

FERNANDO BIOLCATI CHIANTIA

**MEMBRANA DE QUITOSANA E XANTANA EM
LESÃO CUTÂNEO PERIOSTEAL NA CALVÁRIA DE
RATOS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências

São Paulo

2019

FERNANDO BIOLCATI CHIANTIA

**MEMBRANA DE QUITOSANA E XANTANA EM
LESÃO CUTÂNEO PERIOSTEAL NA CALVÁRIA DE
RATOS**

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

Coorientador: Prof. Antonio Carlos Aloise

São Paulo



2019



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL

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

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

COORIENTADOR: Prof. Antonio Carlos Aloise

2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **MAURO CAETANO CHIANTIA E MARIA APARECIDA BIOLCATI CHIANTIA**, pela base e pelo amor incondicional, além de todo suporte oferecido para minha evolução pessoal e profissional e serem sempre os meus maiores exemplos.

À minha amada esposa, **MARINA PASCHOAL HOMEM DE MELO CHIANTIA**, pelo amor, por todo o suporte e apoio que me são dados diariamente. Sua força é minha luta.

Aos meus filhos, **JOÃO PEDRO E MATEUS**, por serem a razão de minha luta e estudos. São meus presentes de Deus e com eles aprendo mais que meus estudos.

Aos meus irmãos, **FABIO BIOLCATI CHIANTIA (*In Memoriam*)** por ter dado todo o *start* nessa minha profissão e por ser meu guia eterno e **ADRIANE BIOLCATI CHIANTIA MC CARDELL**, por ser um exemplo de bondade e retidão e pelo amor e companhia que sei que posso contar a qualquer momento.

A minha sogra, **MARIA EUNICE PASCHOAL HOMEM DE MELO** pelo apoio e pelo suporte em tudo, por ficar com meus filhos, quando não podíamos estar com eles, pelas orações e apoio aos estudos.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**, titular da disciplina de Cirurgia Translacional da Universidade Federal de São Paulo, orientadora desta tese, um exemplo de pesquisadora, pela oportunidade e confiança depositada em minha pessoa para a execução deste trabalho, pelo seu apoio e por ser um exemplo na luta pelo crescimento da Pós-Graduação Brasileira.

Ao **Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE**, afiliado da disciplina de Cirurgia Plástica – UNIFESP – Escola Paulista de Medicina, um verdadeiro mestre e amigo, presente integralmente neste projeto, sendo paciente e determinado em nos guiar. Mostrando 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, FABIO ALESSANDRO SIMÕES e MATEUS ABREU PEREIRA**, pela união, incentivo, apoio, compreensão e dedicação para que este trabalho se tornasse realidade.

À colega de laboratório e **PÓS GRADUAÇÃO**, que me acompanha desde o Mestrado, com carinho especial **ANDRÉA C. BAPTISTA COELHO DE FARIA** pela convivência, aprendizado e pelos bons momentos compartilhados juntos, durante as apresentações, nas reuniões do Laboratório e viagens às segundas-feiras.

A todos os professores e demais alunos do Programa de PÓS GRADUAÇÃO em Cirurgia Translacional, pelas colaborações durante as apresentações nas reuniões do PPG.

Às secretarias do programa de PÓS GRADUAÇÃO **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.

Às gerentes administrativas da ACDC, **DANIELA ANGELO e ROSÂNGELA ROSSETTO**, pelo apoio, retaguarda e lealdade junto ao trabalho na ACDC e pela ajuda direta e indireta com a administração de meu tempo, frente à Presidência da entidade.

*“Dificuldades preparam pessoas comuns para
destinos Extraordinários”*

Sarah Robb O’Hagan

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURA	XI
RESUMO.....	XIV
<i>ABSTRACT</i>.....	XV
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVO.....	06
3 LITERATURA.....	08
4 MÉTODO.....	22
5 RESULTADOS.....	38
6 DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÃO.....	49
8 REFERÊNCIAS.....	51
NORMAS ADOTADAS.....	60
APÊNDICE.....	62
FONTES CONSULTADAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – a) Agitador mecânico usado na preparação da solução de quitosana 1% em solução aquosa de ácido acético 2%; b) Solução de quitosana homogeneizada..... 25
- Figura 2 – Preparação da solução aquosa de xantana 1%, com o auxílio de um agitador mecânico.....27
- Figura 3 – Bomba peristáltica usada para a adição da solução de quitosana 1% em ácido acético 2%, sobre a solução de xantana 1%, mantidas sob agitação.....28
- Figura 4 – Placas de poliestireno 90 x 15 mm, contendo porções de 80 ml da solução de quitosana/xantana, para serem levadas em estufa para secagem.....29
- Figura 5 – a) Determinação dos pontos craniométricos, baseados nas referências anatômicas para a excisão da lesão periosteal de 10mm². b) Determinação dos pontos centrais, para delimitação da lesão final.....32
- Figura 6 – Anestesia local com cloridrato de lidocaína 1:100.000 - 2% epinefrina.....33
- Figura 7 – a) Incisão do retalho demarcado com o uso cabo e lâmina de bisturi tamanho15c. b) Excisão cutânea com auxílio de tesoura.....33
- Figura 8 – Remoção do perióstio após excisão cutânea, no tamanho da lesão na área demarcada.....34
- Figura 9 - a) GC – área cruenta, sem membrana de quitosana/xantana; b) Área cruenta com membrana de quitosana/xantana, suturada junto ao perióstio das margens da lesão.....35

Figura 10 – a) Demonstração da delimitação da área cruenta analisada através do uso do *software* ImageJ, para obtenção das médias e desvio padrão dos valores das áreas de tecido não cicatrizados.....36

Figura 11 – Aspecto final da membrana de quitosana/xantana produzida, mostrando translucidez.....39

LISTA DE ABREVIATURAS

BMSC	Célula estromal da medula óssea
BMP	Proteína morfogenética óssea
BSA	Albumina de soro bovino
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
Ch	Quitosana
Ch-Xn	Quitosana-Xantana
cm	Centímetro
DTR	Defeito tecidual remanescente
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGF	Fatores de Crescimento de Fibroblastos
FTIR- ATR	Titulação potenciométrica e espectroscopia por infra vermelho
GC	Grupo controle
GE	Grupo experimental
g	Gramas
HCL	Ácido clorídrico
HUVECs	Células endoteliais vasculares umbilicais humana
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
KDa	Kilo Dalton
IL- 1β	Interleucina 1 beta
Lyz	Lisozima
MSC	Célula-troco mesenquimal
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscopia de força atômica
mg/kg	Miligrama por kilo de peso
ml	Mililitro
ml/kg	Mililitro por kilo de peso
mm	Milímetros
mm²	Milímetros quadrado

MM-DBSA	Mecânica molecular da área de superfície de <i>Poisson-Boltzmann</i>
Mpa	Mega Pascal
MNaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
n°	Número
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCL	Policaprolactona acelular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGA	Ácido poliglicólico
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
p/v	Relação peso/volume
Q/X	Quitosana/Xantana
Qui/Xan	Quitosana/Xantana
RPM	Rotação por minuto
SGF	Fluido Gástrico Simulado
SIF	Fluido Intestinal Simulado
SS	Solução salina
T	Tensão
TEM	Microscopia eletrônica de luz e transmissão
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TSA	Meio de cultura (<i>Tryptose Soy Agar</i>)
UI/kg	Unidades internacionais por kilograma de peso
v/v	Relação volume/volume
X	Vezes (aumento)
XCA	Presença de ácido cítrico
Xn	Xantana
XNT	Ausência de ácido cítrico
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
%	Porcento

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
γ	Gama
®	Marca registrada

RESUMO

Introdução: O perióstio é uma estrutura complexa composta por uma camada fibrosa externa que confere integridade estrutural e uma camada interna, que possui potencial osteogênico e reparador. Quando ocorre uma lesão extensa, que não permite a reparação espontânea do perióstio, há uma dificuldade na reparação da ferida. Com isso, há uma busca por biomateriais substitutos, com capacidade reparadora. Pesquisas com polímeros biorreabsorvíveis, de origem natural como quitosana, alginato, gelatina, celulose e seus derivados, combinados ou usados individualmente, vem sendo aplicados em engenharia de tecidos no desenvolvimento de membranas ou curativos dérmicos. **Objetivo:** Avaliar a membrana composta de Quitosana e Xantana em lesão cutâneo periosteal na calvária de ratos. **Método:** Foram utilizados 24 ratos Wistar, machos, pesando em média 360 g e com idade de 10 semanas. Todos os ratos foram submetidos a excisão de 10mm² de pele e perióstio da calvária subjacente e a realização de cobertura ou não da lesão. Foram distribuídos em 2 grupos: Grupo Controle (GC), sem membrana de quitosana/xantana, n=12 e Grupo Experimental (GE), com membrana de quitosana/xantana, n=12. Os ratos foram eutanasiados nos tempos de 2, 4 e 6 semanas pós cirúrgicos, e foram obtidos os espécimes da calvária, onde realizou-se a análise macroscópica da área cruenta. Na análise macroscópica, com o uso de um *software* ImageJ, foram obtidas as médias dos valores das áreas da lesão periosteal nas calvárias não cicatrizadas. **Resultados:** Na análise macroscópica, da quantidade de área cruenta, na 2^a semana, os valores expressos para o GC e GE, foram respectivamente 93,7% e 81,3%. Na 4^a e na 6^a semanas, os valores da área cruenta do GE foram 52,3% e 11,3% respectivamente, e no GC foram 78,8% e 69,9%. **Conclusão:** A membrana de quitosana/xantana, em lesão cutâneo periosteal na calvária de ratos, acelerou o processo de cicatrização.

ABSTRACT

Introduction: The periosteum is a complex structure composed of an external fibrous layer that provides structural integrity and an internal layer, which has osteogenic and repair potential. When an extensive injury occurs, which does not allow spontaneous repair of the periosteum, there is a difficulty in repairing the wound. With this, there is a search for substitute biomaterials, with reparative capacity. Research with bioresorbable polymers, of natural origin such as chitosan, alginate, gelatin, cellulose and their derivatives, combined or used individually, has been applied in tissue engineering in the development of membranes or dermal dressings. **Objective:** To evaluate the membrane composed of chitosan and xanthan in periosteal cutaneous lesion in rat calvaria. **Method:** Twenty-four male Wistar rats weighing 360 g on average and 10 weeks old were used. All rats were submitted to 10mm² skin excision and periosteum of the underlying calvary and the lesion was covered or not. They were divided into 2 groups: Control Group (CG), without chitosan / xanthan membrane, n = 12 and Experimental Group (EG), with chitosan / xanthan membrane, n = 12. The rats were euthanized at 2, 4 and 6 weeks after surgery, and the calvary specimens were obtained, where macroscopic analysis was performed. In the macroscopic analysis, using ImageJ software, the mean values of the areas of the unhealed periosteal lesion in the calvary were obtained. **Results:** In the macroscopic analysis of the amount of bloody area in the 2nd week, the values expressed for CG and EG were 93.7% and 81.3%, respectively. In the 4th and 6th weeks, the values of the gut area were 52.3% and 11.3% respectively, and in the CG 78.8% and 69.9%. **Conclusion:** The chitosan/xanthan membrane, in periosteal cutaneous lesion in rat calvaria, accelerated the healing process.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A capacidade regenerativa do periósteo foi reconhecida séculos atrás por Ollier em 1867, e é descrita no trabalho de DWEK. DWEK (2010) relata que este tecido tem um importante papel no crescimento e reparo ósseo e tecidual, e tem um impacto importante, quando ocorre alguma agressão ao periósteo, havendo a necessidade de uma reparação. Apesar da importância do periósteo, ele recebeu pouca atenção na literatura nos últimos anos.

A maior e melhor capacidade adaptativa e reacional do periósteo promove fenômenos locais, e está na dependência de uma agressão mais severa ao periósteo, ou agressão leve e de longa duração, produzindo mediadores, que aumentam no local agredido e induzem a fenômenos reparadores. Esses mesmos mediadores, em níveis mais elevados, induziriam fenômenos reabsortivos, e da manutenção de sua integridade estrutural e funcional, preservando-se suas células e a estrutura circulatória do periósteo para o osso, fundamentais para produzir-se novas camadas ósseas e teciduais, na superfície das corticais (BISSERET *et al.*, 2015).

Procedimentos cirúrgicos na cavidade bucal ocasionalmente resultam em exposição do osso, e isso é verdadeiro em casos que envolvem ressecção parcial de partes moles devido a traumas, cirurgias, cânceres orais ou lesões pré-cancerosas (KOSHINUMA *et al.*, 2016). Esses procedimentos também incluem vestibuloplastia para tratamentos pré-protéticos e ressecção de lesões mucosas amplas nas áreas gengival e alveolar. Quando a remoção do periósteo é necessária, a exposição da superfície óssea pode ser problemática, levando a processos inflamatórios

agudos e de difícil reparação (FRÖSCHL & KERSCHER, 1997; KOSHINUMA *et al.*, 2016).

Superfícies ósseas expostas na cavidade oral são propensas não apenas à inflamação e/ou infecção, mas também à formação de cicatriz durante a cicatrização secundária. A cobertura adequada do periósteo exposto ou da superfície óssea é frequentemente necessária para prevenir essas complicações (FRÖSCHL & KERSCHER, 1997).

A partir do periósteo se estabelece a nutrição sanguínea da estrutura óssea, auxiliados pelo endósteo, Sistema Haversiano e medula óssea. O rebatimento cirúrgico do periósteo, inevitavelmente traumático, implica em perda de viabilidade biológica da camada mais superficial da cortical. Os osteócitos mais superficiais morrem e a camada de matriz onde se localizavam sofre reabsorção, com ou sem neoformação compensatória, o que depende das condições locais estabelecidas (CONSOLARO, 2014; BISSERET *et al.*, 2015).

O periósteo é importante no complexo processo de consolidação óssea e reparação tecidual. No período de 24 a 48 horas após uma lesão periosteal, uma reação inflamatória aguda pode ser observada (CLARKE, 2008). Subsequentemente, as células periosteais começam a proliferar e um espessamento do periósteo é observado após essas 48 horas. Este processo é definido como ativação periosteal. Ao comparar as lesões periosteais com lesões endosteais, COLNOT relatou que as lesões periosteais cicatrizam por ossificação endocondral, enquanto lesões endosteais da medula óssea cicatrizam por ossificação intramembranosa sem condrogênese (COLNOT, 2009).

As células da medula óssea ou endósteo permanecem na cavidade medular e não migram para formar a consolidação óssea (COLNOT, 2009). Estes resultados indicaram que as contribuições das células periosteais

podem ser importantes para a formação de remodelação óssea. De fato, a ativação de células progenitoras derivadas de periósteo podem induzir condrogênese e a osteogênese, acompanhada por indução da angiogênese, que eventualmente pode levar à vascularização e remodelação de enxertos ósseos, com isso, haverá reparação tecidual. (COLNOT *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012).

Um dos primeiros passos, por meio da bioengenharia tecidual, tem sido a seleção de materiais a serem utilizados na preparação de arcabouços (VEIGA & MORAES, 2012; GONZALEZ *et al.*, 2019). Diferentes tipos de materiais poliméricos de origem natural ou sintética, têm sido utilizados, como exemplo, na produção de curativos dérmicos. Algumas propriedades intrínsecas do biomaterial, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência mecânica, tamanho e formato de poros tem sido relatada como relevantes, assim como permitir a adesão celular, crescimento, migração e diferenciação celular (BELLINI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012).

O uso de polímeros biorreabsorvíveis de origem natural como quitosana, alginato, gelatina, celulose e seus derivados (BUENO & MORAES, 2011; BELLINI *et al.*, 2012; KOSHINUMA *et al.*, 2016), preparados separadamente ou associados, têm sido estudados e aplicados em engenharia de tecidos, assim como o uso da xantana, os quais representam uma alternativa para a produção destes arcabouços. A natureza policatiônica da quitosana tem permitido seu uso na preparação de complexos polieletrólitos com espécies aniônicas (CHELLAT *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2017). Sendo a xantana um poliânion, sua interação com a quitosana, em condições apropriadas, possibilitou a formação de um complexo iônico com características que permitam o seu uso como curativos (VEIGA & MORAES, 2012).

Assim como a quitosana, a xantana é um polissacarídeo atóxico, sendo obtido pela fermentação da bactéria *Xanthomonas campestris*, podendo apresentar atividade emulsificante, estabilizante e flocculante, formando géis, filmes e membranas (NEEDLEMAN *et al.*, 1998; ROMERO *et al.*, 2015). A complexação da xantana com a quitosana, através de interações entre os grupos amino da quitosana e carboxil da xantana, possibilita a obtenção de membranas que apresentam elevada absorção de soluções aquosas e com estabilidade comprovada em fluidos biológicos (BUENO & PETRI, 2014; KUMAR *et al.*, 2018). Tais características, são importantes na aplicação como curativos e suportes tridimensionais para o cultivo celular na área de engenharia de tecidos (GONZALEZ *et al.*, 2019). O complexo quitosana/xantana, já é utilizado para a imobilização de enzimas e como componente de microesferas, comprimidos, cápsulas, e membranas para curativos dérmicos (BELLINI *et al.*, 2015). Os resultados mostraram que as membranas não são mutagênicas e apresentam uma arquitetura favorável para adesão, manutenção e proliferação de células. Mostraram também uma aceleração significativa da cicatrização da ferida dermo-epidérmica, levando à conclusão de que esta associação membrana-células pode ser considerada viável na engenharia de tecidos (BELLINI *et al.*, 2012; BELLINI *et al.*, 2015).

Com base nos trabalhos de BELLINI *et al.*, a idéia de se produzir uma membrana com as mesmas características das que foram produzidas, com a combinação de quitosana e xantana, e razão de suas propriedades apresentadas, e que possa servir como um substituto para o perióstio, é que nos levou a realizar o presente estudo. A utilização de uma membrana composta de quitosana e xantana como um biomaterial substituto do tecido periosteal, não foi descrita na literatura consultada.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar a membrana de quitosana e xantana em lesão cutâneo periosteal da calvária, em ratos.

3 LITERATURA

3 LITERATURA

NEEDLEMAN *et al.* (1998) Examinaram as propriedades físicas de géis e formulações semi-sólidas que favorecem a retenção e a bioadesão *in situ*. As propriedades reológicas e de hidratação são importantes neste contexto e este estudo teve como objetivo correlacionar a medida destas propriedades com a bioadesão observada, tanto *in vitro* como *in vivo*. Três biomateriais bioadesivos foram selecionados. Estas foram soluções aquosas(géis) de quitosana, goma xantana e gel de óxido de etileno (poly). Foram analisadas as taxas de hidratação com vários meios aquosos, sendo água destilada, solução salina tamponada e solução fosfatada. Com uma câmara de hidratação, cada polímero acima, foi colocado em uma incubadora a 37 °C e em intervalos de tempo pré-determinados. Cada um dos três géis foi removido da placa de poços, secos em papel absorvente e pesado antes de ser substituído na incubadora. A observação do comportamento desses polímeros se deu a cada 15 minutos pelo período de 1 hora, depois de hora em hora, por 6 horas. As propriedades reológicas foram medidas usando um reômetro de estresse controlado sob condições reguladas. Os resultados demonstraram que os três polímeros estudados com diferentes propriedades bioadesivas, sendo elas quitosana, a xantana e poly (gel a base de óxido de etileno) também possuíam características físicas muito diferentes quanto a adesividade. 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*. Os autores sugerem, que formulações que poderiam demonstrar resistência a alterações nas propriedades reológicas na hidratação podem também favorecer a retenção *in situ*.

CHELLAT *et al.* (1999) investigaram a biocompatibilidade do complexo quitosana/xantana (Qui-Xan) usando modelos *in vitro* e *in vivo*. Os efeitos citotóxicos das microesferas Qui-Xan, 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). A avaliação de biocompatibilidade *in vivo* foi realizada de 1 a 12 semanas. Este estudo utilizou comprimidos, obtidos após a compressão de partículas de quitosana/xantana, implantadas ao nível subcutâneo em ratos Wistar machos. A biocompatibilidade e degradação polimérica foram investigadas realizando análises histológicas. 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. 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. Estudos histológicos mostraram que os comprimidos se degradaram progressivamente em fragmentos menores. Estudos de microscopia de luz mostraram uma reação de corpo estranho. 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. Com base nessas declarações, as microesferas de qui/xan podem potencializar a administração de medicamentos no trato gástrico e no intestino.

RODRIGUES *et al.* (2008) avaliaram as formas de preparação e a caracterização de membranas, obtidas pela combinação de quitosana e alginato para serem usadas como curativos. A influência de diferentes taxas de agitação, variando de 100 a 500 RPM, e taxas de adição de solução de

Literatura

quitosana, com diferentes volumes, entre 20 e 40 ml/h, adicionados à solução de alginato, foram analisadas em detalhes, visando um protocolo de produção de uma membrana simples e facilmente reprodutível. A intensidade de agitação teve efeito significativo na capacidade máxima de absorção de água. Os resultados obtidos com diferentes concentrações de quitosana e alginato, mostraram diferentes características quanto a comportamento reológico e espessura. 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. Essas membranas, podem ser obtidas 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 potencial para uso em feridas altamente exsudativas.

BUENO & MORAES (2011) desenvolveram membranas porosas de quitosana-alginato lamelar, com o uso de surfactantes, 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 porosidade. As membranas preparadas com Tween® 80 apresentaram resistência à tração em torno de 1,5 MPa, alongamento na ruptura de 2,1%, medidas e máquina de ensaio universal, e a 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. As propriedades antimicrobianas de

Literatura

ambas as membranas também foram avaliadas. 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 quitosana (Qui) e xantana (Xan) 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. As membranas preparadas na ausência de surfactantes na proporção de massa de Qui para Xan de 1: 1 revelaram-se ideais para uso como curativos de feridas, pois eram finas, apresentando cerca de 0,10 mm de espessura e transparentes com resistência à tração à ruptura de 25 Mpa. Absorção de água após 24 h de cerca de 86 g/ml, absorção simulada de fluido corporal de 16% e estabilidade adequada na presença das mesmas soluções. As membranas preparadas na relação de massa de Qui para Xan 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. Em conclusão, os autores demonstraram que as membranas de Qui/Xan 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, as membranas preparadas na presença de Tween® 80, independentemente da razão de massa de Qui para Xan, apresentaram-se muito citotóxicas para células L929 e, portanto, não eram apropriadas para nenhuma das aplicações propostas.

COLNOT *et al.* (2012) relataram que apesar das pesquisas sobre perióstio serem estudadas desde os séculos passado, na última década houve um grande número de pesquisas e publicações sobre seu potencial regenerativo. O perióstio é uma estrutura complexa, sendo um núcleo de células pluripotentes e um repositório para fatores moleculares que modulam o comportamento celular. Também possui a propriedade avançada e inteligente de mudar, dependendo da mecânica, estado químico e biológico do tecido. Hoje, reconhecidamente, sabe-se que o perióstio é uma fonte atraente de células. Os autores mostraram estudos que revelam o potencial regenerativo endógeno do perióstio ser bastante alto em comparação com a medula óssea e outras fontes celulares. Na abordagem para compreensão e reparação esquelética, eles apresentaram as estratégias do perióstio que passa por uma série de mudanças para iniciar a formação óssea endocondral e intramembranosa no local da lesão. Toda formação óssea começa com a proliferação intensiva de progenitor periosteal celular. Com trabalho em ratos, mostraram uma ativação, expansão e diferenciação de células-tronco periosteal, criando um modelo de neovascularização, formação óssea e remodelação, mostrando assim uma capacidade endógena de reparação do perióstio. Com essa compreensão a engenharia tecidual é aplicada na fabricação de substitutos do perióstio para reparos e reconstrução óssea. O estudo também demonstrou que a influência das

proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são benéficas e importantes para a reparação, e que na sua ausência, há uma baixa mineralização e baixa reparação óssea. Embora as BMPs e outras moléculas possam aumentar o reparo ósseo, terapeuticamente cresce a demanda por terapias baseadas em materiais poliméricos para fornecer células e fatores de reparação ou cura.

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 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. 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

Literatura

de escoamento, resistências à tração, alongamentos, capacidade de absorção de água quando seca 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 de 0,375%:0,375% proporcionaram melhor absorção de água.

WANG *et al.*(2012) realizaram uma revisão dos mais variados tipos de substitutos ao periósteo. Lembraram que o periósteo é uma membrana densa do tecido conectivo, cobrindo a superfície externa da maioria dos ossos e dividi-se em duas camadas; uma externa e uma interna. Citam que o transplante seria o ideal na reposição dos enxertos que necessitem de periósteo, mas a questão do baixo volume, é um fator limitante. Por isso lança-se mão de aloenxertos através de sua descelularização, promovendo suporte naturalmente compatível. Analisaram também o uso de submucosa porcina do intestino delgado (matriz colágena). Revisaram também o uso de membranas induzidas com o uso de espessadores. Assim como o uso da derme acelular, o mentum, camadas celulares, osteoblastos do periósteo, células estromais da medula óssea (BMSCs) e células endoteliais vasculares umbilicais humana (HUVECs). Quando se trata da revisão de polímeros naturais, pode-se lançar mão de colágeno, quitosana, fibrina e celulose. Os hidrogéis também são outra forma de coberturas periosteais, usados pela engenharia tecidual. Concluindo, o periósteo com seu papel de barreira, promovendo a remodelação óssea e regeneração dos defeitos ósseos, é considerado indispensável na manipulação tecidual, por isso, a busca por diferentes fontes de biomateriais para a construção de um periósteo que possa substituir o nativo. Esse material deve recrutar fatores

endógenos, osteoindutivos e osteogênicos, assim como fatores antimicrobianos.

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 de ácido cítrico (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. As soluções foram homogeneizadas com um agitador à 18.000 RPM por 3 minutos e submetidas à centrifugação por 5 minutos a 3.600 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 minutos. A fração solúvel foi extraída com água a 70 °C, sob agitação magnética suave, durante 24 horas. Os filmes de hidrogéis xantana (XNT) e xantana-ácido cítrico (XCA) resultantes foram secos a 45 °C por 48 horas. 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 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.

ROMERO *et al.* (2015) estudaram o uso da quitosana na produção de um periósteo biomimético para o auxílio nas enxertias com o uso de enxertos alógenos devido as propriedades da quitosana (abundante, biocompatível, biodegradável, atividade antimicrobiana e promoção de cicatrização de feridas) e podem ser processadas em vários tipos de arcabouços na engenharia de tecidos. O grupo demonstrou que o uso de revestimentos ultrafinos em nanopartículas multicamadas de quitosana e heparina, podem ser usadas para ligar, estabilizar e fornecer fatores de crescimento de ligação à heparina, podendo ser aplicados diretamente nas superfícies ósseas corticais e demonstraram sua citocompatibilidade e suas propriedades antimicrobianas. Aplicaram 3 revestimentos de aloenxertos avaliando sua citocompatibilidade e diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo de murino. Coletou-se os fêmurs dos camundongos e os aloenxertos de úmero. As células foram expandidas em meio DMEM, FBS, antibiótico e antifúngico e o meio foi suplementado. Analisaram a diferenciação osteogênica por Western Blotting. A superfície dos enxertos foi revestida com essa tripla camada do arcabouço com base de quitosana e heparina e se mostraram citocompatíveis, quando foram enriquecidas com células-tronco do tecido adiposo, tendo um caráter osteoprogenitor. Concluíram que com a criação deste periósteo biomimético poroso e combinação de células osteoprogenitoras, podem ser usados para criar uma superfície citocompatível.

KOSHINUMA *et al.* (2016) examinaram a cicatrização de feridas em defeitos periosteais em calvária de ratos com o uso de dois tipos diferentes de biomateriais, com o intuito de simular um ambiente úmido, sendo estes biomateriais, substitutos para o periósteo. Utilizaram 36 ratos

Literatura

Wistar, dois biomateriais substitutos ao periosteio, sendo um, uma esponja de gelatina de fibrina e o outro, folhas de ácido poliglicólico (PGA) com cola de fibrina. Eles dividiram em três grupos, sendo um grupo com o defeito na calvária dos ratos sem nenhuma proteção, o segundo grupo, usou-se a gelatina de fibrina de marca comercial Spongel® para o curativo dos defeitos, e o terceiro grupo usou como curativos as folhas de ácido poliglicólico (PGA) mais cola de fibrina. Os animais foram acompanhados por seis semanas, sendo que a cada 2 semana os animais tiveram os defeitos fotografados para análise do efeito da cicatrização e sua evolução macroscópica. Foram criados defeitos de 10mm² na calvária de cada animal, com remoção total do periosteio. Num total de seis semanas mostrou que, nos animais que receberam a esponja de gelatina-Spongel®, os animais tiveram a cicatrização total, já nos ratos com as folhas de PGA+cola de fibrina tiveram 75% do fechamento da ferida e nos ratos que permaneceram sem nenhum curativo, tiveram 25 % do fechamento. Com esses resultados conclui-se que há necessidade de uso de biomateriais com o propósito de manter úmida a região da ferida, promovendo uma melhora na cicatrização. A eficiência da esponja de gelatina foi comprovada como adequada para tal fim e as folhas de PGA+cola de fibrina tiveram sua ação parcial no período descrito. Nos animais sem proteção, a resposta inflamatória foi considerável, prejudicando a reparação da ferida.

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

Literatura

quitosana (Qui) como arcabouços para a regeneração de tecidos. No entanto, há uma grande variabilidade nas características físico-químicas da quitosana usada em alguns estudos e suas combinações com outros biomateriais, dificultando a comparação de resultados e padronização de 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 chaves *Chitosan*, *Scaffolds*, *Tissue Engineering* e *Regeneration*. Os critérios de inclusão (i) ano e 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 arcabouço, principais propriedades físico-químicas da Qui (quando disponível), combinações com outros polímeros, incorporação de fatores e 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 clínicos em humanos (apenas um dos 61 artigos analisados demonstrou os efeitos da Qui nos tecidos humanos), delineamentos experimentais inadequados e a falta de informações sobre as características da Qui limitam a reprodutibilidade e a relevância dos estudos e a aplicabilidade clínica da mesma.

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 peso 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, vem sendo revisadas com precisão, para uma melhor compreensão desse biopolímero nessa área, mostrando um futuro promissor para produtos emergentes de engenharia tecidual. Além disso, as propriedades de diluição de cisalhamento e gelificação da xantana, podem ser mais benéficas na área de bioimpressão 3D de arcabouços teciduais e/ou modelos de tecidos, para futuras aplicações de engenharia tecidual.

GONZALEZ *et al* (2019) promoveram um estudo onde, através de biomateriais que foram carregados com células de diferentes origens, sendo elas, células-tronco mesenquimais, proteína óssea morfogenética tipo 2, colágeno tipo I e osso autógeno. Como arcabouço para as células mesenquimais, foram usadas estruturas de policaprolactona acelular. Aplicaram-se em defeitos de tamanho crítico em ratos, para a avaliação do potencial terapêutico de cada um dos materiais aqui relatados. Dividiu-se em seis grupos sendo G1 o defeito ósseo sem tratamento, G2 aloenxertos derivados dos próprios ratos, G3 rhBMP2 em esponja de colágeno, G4 policaprolactona acelular (PCL), G5 PCL + células-tronco mesenquimais do periósteo dos ratos e G6 com PCL + células-tronco mesenquimais da medula. Nas aplicações dos grupos, os pesquisadores relataram após as análises tomográficas, histológicas e de imuno-histoquímica, que nos defeitos sem cobertura, não houve reparação do defeito, com formação óssea limitada. No grupo com aloenxerto, houve uma discreta formação óssea e nos com células tronco mesenquimais de periósteo e medula, a do periósteo mostrou-se mais eficiente na reparação do defeito. Os resultados corroboram com a conclusão de que, sua capacidade de regeneração é melhor dentre os outros grupos testados.

4. MÉTODO

4 MÉTODO

4.1 Desenho de pesquisa

- Primário
- Experimental
- Prospectivo
- Centro-único
- Analítico
- Controlado
- Aleatorizado

4.2 CEUA

O estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais recebendo o nº CEUA/Unifesp 1836140519. (APÊNDICE 1)

4.3 Amostra

4.3.1 Produção das Membranas de Quitosana e Xantana

Para obtenção das membranas de quitosana/xantana, 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).

A preparação das membranas foi realizada de acordo com os

protocolos estabelecidos por RODRIGUES *et al.* (2008) para membranas de quitosana/alginato, VEIGA & MORAES (2012) 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 um surfactante de marca comercial Pluronic® F68.

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 ultrapura, 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® (Vitelab, GroBostheim, Germany) e uma pipeta sorológica 10 ml (BioNaky) esterelizada por radiação γ , foram adicionados 20 ml de ácido acético glacial 100% (Merck, Alemanha).

Em seguida, foram adicionados ao balão volumétrico mais 930 ml de água ultrapura para atingir o volume total de 1.000 ml, e homogeneizados na sequência. Essa solução de ácido acético foi reservada, para uso na dissolução da quitosana.

4.3.3 Preparação da Membrana Quitosana / Xantana

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

Em um recipiente tipo *becker*, de 1.000 ml (Nalgon, Itupeva/SP) 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 de média massa molecular e grau de desacetilação de 82% (Sigma-Aldrich

Método

Co.; Saint Louis, MO, USA). A balança foi ligada e aguardou-se cerca de 5 segundos para a estabilização do sistema e um *becker* de 100 ml (Dovil, São Paulo/SP) foi colocado sobre o prato da balança e na sequência, a tecla tara foi pressionada, a fim de se neutralizar o peso do *becker*.

Com o auxílio de uma espátula metálica, 5,0 g de quitosana foram adicionados a esse *becker*, para serem diluídos na solução de ácido acético 2%. O volume de 5,0 g de quitosana foi então adicionado aos 500 ml da solução de ácido acético 2% e foram levados à um agitador mecânico para a obtenção da solução de quitosana 1% em ácido acético a 2%.

O agitador mecânico utilizado, possuía hélices do tipo naval e pás inclinadas, com 3,0 cm de raio, modelo Tecnal TE-139 (Tecnal - Piracicaba/SP); a base do eixo das pás foi mantida a uma distância de 2,0 cm do fundo do *becker* e uma rotação pré-estabelecida de 1.000 RPM foi mantida. As rotações foram aferidas com o auxílio de um tacômetro digital portátil óptico com mira laser, modelo TD-812 (INSTRUTHERM, São Paulo/SP).

Após a inclusão dos 5,0 g de quitosana na solução de ácido acético 2%, a agitação foi mantida por 30 minutos, até a completa solubilização da quitosana e a obtenção de uma solução homogênea. (Figura 1)

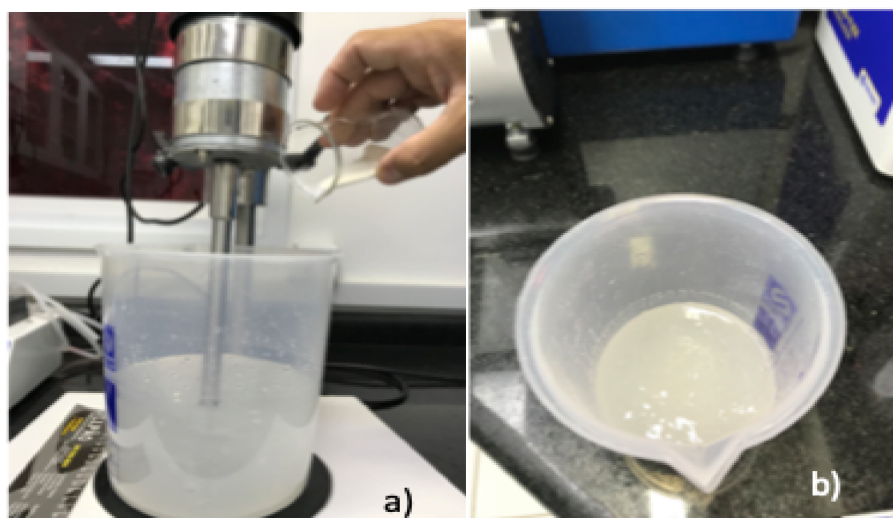


Figura 1 – a) Agitador mecânico usado na preparação da solução de quitosana 1% em solução aquosa de ácido acético 2%; b) Solução de quitosana homogêinizada.

4.3.3.2 Preparação da solução aquosa de xantana 1%

Em um recipiente tipo *becker*, de 1.000 ml (Nalgon, Itupeva/SP), 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).

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 5 segundos, a tecla tara foi pressionada, a fim de se neutralizar o peso do *becker*.

Com o auxílio de uma espátula metálica, 5,0 g de goma xantana foram adicionados ao *becker*, para serem diluídos em água, e foram levados até um agitador mecânico. O agitador mecânico utilizado, possuía hélices do tipo naval e pás inclinadas, com 3,0 cm de raio, modelo Tecnal TE-139 (Tecnal -Piracicaba/SP); a base do eixo das pás foi mantida a uma distância de 2,0 cm do fundo do *becker* e uma rotação pré-estabelecida de 1.000 RPM foi mantida.

Os 5,0 g de goma xantana adicionados à água, permaneceram em uma agitação 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%, com o auxílio de um agitador mecânico.

4.3.3.3 Preparação da solução de Quitosana e Xantana

Para a produção da solução de quitosana/xantana, a solução aquosa de xantana 1% foi colocada no agitador mecânico, mantendo-se as pás do agitador, a uma distância de 2 cm entre a base do eixo e o fundo do *becker*. Com o auxílio de uma bomba peristáltica, modelo TE-BP-01 (TECNAL, Piracicaba/SP) -(Figura 3) a solução de quitosana 1% em solução de ácido acético 2% foi adicionada à solução aquosa de xantana 1% com velocidade de 1.400 RPM.

Durante 50 minutos, o agitador mecânico foi mantido na velocidade de 1.400 RPM, até que toda solução de quitosana fosse adicionada sobre a solução de xantana. Ao término da mistura das soluções, a velocidade do

Método

agitador mecânico foi aumentada para 1.600 RPM, e permaneceu por mais 10 minutos sob agitação.

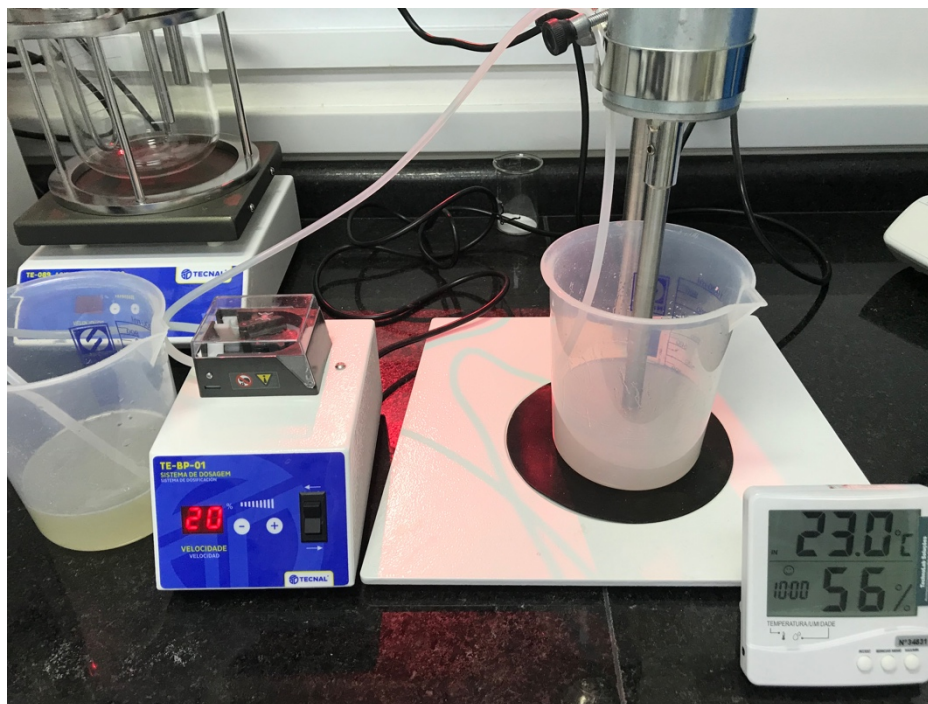


Figura 3 –Bomba peristáltica usada para a adição da solução de quitosana 1% em ácido acético 2%, sobre a solução de xantana 1%, mantidas sob agitação.

O volume obtido do *blend* de quitosana/xantana, foi igualmente distribuído, em porções de 80 ml, em 15 placas lisas de poliestireno, nas medidas de 90 x 15 mm (Figura 4). Para efetuar esta distribuição uma pipeta sorológica de 10 ml (BioNack) foi usada com o auxílio de um pipetador automático Pipeo® (Vitlab, BroBostheim, Germany).

Os 80 ml da solução de quitosana/xantana foram depositados no centro da placa, tomando-se o cuidado de não descarregar todo o conteúdo de forma muito rápida e, mantendo-se uma gota da solução no seu interior, a fim de se evitar a formação de bolhas na superfície, decorrentes da pipetagem.

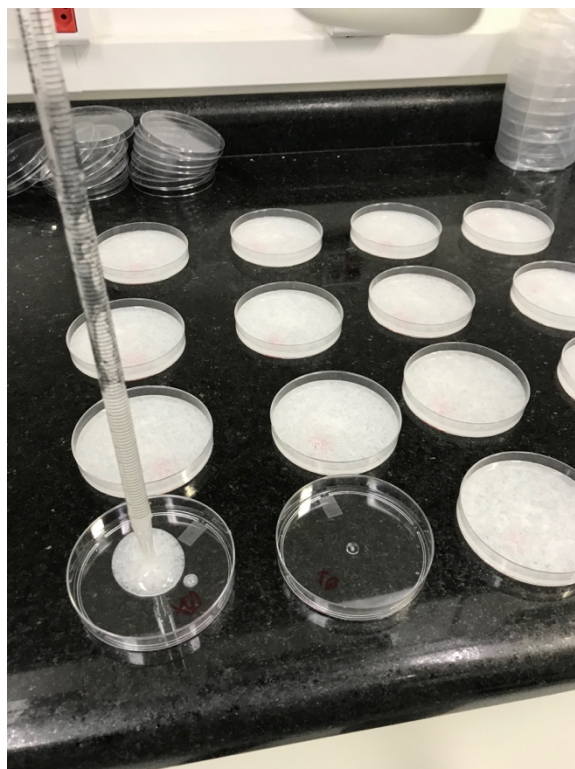


Figura 4 – Placas de poliestireno 90 x 15 mm, contendo porções de 80 ml da solução de quitosana/xantana, para serem levadas em estufa para secagem.

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 horas para evaporação do ácido acético e secagem. Após a secagem as membranas foram removidas das placas de poliestireno, com o uso de pinças, e imersas em 500 ml de água, por 30 minutos, em um *becker* de 1.000ml (Nalgon, Itupeva/SP). Este procedimento foi repetido por três vezes, com a troca da água do *becker* 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 24 horas.

Todo o procedimento foi realizado em ambiente fechado e com temperatura e umidade relativa do ar controladas em 23,0 °C e 56%, respectivamente.

4.3.4 Estudo *in vivo*

Foram utilizados 24 ratos Wistar machos, com 10 semanas de idade pesando em média 360 g (320 a 380 g), provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) Unifesp. Os animais foram distribuídos em dois grupos: I Grupo Controle (GC) - animais com lesão periosteal permaneceram sem associação da membrana de quitosana/xantana. Estes foram distribuídos de acordo com o tempo de avaliação: (GC2) - análise na 2ª semana n=4; (GC4) - análise na 4ª semana n=4 e (GC6) - análise na 6ª semana (n=4).

II. Grupo Experimental (GE) - animais tiveram a excisão periosteal na calvária, associada a cobertura com membrana de quitosana/xantana, que foram distribuídos de acordo com o tempo de análise: (GE2) - análise na 2ª semana n=4; (GE4) - análise na 4ª semana n=4 e (GE6) - análise na 6ª semana (n=4).

Os animais passaram por um período de uma semana para adaptação às condições ambientais, e foram alojados em gaiolas individuais, padrão CEDEME/Unifesp e mantidos num ambiente controlado por temperatura e umidade ($23^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ e $60 \pm 10 \%$). Durante o período experimental os animais receberam água e ração *ad libitum*.

4.3.5 Técnica operatória

Os animais foram anestesiados com uma combinação anestésica de 1 ml/kg, nas proporções de 80% de Cloridrato Cetamina e 20% de Cloridrato de Xilazina. O Cloridrato de Xilazina (Rompum – Bayer – São Paulo, SP, Brasil) foi usado na proporção de 13 mg/kg e, o Cloridrato Cetamina (Francotar- Virbac- Roseira, SP, Brasil) na proporção de 33 mg/kg, via intramuscular. A anestesia foi realizada com o uso de uma seringa de 5 ml (BD- Becton Dickinson Industria Cirurgica – São Paulo - SP) e agulha hipodérmica 30mm x 7mm (BD). Os ratos tiveram a região parietal tricotomizada por máquina tosqueadora elétrica de corte em tamanho 0. Posteriormente a execução da tricotomia na calvária dos animais, foi realizada assepsia do meio com solução de clorexidina a 2% (Riohex Clorexidina solução aquosa- Rioquímica- São José do Rio Preto – SP).

Após a tricotomia com máquina tosqueadora elétrica em tamanho 0, e assepsia com solução de clorexidina a 2%, realizou-se a demarcação dos pontos craniométricos, os quais delimitaram e padronizaram a área da lesão em 10 mm².

Todos os animais após anestesiados, foram posicionados ventralmente em placas de cortiça e receberam uma fixação metálica nas patas dianteiras e trazeiras para total imobilização. A cabeça também foi imobilizada, para que as cirurgias pudessem ocorrer de maneira estável. A área tricotomizada da calvária foi isolada por campo cirúrgico fenestrado descartável (Bioconnect Paramentação - Itapira-SP, Brasil).

Após a colocação do campo fenestrado descartável, foram demarcados os seguintes pontos: A (ponto médio da base da orelha direita);

Método

A1 (ponto médio da base da orelha esquerda); B (canto medial do olho direito); B1 (canto medial do olho esquerdo) e das seguintes linhas: Linha A-A1; B-B1. Após a marcação destas linhas, procedeu-se a marcação dos seguintes pontos: C (ponto médio da linha A-A1); D (ponto médio da linha B-B1). Após a marcação destes pontos, procedeu-se a marcação da linha sagital C-D. Após, foi realizada a marcação dos pontos C1 e C2 respectivamente 5mm distantes do ponto C para direita e para esquerda, da mesma forma, foram marcados os pontos D1 e D2 respectivamente 5mm distantes do ponto D para direita e para esquerda. Após, foram realizadas as marcações das linhas C1-D1 e C2-D2. A partir do ponto C1 e D1 foi medido um ponto distante 10mm e realizada a linha correspondente. Desta forma, obteve-se o desenho de uma área de 10mm^2 . (Figura 5)

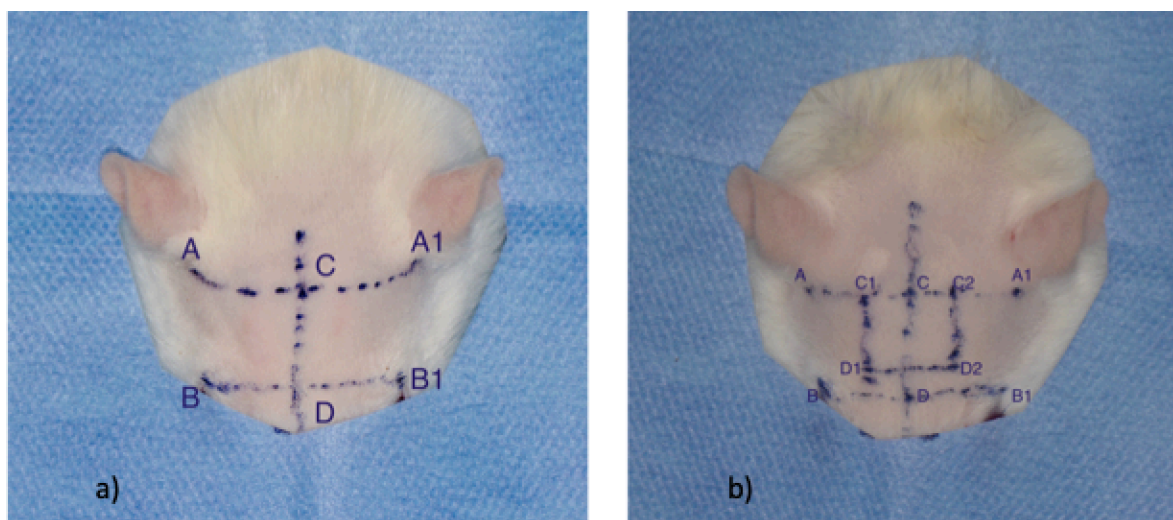


Figura 5 – a) Determinação dos pontos craniométricos, baseados nas referências anatômicas para a excisão da lesão periosteal de 10mm^2 b) Determinação dos pontos centrais, para delimitação da lesão final.

Após a determinação do desenho da lesão a ser criada de 10mm^2 baseado em referências anatômicas, e antes da excisão cutânea e do

Método

periósteo, foi administrada anestesia local subperiosteal, com Cloridrato de Lidocaina com epinefrina 2% 1:100.000 (Alphacaine 100 2% 1:100.000 Nova DFL - Rio de Janeiro – Brasil) para controle de sangramento (Figura 6).

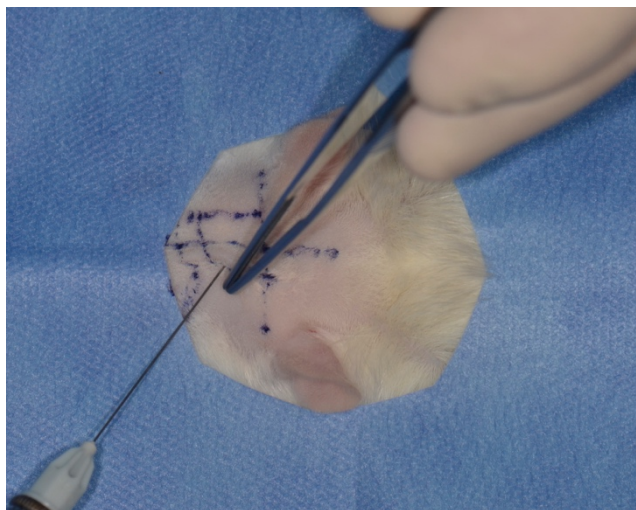


Figura 6 - Anestesia local com cloridrato de lidocaína 1:100.000 – 2% epinefrina.

Com o uso de um cabo para lamina de bisturi nº 3 (Golgran® – Industria Material Odontológico - São Caetano do Sul – SP) tesoura tipo Iris 14 cm (Golgran® – Industria Material Odontológico - São Caetano do Sul – SP), uma lâmina de bisturi tamanho 15c (Swam Morton® – Surgical Scalpel Blades, Shaffield – Reino Unido) e o auxílio de uma pinça de Dietrich tamanho 14 cm (Hu-Friedy® Instrumentais – Chicago, Illinois – EUA) promoveu-se a excisão cutânea e do periósteo. (Figuras 7 e 8)

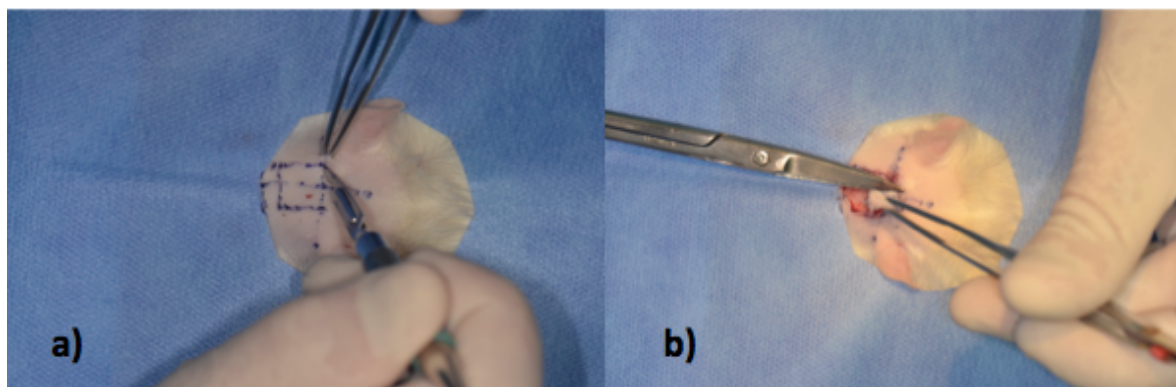


Figura 7 – a) Incisão do retalho demarcado com o uso cabo e lâmina de bisturi tamanho 15c. b) Excisão cutânea com auxílio de tesoura.



Figura 8 – Remoção do periósteo após excisão cutânea, no tamanho da lesão na área demarcada.

Nos animais do grupo controle (GC2, 4 e 6), as áreas cruentas foram mantidas sem cobertura. Nos animais do grupo experimental (GE2, 4 e 6), as áreas cruentas foram cobertas com membranas de quitosana/xantana (Qui/Xan) suturadas ao periósteo das margens da lesão.

Membranas de qui/xan, no tamanho de 10 mm², foram obtidos através do uso de uma tesoura tipo Castroviejo (Hu-Friedy® Instrumentais – Chicago, Illinois – EUA) e régua metálica esterilizada por calor úmido

Método

(Autoclave Cristófoli® Vitale Class CD 21 litros – Campo Mourão – Paraná – Brasil). As suturas das membranas junto ao periósteo das bordas da lesão, foram realizadas com 4 pontos simétricos com fio de Nylon Ethicon 6-0 (Ethicon® – Johnson & Johnson® – Ethicon USA) com o auxílio de uma pinça porta agulha tipo Castroviejo e uma tesoura tipo Castroviejo (Hu-Friedy® Instrumentais – Chicago, Illinois – EUA). (Figura 9)

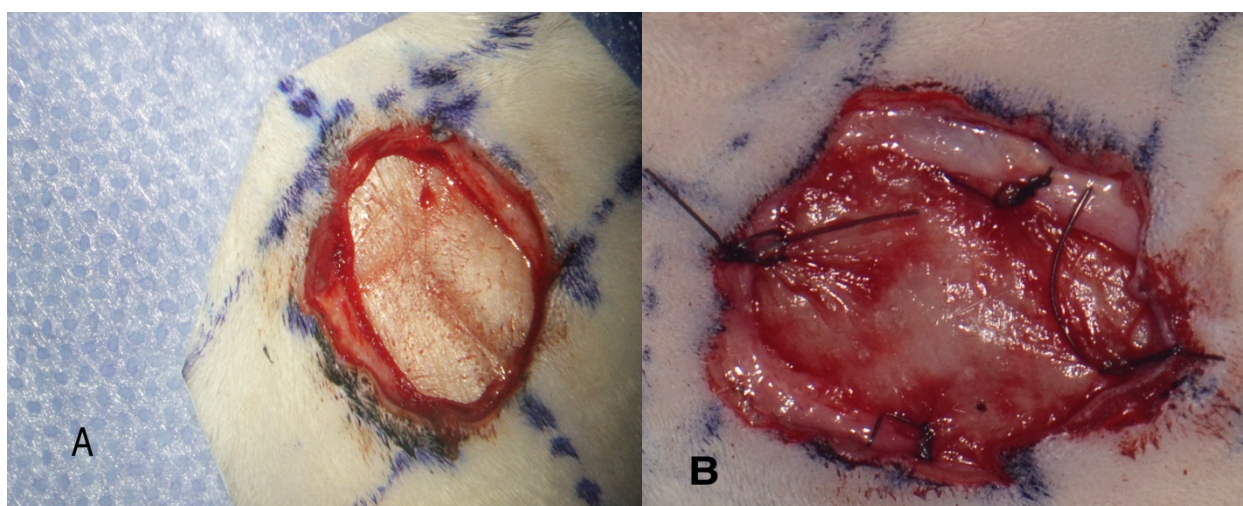


Figura 9 – a) GC – área cruenta, sem membrana de quitosana/xantana; b) Área cruenta com membrana de quitosana/xantana, suturada junto ao periósteo das margens da lesão.

Durante os três primeiros dias de pós-operatório, os animais receberam via intramuscular, uma dose diária de 1mg/kg de antiinflamatório, Diclofenaco sódico 75mg (Voltaren injetável- Novartis Biociências- Taboão da Serra, SP, Brasil), e 24000 UI/kg de benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaine e benzilpenicilina potássicas associadas.

4.3.6 Análise Macroscópica

Foi realizada a morte indolor induzida dos animais de todos os

Método

grupos por meio de administração, por via intraperitoneal, de sobredosagem de Cetamina 300mg/kg + Xilazina 30mg/kg.

Todos os animais, após confirmada a morte, foram posicionados ventralmente em placas de cortiça e receberam uma fixação metálica nas patas dianteiras e trazeiras para total imobilização. A cabeça também foi imobilizada, para a realização das fotografias.

Os animais de todos os grupos foram fotografados com o uso de uma câmera fotográfica Canon Rebel T5i (Canon Eletrônica Ind.- Tóquio - Japão) e uma lente Canon modelo Macro EF 100 mm f/2.8L com abertura de foco e exposição de 1/125 e ASA 100 (Canon Eletrônica Ind.- Tóquio - Japão), com o auxílio de um tripé de apoio (Worten-Star 61 HAMA ALT60 a 153 cm-4161- Chaves - Portugal) a uma distância focal de 30 cm medida da lente até a área da região parietal do rato.

Foram realizadas aferições das médias e o desvio-padrão dos valores das áreas da lesão periosteal nas calvárias, após os períodos de 2, 4 e 6 semanas, obtidas por fotografias. As áreas analisadas foram delimitadas conforme o fechamento da lesão, sempre procurando delimitar as margens da lesão reparada nos respectivos tempos de 2, 4 e 6 semanas. Foi utilizado o *software* ImageJ e apresentadas em mm². (Figura 10)



Figura 10 – Demonstração da delimitação da área cruenta analisada através do uso do *software* ImageJ, para obtenção das médias e desvio padrão dos valores das áreas de tecido não cicatrizados.

4.3.7 Análise Estatística

Para análise das variáveis intra-grupo entre os tempos 2, 4 e 6 semanas foi utilizado Teste Kruskal-Wallis e para a análise inter-grupos nos tempos de 2, 4 e 6 semanas foi utilizado o Teste de Wilcoxon. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise macroscópica

5.1.1 Membranas de Qui/Xan

Pôde-se observar na análise macroscópica que a mistura da quitosana e xantana produziu uma membrana translúcida, homogênea, flexível, transparente e de superfície ondulada (Figura 11).

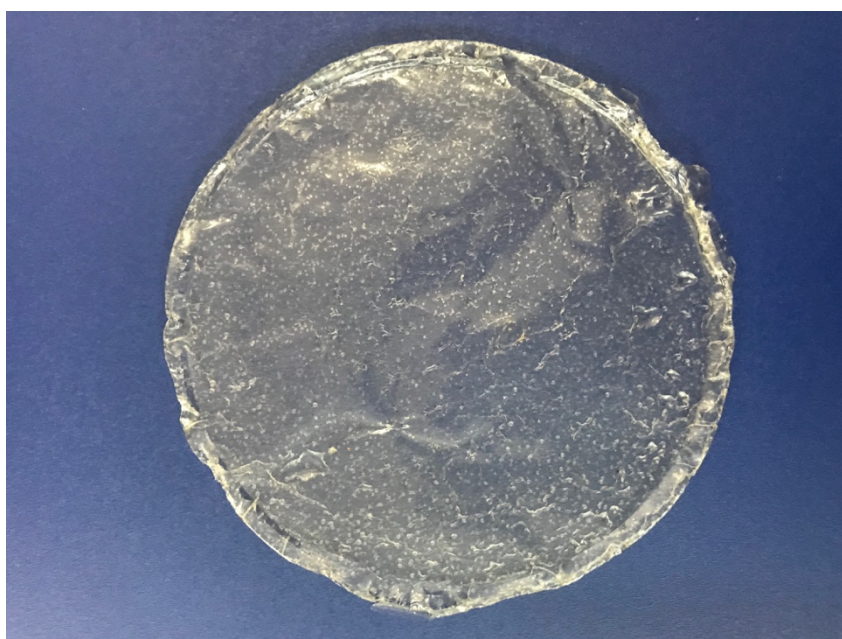


Figura 11 - Aspecto final da membrana de quitosana/xantana produzida, mostrando translucidez.

5.1.2 Análise quantitativa da área cruenta remanescente

As medições das áreas das áreas cruentas, não cicatrizadas, são resumidas na Tabela 1. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). 2 semanas após a cirurgia, as áreas defeituosas eram $93,7 \pm 12,5 \text{ mm}^2$, $81,3 \pm 25,7 \text{ mm}^2$ nos grupos GC e GE respectivamente. Na avaliação de quatro semanas, as áreas das áreas das áreas cruentas eram $78,8 \pm 12,7 \text{ mm}^2$, $52,3 \pm 16,7 \text{ mm}^2$, nos grupos GC e GE respectivamente. Em 6 semanas após a cirurgia, os ratos exibiram áreas cruentas com $69,9 \pm 11,7 \text{ mm}^2$ e $11,3 \pm 3,7 \text{ mm}^2$, nos grupos GC e GE respectivamente.

Tabela 1: Médias e desvio-padrão dos valores das áreas cruentas não cicatrizadas, obtidas por fotografias e analisadas pelo *software* Image J, com os valores expressos em valores relativos.

Grupos	Tempo			Valor de p
	2 semanas	4 semanas	6 semanas	
GC	$93,7 \pm 12,5$	$78,8 \pm 12,7$	$69,9 \pm 11,7$	0,03*
GE	$81,3 \pm 25,7$	$52,3 \pm 16,7$	$11,3 \pm 3,7$	0,03*
Valor de p	0,4	0,04*	0,02*	

GC: grupo controle (sem cobertura de qui/xan) n = 12; GE: grupo experimental (com cobertura qui/xan) n = 12

Análise intra-grupo entre os tempos 2, 4 e 6 semanas – Teste Kruskal-Wallis
 Análise inter-grupos nos tempos de 2, 4 e 6 semanas – Teste de Wilcoxon
 Os dados são mostrados como média \pm desvio padrão (mm^2). Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes e foram assinalados com *

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O periósteo consiste em tecido conjuntivo microvascularizado que cobre a superfície externa do osso cortical, que pode ser separado em duas camadas distintas: uma camada externa que contém fibroblastos e fibras de Sharpey e uma camada interna chamada *cambium*, que contém células-tronco mesenquimais multipotentes e células osteoprogenitoras que contribuem para o crescimento e a regeneração óssea normais (BAUER & MUSCHLER, 2000).

Semelhante às células estromais da medula óssea na cultura de monocamada, as células periosteais aderentes demonstraram morfologia semelhante a fibroblastos e não expressaram nem o fenótipo osteogênico e nem o condrogênico. Quando inoculadas heterotopicamente em camundongos nudes, essas células originaram tecidos ósseo e cartilaginoso no local da injeção subcutânea (GOSAIN *et al.*, 2000).

A busca por biomateriais na engenharia de tecidos, que possam servir de substituto do periósteo, têm sido tema de pesquisas nesta última década (GUO *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2018), objetivando principalmente o desenvolvimento de produtos que possam promover uma ativação, expansão e diferenciação de células, neovascularização, formação e remodelação óssea (COLNOT *et al.*, 2012). Os biomateriais candidatos a substitutos periosteais podem ser classificados, da mesma forma que o tecido ósseo, de acordo com a sua origem em autógenos, xenógenos e sintéticos e de acordo com as suas propriedades intrínsecas deveriam apresentar biocompatibilidade, bioadesividade e biodegradabilidade (GIANNOUDIS *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2015).

Os polímeros, são os materiais utilizados como biomateriais sintéticos na regeneração tecidual e podem ser classificados como

polímeros sintéticos (silicones, poliésteres e derivados de celulose) e naturais (proteínas e polissacarídeos). A associação entre arcabouços tridimensionais às células de interesse tem proporcionado perspectivas para a obtenção de tecidos complexos viáveis *in vitro*, como a pele, resultando em avanços no campo da engenharia tecidual aplicada às terapias regenerativas. O uso de células de mesenquimais estromais multipotentes no tratamento de feridas dermo-epidérmicas tem sido particularmente promissor devido a várias propriedades relevantes dessas células, como alta capacidade de proliferação em cultura, potencial de diferenciação em vários tipos de células da pele, importantes efeitos parácrinos e imunomoduladores, entre outros. De acordo com BELLINI *et al.*, (2015) as membranas de quitosana associadas com xantana podem ser potencialmente úteis como arcabouços para células mesenquimais estromais multipotentes, uma vez que apresentam características físico-químicas adequadas e possuem estrutura tridimensional adequada para adesão, crescimento e manutenção da função celular.

Polissacarídeos naturais são polímeros hidrofílicos que consistem em unidades monossacarídicas repetidas ligadas por ligações glicosídicas. São obtidos de várias fontes, principalmente vegetais (celulose, amido), micróbios (goma xantana, dextrana), crustáceos (quitina) e algas (alginato, carragenina) (KLEIN, 2009; ROSEN & ABRIBAT, 2005). O processamento de membranas polissacarídicas estáveis com propriedades mecânicas adequadas tem sido um desafio para aplicações na cicatrização de feridas e engenharia de tecidos. O uso de de pectina / quitosana (PT/CS) pode ser ajustada para aumentar a resistência mecânica e modular a hidrofiliabilidade e citocompatibilidade. As propriedades de molhabilidade e intumescimento superficial dos complexos de polieletrólitosm (PECs)

desempenham um papel importante para promover a fixação de células-tronco. Essas membranas de PECs têm resistência à tração final semelhante à da pele humana, que é da ordem de dez vezes maior do que a de materiais de polissacarídeos relatados anteriormente. Essas membranas podem promover ancoragem, adesão e apoiar o crescimento de células-tronco humanas, tornando-as materiais candidatos engenharia tecidual (MARTINS *et al.*, 2018).

Quitosana é um polissacarídeo linear produzido pela desacetilação em N da quitina. A quitina é encontrada principalmente no exoesqueleto de crustáceos marinhos, além de insetos e fungos (BOONSOGRIT *et al.*, 2006) Glucosamina e N-acetil glucosamina são as unidades construtoras de CS. Eles estão ligados via ligações Beta (1-4) glicosídicas. O grau de acetilação e distribuição dos grupos acetila ao longo da cadeia polimérica (distribuição em bloco ou aleatória) dependem da duração do processo de desacetilação e do método de preparação para quitosana (KUSHWAHA *et al.*, 2010). Após desacetilação da quitina, a quitosana é (diferentemente da quitina) solúvel em meio ácido. Além disso, a presença de grupos amina primários leva a propriedades únicas da quitosana sobre todos os outros polissacarídeos naturais (REKHA & SHARMA, 2009). É o único sacarídeo que possui uma carga líquida positiva de alta densidade, o que lhe permite interagir com uma ampla gama de polímeros aniônicos e moléculas biológicas. Além disso, a quitosana mostra alta mucoadesão, o que aumenta o tempo de permanência e melhora a permeação de moléculas ativas. Portanto, a quitosana é um produto usado na indústria de alimentos, para administração de medicamentos e na engenharia de tecidos (VOLOD'KO *et al.*, 2014).

Xantana é um heteropolissacarídeo ramificado produzido por

fermentação microbiana do microrganismo *Xanthomonas campestris* (BUENO & PETRI, 2014) A unidade primária de xantana consiste em um composto celulósico de duas unidades de d-glicose (1-4) Beta ligadas a uma cadeia lateral de unidades de d-manose e ácido d-glucurônico na proporção de 2: 1, respectivamente (AL-AKAYLEH *et al.* 2013). A d-manose, que está conectada ao esqueleto principal, está ligada a um grupo acetil em O₆, enquanto aproximadamente metade da d-manose terminal forma um grupo de ácido pirúvico entre os carbonos C4 e C6. Essa cadeia lateral é encontrada no átomo de O₃ de cada unidade alternativa de glicose na espinha dorsal. Devido à presença de grupos carboxílicos em sua estrutura, a xantana exibe uma carga líquida negativa e pode formar complexos com polímeros catiônicos (MUNDAY & COX, 2000). Na última década, a demanda por xantana, na indústria, tem aumentado em cerca de 5 a 10% ao ano (AL-AKAYLEH *et al.* 2013). É usada em uma ampla variedade de indústrias, incluindo cosméticos, agricultura, alimentos, têxteis e petróleo. Isto é devido à sua segurança (não tóxica), propriedades reológicas desejáveis, alta estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, juntamente com sua alta resistência à degradação enzimática (MUNDAY & COX, 2000).

A combinação de quitosana e xantana foi usada pela primeira vez na forma de hidrogel de complexo de polieletrólitos (PEC) (MARTÍNEZ-RUVALCABA *et al.*, 2007). Os hidrogéis formados, exibiram um comportamento de inchaço dependente do pH e abordaram a possibilidade de desenvolver um sistema de administração de drogas gastrointestinais. Os PECs são formados devido às forças iônicas atraentes entre os grupos amino carregados positivamente na quitosana e os grupos carboxila carregados negativamente na xantana (MAGNIN *et al.*, 2003). Portanto, as

características dos PECs produzidos, podem ser controladas através da manipulação das propriedades físico-químicas de cada polímero (ARGIN-SOYSAL *et al.*, 2009). Peso molecular, grau de acetilação da quitosana e teor de ácido pirúvico na xantana estão entre os fatores considerados importantes na caracterização dos biomateriais poliméricos (ARGIN-SOYSAL *et al.*, 2009). As condições de complexação (incluindo concentração de cada polímero, razão de mistura e pH) têm uma influência significativa no comportamento e na estabilidade da PEC resultante (MAGNIN *et al.*, 2003).

Neste estudo, utilizou-se uma membrana produzida pela combinação de quitosana e xantana na proporção de massa de 1:1. A preparação das membranas foi realizada de acordo com o estabelecido por RODRIGUES *et al.* (2008) para membranas de quitosana/alginato, VEIGA & MORAES (2012) na produção de membranas de quitosana/carragena, quitosana/pectina e quitosana/xantana, e por BELLINI *et al.* (2012).

Esta combinação foi suficiente para a produção de uma membrana com propriedades estruturais de translúcidez, formatável e resistente ao rasgamento, já que a mesma pode ser suturada no periósteo adjacente ao da lesão utilizada neste estudo sem apresentar rasgamento ou outras dificuldades. BELLINI *et al.* (2015) utilizando membranas com a combinação de Qui/Xan na proporção de 1,2/0,8 obtiveram membranas com outras características, denominando-as de membranas porosas uma vez que, foi utilizado a adição de surfactantes Tween® 80 ou Pluronic® F68 (BUENO & MORAES, 2011; BELLINI *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2017). Um fator relatado por estes autores, foi de que as membranas porosas possuiriam maior espessura e poderiam aumentar a dificuldade de adesão celular. No presente estudo foram utilizadas as membranas

denominadas como “densas, ou seja, sem o uso de surfactantes, pelo fato de que os surfactantes podem deixar resíduos citotóxicos e diminuir a retenção (NEEDLEMAN *et al.*, 1998).

No presente estudo foi utilizado um modelo experimental “*in vivo*” murino, que permitiu uma análise quantitativa da regeneração periosteal. Esse modelo envolveu a excisão total de pele, panículo carnoso e periósteo da calvária de ratos Wistar-EPM numa medida de 10mm², aqui considerado de tamanho crítico. As "lesões de tamanho crítico" têm sido uma abordagem experimental para a avaliação *in vivo* de reconstruções teciduais e pode ser definida como "um defeito que não regenera sem intervenção" (MUSCHLER *et al.*, 2010) ou um defeito que não cicatrizará espontaneamente durante a vida do animal ou do experimento (HOLLINGER *et al.*, 1990). A área removida de pele, panículo carnoso e periósteo no modelo utilizado neste estudo foi de 10 mm² sendo a mesma utilizada por (JENKINS & JANDA, 1946; KOSHINUMA *et al.*, 2016).

Neste estudo, a análise da área cruenta, verificou-se que não houve diferença significativa em área cicatrizada, entre os grupos controle e experimental no período de análise de duas semanas. Houve diferença significativa entre os demais grupos controle GC4 e GC6 e grupos experimentais GE4 e GE6, ou seja, nos períodos de análise de quatro semanas pós cirurgia e seis semanas pós cirurgia, sendo a área de tecido não cicatrizado, maior nos grupos controle em relação ao experimental. Quando comparamos os valores absolutos do grupo controle em duas, quatro e seis semanas com os valores encontrados no estudo de KOSHINUMA *et al.*, (2016) pode-se verificar que no presente estudo a área de tecido não cicatrizado foi próxima a encontrada por estes autores.

D i s c u s s ã o

Os resultados de KOSHINUMA *et al.* (2016) demonstraram que membranas de origem colágena, são reabsorvidas em quatro semanas, enquanto as originárias de PGA (ácido poli-glicólico) são reabsorvidas por hidrólise e atividade metabólica em aproximadamente 15 semanas. Relataram também que as membranas de PGA que não foram reabsorvidas, poderiam inibir a formação de periósteo e a proliferação de osteoblastos e assim, atrasar a remodelação óssea e, finalmente, a cicatrização da ferida (ROMERO *et al.*,2015). No presente estudo, comparando com o que foi observado por KOSHINUMA *et al.* (2016), as membranas de qui/xan, as quais permaneceram sobre a calvária dos ratos, durante todo o tempo do experimento, permitiram que houvesse um fechamento da lesão.

A produção de membranas com diferentes proporções entre os polímeros quitosana e xantana, bem como a análise das vias de sinalização celulares da inflamação e regeneração tecidual compreendem as perspectivas imediatas deste estudo.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A membrana de quitosana/xantana, em lesão cutânea periosteal na calvária de ratos, acelerou o processo de cicatrização.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Al-Akayleh F, Al Remawi M, Rashid I, Badwan A. Formulation and in vitro assessment of sustained release terbutaline sulfate tablet made from binary hydrophilic polymer mixtures. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2013;18(5):1204-12.

Argin-Soysal S, Kofinas P, Lo YM. Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels. *Food Hydrocolloids*. 2009; 23(1):202-9.

Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2000; 371:10–27

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: E421-31.

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.

Bisseret D, Kaci R, Lafage-Proust MH, Alison M, Parlier-Cuau C, Laredo JD, Bousson V. Periosteum: Characteristic imaging findings with emphasis on radiologic-pathologic comparisons. *Skeletal Radiol*, 2015;44: 321–38

Referências

Boonsongrit Y, Mitrevej A, Mueller BW. Chitosan drug binding by ionic interaction. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;62(3):267-74.

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 trough the addition of diferente 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.

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.

Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3: S131-9.

Colnot, C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J. of Bone and Mineral Res*. 2009;24(4): 274-82.

Referências

Colnot C, Zhang X, Melissa L, Tate K. Current insights on the regenerative potencial of periosteum: molecular, cellular, and endogenous engineering approaches. *J Orthop Res.* 2012; 30: 1869-78.

Dwek, Jerry R. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radio.* 2010; 39: 319-23

Fröschl, T. and Kersch, A. The optimal vestibuloplasty in preprosthetic surgery of the mandible. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 1997;25: 85–90.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 2005;36(S): S20-7.

González GAB, Espinosa JML, López EM, Cemboráin PR, Abizanda G Fernández JV, Martínez TL, Malparraguirre MF, Andreu I, Elizalde MR Stuckensen K, Groll J, Pardo EMDJ, Prósper F, Moltó FG. Periosteum - derived mesenchymal progenitor cells in engineered implants promote fracture healing in a critical-size defect rat model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;1–11.

Gosain AK, Song L, Yu P. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF- β isoforms. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2000;106(2):360-71.

Guo H, Li X, Yuan X, Ma X. Reconstruction of radial bone defects using the reinforced tissueengineered periosteum: An experimental study on rabbit weightbearing segment. *J Trauma.* 2012;72: E94-100.

Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *Journal of Craniofacial Surgery*. 1990;1(1):60-8

Jenkins, H.P. and Janda, R. Studies on the use of gelatin Sponge or Foam as a Hemostatic Agent in Experimental Liver resections and injuries to Large Veins. *Ann. Surg.* 1946 124: 952-61.

Klein S. Polysaccharides in oral drug delivery—Recent applications and future perspectives. In: *Polysaccharide Materials: Performance by Design*. American Chemical Society; 2009; 62,13-30.

Koshinuma S, Murakami S, Noi M, Murakami T, Mukaisho KI, Sugihara H, Yamamoto G. Comparison of the wound healing efficacy of polyglycolic acid sheets with fibrin glue and gelatin sponge dressings in a rat cranial periosteal defect model. *Exp. Anim.* 2016;65(4), 473-83.

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

Kushwaha Swatantra KS, Rai Awani K, Satyawan S. Chitosan: A platform for targeted drug delivery. *International Journal PharmTech, Research*. 2010;2(4):2271-82

Referências

Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;60(15):1650 - 62.

Magnin D, Dumitriu S, Chornet E. Immobilization of enzymes into a polyionic hydrogel: ChitoXan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2003;18(5):355-73.

Martínez-Ruvalcaba A, Chornet E, Rodrigue D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*. 2007;67(4):586-95.

Martins JG, Camargo SEA, Bishop TT, Popatc KC, Kipper MJ, Martins AF. Pectin-chitosan membrane scaffold imparts controlled stem cell adhesion and proliferation. *Carbohydrate Polymers*. 2018;197: 47-56.

Munday DL, Cox PJ. Compressed xanthan and karaya gum matrices: Hydration, erosion and drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;203(1-2):179-92.

Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Engineering B*. 2010;16(1):123-45.

Needleman IG, Martin GP, Smales FC. Characterisation of bioadhesives for periodontal and mucosal drug delivery. *J Clin Periodontol*. 1998;25: 74-82.

Rekha MR, Sharma CP. Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption. *Journal of Controlled Release*. 2009;135(2):144-51.

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; 1-25.

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.

Romero R, Travers JK, Asbury E, Pennybaker A, Chubb L, Rose R, Ehrhart NP, Kipper MJ. Combined delivery of FGF-2, TGF- β 1, and adipose-derived stem cells from an engineered periosteum to a critical-sized mouse femur defect. *Carbohydrate Polymers* 2015;22, 144-51.

Rosen H, Aribat T. The rise and rise of drug delivery. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2005;4(5):381-5

Veiga IG, Moraes AM. Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes. *J. Appl. Polym. Sci*. 2012; 124: E154-60.

Volod'Ko AV, Davydova VN, Chusovitin E. Soluble chitosan-carrageenan polyelectrolyte complexes and their gastroprotective activity. *Carbohydrate Polymers*. 2014;101(1):1087-93.

Wang HL, Modarressi M, Hui Fu J. Utilizing collagen membranes for guided tissue regeneration-based root coverage. *Periodontology* 2000. 2012;59, 140-57

Yang J, Han S, Zheng H, Dong H, Liu J. Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 2015;123:53-66.

NORMAS ADOTADAS

9 NORMAS ADOTADAS

- Normas para a utilização de animais de laboratórios na pesquisa e ensino na Unifesp [Internet]. São Paulo: Centro de Desenvolvimento de Medicina Experimental (CEDEME/Unifesp) – [citado 2013 jan 27] Disponível: <http://www.unifesp.br/centros/cedeme/normas.htm>.
- Legislação. Brasília: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) – [citado 2013 jan 27]. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/31055.tml>.

APÊNDICE



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "MEMBRANA DE QUITOSANA E XANTANA NA REGENERAÇÃO DO TECIDO PERIOSTEAL EM DEFEITO CRÍTICO NA CALVÁRIA DE RATO", protocolada sob o CEUA nº 1836140519 em 09/09/19, sob a responsabilidade de **Fernando Biolcati Chiantia** e equipe: **Lydia Masako Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 08/06/2019.

We certify that the proposal "MEMBRANE OF CHITOSAN AND XHANTAN IN THE REGENERATION OF PERIOSTEAL TISSUE IN CRITICAL DEFECT IN RAT CALVARIA", utilizing 24 Heterogenics rats (24 males), protocol number CEUA 1836140519 (09/09/19), under the responsibility of **Fernando Biolcati Chiantia** and team, **Lydia Masako Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 08/06/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Academica)

Vigência da Proposta: de 07/2019 a 11/2019 Área: Cirurgia Plástica/cirurgia

Origem:	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME
Especie:	Ratos heterogenicos sexo: Machos idade: 08 a 10 semanas N: 24
Linhagem:	W1STAR Peso: 300 a 300 g

Local do experimento: OS ANIMAIS SERÃO OPERADOS E MANTIDOS JUNTO AO LABORATORIO DE CULTURA DE CÉLULAS E ENGENHARIA TECIDUAL, EDIFÍCIO DE PESQUISA I, RUA BOTUCATU 741 11º ANDAR.

São Paulo, 08 de setembro de 2019

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

FONTES CONSULTADAS

Fontes Consultadas

- Comitê de Ética e Pesquisa [Internet], São Paulo: Universidade Federal de São Paulo (Unifesp); [citado 2013 Jan 27]. Disponível em: <http://www.unifesp.br/reitoria/orgaos/comites/etica>.
- Princípios Éticos no uso de animais de laboratório [Internet]. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Disponível em: <http://www.cobea.org.br>.