares compactas e porosas de xantana e quitosana em proporções de massa de 1: 1 e 1,2:0,8 para verificar possíveis aplicações no tratamento de lesões cutâneas. As membranas porosas foram obtidas por adição de Tween® 80 ou Pluronic® F68 aos complexos de polissacarídeos antes da fundição. As membranas preparadas na ausência de surfactantes na proporção de massa de Ch para Xn de 1: 1 revelaram-se ideais para uso como curativos de feridas,

Literatura

pois eram finas, apresentando cerca de 0,10 mm de espessura (micrômetro Digimess) e transparentes com resistência à tração à ruptura de 25 MPa (texturômetro Stable MicroSystem, TA.XT2), absorção de água após 24 h de cerca de 86 g/g, absorção simulada de fluido corporal de 16% e estabilidade adequada na presença das mesmas soluções. As membranas preparadas na relação de massa de Ch para Xn de 1: 1 na presença de Pluronic® F68 mostraram características mais favoráveis para aplicação como arcabouços para engenharia tecidual, como espessura, interconectividade dos poros e baixa citotoxicidade. Essas membranas consistiram em uma matriz com poros interligados que foram distribuídos de forma homogênea em toda a estrutura e apresentaram uma espessura de 1,84 mm, alta capacidade de absorção de FBS (cerca de 18 g/g) e absorção de meio de cultura celular (8,6 g/g), perda de massa no meio de cultura de 33% após 144 h, e baixa toxicidade *in vitro* para células L929. Em conclusão, os autores demonstraram que as membranas de Ch e Xn produzidas na presença ou ausência do surfactante Pluronic® F68 apresentaram um alto potencial de uso como arcabouços na engenharia tecidual ou como curativos dérmicos, respectivamente, enquanto que, em contraste, membranas preparadas na presença de Tween® 80, independentemente da razão de massa de Ch para Xn, apresentaram-se muito citotóxicas para células L929 e, portanto, não eram apropriadas para nenhuma das aplicações propostas.

VEIGA & MORAES (2012) apresentaram um trabalho com o objetivo de desenvolver membranas estáveis compostas por diferentes proporções de quitosana e xantana e investigar suas propriedades. Para tais soluções aquosas de quitosana 0,5 ou 0,75% foram preparadas em ácido acético a 2% (p/v), enquanto a xantana foi dissolvida diretamente em água nas

Literatura

concentrações de 0,25, 0,5 e 0,75% p/v. Cada formulação de membrana foi obtida pela adição de 90 mL de solução de quitosana em 90 mL de solução de xantana (em vazões de 40 a 300 mL/h, com o auxílio de uma bomba de infusão) sob agitação a 1.000 RPM. A mistura foi desgaseificada com uma bomba de vácuo por 2 h e seca em estufa com circulação de ar a 37 °C por 24 h. As membranas secas foram imersas duas vezes em 200 mL de água desionizada durante 1 h e novamente secas a 37 °C durante 24 h. Em seguida, as membranas foram esterilizadas com óxido de etileno por exposição a Oxyfume-30 por 8 h a 40 °C e umidade relativa de 40 a 50%. As membranas foram caracterizadas quanto à sua espessura, morfologia, capacidade de drenagem da água, capacidade de captação e perda de massa em diferentes soluções aquosas e também de suas propriedades mecânicas. Chegou-se a conclusão que o uso de uma vazão de 40 mL/h resultou em membranas frágeis, que se fragmentaram e/ou se dissolveram durante os procedimentos de caracterização. Uma tendência à redução na espessura da membrana foi notada quando a taxa de fluxo da solução de quitosana foi aumentada. Houve uma tendência de aumento da capacidade de drenagem da água com o fluxo de solução de quitosana nas amostras preparadas com fluxo de quitosana acima de 120 mL/h. As membranas obtidas com maiores taxas de fluxo mostraram os melhores resultados para a resistência à tração e as membranas produzidas em uma taxa de fluxo de solução de quitosana de 80 mL/h mostraram o maior alongamento na ruptura. Concluíram que é possível produzir membranas de quitosana e xantana sem o uso de solventes orgânicos ou sais reticulantes. Como resultado obtiveram membranas com espessuras entre 112 e 200 μm , com capacidade de escoamento entre 3180 e 5900 $\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, resistências à tração entre 2,2 e 5,2 MPa, alongamentos na ruptura de até 2,5%, capacidade de absorção de água de 16 a 61 $\text{g H}_2\text{O/g}$ de

Literatura

membrana seca e perda de massa máxima de 13% nas soluções aquosas testadas. De acordo com os resultados, a taxa mais apropriada de adição de solução de quitosana à solução xantana é de 300 mL/h. Membranas preparadas na proporção 0,25%:0,25% resultaram em menores espessuras e maior resistência mecânica, enquanto que membranas 0,375%:0,375% proporcionaram melhor absorção de água.

BUSILACCHI *et al.* (2013) fizeram uma revisão de literatura na qual a associação da quitosana com fatores de crescimento, PRP e MSC, com a intenção de ajudar na regeneração óssea e de tecidos moles foi abordada. A idéia de usar a quitosana como auxiliar de entrega funcional para suportar simultaneamente PRP, células-tronco e fatores de crescimento está associada à intenção de usar biomateriais morfogênicos para modular a seqüência de cura natural dos ossos e outros tecidos. Quitosana-sulfato de condroitina carregado com lisado de plaquetas foi incluído em uma espuma poli (d,L-lactato) que foi então semeada com células-tronco derivadas de tecido adiposo humano e cultivadas *in vitro* sob estímulo osteogênico: o lisado de plaquetas forneceu ao tecido ósseo uma gama de fatores de crescimento que induzem a diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais. PDGF, FGF, IGF e TGF- β foram protagonistas no reparo de fraturas de calo. A liberação de fatores de crescimento dos compósitos de quitosana-PRP e de nano-hidroxiapatita ou fosfato de tricálcio foi altamente benéfica para aumentar a proliferação e diferenciação de MSC, qualificando a quitosana como um excelente veículo. Uma série de características bioquímicas da quitosana exercem sinergismo com células-tronco na regeneração de tecidos moles.

CROISIER & JÉRÔME (2013) destacaram em seu trabalho, a preparação e propriedades de biomateriais inovadores baseados em quitosana, no que diz

Literatura

respeito às suas futuras aplicações. Derivada da quitina, a quitosana é um biopolímero único que exhibe excelentes propriedades, além de biocompatibilidade e biodegradabilidade. A maioria dessas propriedades peculiares surge da presença de aminas primárias ao longo da espinha dorsal da quitosana. Como consequência, este polissacarídeo é um candidato relevante no campo dos biomateriais, especialmente para engenharia de tecidos. O uso de quitosana em arcabouços tridimensionais - como géis e esponjas - e em suportes 2D - como filmes e fibras - é discutido, com foco especial na aplicação de cicatrização de feridas.

BUENO & MORAES (2014) abordaram o desenvolvimento e a caracterização de complexos polieletrólíticos porosos de quitosana-alginato, 90 mL de quitosana 1% (p/v) dissolvida em solução aquosa de ácido acético a 2% (v/v) foram adicionados a 180 mL de uma solução aquosa de alginato 0,5% (p/v) contendo diferentes proporções do surfactante biocompatível Pluronic® F68 (0,02% ou 0,1% - p/v).utilizando uma vazão de 200 mL/h, agitado a 500 RPM. A suspensão final foi homogeneizada a 1000 RPM durante 10 min. A mistura foi seca a 60 °C por 13 horas, lavadas e secas novamente a 37 °C por 6 horas. Os resultados indicaram que a espessura, aferida por um micrômetro digital Mitutoyo MTC-25S, rugosidade (rugosímetro Mitutoyo SJ-201), porosidade (aferida pela adsorção de N₂) e absorção de líquido das membranas aumentam com a quantidade de surfactante utilizada, enquanto suas propriedades mecânicas (aferidas por meio de um texturômetro TA.XT2, Stable Micro System) e estabilidade em meio aquoso diminuem. Outras propriedades importantes, como a cor (medida com um colorímetro portátil Minolta CT-310) e a hidrofília da superfície (ângulo de contato com a água), não são significativamente alteradas ou não apresentam uma clara tendência de variação com o aumento

Literatura

da quantidade de surfactante adicionado aos complexos polieletrólíticos, como a densidade real, diâmetro médio dos poros, volume total de poros e área superficial. Os biomateriais preparados não foram citotóxicos para as células L929. Em conclusão, é possível ajustar as propriedades físico-químicas dos complexos polieletrólito quitosana-alginato, através da variação da proporção de surfactante (Pluronic® F68) adicionada à mistura, de modo a possibilitar a aplicação desejada desses biomateriais.

BUENO & PETRI (2014) investigaram a conformação molecular de cadeias de xantana em filmes de hidrogel por meio de dicroísmo circular, mostrando diferenças substanciais entre o hidrogel de xantana preparado na ausência (XNT) e na presença de ácido cítrico (XCA). Todos os hidrogéis à base de xantana foram produzidos lançando uma solução aquosa de 6 g/L de xantana na ausência ou na presença de ácido cítrico a 0,3 g/L, a 45 °C durante a noite. As soluções foram homogeneizadas com um agitador a 18.000 RPM por 3 min e submetidas à centrifugação por 5 min a 3600 RPM, para remover bolhas de ar antes da fundição. A reticulação foi conseguida aquecendo as películas secas (~ 0,02 mm de espessura) a 165 °C durante 7 min. A fração sol foi extraída com água a 70 °C, sob agitação magnética suave, durante 24 h. Os filmes de hidrogéis xantana (XNT) e xantana-ácido cítrico (XC) resultantes foram secos a 45 °C para 48 h. As cadeias de xantana em filmes de hidrogéis XNT apresentaram conformação ordenada (hélices), enquanto no XCA estavam na conformação desordenada (bobinas), expondo um maior número de grupos carboxilato do que o XNT. A grande densidade de carga em hidrogéis XCA foi evidenciada pelo seu comportamento sob força iônica variável. Estudos sobre a aplicação de XNT e XCA para carregamento e liberação de albumina de soro bovino (BSA) e lisozima (LYZ) mostraram

Literatura

que ambos os eventos são controlados por hidrogéis e carga líquida de proteínas, que podem ser desencadeadas pelo pH. A preservação da conformação nativa de LYZ após o carregamento do hidrogel explicou a substancial atividade bactericida dos hidrogéis carregados com LYZ, permitindo sua utilização como curativos ativos para feridas.

BELLINI *et al.* (2015) realizaram um trabalho que teve por objetivo avaliar a aplicabilidade de curativos bioativos associando membranas densas e porosas de quitosana-xantana a células estromais mesenquimais multipotentes para o tratamento de feridas cutâneas. Para tal, membranas densas e porosas de quitosana reticuladas com xantana foram preparadas de acordo com os procedimentos prévios em uma razão mássica de 1:1, usando quitosana, goma xantana, Pluronic® F68 e ácido acético glacial. Células estromais mesenquimais multipotentes foram isoladas da medula óssea de três ratos Wistar pesando entre 200 e 300 g, por grupo. Células na terceira ou quarta passagem foram então testadas quanto à adesão e proliferação nas membranas. Mais de 50% da população total inicial já aderiram aos materiais 2 h após a inoculação com MSCs, no entanto, as células aderiram mais rapidamente à superfície da placa de cultura controle do que às membranas. Três horas após a inoculação das células nas membranas de Ch-Xn, o número de células no sobrenadante da placa de cultura de controle e das placas contendo amostras de membrana densa eram semelhantes e mais de 98% das células inoculadas eram capazes de aderir às membranas. As MSCs foram inoculadas a uma concentração inicial de $3,0 \times 10^4$ células por poço na superfície de cada amostra de membrana. Crescimento celular intenso foi notado por até 96 horas de cultivo e a concentração celular alcançou valores máximos de $1,1 \times 10^5$ e $1,27 \times 10^5$ células/por membrana para amostras de membrana densa e porosa, respectivamente. Após isso, ocorreu morte

celular. A membrana densa de Ch-Xn foi selecionada sobre a porosa devido à menor espessura e maior transparência. Características que podem contribuir positivamente para aspectos relacionados à melhora do conforto para o paciente com curativo mais fino e também para melhor o acompanhamento visual da cicatrização das lesões. O aspecto usual das lesões antes do tratamento, o percentual de cicatrização das feridas 20 dias após o início do tratamento e o aspecto típico das feridas dos animais foram analisados. O grupo tratado com membranas contendo MSCs mostrou cicatrização de feridas significativamente maior ($96,49 \pm 1,62\%$) quando comparada ao grupo controle ($90,01 \pm 2,38\%$, $p = 0,03$), onde a cicatrização aconteceu naturalmente. As membranas mostraram-se não mutagênicas e permitiram adesão e proliferação eficientes das células estromais mesenquimais *in vitro*. Ensaios *in vivo* realizados com células do estroma mesenquimais crescidas na superfície das membranas densas mostraram aceleração da cicatrização de feridas em ratos Wistar, indicando assim que o uso desta associação de suporte de células para fins de engenharia de tecidos é viável e atraente.

SZYMANSKA & WINNICKA (2015) relatam que a quitosana é considerada um composto útil na tecnologia médica e farmacêutica devido às suas propriedades biológicas únicas e versáteis. Consideráveis esforços vem sendo feitos em pesquisas na tentativa de desenvolver produtos a base de quitosana seguros e eficientes. No entanto, o problema da fraca estabilidade dos sistemas baseados em quitosana restringe sua aplicabilidade prática. A estabilidade melhorada pode ser avaliada controlando fatores ambientais, manipulando condições de processamento (ex, temperatura), introduzindo um composto estabilizador apropriado, desenvolvendo misturas de quitosana com outro polímero, ou modificando a estrutura de

Literatura

quitosana utilizando agentes químicos ou iônicos. Apesar do grande potencial do uso de quitosana em sistemas de entrega de drogas ou de engenharia tecidual, sua fraca estabilidade a longo prazo é uma desvantagem substancial no aumento de escala de aplicações farmacêuticas de quitosana. Após o armazenamento, a quitosana sofre gradativa degradação da cadeia, seguida pela destruição de seus grupos funcionais, o que leva à perda irreversível de suas propriedades físico-químicas. Tanto o nível intrínseco (grau de desacetilação, peso molecular, pureza e umidade) quanto os fatores extrínsecos (condições ambientais de armazenamento, processamento térmico, esterilização e processamento envolvendo dissolução ácida) são reconhecidos como parâmetros cruciais que afetam a estabilidade das formulações à base de quitosana. Para melhorar a estabilidade da quitosana, várias estratégias (adição do agente estabilizante durante o processo de preparação, mistura com polímero hidrofílico e uso de reticulantes iônicos ou químicos) também foram relatadas. Como não há princípios universais para preservar os produtos à base de quitosana durante o armazenamento, estudos de pré-formulação e seleção das condições de armazenamento mais adequadas são essenciais para proporcionar sua máxima estabilidade.

DADOU *et al.* (2017) realizaram simulações de dinâmica molecular para obter informações relativas ao efeito do estado de protonação e grau de N-acetilação na conformação molecular da quitosana (Ch) e sua capacidade de interagir com a goma xantana (Xn) em soluções aquosas. A flexibilidade conformacional da quitosana mostrou-se altamente dependente de seu estado de protonação. Após complexação com a Xn, uma restrição substancial na rotação livre em torno da ligação glicosídica foi observada em dímeros de Ch protonados, independentemente do seu grau de N-acetilação, enquanto que as moléculas desprotonadas preservaram a sua mobilidade livre. Valores

Literatura

calculados para a energia livre de ligação entre Ch e Xn revelaram a contribuição dominante de forças eletrostáticas na formação de complexos e que os complexos mais estáveis foram formados quando a quitosana foi pelo menos semi-protonado e o grau de N-acetilação foi $\leq 50\%$. Os resultados mostram que o comportamento da quitosana solvatada juntamente com a sua complexação com a Xn foi abordado por meio de estudos de simulação de dinâmica molecular e MM-PBSA. Três níveis de acetilação e estados de protonação foram escolhidos (0%, 50% e 100%) para Ch. Complexos de Ch-Xn indicam a preferência da Ch em interagir e penetrar entre as cadeias de Xn quando a protonação é aumentada. As estruturas médias dos complexos Ch-Xn mostram um contato próximo e uma interação mais favorável entre os dois polímeros quando a quitosana é 50-100% protonado, enquanto a Ch desprotonada interage preferencialmente com moléculas de água maior que Xn. Os cálculos de mecânica molecular da área de superfície de Poisson-Boltzmann revelaram que as forças eletrostáticas (interações polares) foram de grande importância para a estabilidade dos complexos de Ch e Xn formados, e que a força dessa interação está relacionada ao estado de protonação da Ch. Os resultados também mostraram que não só o estado de protonação afeta a energia livre de ligação dos complexos, mas a posição dos grupos amônia desempenha um papel importante na interação entre Ch e Xn também. Além da protonação, os grupos acetamida na estrutura da Ch desempenham um papel na formação e estabilização de seus complexos correspondentes com a Xn. Pode-se concluir que o pH da solução aquosa (estado de protonação da Ch) é o fator predominante na determinação da extensão da interação entre Xn e Ch, e que a posição dos grupos amônio e acetila desempenha um papel importante na estabilização do complexos formados.

RIBEIRO *et al.* (2017) relataram que a quitosana é um polissacarídeo de ocorrência natural obtido da quitina, presente em abundância nos exoesqueletos de crustáceos e insetos. Tem despertado grande interesse como biomaterial para a engenharia de tecidos, por sua biocompatibilidade e biodegradação e sua afinidade por biomoléculas. Um número significativo de grupos de pesquisa investigou a aplicação de quitosana como arcabouços para a regeneração de tecidos. No entanto, há uma grande variabilidade em termos de características físico-químicas da quitosana usada em alguns estudos e suas combinações com outros biomateriais, dificultando a comparação de resultados e padronizando suas propriedades. Em uma revisão sistemática da literatura sobre o uso da quitosana para regeneração tecidual que consistiu em uma pesquisa de 478 artigos na base de dados PubMed utilizando as palavras-chave *Chitosan*, *Scaffolds*, *Tissue Engineering* e *Regeneration*. Os critérios de inclusão (i) ano de publicação (entre 2011 e 2016), (ii) estudos pré-clínicos (animais) e (iii) estudos clínicos (humanos), foram aplicados; reduzindo a quantidade de artigos para 246. Após a leitura crítica dos títulos, resumos e quando necessário metodologia; somente artigos publicados em inglês foram selecionados e os critérios de exclusão (i) revisão de literatura, (ii) estudos de casos, (iii) estudos em que a quitosana não foi usada para avaliar regeneração tecidual e (iv) resumos e artigos que não estavam disponíveis por completo, foram aplicados, resultando na seleção final de 61 artigos. Os resultados relacionados ao tipo de tecido envolvido, as características do *scaffold*, principais propriedades físico-químicas da Ch (quando disponível), combinações com outros polímeros, incorporação de fatores de crescimento e/ou células e a metodologia *in vitro* e *in vivo* avaliadas demonstraram a eficácia dos biomateriais à base de quitosana em 93,4% dos estudos revisados na regeneração de diversos tipos de tecidos em animais. A ausência de estudos

Literatura

clínicos em humanos (apenas um dos 61 artigos analisados demonstrou os efeitos da Ch nos tecidos humanos), delineamentos experimentais inadequados e a falta de informações sobre as características da Ch limitam a reprodutibilidade e a relevância dos estudos e a aplicabilidade clínica da mesma.

SOUZA *et al.* (2017) concluíram que o comportamento de matrizes hidrofílicas na presença de meios aquosos desempenha um papel fundamental na seleção de materiais que entram em contato com fluidos corporais. Como os polissacarídeos têm benefícios comprovados no tratamento de lesões de pele, o desempenho de membranas produzidas com quitosana combinada com alginato, xantana, ou goma guar após exposição a diferentes soluções aquosas e níveis de umidade foram analisados com o objetivo de direcionar suas aplicações como curativos em feridas com diferentes produções de exsudato. As membranas quitosana-xantana apresentaram alta capacidade de captação de fluidos e taxa de transmissão de vapor d'água; isso foi atribuído a ramificações na estrutura xantana, e as membranas foram então recomendadas para feridas moderadamente a altamente exsudativas. As membranas quitosana-guar mostraram uma estrutura densa, avaliada por microscopia eletrônica de varredura, e apresentaram baixa capacidade de captação de fluidos; sendo mais apropriados para feridas com baixa exsudação ou em estágio avançado de cicatrização. Ambas as membranas quitosana-alginato e quitosana-guar apresentaram propriedades mecânicas adequadas, avaliadas por meio de texturômetro TA.XT2 (Stable Micro System) em uma ampla faixa de condições de umidade relativa e poderiam ser consideradas adequadas para uso em todas as partes do corpo. No entanto, como a formulação quitosana-

alginate mostrou taxa de transmissão de vapor d'água limitada, seu uso deve ser restrito a, no máximo, feridas com exsudato moderado.

SANCHO-TELLO *et al.* (2017) relataram que diferentes biomateriais têm sido usados para desenvolver substitutos de engenharia tecidual para reparo de cartilagem, incluindo quitosana sozinha ou em combinação com fatores de crescimento para melhorar suas propriedades condrogênicas. O principal objetivo desta investigação foi avaliar os benefícios da combinação de plasma rico em plaquetas ativado com uma estrutura estabilizada de quitosana porosa para a regeneração de cartilagens. Para atingir este objetivo, os suportes de quitosano poroso estabilizado foram preparados utilizando gelificação por congelação e combinados com plasma rico em plaquetas ativado. Os condrócitos articulares primários humanos foram isolados e cultivados em arcabouços de quitosana porosa estabilizada com e sem combinação de plasma rico em plaquetas ativado, obtido por meio da centrifugação de 4,8 mL de sangue periférico, a 1.800 RPM, e a sua ativação deu-se após a adição de CaCl_2 a uma concentração final de 0,45 mM. Microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para a caracterização morfológica dos arcabouços resultantes. As contagens de células foram realizadas em cortes corados com hematoxilina e eosina, e a expressão de colágeno tipo I e II foi avaliada por imunohistoquímica. Um aumento significativo no número de células nos arcabouços de quitosana porosa estabilizada/plasma rico em plaquetas ativado foi encontrado em comparação com arcabouços de quitosana porosa estabilizada. Os condrócitos crescidos em quitosana porosa estabilizada expressaram altos níveis de colágeno tipo I, mas o tipo II não foi detectável, enquanto as células crescidas em quitosana porosa estabilizada/plasma rico em plaquetas ativado expressaram altos níveis de colágeno tipo II e tipo I foi quase indetectável.

Em resumo, o plasma rico em plaquetas ativado aumentou a adesão e induziu a diferenciação de condrócitos cultivados em estruturas de quitosana porosas estabilizadas.

KUMAR *et al.* (2018) relataram em sua revisão de literatura a goma xantana como sendo um exo-polissacarídeo microbiano de alto peso molecular produzido pela bactéria *Xanthomonas* (um gênero de bactérias Gram-negativas que exhibe várias espécies diferentes) que tem sido amplamente usado para aplicações industriais e biomédicas, como embalagens de alimentos, produtos de higiene pessoal, cosméticos e sistemas de distribuição de medicamentos. Nos últimos anos tem mostrado grande potencial em aplicações na engenharia tecidual por possuir boa solubilidade em água, excelente biocompatibilidade, capacidade imunogênica intrínseca, alta viscosidade em uma concentração muito baixa, hidrogel físico com cátion bivalente, propriedade de diluição de cisalhamento, comportamento pseudo-plástico e estabilidade térmica (contra hidrólise) que é muito melhor do que outros polissacarídeos ou polímeros. Entretanto o baixo desempenho mecânico e o processamento da goma xantana limitam seu uso para diferentes aplicações de engenharia tecidual, levando a necessidade de modificação adicional devido a algumas desvantagens onde a goma xantana modificada será bem adequada para produtos de engenharia tecidual. Concluíram que as tendências sobre o uso de formulações de polissacarídeos baseados em xantana para várias aplicações de biotecnologia revisando com precisão para uma melhor compreensão desse biopolímero nessa área, mostrando um futuro promissor para produtos emergentes de engenharia tecidual. Além disso, a propriedade de diluição de cisalhamento e gelificação da xantana pode ser mais benéfica na área de bioimpressão 3D de arcabouços

Literatura

teciduais e/ou modelos de tecido para futuras aplicações de engenharia tecidual.

MÉTODO

4.1 Desenho do estudo

- Experimental
- Prospectivo
- Analítico
- Centro-único

4.2 CEP

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP, tendo sido aprovado sob número 5586051216. (APÊNDICE 1)

4.3 Amostras

4.3.1 Materiais

Para obtenção das membranas foram utilizados os seguintes reagentes: Quitosana de média massa molecular (190 a 310 kDa) com grau de desacetilação de 82% (Sigma-Aldrich Co.; Saint Louis, MO, USA – Lote STBH0024), Goma Xantana de *Xanthomonas campestris* (Sigma-Aldrich Co.; Saint Louis, MO, USA – Lote SLBS9383), Ácido acético (glacial) 100% (Merck, Alemanha – Lote K48810463), Pluronic[®] F-127 (Sigma-Aldrich Co.; Saint Louis, MO, USA – Lote BCBV8048^[11]_[SEP]).

Soro fisiológico e água ultrapura foram utilizados nos ensaios de caracterização físico-química das membranas. Toda a água utilizada nos ensaios foi obtida por meio do sistema Direct-Q[®]3 da Millipore (France).

A preparação das membranas foi realizada de acordo com os protocolos estabelecidos por RODRIGUES *et al.* (2008) para membranas de

quitosana/alginato, VEIGA & MORAES (2011) na produção de membranas de quitosana/carragena, quitosana/pectina e quitosana/xantana, e por BELLINI *et al.* (2012) na produção de membranas de quitosana/xantana com o uso de surfactantes, com algumas adaptações.; e será descrito adiante.

4.3.2 Preparação da solução de Ácido Acético 2%

No interior de uma capela de fluxo laminar (CE Lab, Sumaré/SP), 50 mL de água foram colocados em um balão volumétrico de vidro com capacidade de 1.000 mL (Laborglass, São Paulo/SP). Com o auxílio de um pipetador automático Pipeo® (Vitlab, GroBostheim, Germany) e uma pipeta serológica de dez mL (Corning Incorporated, Corning, NY, USA), 20 mL de Ácido Acético Glacial 100% (Merck, Alemanha) – duas pipetas com dez mL cada - foram adicionados ao balão. Água ultrapura foi utilizada até atingir o menisco (marcação) de 1.000 mL do balão volumétrico. A solução foi então tampada com tampa própria do balão e homogeneizada por meio de agitação manual por dois minutos.

4.3.3 Preparação da Membrana de Quitosana / Xantana Densa

4.3.3.1 Preparação da solução de Quitosana 1% em Ácido Acético 2%.

Em um Becker de 1.000 mL (Nalgon, Itupeva/SP) com 15 cm de altura, 13,1 cm de diâmetro de boca, 10,5 cm de diâmetro de fundo e fundo chato foram adicionados 500 mL da solução de Ácido Acético 2%. Uma balança de precisão modelo ATX224 (Shimadzu, Kyoto, Japan) com capacidade de aferição em milésimos de grama foi utilizada para dosar a quitosana com grau de desacetilação de 82% (Sigma-Aldrich Co; Saint Louis, MO, USA). A balança foi ligada, aguardou-se cerca de cinco segundos para estabilização do sistema, abriu-se a parede lateral de vidro e

Método

um Becker de 100 mL (Dovil, São Paulo/SP) foi colocado centralizado sobre o prato da balança. Após estabilização da pesagem a tecla tara foi pressionada a fim de se neutralizar o peso do Becker. Com o auxílio de uma espátula metálica com 15 cm de comprimento, cinco gramas de quitosana foram pesados e reservados. Toda vez que houve adição ou remoção de material do Becker, as paredes laterais de vidro foram fechadas, para evitar interferências externas durante a aferição do peso.

O Becker de 1.000 mL foi levado a um agitador mecânico (Tecnal TE-139, Piracicaba/SP) de hélices do tipo naval e pás inclinadas, com três centímetros de raio; a base do eixo foi posicionada a uma distância de dois centímetros do fundo do Becker. O agitador foi ligado e aguardou-se até atingir uma rotação pré-determinada de 1.000 RPM, aferida com o auxílio de um tacômetro digital portátil óptico com mira laser, modelo TD-812 (Instrutherm, São Paulo/SP). Os cinco gramas de quitosana foram adicionados à solução de ácido acético 2%, vagarosamente, durante os primeiros 10 minutos e a agitação foi mantida por 30 minutos, até a completa solubilização da quitosana e obtenção de uma solução homogênea (Figura 1).

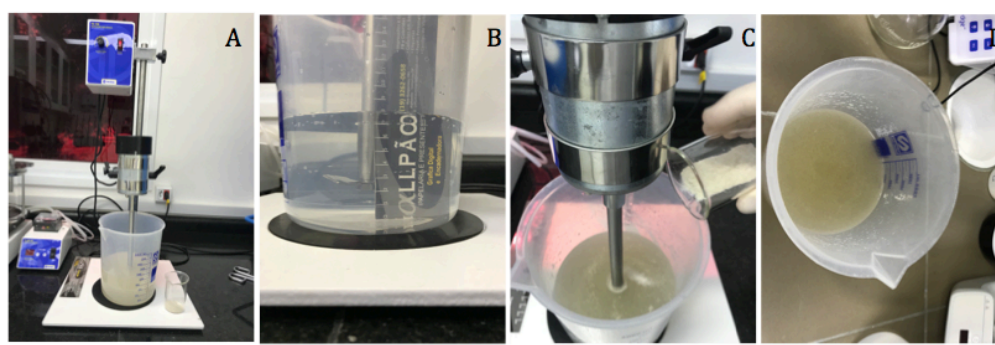


Figura 1 – Preparação da solução de quitosana 1% em solução aquosa de ácido acético 2% em um agitador mecânico (A), base do eixo posicionada a 2 cm do fundo do Becker (B), adição da quitosana à solução de ácido acético (C), aspecto final da solução de quitosana 1% em solução aquosa de ácido acético 2% (D).

4.3.3.2 Preparação da solução aquosa de xantana 1%

Método

Em um Becker de 1.000 mL (Nalgon, Itupeva/SP) com 15 cm de altura, 13,1 cm de diâmetro de boca, 10,5 cm de diâmetro de fundo e fundo chato foram adicionados 500 mL de água ultrapura. Uma balança de precisão modelo ATX224 (Shimadzu, Kyoto, Japan) com capacidade de aferição em milésimos de grama foi utilizada para dosar a goma xantana (Sigma-Aldrich Co; Saint Louis, MO, USA). Abriu-se a parede lateral de vidro e um Becker de 100 mL (Dovil, São Paulo/SP) foi colocado centralizado sobre o prato da balança. Após a estabilização da pesagem, que levou cerca de cinco segundos, a tecla tara foi pressionada, a fim de se neutralizar o peso do Becker. Com o auxílio de uma espátula metálica com 15cm de comprimento, cinco gramas de goma xantana foram pesados e reservados. Toda vez que houve adição ou remoção de material do Becker as paredes laterais de vidro foram fechadas, para evitar interferências externas durante a aferição do peso.

O Becker de 1.000 mL foi levado a um agitador mecânico (Tecnal TE-139, Piracicaba/SP) com hélices do tipo naval e pás inclinadas, com três centímetros de raio; a base do eixo foi posicionada a uma distância de dois centímetros do fundo do Becker. O agitador foi ligado e aguardou-se até atingir uma rotação pré-determinada de 1.000 RPM, aferida com o auxílio de um tacômetro digital portátil óptico com mira laser, modelo TD-812 (Instrutherm, São Paulo/SP). Os cinco gramas de goma xantana foram adicionados à água vagarosamente e a agitação foi mantida por 20 minutos até a completa solubilização da goma xantana e obtenção de uma solução homogênea (Figura 2).

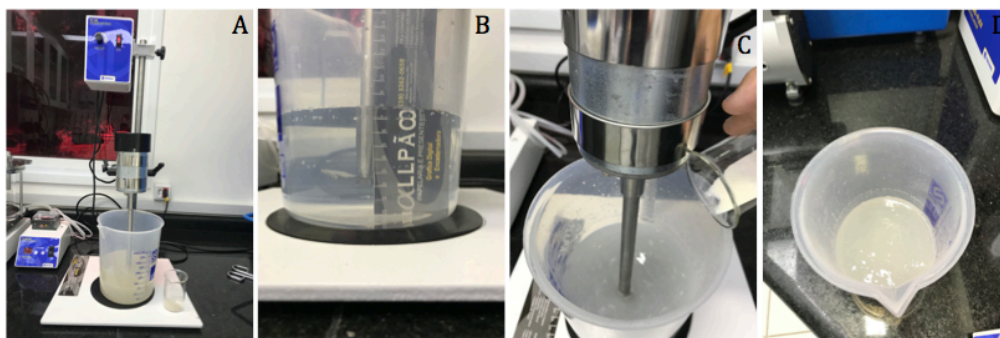


Figura 2 – Preparação da solução aquosa de xantana 1% em um agitador mecânico(A), base do eixo posicionada a 2 cm do fundo do Becker (B), adição da xantana à solução aquosa (C), aspecto final da solução aquosa de xantana 1% (D).

4.3.3.3 Preparação da solução de Quitosana e Xantana

O Becker contendo a solução aquosa de xantana 1% foi colocado no agitador mecânico, deixando uma distância de dois centímetros entre a base do eixo e o fundo do Becker. Uma bomba peristáltica, modelo TE-BP-01 (Tecnal, Piracicaba/SP) foi montada ao lado do agitador mecânico para que a solução de quitosana 1% em solução de ácido acético 2% fosse vertida sobre a solução aquosa de xantana 1% com velocidade de dosagem estabelecida em 20%. Ligou-se o agitador mecânico e aguardou-se até que uma velocidade de 1.400 RPM fosse alcançada, a bomba peristáltica foi ligada até que toda solução de quitosana fosse vertida sobre a solução de xantana, o que levou 50 minutos. Ao término da mistura das soluções a velocidade do agitador mecânico foi aumentada para 1.600 rpm durante 10 minutos (Figura 3).

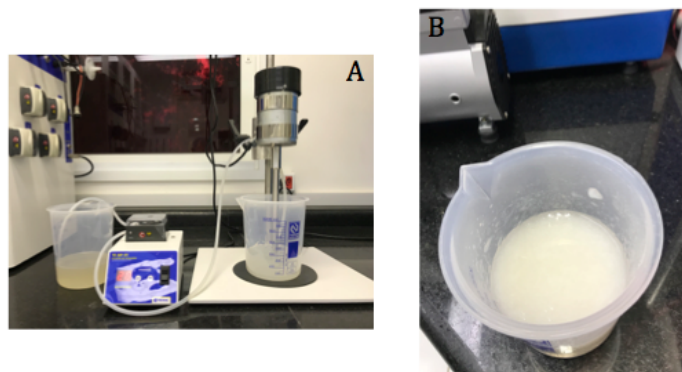


Figura 3 – Solução de quitosana sendo vertida sobre a solução de xantana com o auxílio de uma bomba peristáltica e sendo homogenizada por um agitador mecânico (A) e aspecto final da solução de quitosana/xantana (B).

O volume obtido foi igualmente distribuído em 15 placas lisas de poliestireno, com 90 x 15 mm (KASVI, São José dos Pinhais, PR). As placas foram identificadas com as letras “Q/X”. Para efetuar esta distribuição uma nova pipeta sorológica de dez mililitros (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) foi aberta e acoplada ao pipetador automático Pipeo® (Vitlab, BroBostheim, Germany). Um total de 80 mL, oito pipetas de dez mililitros cada, da solução de quitosana/xantana foi depositado no centro da placa, tomando-se o cuidado de não descarregar todo o conteúdo da mesma, mantendo-se uma gota da solução no seu interior, a fim de se evitar a formação de bolhas na superfície, decorrentes da pipetagem (Figura 4).

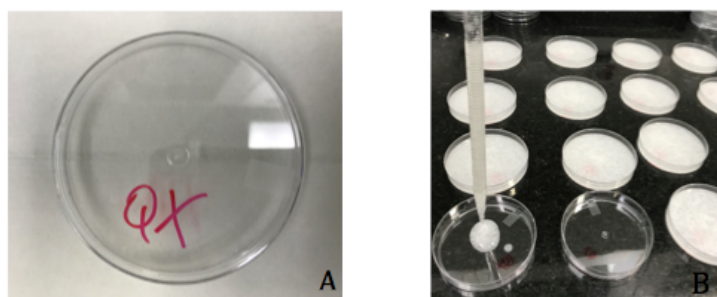


Figura 4 – Identificação das placas de poliestirenos com as letras QX (A) e Adição de 80 mL da solução de quitosana/xantana nas placas de poliestireno (B)

As placas com a solução de quitosana/xantana foram levadas à estufa modelo TE-393-80L (Tecnal, Piracicaba/SP), a 37 °C, por um período de 48

Método

horas para evaporação do ácido acético e secagem. Após a secagem as membranas foram removidas das placas de poliestireno e imersas em 500 mL de água, por 30 minutos, em um Becker de 2.000mL (Nalgon, Itupeva/SP). Este procedimento foi repetido por 3 vezes para remoção dos resíduos de ácido acético. As membranas foram novamente acondicionadas nas placas de poliestireno e levadas à estufa para secagem final por um prazo de 16 a 24 horas (Figura 5).

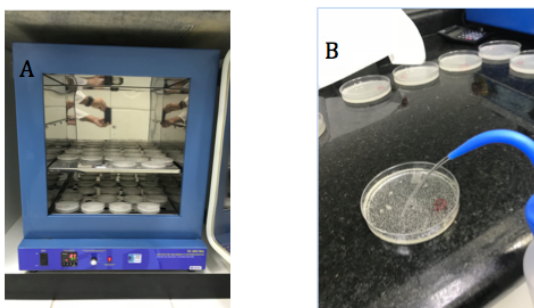


Figura 5 – Placas de poliestireno na estufa para evaporação do solvente (37 °C por 24 horas) (A) e lavagem das membranas com água ultrapura (500 mL por 30 min) (B)

Todo o procedimento foi realizado em laboratório, em ambiente fechado e com temperatura e umidade relativa do ar controladas em 24,7 °C e 56%, respectivamente.

4.3.4 Preparação da Membrana Quitosana / Xantana Porosa

4.3.4.1 Preparação da solução de Quitosana 1% em Ácido Acético 2%.

Em um Becker de 1.000 mL (Nalgon, Itupeva/SP) com 15 cm de altura, 13,1 cm de diâmetro de boca, 10,5 cm de diâmetro de fundo e fundo chato foram adicionados 500 mL da solução de Ácido Acético 2%. Uma balança de precisão modelo ATX224 (Shimadzu, Kyoto, Japan) com capacidade de aferição em milésimos de grama foi utilizada para dosar a quitosana com grau de desacetilação de 82% (Sigma-Aldrich Co; Saint

Método

Louis, MO, USA). A balança foi ligada, aguardou-se cerca de cinco segundos a estabilização do sistema, abriu-se a parede lateral de vidro e um Becker de 100 mL (Dovil, São Paulo/SP) foi colocado sobre o prato da balança. Após a estabilização da pesagem a tecla tara foi pressionada, a fim de se neutralizar o peso do Becker. Com o auxílio de uma espátula metálica com 15cm de comprimento, cinco gramas de quitosana foram pesados e reservados. Toda vez que houve adição ou remoção de material do Becker as paredes laterais de vidro eram fechadas, para evitar interferências externas durante a aferição do peso.

O Becker de 1.000 mL foi levado a um agitador mecânico (Tecnal TE-139, Piracicaba/SP) de hélices do tipo naval e pás inclinadas, com três centímetros de raio; a base do eixo foi posicionada a uma distância de dois centímetros do fundo do Becker. O agitador foi ligado e aguardou-se até que a rotação pré-determinada de 1.000 RPM fosse aferida com o auxílio de um tacômetro digital portátil óptico com mira laser, modelo TD-812 (Instrutherm, São Paulo/SP). Os cinco gramas de quitosana foram adicionados à solução de ácido acético, vagarosamente, durante os primeiros 10 minutos e a agitação foi mantida por 30 minutos, até a completa solubilização da quitosana e obtenção de uma solução homogênea.

4.3.4.2. Preparação da solução aquosa de xantana 1% com Pluronic® F127 1,5%

Em um Becker de 1.000 mL (Nalgon, Itupeva/SP) com 15 cm de altura, 13,1 cm de diâmetro de boca, 10,5 cm de diâmetro de fundo e fundo chato foi colocado 500 mL de água. Uma balança de precisão modelo ATX224 (Shimadzu, Kioto, Japan) com capacidade de aferição em milésimos de grama foi utilizada para dosar a goma xantana (Sigma-Aldrich Co; Saint Louis, MO, USA). Abriu-se a parede lateral de vidro e um Becker

Método

de 100 mL (Dovil, São Paulo/SP) foi colocado sobre o prato da balança. Após a estabilização da pesagem a tecla tara foi pressionada, a fim de se neutralizar o peso do Becker. Com o auxílio de uma espátula metálica de 15cm, cinco gramas de goma xantana foram pesados e reservados. Da mesma forma sete gramas e meio de Pluronic® F127 (Sigma-Aldrich Co; Saint Louis, MO, USA) foram pesados e reservados em um Becker de 100 mL (Dovil, São Paulo/SP). Toda vez que houve adição ou remoção de material do Becker as paredes laterais de vidro eram fechadas, para evitar interferências externas durante a aferição do peso.

O Becker de 1.000 mL foi levado a um agitador mecânico (Tecnal TE-139, Piracicaba/SP) com hélices do tipo naval e pás inclinadas, com três centímetros de raio; a base do eixo foi posicionada a uma distância de dois centímetros do fundo do Becker. O agitador foi ligado e aguardou-se até que uma rotação pré-determinada de 1.000 RPM fosse alcançada, aferição realizada com o auxílio de um tacômetro digital portátil óptico com mira laser, modelo TD-812 (Instrutherm, São Paulo/SP). Os cinco gramas de goma xantana foram adicionados à água ultrapura, vagarosamente e a agitação foi mantida por 20 minutos, até a completa solubilização da goma xantana e obtenção de uma solução homogênea.

Após a solubilização e homogeneização da goma xantana os sete gramas e meio do surfactante Pluronic® F127 (Sigma-Aldrich Co; Saint Louis, MO, USA), foram adicionados à mistura de forma muito lenta, evitando a formação de grumos. A mistura foi agitada por mais 10 minutos mantendo-se a agitação em 1.000 RPM (Figura 6).

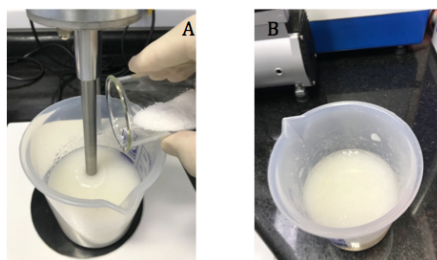


Figura 6 – Adição do surfactante à solução aquosa de xantana 1% (A); Solução aquosa preparada (B)

4.3.4.3. Preparação da solução de Quitosana e Xantana com Pluronic®

A solução aquosa de xantana 1% com o Pluronic® F127 (Sigma-Aldrich Co; Saint Louis, MO, USA) 1,5% foi colocada no agitador mecânico, posicionando a base do eixo a uma distância de dois centímetros do fundo do Becker. Uma bomba peristáltica, modelo TE-BP-01 (Tecnal, Piracicaba/SP) foi montada ao lado do agitador mecânico para que a solução de quitosana 1% em solução de ácido acético 2% fosse vertida sobre a solução aquosa de xantana 1% com o Pluronic® F127 1,5%. A velocidade de dosagem da bomba peristáltica foi estabelecida em 20%. O agitador mecânico foi ligado e aguardou-se até que uma velocidade de 1.400 RPM fosse alcançada, a bomba peristáltica foi ligada até que toda solução de quitosana fosse vertida sobre a solução de xantana/Pluronic® F127, o que levou 50 minutos. Ao término da mistura das soluções a velocidade do agitador mecânico foi aumentada para 1.600 rpm durante 10 minutos (Figura 7).

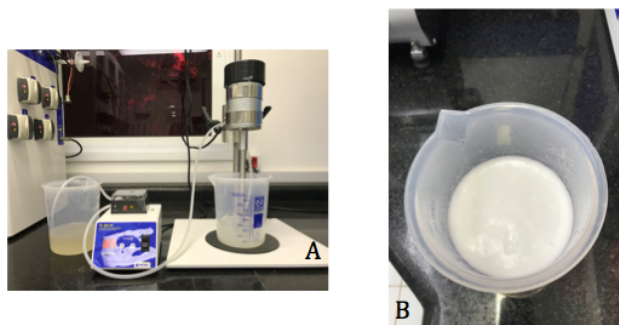


Figura 7 – Solução de quitosana sendo vertida sobre a solução de xantana com Pluronic, com o auxílio de uma bomba peristáltica e sendo homogenizada por um agitador mecânico(A) e aspecto final da solução de quitosana/xantana/Pluronic (B).

O volume obtido foi igualmente distribuído em 15 placas lisas de poliestireno, com 90 x 15 mm (KASVI, São José dos Pinhais, PR). As placas foram identificadas com as letras “Q/X/P”. Para efetuar esta distribuição uma nova pipeta sorológica (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) de dez mililitros foi aberta e acoplada ao pipetador automatic Viveo® (Vitlab, GroBostheim, Germany). Um total de 80 mL, oito pipetas de dez mililitros cada, da solução de quitosana/xantana/Pluronic® foi depositado no centro da placa, tomando-se o cuidado de não descarregar todo o conteúdo da mesma, mantendo-se uma gota da solução no seu interior, a fim de se evitar a formação de bolhas superficiais, decorrentes da pipetagem (Figura 8).

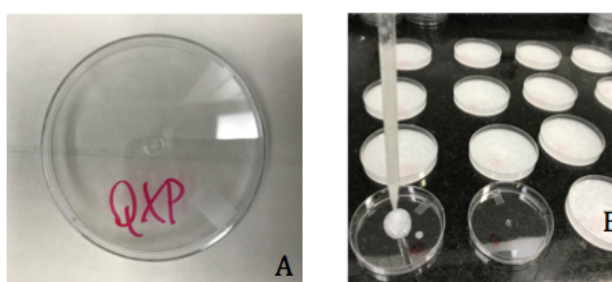


Figura 8 – Identificação das placas de poliestirenos com as letras QXP (A) e Adição de 80 mL da solução de quitosana/xantana/Pluronic nas placas de poliestireno (B)

As placas com a solução de quitosana/xantana/Pluronic® foram levadas à estufa modelo TE-393-80L (Tecnal, Piracicaba/SP), a 37 °C, por

Método

um período de 48 horas para evaporação do ácido acético e secagem. Após as 48 horas de secagem as membranas foram retiradas das placas de poliestireno e imersas em 500 mL de água em um Becker de 2.000 mL (Nalgon, Itupeva/SP), por 30 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes para remoção dos resíduos de ácido acético. Uma nova lavagem, em 200 mL de solução HEPES 10% por 30 minutos foi efetuada em um Becker de 2.000 mL (Nalgon, Itupeva/SP), a fim de se eliminar resíduos do Pluronic® F127 e uma lavagem final por 30 minutos, em 500 mL de água, foi realizada para remoção da solução HEPES. As membranas foram novamente acondicionadas nas placas de poliestireno e levadas à estufa para secagem final por um prazo de 18 horas.

Todo o procedimento foi realizado em laboratório, em ambiente fechado e com temperatura e umidade relativa do ar controladas em 24,7 °C e 56%, respectivamente.

4.3.5 Caracterização físico-química das membranas

As membranas de quitosana/xantana complexadas, na presença dos tensoativos ou não, foram avaliadas conforme descrito a seguir.

4.3.5.1 Aspecto da superfície

As membranas foram analisadas a olho nu avaliando-se a capacidade de formação de uma película contínua, sua manuseabilidade e continuidade (ausência de rompimentos e fraturas após a secagem) e seu aspecto foi registrado por fotografia digital realizada com um conjunto fotográfico composto por máquina NIKON D7000, lente NIKON AF-S MICRO NIKKOR 105mm 1:2.8G ED e flash circular SIGMA EM-140DG. A

Método

máquina foi configurada com abertura de diafragma F29, velocidade de obturador 160 e flash utilizado no modo TTL-BL. O conjunto foi montado em tripé para estabilização da imagem, a uma distância de 50 cm da lente até a membrana (profundidade de campo). Um fundo azul foi utilizado para que a imagem capturada possua um melhor contraste (Figura 9).

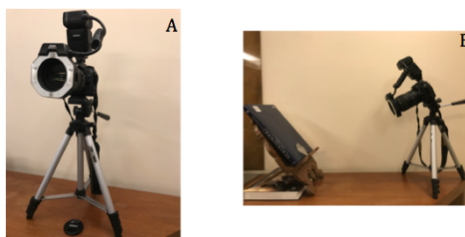


Figura 9 – Conjunto fotográfico utilizado (A) e método de obtenção das fotos (B).

4.3.5.2 Espessura

A espessura das membranas foi mensurada após hidratação por 30 minutos em água ultrapura, utilizando-se um medidor de espessura Mainard (São Paulo/SP) (Figura 10) com precisão de centésimos de milímetro, realizando-se sete medidas perto das margens da membrana, em ângulo de 90°. Os resultados foram expressos como médias.

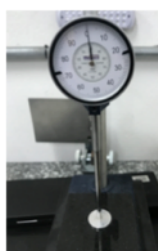


Figura 10 – Medidor de espessura Mainard

4.3.5.3 Capacidade de absorção e estabilidade durante exposição a soluções aquosas

Método

A capacidade das membranas absorverem água e solução aquosa de NaCl a 0,9% (SS) foi determinada utilizando corpos de prova de 27 mm de diâmetro, em triplicata, com massa seca inicial (M_s) determinada em balança de precisão modelo ATX224 (Shimadzu, Kyoto, Japan). As amostras foram hidratadas em placas de cultura de células 6 poços (Kasvi, São José dos Pinhais/PR) com 7 mL destas soluções e ali mantidas por 24 horas em estufa (Tecnal, Piracicaba/SP) a 37 °C. Após este período as amostras foram pesadas para a determinação das massas úmidas finais (M_u). A capacidade de absorção (C_i) de cada solução foi calculada através da Equação 1:

$$C_i = \frac{(M_u - M_s)}{M_s} \quad (\text{Equação 1})$$

A estabilidade das membranas foi avaliada através da variação da massa das amostras expostas as mesmas soluções citadas acima por 24 h e após sua secagem em estufa a 37 °C (Tecnal, Piracicaba/SP), até que atingissem massa constante, o que levou cerca de 10 h, neste momento nova pesagem foi realizada, obtendo-se suas massas secas finais (M_f). A variação de massa (V_m) após a exposição a cada solução foi calculada através da Equação 2:

$$V_m = \frac{[M_f - (M_s + M_{SS})]}{M_s} \quad (\text{Equação 2})$$

onde M_{SS} refere-se à massa estimada de sólidos da solução incorporados pelas amostras, considerando-se que a concentração de sólidos de partida na solução SS era de 9,00 g/L.

4.3.5.4 Tensão e alongamento na ruptura

As propriedades mecânicas das membranas foram avaliadas com base

Método

na norma D-882-12 da *American Society for Testing and Materials* (ASTM). Os ensaios foram realizados a uma temperatura ambiente de $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (certificado RBC/ABS1 CAL 157561/18 Rev. 1 – válido até 03/2019).

Utilizando quatorze replicatas para cada tipo de membrana, as amostras foram fixadas em garras de 5 cm de uma máquina universal de ensaios (modelo BME-20kN, Oswaldo Filizola, Brasil), com velocidade de afastamento de 50 mm/min e célula com carga de 200N (certificado RBC/Dinateste DNTT/597c/17 – válido até 07/2018). A fixação, em todos os ensaios, foi realizada pelo mesmo operador, com força de dois dedos, estipulada em testes prévios, e um apoio de borracha foi utilizado entre a membrana e a garra, a fim de se minimizar o risco de rompimento da membrana na área de contato da mesma com o metal da garra.

A tensão (T) e o alongamento (A) na ruptura foram calculados pelo software Dina View Pro (Figura 11), que além de controlar os parâmetros utilizados nos ensaios, mensurou os resultados dos mesmos.

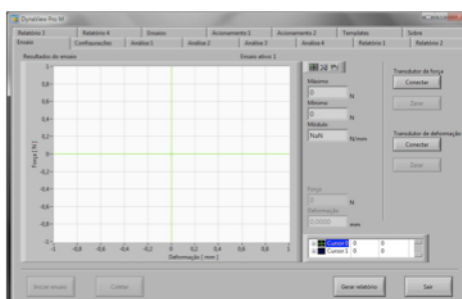


Figura 11 – Tela de análise do Software DynaView Pro

5 RESULTADOS

5.1 Aspecto da superfície

Em todas as membranas de todos os grupos (Controle e Experimental) pôde-se observar a formação de um complexo translúcido, homogêneo e com alta viscosidade, que se prendia à hélice do agitador mecânico. A secagem, visando a evaporação de solvente e, conseqüentemente a formação da membrana, ocorreu em 38 horas.

Durante as três lavagens realizadas para a remoção dos resíduos de ácido acético, estas amostras apresentaram aumento de tamanho, em especial no seu diâmetro, mostrando-se muito delicadas. Após a segunda secagem, com duração média 20 horas, observou-se a formação de membranas finas, flexíveis e transparentes, com a superfície ondulada (Figura 12).

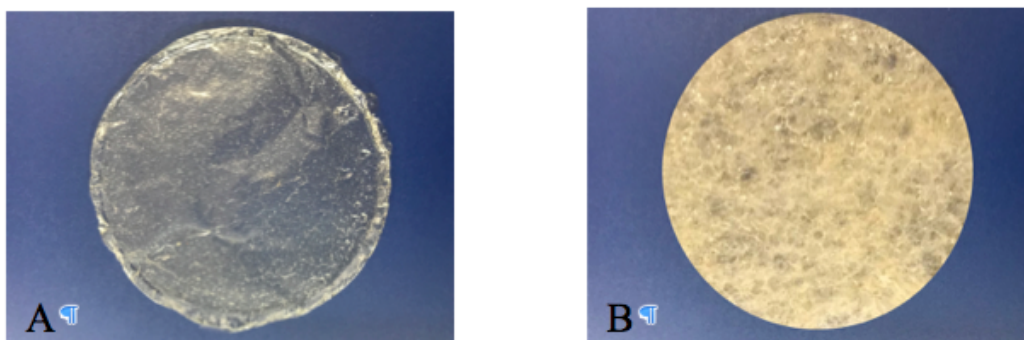


Figura 12 - Aspecto das membranas após a segunda secagem (A – Densa, B – Porosa)

5.2 Espessura

Resultados

Os valores correspondentes à espessura média das membranas umidecidas são apresentados na Tabela 1. As espessuras das membranas densas variaram de 1,75 a 2,81 mm. Já as membranas adicionadas do surfactante tiveram variações entre 2,11 a 3,40 mm.

Tabela 1- Espessura das membranas hidratadas nos grupos controle (GC) (n=14) e experimental (GE) (n=14). Valores expressos em *milímetros* (mm)

	Grupos		Valor de <i>P</i>
	GC	GE	
1	2,25	2,11	
2	1,75	2,11	
3	2,28	2,15	
4	2,65	3,14	
5	2,60	2,67	
6	2,33	3,40	
7	2,62	3,37	
8	2,43	2,26	
9	2,54	2,26	
10	2,30	2,74	
11	2,81	3,13	
12	2,07	2,85	
13	2,45	2,91	
14	2,35	2,58	
Média	2,39	2,69	0,87
DP	0,27	0,46	

Análise pelo Teste “t” de *Student* considerando valores de $p \geq 0,05$ como *significantes e assinalados com (*)*

GC: membranas de quitosana e xantana densas

GE: membranas de quitosana e xantana porosas

5.3 Capacidade de absorção e estabilidade durante exposição a soluções aquosas

Resultados

Os valores observados na Tabela 2 correspondem à capacidade de absorção de água e solução salina das membranas. Todas as membranas apresentaram capacidades elevadas de absorção, variando de 27,18 a 75,12 g de H₂O/grama de membrana seca, 14,13 a 30,28 g de SS/grama de membrana seca.

Tabela 2- Capacidade de absorção de água e solução salina das membranas nos grupos controle (GC) (n=14) e experimental (GE) (n=14). Valores expressos em gramas (g)

	Grupos		Valor de P	Grupos		Valor de P
	H ₂ O			SS		
	GC	GE		GC	GE	
1	67,12	28,21		28,49	15,01	
2	67,93	29,31		28,64	15,49	
3	74,41	30,11		29,17	16,03	
4	71,19	30,22		28,91	16,27	
5	66,87	29,48		28,41	15,76	
6	70,27	28,81		28,89	15,29	
7	66,14	28,72		28,31	15,12	
8	75,12	27,35		29,36	14,22	
9	72,14	27,18		29,08	14,13	
10	69,16	28,75		28,83	15,25	
11	65,43	27,98		28,25	14,95	
12	77,01	28,73		30,28	15,12	
13	68,23	28,02		28,71	14,97	
14	75,86	29,25		29,61	15,43	
Média	70,13	28,72	0,03*	28,92	15,21	0,04*
DP	3,77	0,91		0,55	0,59	

Análise pelo Teste “t” de *Student* considerando valores de $p \geq 0,05$ como significantes e assinalados com (*)

GC: membranas de quitosana e xantana densas

GE: membranas de quitosana e xantana porosas

Os resultados obtidos para a variação de massa das membranas preparadas na presença ou ausência dos tensoativos expostas a solução aquosas salinas e água por 24 horas estão listados na Tabela 03. Todas as

membranas perderam massa.

Tabela 3- Variação de massa das membranas nos grupo controle (GC) (n=14) e grupo experimental (GE) (n=14). Valores expressos em percentual de perda de massa (%).

	Grupos		Valor de P	Grupos		Valor de P
	H ₂ O			SS		
	GC	GE		GC	GE	
1	12,84	16,12		8,61	26,53	
2	12,13	16,05		10,76	25,87	
3	12,34	15,92		9,43	25,31	
4	12,57	15,93		8,91	23,37	
5	13,28	16,51		6,46	26,12	
6	13,41	16,06		7,85	26,06	
7	13,55	16,28		9,78	23,84	
8	12,89	15,96		7,53	24,89	
9	12,75	16,32		10,48	24,41	
10	13,14	16,28		10,04	25,22	
11	12,42	15,98		6,82	24,91	
12	12,68	15,98		7,31	23,79	
13	13,02	16,09		9,02	26,12	
14	12,91	16,42		10,16	24,48	
Media	12,85	16,13	0,21	8,79	25,06	0,02*
DP	0,41	0,19		1,40	0,99	

Análise pelo Teste “t” de Student considerando valores de $p \geq 0,05$ como significantes e assinalados com (*)

GC: membranas de quitosana e xantana densas

GE: membranas de quitosana e xantana porosas

5.4 Avaliação das propriedades mecânicas

Os resultados obtidos para as propriedades mecânicas de tensão (T) das membranas podem ser observados na Tabela 4. Para as membranas de quitosana/xantana densas os valores variaram de 0,01 a 0,06 MPa para a tensão na ruptura. Já nas membranas porosas variações de 0,02 a 0,11 MPa foram encontradas.

Resultados

Tabela 4- Tensão máxima na ruptura nas membranas nos grupos controle (GC) (n=14) e experimental (GE) (n=14). Valores expressos em *megapascal* (MPa)

	Grupos		Valor de <i>P</i>
	GC	GE	
1	0,02	0,11	
2	0,06	0,11	
3	0,03	0,07	
4	0,02	0,06	
5	0,02	0,05	
6	0,02	0,03	
7	0,01	0,03	
8	0,03	0,04	
9	0,02	0,06	
10	0,03	0,04	
11	0,01	0,02	
12	0,05	0,03	
13	0,02	0,02	
14	0,02	0,04	
Média	0,03	0,05	0,04*
DP	0,01	0,03	

Análise pelo Teste “t” de *Student* considerando valores de $p \geq 0,05$ como *significantes e assinalados com (*)*

GC: membranas de quitosana e xantana densas

GE: membranas de quitosana e xantana porosas

Na análise do parâmetro porcentagem de alongamento (A) os valores variaram entre 33,08 a 92,03% para membranas densas e 30,89 a 67,89% para a porcentagem de alongamento das membranas com o pluronic, conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 5- Alongamento na ruptura nas membranas nos grupos controle (GC) (n=14) e experimental (GE) (n=14). Valores expressos em *porcentagem (%)*

	Grupos		Valor de <i>P</i>
	GC	GE	
1	39,72	43,84	

Resultados

2	44,54	60,55	
3	62,30	67,24	
4	55,52	67,89	
5	37,83	62,33	
6	54,98	53,36	
7	35,52	50,37	
8	69,89	32,45	
9	59,64	30,89	
10	50,21	52,17	
11	33,08	40,42	
12	92,03	50,49	
13	48,59	40,94	
14	72,39	59,24	
Média	54,02	50,86	0,05
DP	16,45	11,94	

Análise pelo Teste “t” de *Student* considerando valores de $p \geq 0,05$ como significantes e assinalados com (*)

GC: membranas de quitosana e xantana densas

GE: membranas de quitosana e xantana porosas

6 DISCUSSÃO

Grandes defeitos teciduais, sejam eles ósseos ou de tecido mole, são frequentemente encontrados por profissionais da área da saúde. A reconstrução desses defeitos ainda é um grande desafio devido a escassez tecidual. Neste sentido diferentes tipos de retalho e enxertos têm sido propostos como substitutos. Em alguns pacientes, no entanto, a utilização de alguma destas técnicas está associada a desvantagens como morbidade e limitações estéticas e funcionais. O desenvolvimento de coberturas, através da engenharia tecidual, pode vir a contribuir com a solução destes problemas e complicações (SCHULTZE-MOSGAU *et al.*, 2004).

A quitosana tem sido comumente utilizada na engenharia tecidual pelo fato de moldar-se facilmente em diversas formas, possibilitando a formação de estruturas com diferentes tamanhos de poros. Sua ação bactericida, além da biodegradabilidade, propriedades anticoagulantes, ação antifúngica e atividade imunoestimuladora lhe conferem uma vasta aplicação na área da saúde (DADOU *et al.*, 2017; CAMPOS & RAWLS, 2009). Tem sido produzida através da desacetilação da quitina, que pode ser encontrada na natureza em crustáceos, fungos, insetos, anelídeos e moluscos, dentre outros (Kumar *et al.*, 2018). Possui aplicação na composição de curativos, recobrindo e protegendo feridas, além da eficácia no controle da liberação de fármacos nele incorporados (DALLAN *et al.*, 2005; BERGER *et al.*, 2004; KURITA, 1998) devido à sua característica de biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de acelerar a cicatrização.

A goma xantana é um exopolissacarídeo microbiano produzido por linhagens de *Xanthomonas campestris* pertencentes à família Pseudomonodaceae. Suas colônias bacterianas são de fácil cultivo *in vitro*, apresentando temperatura ideal de crescimento entre 25 ° e 30 °C, produzindo turbidez característica de proliferação celular em meio líquido

D i s c u s s ã o

entre os dias 2 e 3 de fermentação. Possui características funcionais como capacidade de emulsificação, estabilização, floculação e suspensão de soluções aquosas, formando assim géis e membranas (BEJENARIU *et al.*, 2008); bem como alto grau de pseuplasticidade, alta viscosidade mesmo em pequenas concentrações, compatibilidade e estabilidade com a maioria dos sais metálicos, excelente solubilidade e estabilidade tanto em meio ácido quanto alcalino, resistência à degradação em elevadas temperaturas, assim como a oscilações de pH. Atividade antitumoral da xantana também é reportada na literature por TAKEUCHI *et al.* (2009).

A mistura, ou *blend*, entre a quitosana e a xantana forma um complexo polieletrólito (PEC), estabelecido por meio de interações iônicas entre os grupos amino da quitosana e carboxil da xantana. A interação iônica proveniente desta complexação polimérica possibilita variar as características relativas à sensibilidade ao pH, permitindo a imobilização de células, agentes terapêuticos e enzimas (KUMAR *et al.*, 2018, CHELLAT *et al.*, 2000).

As propriedades químicas de uma membrana polimérica que governa o comportamento de adsorção de proteínas podem desempenhar um papel importante na determinação das propriedades biológicas de estruturas de engenharia de tecidos derivadas daquele polímero (UYGUN *et al.*, 2010). A taxa de degradação do hidrogel CH-X é importante para o controle da reação inflamatória e da biocompatibilidade. Parâmetros tais como diluição e concentração de produtos de degradação podem determinar o efeito final dos hidrogéis CH-X nas células circundantes. Com base na sua extrema hidrofiliidade, alta porosidade permitindo a sua invasão por células fagocíticas, e ainda reabsorção e eliminação do corpo, bem como a sua biocompatibilidade aceitável, o CH-X pode constituir um candidato

D i s c u s s ã o

apropriado para um veículo de distribuição de drogas. Os resultados são ainda mais encorajadores se for considerado que a dose de partículas de CH-X administrada foi tão alta quanto 100 mg e concentrada em um local. De acordo com testes *in vitro*, os hidrogéis CH-X exibiram propriedades biocompatíveis muito promissoras. Seus produtos de degradação não levaram a efeitos citotóxicos. A avaliação de IL-1 e TNF- α , bem como a secreção de NO, indicaram ativação de macrófagos (CHELLAT *et al.*, 1999).

Neste estudo foram consideradas densas as membranas que em seu estado seco adquiriram a característica de maior lisura de superfície externa, translucidez (passagem de luz artificial) e principalmente não possuíram surfactante em sua composição química. De acordo com VEIGA & MORAES (2011) e BELLINI *et al.* (2012) as membranas consideradas densas foram as mais indicadas para uso em regeneração tecidual. Este fato permitiu que neste estudo as membranas de quitosa e xantana densas fossem consideradas o grupo controle sendo o grupo experimental composto pelas membranas denominadas de porosas ou seja aquelas que tiveram na sua composição química a presença do surfactante.

MA *et al.* (2001) afirmaram que biomateriais com aplicação como substitutos dérmicos devem ser idealmente mais finos que a derme humana, cuja espessura varia entre 0,5 e 2 mm, dependendo da idade, sexo, bem como, da região do corpo, entretanto arcabouços com até 4 mm de espessura já foram relatados na literatura (WAN *et al.*, 2007). Os resultados obtidos para as membranas preparadas com quitosana e xantana indicaram que as membranas testadas apresentam propriedades convenientes visando a utilização do material como curativos, membranas e arcabouços; apresentando espessura dentro de faixas apropriadas para aplicação na

biotecnologia.

A espessura das membranas destinadas ao uso como suportes celulares é uma variável importante na arquitetura da matriz, podendo interferir na absorção e adsorção de nutrientes do meio, influenciando diretamente propriedades biológicas relevantes das células nele inoculadas, tais como adesão, espalhamento e proliferação celular (UYGUN et al., 2010).

Membranas de quitosana e alginato preparadas similarmente apresentam espessuras inferiores, variando entre 23,5 e 26,0 μm (WANG *et al.*, 2001) e entre 66 e 80 μm (RODRIGUES *et al.*, 2008). VEIGA & MORAES (2011) relataram um aumento na espessura de membranas lamelares de quitosana quando se substituiu o alginato por xantana. Segundo os autores este aumento da espessura pode estar relacionado ao tipo de coacervação e ao empacotamento dos agregados obtidos e à ausência de acetona como co-solvente durante a coacervação, provocando a expansão da estrutura.

Espessuras mais elevadas, variando entre 2,110 a 3,400 mm, foram obtidas nas membranas com a presença dos surfatantes. Tais valores são superiores aos reportados por BUENO & MORAES (2011) para membranas de quitosana/alginato produzidas com tensoativos (entre 0,38 e 0,41 mm quando secas), mas comparáveis aos de outros materiais esponjosos descritos na literatura com aplicação na engenharia tecidual, como *scaffolds* de colágeno com espessura de 1 mm (GEORGE et al., 2008), membranas porosas de quitosana/alginato obtidas por liofilização, com espessura média de 2,5 mm (KUCHARSKA et al., 2008) e de quitosana/poli(láctico), com espessura de 4 mm quando secas, chegando a 6 mm quando hidratadas

(WAN et al., 2007).

Membranas preparadas sem a adição de tensoativos apresentaram elevada capacidade de absorção de água, variando de 65,43 a 77,01 g de H₂O/g de membrana seca. Esses valores são superiores aos descritos na literatura para membranas de quitosana-alginato, que variam entre 11 e 19 g/g em H₂O (RODRIGUES *et al.*, 2008) e quitosana/xantana (entre 24 e 61 g/g em H₂O) preparadas em condições similares (VEIGA & MORAES, 2011), mas inferiores ao apresentado por BELLINI *et al.* (2012) que em membranas quitosana/xantana observou em média 85,6 g/g. Ito pode ser explicado pela existência de uma ligação sub-ótima entre os polímeros, causada pelo excesso relativo de grupos amino da quitosana em relação às carboxilas da xantana, resultando em redes poliméricas mais soltas, capazes de absorver mais água. Isto também foi verificado por MACLEOD *et al.* (1999) para membranas de pectina e quitosana em diferentes proporções poliméricas. Os autores observaram que a proporção polimérica Pectina:Quitosana igual a 2:1, na qual a rede estaria mais unida, apresentou absorção de água cinco vezes inferior à proporção Pectina:Quitosana igual a 1:1. A elevação da capacidade de absorção deu-se, segundo os autores, ao excesso de grupos NH₃ da quitosana na proporção 1:1, causando um decréscimo na quantidade de pontes de hidrogênio formados com a água, resultando em uma rede polimérica mais frouxa, que absorvia mais líquido.

Membranas preparadas na presença do tensoativo absorveram menor quantidade de água quando comparadas às que continham somente polissacarídeos em sua formulação. No entanto, diferenças significativas não foram observadas na capacidade de absorção de solução salina.

O valor médio de absorção encontrado para as membranas com

D i s c u s s ã o

surfatante adicionados em sua preparação (28,72 g/g H₂O e 15,22 g/g SS) são superiores aos reportados por BUENO & MORAES (2011) para membranas porosas de quitosana e alginato, que relatam absorção média de 13,83 g/g em H₂O, 11,96 g/g em SS. As capacidades de absorção de soluções aquosas encontradas neste trabalho também podem ser comparadas às descritas para materiais esponjosos obtidos por liofilização, como curativos esponjosos de quitosana- alginato, que foram capazes de absorver 17,5 g/g em água após 180 min de imersão (KUCHARSKA *et al.*, 2008). Valores parecidos foram relatados por BELLINI *et al.* (2012), onde 24,6 e 17,1 g/g foram medidos para H₂O e SS, respectivamente.

BELLINI *et al.*, 2012 efetuaram o teste de alongamento com as membranas secas, apresentando baixos índices de alongamento, média de 2,02% e 2,13% para membranas de quitosana/xantana densa e porosas, respectivamente. Como tais propriedades foram determinadas para amostras secas e na condição de uso as mesmas possivelmente estariam em contato com fluidos corpóreos, o alongamento das membranas durante sua utilização pode ser significativamente maior que o determinado devido à água exercer um efeito plastificante na estrutura, conforme observado por RODRIGUES *et al.* (2008) para membranas de quitosana e alginato. Esta observação corrobora os achados em nosso trabalho, onde o teste de tensão foi realizado após a hidratação das membranas por 30 minutos e índices de alongamento superiores foram encontrados, com média de 54,017 para membranas densas e 50,864 para membranas porosas.

A adição dos surfatantes na formulação das membranas resultou na estabilização da espuma nos coacervados e, conseqüentemente, na formação de poros na estrutura do material (BELLINI *et al.*, 2012). A presença desses

poros acarretou em grande queda na resistência à ruptura. BUENO & MORAES (2011) também observaram baixa resistência mecânica em membranas de quitosana/alginato preparadas com a adição destes mesmos surfatantes. Outros trabalhos descrevem a baixa resistência mecânica de materiais porosos usados na engenharia de tecidos. SHE et al (2008), por exemplo, reportaram valores entre 0,11 a 0,40 MPa para suportes à base de quitosana e fibra de seda. O presente trabalho alcançou resultados melhores nas membranas porosas do que nas membranas densas.

A preparação das membranas foi realizada de acordo com os protocolos estabelecidos por RODRIGUES *et al.* (2008) para membranas de quitosana/alginato, VEIGA & MORAES (2011) na produção de membranas de quitosana/carragena, quitosana/pectina e quitosana/xantana, e por BELLINI *et al.* (2012) na produção de membranas de quitosana/xantana com o uso de surfactantes, com algumas adaptações; onde efetua-se a homogeneização das soluções de quitosana 1% em solução aquosa de ácido acético 2% a uma rotação de 1.000 RPM e a confecção do blend de Ch/Xn também a 1.000 RPM, até que toda a quitosana seja vertida sobre a xantana; momento em que a rotação do agitador mecânico deve ser aumentada para 1.200 RPM durante 10 minutos. Em nosso experimento a homogeneização das soluções de quitosana e xantana foram realizadas a 1.000 RPM, mas durante a mistura das soluções a rotação teve de ser aumentada para 1.400 RPM pois o blend de Ch/Xn começou a tornar-se muito espesso, não permitindo uma correta homogeneização da mistura. Ao término da inserção da quitosana sobre a xantana a rotação do agitador mecânico foi aumentada para 1.600 RPM por 10 minutos, obtendo-se um blend homogêneo. RODRIGUES *et al.* 2008 concluiu que, alterações no quociente de fluxo com que as soluções são misturadas e na rotação do agitador mecânico alteram as

D i s c u s s ã o

propriedades mecânicas das membranas, como tensão, alongamento, viscosidade, capacidade de absorção de soluções aquosas e estabilidade da membrana quando expostas a essas soluções; o que pode justificar as diferenças encontradas.

Como perspectivas deste trabalho podemos citar a análise por microscopia eletrônica de varredura a fim de se analisar a interconectividade dos poros obtidos com o uso do surfactante, o que deve favorecer a adesão e proliferação celular. Estudos de citotoxicidade mostram-se necessários para analisar a viabilidade celular do biomaterial com o uso do surfactante Pluronic® F127. A formulação e análise de novas proporções de quitosana e xantana, proporcionando diferentes *blends* podem ser explorados, de acordo com as características do tecido que se deseja regenerar é uma possibilidade real deste trabalho.

7 CONCLUSÃO

C o n c l u s ã o

As membranas de quitosana/xantana porosas apresentaram características mecânicas adequadas, com resistência maior ao rasgamento quando comparadas às densas, podendo ser utilizadas como arcabouços e coberturas em estudos experimentais *in vitro* de engenharia tecidual.

8 REFERÊNCIAS

Referências

Alaminos M, Sanches-Quevedo MDC, Muñoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a Complete Rabbit Cornea Substitute Using a Fibrin-Agarose Scaffold. IOVS. 2006; 47(8):3311-7.

Baddour JA, Sousounis K, Tsonis PA. Organ repair and regeneration: An overview. Birth Defects Res. - Part C-Embryo Today. 2012; 96(1):1-29.

Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. Polímeros: Ciência e Tecnologia. 2005; 15(1):13-21.

Bellini MZ, Pires ALR, Vasconcelos MO, Moraes AM. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. J Appl Polym Sci. 2012; 125:E421-E431.

Bellini MZ, Caliari-Oliveira C, Mizukami A, Swiech K, Covas DT, Donadi EA, Oliva-Neto P, Moraes AM. Combining Xanthan and chitosan membranes to multipotent mesenchymal stromal cells as bioactive dressings for dermo-epidermal wounds. J. Biomater. Appl. 2015; 29(8):1155-66.

Bejenariu A, Popa M, Cerf DL, Picton L. Stiffness xanthan hydrogels: synthesis, swelling characteristics and controlled release properties. Polym. Bull. 2008; 61:631-41.

Referências

Beppu MM, Arruda EJ, Santana CC. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. *Polímeros: Ciência e tecnologia*. 1999; 9(4):163-69

Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004; 57:19-34.

Bueno CZ, Moraes AM. Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: effect of different surfactants on biomaterial properties. *J App Polym Sci*. 2011; 122:624-31.

Bueno CZ, Dias AMA, Sousa HJC, Braga MEM, Moraes AM. Control of the properties of porous chitosan-alginate membranes through the addition of different proportions of Pluronic F68. *Mater. Sci. Eng. C-Biomimetic Supramol. Syst*. 2014; 44:117-25.

Bueno VB, Petri DFS. Xanthan hydrogels films: Molecular conformation, charge density and protein carriers. *Carbohy. Polym*. 2014; 101:897-904.

Busilacchi A, Gigante A, Mattioli-Belmonte M, Manzotti S, Muzzarelli RAA. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohy. Polym*. 2013; 98:665-76.

Referências

Campos MGN, Rawls HR, Innocentini-Mei LH, Satsangi N. In vitro gentamicin sustained and controlled release from chitosan cross-linked films. *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 2009; 20:537-42.

Capito RM, Spector M. Scaffold-based articular cartilage repair. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 2003; 22(5):42-50.

Chellat F, Tabrizian M, Dumitriu S, Chornet E, Magny P, Rivard CH, Yahia L. In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan polyonic complex. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999;51:107-16.

Chellat F, Tabrizian M, Dumitriu S, Chornet E, Magny P, Rivard CH, Yahia L. Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater).* 2000; 53:592-9.

Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterial for tissue engineering. *Eur. Polym. J.* 2013; 49:780-92.

Dadou SM, El-Barghouthi M, Alabdallah SK, Badwan AA, Antonijevic MD, Chowdhry BZ. Effect of protonation state and N-acetylation of chitosan on its interaction with xanthan gum: A molecular dynamics simulation study. *Mar Drugs.* 2017; 15(10):298-323.

Referências

Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *Internat. J. Polym. Scie.* 2011;1-19.

George J Onodera J, Miyata T. Biodegradable Honeycomb Collagen Scaffold For Dermal Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res Part A.* 2008; 87:1103- 11.

George M Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *J. Control. Release.* 2006; 114:1-14.

Getgood A, Brooks R, Fortier L, Rushton N. Articular cartilage tissue engineering. *J Bone Joint Surg.* 2009; 91:565-76.

Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterial.* 2000; 21:2529-43.

Kucharska M, Niekraszewicz A, Wiśniewska-Wrona M, Brzoza-Malczewska K. Dressing sponges made of chitosan and chitosan-alginate fibrids. *Fibres Text East Eur.* 2008; 16(3):109-13.

Kumar A, Rao KM, Han SS. Application of xanthan gum as polysaccharide in the tissue engineering – A review. *Carbohy. Polym.* 2018; 180:128-44.

Referências

Kurita K. Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polym Degrad Stabil.* 1998; 59:17- 20.

Lauer G, Schimming R. Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: A clinical and immunohistologic study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 59:169-77.

Llames SG, Del-Rio M, Larcher F, Garcia E, Garcia M, Escamez MJ, Jorcano JL, Holguín P, Meana A. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation.* 2004; 77(3):350-55.

Llames S, Garcia E, Garcia V, Del-Rio M, Larcher F, Jorcano JL, López E, Holguín P, Miralles F, Otero J, Meana A. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank.* 2006; 7:47-53.

Ma J, Wang H, He B, Chen J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials.* 2001; 22:331-6.

Macleod GS, Collett JH, Fell JT. The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *J Control Release.* 1999; 58:303-10.

Referências

- Meana A, Iglesias J, Del-Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martin C, San Roman F, Tever F. Large surface of cultured epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrina gels. *Burns*. 1998; 24:621-30.
- Meng X, Tian F, Yang J, Chun-Nian H, Xing N, Li F. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *J. Mater. Sci: Mat. Med.* 2010; 21(5):1751-59.
- Mi FL, Shyu SS, Wu YB, Lee ST, Shyong JY, Huang RN. Fabrication and characterization of sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*. 2001; 22:165-73.
- Needleman IG, Martin GP, Smales FC. Characterisation of bioadhesives for periodontal and mucosal drug delivery. *J Clin Periodontol*. 1998; 25:74-82.
- Nishida, K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea*. 2003; 22(suppl.1):S28-S34.
- Pabbruwe MB; Esfandiari E, Kafienah W, Tarlton JF. Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. *Biomaterials*. 2009; 30:4277-86.
- Pascual G, Rodríguez M, Corrales C, Turégano F, García-Hoduvilla N, Bellón JM, Buján J. New approach to improving endothelial preservation in cryopreserved arterial substitutes. *Criobiology*. 2004; 48:62-71.

Referências

Ribeiro JCV, Vieira RS, Melo IM, Araújo VMA, Lima Vilma. Versatility of chitosan-based biomaterials and their use as scaffolds for tissue regeneration. *The Scientific Wound Journal*. 2017; V2017: 25 pages.?

Rodrigues AP, Sanchez EMS, Costa AC, Moraes AM. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *J. Appl. Polym. Sci*. 2008; 109:2703-10.

Sancho-Tello M, Martorell S, Roig MM, Milián L, Gámiz-González MA, Ribelles JLG, Carda C. Human platelet-rich plasma improves the nesting and differentiation of human chondrocytes cultured in stabilized porous chitosan scaffolds. *J. Tissue Eng*. 2017; 8:1-6.

Schultze-Mosgau S, Lee BK, Ries J, Aman K, Wiltfang J. In Vitro cultured autologous pre-confluent oral keratinocytes for experimental prefabrication of oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33:476-85.

She Z, Jin C, Huang Z, Zhang B, Feng Q, Xu V. Silk fibroin/chitosan scaffold: preparation, characterization, and culture with HepG2 cell. *J Mater Sci-Mater Med*. 2008; 19:3545-53.

Song J, Izumi K, Lanigan T, Feinberg SE. Development and characterization of a canine oral mucosa equivalent in a serum-free environment. *J. Biomed. Mat. Res.-Part A*. 2004; 71(1):143-53.

Referências

Souza RFB, Souza FCB, Moraes AM. Analyses of the performance of polysaccharide membranes in aqueous media as a tool to assist wound-dressing selection. *J Appl Polym Sci.* 2017; 134:45386.

Szymanska E, Winnicka K. Stability of chitosan – A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Mar Drugs.* 2015; 13:1819-46.

Takeuchi A, Kamiryu Y, Yamada H, Eto M, Shibata K, Haruna K, Naito S, Yoshikai Y. Oral administration of xanthan gum enhances antitumor activity through toll-like receptor 4. *Int Immunopharmacol.* 2009; 9:1562-7.

Toft K, Keller GS, Blackwell KE. Ectopic hair growth after flap reconstruction of the head and the neck. *Arch Facial Plast Surg.* 2000; 2:148-50.

Uygun BE, Bou-Akl T, Albanna M, Matthew HW. Membrane thickness in an important variable in membrane scaffolds: influence of chitosan membrane structure on the behavior of cells. *Acta Biomater.* 2010; 6:2126-31.

Van Vlierberghe S, Dubruel P, Schacht E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review. *Biomacromolecules.* 2011; 12:1387-408.

Veiga IG, Moraes AM. Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes. *J. Appl. Polym. Sci.* 2012; 124:E154-E160.

Referências

Wan Y, Wu Q, Wang S, Zhang S, Hu Z. Mechanical properties of porous polylactide/chitosan blend membranes. *Macromol Mater Eng.* 2007; 292:598-607.

Wang L, Khor E, Lim LY. Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application. *J Pharm Sci.* 2001; 90:1134-42.

Wittaya-Areekul S, Prahsarn C. Development and in vitro evaluation of chitosan- polysaccharides composite wound dressings. *Int. J. Pharm.* 2006; 313:123-28.

Wunsch L, Ehlers EM, Russlies M. Matrix testing for urothelial tissue engineering. *Eur J Pediatr Surg.* 2005; 15:164-69.

Zhao F, Yin Y, Lu WW, Leong JC, Zhang W, Zhang J, Zhang M, Yao K. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials.* 2002; 23:3227-34.

NORMAS ADOTADAS

Normas – Adotadas

American Society for Testing and Materials ASTM D882–12: Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, 2012.

Ferreira LM. Projetos, dissertações e teses – Orientação Normativa. São Paulo: Red Publicações; 2017. 118p.

APÊNDICES



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



São Paulo, 12 de dezembro de 2016
CEP N 5586051216

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Fabio Alessandro Simões

Depto/Disc: Cirurgia / Cirurgia Plástica

Pesquisadores associados: Antonio Carlos Aloise (unifesp); Lydia Masako Ferreira (orientador)

Título do projeto: "MUCOSA ORAL ARTIFICIAL".

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP

Projeto de Pesquisa de Fabio Alessandro Simões Apresentado à Universidade Federal De São Paulo, Para Matrícula No Programa De Pós-Graduação Em Cirurgia Translacional – Nível Mestrado. Orientadora: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira; Co-Orientador: PROF. Antonio Carlos Aloise

O desenvolvimento in vitro de uma mucosa oral artificial mostrou-se viável, vindo de encontro a atual necessidade de biomaterias substitutos aos autógenos, minimizando a morbidade e a falta de disponibilidade de quantidades autógenas ideais para enxertia. Embora sua viabilidade já tenha sido demonstrada em diversos trabalhos, faz-se necessário o desenvolvimento de uma mucosa oral artificial dentro deste laboratório de cultura de células pois uma vez este modelo sendo estabelecido, outros estudos poderão ser realizados. Assim, o objetivo deste estudo é o de

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 12/12/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** ao CEP até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Miguel Roberto Jorge

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

A p ê n d i c e s

Tabela 6- Análise realizada por máquina de ensaio universal para avaliação da força máxima de rasgamento nas membranas do grupo controle (GC) (n=14) e grupo experimental (GE) (n=14). Valores expressos em *newtons* (N).

	Grupos		Valor de <i>P</i>
	GC	GE	
1	1,150	7,990	
2	3,720	8,110	
3	2,680	7,570	
4	1,840	6,480	
5	1,610	5,390	
6	2,030	3,840	
7	1,260	3,260	
8	3,000	3,880	
9	2,080	5,240	
10	2,900	3,720	
11	0,870	2,540	
12	3,970	3,500	
13	1,480	2,360	
14	1,910	4,060	
Média	2,178	4,852	0,02*
DP	0,947	1,975	

Análise pelo Teste “t” de *Student* considerando valores de $p \geq 0,05$ como *significantes e assinalados com (*)*

GC: membranas de quitosana e xantana densas

GE: membranas de quitosana e xantana porosas

A p ê n d i c e s

Tabela 7 - Análise realizada por máquina de ensaio universal para avaliação do alongamento na ruptura – distância entre as garras nas membranas do grupo controle (GC) (n=14) e grupo experimental (GE) (n=14). Valores expressos em *milímetros* (mm)

	Grupos		Valor de <i>P</i>
	GC	GE	
1	16,385	17,381	
2	18,374	17,379	
3	25,501	24,045	
4	23,845	20,715	
5	16,219	15,389	
6	21,524	26,661	
7	15,058	21,854	
8	23,678	13,400	
9	29,314	16,052	
10	17,711	27,324	
11	14,726	20,363	
12	25,003	21,191	
13	16,715	18,705	
14	25,004	28,651	
Média	20,646	20,650	0,93
DP	4,724	4,678	

Análise pelo Teste “t” de *Student* considerando valores de $p \geq 0,05$ como *significantes e assinalados com (*)*

GC: membranas de quitosana e xantana densas

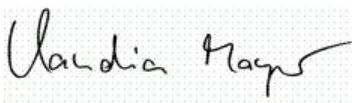
GE: membranas de quitosana e xantana porosas

ANEXOS

SIGMA-ALDRICH3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com**Certificate of Analysis**

Product Name: CHITOSAN
medium molecular weight
Product Number: 448877
Batch Number: STBH0024
Brand: Aldrich
CAS Number: 9012-76-4
Formula:
Formula Weight:
Quality Release Date: 05 MAY 2017

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	OFF WHITE TO BEIGE AND FAINT BROWN TO LIGHT BROWN	LIGHT BEIGE
APPEARANCE (FORM)	POWDER AND/OR CHIPS	POWDER
ASSAY	75 - 85 % DEACETYLATION	82.0 %
VISCOSITY	200 - 800 CPS (C = 1%, 1% ACETIC ACID)	420 CPS



Claudia Mayer
Manager Quality Control
Steinheim, Germany

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

SIGMA-ALDRICH®sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sial.comOutside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:

Xanthan gum from *Xanthomonas campestris*

Product Number: G1253
Batch Number: SLBS9383
Brand: SIGMA
CAS Number: 11138-66-2
MDL Number: MFCD00131256
Quality Release Date: 19 DEC 2016

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Yellow to Tan	Faint Tan
Appearance (Form)	Powder	Powder
Brookfield Viscosity 1% Solution	800 - 1200 cps	940 cps



Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

SIGMA-ALDRICH3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com**Certificate of Analysis**

Product Name: PLURONIC™ F-127
powder, BioReagent, cell culture
Product Number: P2443
Batch Number: BCBV8048
Brand: Sigma
CAS Number: 9003-11-6
Formula:
Formula Weight:
Quality Release Date: 05 OCT 2017
Recommended Retest Date: AUG 2019

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS	COLORLESS
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	50MG/ML WATER, AT LESS THAN 10 DEG C	50MG/ML WATER, AT LESS THAN 10 DEG C
PH	6.0 - 7.0	6.9
PH (METHOD)	2.5 % SOLUTION	--
WATER	≤ 0.75 %	0.50 %
CELL CULTURE TEST	PASS	PASS
REMARKS	PLURONIC IS A REGISTERED TRADEMARK OF BASF CORPORATION	--



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

FONTES CONSULTADAS

Fontes Consultadas

Adati, HK. Preparação e avaliação das propriedades físico-químicas de membranas de quitosana para uso biomédico e farmacêutico. Dissertação (Mestrado em tecnologia Bioquímico-farmacêutica). (São Paulo) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP; 2006.

Asti AL, Barbanti SH, Duek EAR. Polímeros bioreabsorvíveis como suporte para cultura de células na engenharia de tecidos: estudo da degradação in vitro. XIII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP: 2005; Campinas, SP.

Bhat SV. Overview of Biomaterials. In: Bhat SV. Biomaterials. 2. Ed. New Delhi, India. Narosa Publishing House; 2005, p.279.

Bradbury JF. Xanthomonas dowson. In: Krieg NR, Holt JG. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Willians & Wilkins, v.1, p.199-210, 1984.

Dallan PRM. Síntese e Caracterização de Membranas de Quitosana para Aplicação na Regeneração de Pele. Tese (Doutorado). Campinas. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Dumitriu S. Polysaccharides as biomaterials. In: Dumitriu S. Polymeric Biomaterials. 2a Edição, University of Sherbrooke, Quebec, Canada. Marcel Dekker, New York; 2002, p.1-61.

Fontes Consultadas

Faria, S. Produção de Goma Xantana Empregando Caldo de Cana por *Xanthomonas campestris* pv *campestris* NRRL B-1459. Dissertação - (Mestrado em Engenharia Química). Uberlândia. Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia; 2005.

Hon DNS. Chitin and chitosan: medical applications. In: Dumitriu S. Polysaccharides in Medical Applications. University of Sherbrooke, Quebec, Canada. Marcel Dekker, New York. 1996; p.631-649.

Ikada, Y. Membranes as biomaterials. In: Dumitriu S. Polysaccharides in Medical Applications. University of Sherbrooke, Quebec, Canada. Marcel Dekker, New York. 1996; p.663, 1996.

Kennedy JF, Bradshaw IJ. Production, properties and applications of xanthan, In Bushell ME. Progress in industrial microbiology, Elsevier, p.495-498, 1984.

Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schimidell W. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. Ed. Edgard Blucher, Brasil, v.3, 2001.

Machado JLM, Benderovics G, Santos LA. Obtenção de suporte para engenharia de tecidos utilizando-se cimento de α -trifosfato de cálcio (α -TCP). 17o CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2006.

Fontes Consultadas

Miyaguti RM. Remoção de Fenol de Soluções Aquosas através da Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada em Quitosana. (Monografia apresentada para conclusão do curso de Bacharelado em Biotecnologia). Universidade Estadual Paulista – UNESP; 2008.

Quinn, FX. Xanthan Gum. In: Salamone, JC. Concise Polymeric Materials Encyclopedia, Boca Raton. 1999; p.1652-1653.

Rhein LD, Schlossman M, O'lenick A, Somasundaran P. Surfactants in personal care products and decorative cosmetics. 3a ed. Surfactant series v. 135. New York, Estados Unidos: CRC Press, Taylor and Francis, 2007.

Silva, CRR. Efeito da sacarose e ácidos orgânicos no crescimento celular, produção e viscosidade de goma xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Rio Claro. Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, UNESP; 2007.

Sutherland IW. Xanthan. In: Swings JG, Civerolo EL. *Xanthomonas*. Chapman & Hall, Londres, p.363-388, 1993.