



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

ABRAÃO ÍTALO LIMA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS A BASE DE  
QUITOSANA E ALGINATO PARA CULTURA DE CÉLULAS VERO**

Recife  
2021

ABRAÃO ÍTALO LIMA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS A BASE DE  
QUITOSANA E ALGINATO PARA CULTURA DE CÉLULAS VERO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de concentração: Morfologia e Inovação Tecnológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Rosa Valéria da Silva Amorim

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Paloma Lys de Medeiros

Recife

2021

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Santos, Abraão Ítalo Lima dos

Desenvolvimento e caracterização de arcabouços a base de quitosana e alginato para cultura de células vero / Abraão Ítalo Lima dos Santos - 2021.

51 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Rosa Valéria da Silva Amorim

Coorientadora: Paloma Lys de Medeiros

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia. Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Arcabouço 2. Engenharia de tecidos 3. Adesão celular

I. Amorim, Rosa Valéria da Silva (Orientadora) II. Medeiros, Paloma Lys de (Coorientadora) III. Título

571.538 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-373

ABRAÃO ÍTALO LIMA DOS SANTOS

**"DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS A BASE DE  
QUITOSANA E ALGINATO PARA CULTURA DE CÉLULAS VERO "**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosa Valéria da Silva Amorim  
(Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira  
(Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Maria Silva de Seixas Maia  
(Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

*A conclusão deste trabalho resume-se em dedicação, dedicação que meu pai teve ao longo dos anos, a quem dedico este trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais pelo apoio incondicional durante todos os anos de curso.

Agradeço aos meus amigos pelos ombros e pelas risadas, nos melhores e piores momentos.

Agradeço a professora Rosa Valéria, orientadora, pelos cinco anos de auxílio no caminho que eu decidi seguir.

Agradeço a professora Paloma de Medeiros Lys, pelo enorme apoio com o cultivo celular e a disponibilidade e paciência para ensinar.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, por se disponibilizarem a ajudar mesmo quando seus próprios trabalhos seguiam atrasados.

Agradeço também a todos que ajudaram de forma indireta, sendo com apoio emocional ou conhecimento que se aplicou ao projeto.

*“Julgue os homens mais pelas suas perguntas do que pelas suas respostas”*

*- Voltaire*

## RESUMO

Arcabouços são estruturas que simulam a matriz extracelular e podem ser utilizados como novos suportes em culturas de células, revelando vasta aplicação para a engenharia de tecidos. O principal objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar arcabouços à base de quitosana (Qs) e alginato (Alg) e avaliar a biocompatibilidade desses em cultura de células Vero. Para obtenção de arcabouços funcionais foram utilizados os biopolímeros de Qs e Alg, tendo sido alterada as diversas características dentre as formulações estudadas, como as concentrações dos polímeros (0,5% a 1,5%), as proporções entre eles (1:1, 2:1, 1:2) e o peso molecular da Qs. Os arcabouços foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e grau de intumescimento. A biocompatibilidade foi avaliada através de um ensaio de adesão com células Vero. De acordo com os resultados, o FTIR demonstrou que a despolimerização altera o espectro de absorvância da Qs a 3294  $\text{cm}^{-1}$  referente aos alongamentos de  $-\text{OH}$ , mas não altera seus picos característicos de amina primária, nem seu grau de deacetilação. Em função do tipo de arcabouço produzido, a MEV revelou alterações no tamanho da população predominante de poros das amostras, que variaram de 10 a 600  $\mu\text{m}$ . A capacidade de intumescimento da maioria das amostras foi maior em pH ácido (1,4), em comparação com outras faixas de pH (6,93 e 7,2). Os arcabouços Qsdp 1% Alg 1% (1:2) e Qsdp 0,5% Alg 0,75% Qsdp 0,5% demonstraram bons resultados nos ensaios de MEV e intumescimento, sendo escolhidos como suportes para o ensaio de adesão com células Vero e revelaram ótima biocompatibilidade. Assim, arcabouços de Qs e Alg se demonstram ser uma boa alternativa para cultivo de células VERO em ambiente tridimensional apresentando, também, grande potencial como curativos.

**Palavras-chave:** arcabouço; engenharia de tecidos; adesão celular; quitosana; alginato.

## ABSTRACT

Biopolymer based scaffolds are structures that simulate the extracellular matrix and can be used as new supports in cell cultures, revealing a wide application for tissue engineering. The main objective of the present work was to develop and characterize scaffolds based on chitosan (Qs) and alginate (Alg) and evaluate their biocompatibility in VERO cell culture. To obtain functional scaffolds, Qs and Alg biopolymers were used, with different characteristics among the studied formulations being changed, such as biopolymer concentrations (0.5% to 1.5%), the proportions between them (1:1 , 2:1, 1:2) and the molecular weight of Qs. Physicochemical analysis and characterization were performed by Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and swelling behavior. Biocompatibility was assessed using an adhesion assay with Vero cells. The FTIR showed that depolymerization alters the absorbance spectrum of Qs at 3294 cm<sup>-1</sup> referring to the -OH stretches, but does not alter its characteristic primary amine peaks, nor its degree of deacetylation. Depending on the type of scaffolds produced, the SEM revealed changes in the size of the predominant population of pores in the samples, which ranged from 10 to 600 µm. The swelling capacity of most samples was higher at acidic pH (1.4) compared to other pH ranges (6.93 and 7.2). The Qsdp 1% Alg 1% (1:2) and Qsdp 0.5% Alg 0.75% Qsdp 0.5% scaffolds showed the best physicochemical results, being chosen as supports for the adhesion test with Vero cells and showed excellent biocompatibility. Thus, Qs and Alg scaffolds showed to be a great alternative as a tridimensional support for cell VERO's culture and it also has potential as wound healer material.

**Keywords:** scaffold; tissue engineering; cell adhesion; chitosan; alginate;

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Arcabouços pós-liofilização.	26
<b>Figura 2 –</b>	Análise morfológica do arcabouço Qsdp 1% Alg 1% 1:2.	28
<b>Figura 3 –</b>	Análise morfológica do arcabouço Qs 1% Alg 1% 1:2.	29
<b>Figura 4 –</b>	Análise morfológica do arcabouço Qsdp 1,5% Alg 1,5% 2:1.	30
<b>Figura 5 –</b>	Análise morfológica do arcabouço Qs 1,5% Alg 1,5% 1:2.	31
<b>Figura 6 –</b>	Análise morfológica do arcabouço em camadas Qsdp 0,5% Alg 0,75% Qsdp 0,5%.	32
<b>Figura 7 –</b>	Análise morfológica do arcabouço em camadas Qs 1,5% Alg 1,5% Qs 1,5%.	33
<b>Figura 8 –</b>	Análise morfológica do arcabouço em camadas Qsdp 1,5% Alg 1,5% Qsdp 1,5%.	34
<b>Figura 9 –</b>	Espectros de FTIR referente aos pós das amostras dos biopolímeros.	35
<b>Figura 10 –</b>	Espectros de FTIR referente as amostras dos arcabouços.	36
<b>Figura 11 –</b>	Comparação dos Intumescimentos dos arcabouços baseados apenas em Qs e Qsdp	37
<b>Figura 12 –</b>	Comparação dos Intumescimentos dos arcabouços baseados em Qs e Alg 1 %	37
<b>Figura 13 –</b>	Comparação dos intumescimentos dos arcabouços de Qs e Alg 1,5 %.	38
<b>Figura 14 –</b>	Comparação dos intumescimentos dos arcabouços em camadas Qs 0,5 % e Alg 0,75 %.	38
<b>Figura 15 –</b>	Fotomicrografias de células Vero cultivadas por 72h em contato com o arcabouço Qsdp 0,5 % Alg 0,75 % Qsdp 0,5 %, observadas através de microscópio invertido com contraste de fase.	41
<b>Figura 16 –</b>	Fotomicrografias de células Vero cultivadas por 72h em contato com o arcabouço 1 % Qsdp 1 % Alg 1:2, observadas através de microscópio invertido com contraste de fase.	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Formulações dos arcabouços selecionados para as análises.	27
-------------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alg	Alginato
Da	Dalton
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho Com Transformada De Fourier
KDa	Kilodalton
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLA	Poliácido láctico
Qs	Quitosana
Qsdp	Quitosana despolimerizada
U	Unidade internacional

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	15
<b>4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	16
4.1 ARCABOUÇOS E ENGENHARIA DE TECIDOS .....	16
4.2 BIOPOLÍMEROS APLICADOS À ENGENHARIA DE TECIDOS .....	16
4.3 PESO MOLECULAR E SEU EFEITO SOBRE A QUITOSNA .....	17
4.4 RETICULAÇÃO E INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA QUITOSANA-ALGINATO .....	18
4.5 TÉCNICAS DE FORMAÇÃO DE ARCABOUÇOS .....	19
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
5.1 MATERIAIS .....	20
5.2 PURIFICAÇÃO E DESPOLIMERIZAÇÃO DA QUITOSANA .....	20
5.3 PREPARO DOS ARCABOUÇOS EM CAMADA ÚNICA .....	21
5.4 PREPARO DOS ARCABOUÇOS DE EM CAMADAS .....	21
5.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ARCABOUÇOS .....	21
5.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ARCABOUÇOS .....	22
5.7 CULTURA DE CÉLULAS VERO .....	22
5.8 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE E SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS VERO .....	23
5.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS VERO ADERIDAS AOS ARCABOUÇOS DE QUITOSANA E ALGINATO .....	23
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
6.1 PREPARO DOS ARCABOUÇOS .....	24
6.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	25
6.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	32
6.4 INTUMESCIMENTO .....	34
6.5 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR .....	36
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	41
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42

## 1. INTRODUÇÃO

Arcabouços de biopolímeros são estruturas tridimensionais para fixação e crescimento celular, e suas características podem ser aplicadas em muitas áreas além da engenharia de tecidos, como veiculação de drogas, cultura de células e como modelo para tratamento de câncer e curativos para feridas (INTINI et al., 2018; KIEVIT et al., 2010). Sua estrutura tridimensional simula uma matriz extracelular saudável e permite que a célula se fixe e cresça, além de possibilitar a adsorção de água em sua estrutura, mantendo-a estável, (BANKOTI et al., 2017; HAN et al., 2010). Para atingir este objetivo é necessário que o arcabouço seja derivado de um material não tóxico, estável em ambientes úmidos, biodegradável e biocompatível.

A cultura de células é uma técnica que visa o crescimento de células e tecidos, humanos ou de animais, em uma superfície bidimensional; sendo muito utilizada na rotina de alguns laboratórios (INTINI et al., 2018). Embora a cultura bidimensional proporcione algumas vantagens, como simplicidade e acessibilidade, o microambiente disponibilizado por essa técnica é completamente diferente em relação ao ambiente tridimensional natural de uma célula eucariótica animal, que não cresce em uma superfície bidimensional, mas sim cercada por sua matriz extracelular, em um ambiente tridimensional (MAHMOUDZADEH; MOHAMMADPOUR, 2016).

Essa drástica mudança no ambiente da célula altera sua morfologia, seu fenótipo, sinalizando que a sua expressão gênica está comprometida, assim culturas bidimensionais tendem a oferecer resultados menos precisos em relação a testes *in vivo* (KIEVIT et al., 2010; MCBANE et al., 2012). Tendo em vista estas limitações, o conceito de cultivo celular em modelo tridimensional passou a ganhar bastante destaque e com isso houve o surgimento de várias ferramentas que possibilitam sua aplicação, dentre elas os arcabouços (DHIMAN; RAY; PANDA, 2005).

Os arcabouços estão entre os componentes essenciais para o processo de regeneração, servindo como carreadores ou suportes para interações celulares, proporcionando ambiente semelhante ao da matriz extracelular (FOMBY et al., 2010; KONG et al., 2006; RAMAY; ZHANG, 2003).

A quitosana (Qs) é um biopolímero amplamente estudado, possuindo várias características adequadas ao desenvolvimento de um arcabouço, além de apresentar atividade antimicrobiana e capacidade de mimetizar atividades

semelhantes às dos glicosaminoglicanos, como adesividade e capacidade de ligação a fatores de crescimento. Ademais, grupos funcionais aminos na Qs podem fornecer locais para fatores de ancoragem celular como oligopeptídeos, (GHOSAL et al., 2019a). No entanto, o arcabouço de Qs tende a ser instável, dependendo das condições ambientais em que é encontrado. Para dar maior estabilidade ao arcabouço é necessário uma alteração em sua estrutura, firmando as cadeias de Qs em condições adversas, como pH ácido, (BANKOTI et al., 2017; SORIANO-RUIZ et al., 2019; XU et al., 2019).

Alginato (Alg) é um biopolímero que tem sido amplamente descrito na literatura e sua interação com a Qs é bem conhecida, compartilhando de várias características em comum, como biocompatibilidade, baixa toxicidade e degradabilidade; além do que, esses polímeros caracterizam-se por interagirem devido a oposição de cargas (SHAMEKHI et al., 2017). A união dos dois polímeros (Alg e Qs) forma um hidrogel, que é um bioproduto que vem, a cada ano, despertando mais interesse dos pesquisadores por suas aplicações; tanto com relação à capacidade de liberação de bioativos, quanto ao seu potencial na engenharia de tecidos (SORIANO-RUIZ et al., 2019; XU et al., 2019).

Os arcabouços de Qs e Alg têm demonstrado potencial aplicabilidade como biomateriais para a cultura de células, e possivelmente essenciais para o processo de regeneração, servindo como carreadores ou suportes para as interações celulares, proporcionando um ambiente semelhante ao da matriz extracelular (FOMBY et al., 2010; KONG et al., 2006; RAMAY; ZHANG, 2003); além do que, sua aplicação em outras áreas tem sido bastante promissora, como na engenharia de tecidos, como vetorização de medicamentos ou podendo ser utilizados como curativos bioativos. Neste trabalho, objetivamos desenvolver e caracterizar um arcabouço baseado em Qs e Alg por um processo simples de formulação, analisar o efeito do grau de despolimerização da Qs nas propriedades do arcabouço e avaliar sua biocompatibilidade a partir de ensaios de adesão com células Vero, visando-se estimular a produção um novo suporte tridimensional com aplicabilidade para engenharia de tecidos.

## 1. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar, físico-química e biologicamente, arcabouços tridimensionais à base de quitosana e alginato para a cultura de células.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar a Qs, através de centrifugações.
- Despolimerizar a Qs, através de um processo de degradação oxidativa baseada em nitrito.
- Desenvolver um suporte tridimensional (arcabouço), utilizando Qs, despolimerizada e não despolimerizada, e Alg.
- Caracterizar as interações químicas dos arcabouços por espectroscopia de FTIR.
- Caracterizar as propriedades morfológicas, tamanho de poros dos arcabouços por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- Caracterizar as propriedades físicas, capacidade de absorção de água dos arcabouços, através de ensaios de intumescimento.
- Avaliar a influência da despolimerização da Qs na elaboração dos arcabouços e aplica-los na cultura de células Vero.
- Avaliar a biocompatibilidade do arcabouço de Qs e Alg através do ensaio de adesão com células Vero.

## 2. JUSTIFICATIVA

Além da aplicação como suporte para a cultura de células, os arcabouços vêm ganhando espaço em várias áreas da ciência de engenharia de tecidos. Dentro das aplicações mais promissoras dos arcabouços de biopolímero está o uso como enxerto em feridas, (GHOSAL et al., 2019b). Por apresentar características como, biocompatibilidade, baixa citotoxicidade, biorreabsorção, e alta capacidade de intumescimento, os arcabouços promovem uma ótima cobertura para queimaduras e lesões de bordas irregulares isolando o tecido lesado de contaminantes, ao mesmo tempo em que permite o crescimento das células, (BANKOTI et al., 2017). Todos os anos há cerca de 300.000 mortes por queimaduras no mundo, Identificar e tratar infecções são cuidados básicos com vítimas de queimaduras e o uso de arcabouços como cobertura para feridas pode ser uma ferramenta promissora para reduzir o risco de infecções em um paciente tão vulnerável quanto um queimado, (KRUSE et al., 2018).

Os tratamentos atuais para feridas e queimaduras consistem na cobertura da área lesada por bandagens e curativos que impedem o contato do tecido lesado com o ambiente contaminado, e em determinados casos utiliza-se do autoenxerto de pele. Infelizmente o uso desses enxertos podem provocar cicatrizes indesejáveis, (PAYNE et al., 2017). O uso de arcabouços para como cobertura de feridas pode melhorar o processo de cicatrização do paciente, sendo capazes de mimetizar a estrutura da matriz extracelular, esses suportes são ideais para o crescimento e diferenciação das células, como fibroblastos, e sua ampla variedade de materiais providenciam uma enorme biblioteca de radicais químicos que podem ser modificados de acordo com a necessidade do tecido lesado, (BANKOTI et al., 2017).

Na engenharia de tecidos, a adesão celular a uma superfície é essencial, pois a adesão ocorre antes de outros eventos, como disseminação celular, migração celular e função celular diferenciada. A adesão celular está intimamente ligada às propriedades de superfície do material ou arcabouços. A adesão de células à substratos sólidos é influenciada pelas propriedades da superfície do substrato, como intumescimento, carga de superfície, rugosidade e topografia (WAN et al., 2003).

### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **4.1 ARCABOUÇOS E ENGENHARIA DE TECIDOS**

A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar da biotecnologia, suas pesquisas mais aplicadas visam à criação e/ou restauração de tecidos e órgãos perdidos por um indivíduo, assim como a compreensão da interação célula-matriz extracelular e estímulos de crescimento tecidual (HAN et al., 2010). Esse ramo da biociência vem ganhando espaço conforme a descoberta de novas ferramentas, como réplicas estruturais tridimensionais de matrizes extracelulares que permitem a adesão, crescimento e diferenciação do tecido, essa estrutura é chamada de arcabouço.

Os arcabouços tiveram um impacto importante na engenharia de tecidos, a capacidade de mimetizar o microambiente tridimensional de uma célula melhora sua afinidade com o seu meio e estimula a mesma a assumir um comportamento fenotípico mais semelhante ao seu original. Apesar de sua aplicabilidade ter ganhado muito espaço recentemente, a metodologia para a produção dos arcabouços é antiga, desde o final da década de 80 cientistas vêm descrevendo processos para a sua produção (SIMON, 2017).

Vários materiais podem ser usados para formar um arcabouço, contudo eles precisam se adequar a sua aplicabilidade. Para cultivo celular é importante que o material aplicado seja biocompatível, biodegradável, não tóxico, e com características químicas e físicas que permitam à célula exercer suas funções básicas e que tenham maior semelhança ao seu ambiente natural possível (HAN et al., 2014).

#### **4.2 BIOPOLÍMEROS APLICADOS À ENGENHARIA DE TECIDOS**

Polímeros como poliácido láctico (PLA), colágeno e alguns poliésteres são candidatos clássicos quando se trata de material para confecção de arcabouços para o cultivo de células e aplicações em engenharia de tecidos, esses polímeros naturais apresentam uma maior biocompatibilidade que os sintéticos e são mais bem aceitos pelas células ou tecidos (J. S. CRUSCA, A. C. B. OLIVEIRA, J. R. PERUSSI, 2014; SOPPIMATH; AMINABHAVI; KULKARNI, 2001; WAN et al., 2003). Outros biopolímeros que se destacam são Qs e Alg, amplamente usados em pesquisas esses dois polímeros têm todas as características básicas que os arcabouços

necessitam para engenharia de tecidos, além de a Qs ser conhecida por sua atividade antimicrobiana e ter como característica o fato de grupos químicos semelhantes à glicosaminoglicanos, que providenciam características como adesividade e capacidade de ligação a fatores de crescimento, os grupamentos aminofuncionais da Qs podem providenciar sítios de ancoramento de fatores como oligopeptídeos (SHAMEKHI et al., 2017).

#### 4.3 PESO MOLECULAR E SEU EFEITO SOBRE A QUITOSNA

Peso molecular é, essencialmente, uma forma de denotar-se a quantidade de matéria em uma substância. Embora nunca tenha sido reconhecido pela *conférence générale des poids et mesures*, o Dalton (Da) é a unidade que está associada ao peso molecular, massa atômica, de uma substância, também pode ser expressa como a unidade internacional (U), essa comumente associada a proteínas. O Dalton é o equivalente à g/mol e pode ser encontrada como KDa, kilodalton, quando as escalas são muito grandes. Polímeros são substâncias que têm a característica de se ligar a si mesma “n” vezes, e podem apresentar subclassificações de acordo com sua massa atômica, podendo ser caracterizados como de baixo, médio ou alto peso molecular, dependendo da quantidade de vezes que seus monômeros se repetem em sua cadeia. O peso molecular de uma substância pode afetar diretamente sua atividade, de tal modo que um mesmo polímero tenha diferentes características, químicas e biológicas, a depender da quantidade de vezes que seus monômeros se repetem em sua cadeia.

Referente à Qs, Garcia et al., (2020) demonstra que seu peso molecular afeta sua atividade antimicrobiana em cepas de *Sporothrix schenckii*. Os pesquisadores testaram Qs com baixo, médio e alto peso molecular, e concluíram que a Qs de baixo peso apresenta a melhor CI50, além de reduzir biomassa e adesividade do fungo.

Solubilidade é outro fator de extrema importância que pode ser afetado pelo peso molecular de um polímero. Quando apresenta um peso molecular baixo, variando de 5000 – 10000 Da, ou 5 – 10 KDa, a Qs apresenta melhor solubilidade devido a cadeias mais curtas que expõe seus radicais amina. Esse tipo de característica é de extrema importância em sistemas de vetorização de medicamentos (HOSSEINI-ASHTIANI; TADJARODI; ZARE-DORABEI, 2021).

De acordo com Zhou et al., (2017), o peso molecular, densidade de reticulação e hidrofiliicidade de um polímero são determinantes para o tamanho do poro no seu arcabouço. Quanto maior o peso molecular, tamanho das cadeias do polímero, mais longo serão os intervalos de contato entre seus radicais, o que leva um maior tamanho de poro, isso sugere uma razão para que polímeros com menores pesos moleculares tenham um tamanho de poro menor em seus respectivos arcabouços. Essas propostas foram apresentadas, também, por Santos et al., (2019), que usou Qs e Qs despolimerizada (Qsdp) na formação de seus arcabouços de Qs e Alg, chegando à conclusão de que as amostras com Qsdp formavam arcabouços com os menores tamanhos de poros.

#### 4.4 RETICULAÇÃO E INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA QUITOSANA-ALGINATO

Embora alguns desses polímeros interajam naturalmente, há uma necessidade de se firmar as ligações entre as cadeias para fortalecer sua estrutura final, esse processo é chamado de reticulação, do inglês “cross-link”. Um agente reticulador forma um braço químico que liga de forma covalente duas estruturas, firmando as cadeias laterais de polímeros, dificultando a sua degradação. Alguns agentes reticuladores são amplamente conhecidos como ácido tânico que usa de interações hidrofóbicas entre carbonos e hidrogênios para firmar as ligações entre proteínas (PICCHIO et al., 2018) e glutaraldeído, sendo esse um agente reticulador que conhecidamente aumenta a toxicidade do suporte (LIU et al., 2008). Genipina surge como uma opção não tóxica de agente reticulador, seus radicais têm a capacidade de ligar nitrogênios de cadeias diferentes e firmar uma estrutura química, mas seu uso ainda está ganhando espaço (CUI et al., 2014). Outros biopolímeros requerem estratégias diferentes de reticulação, o Alg é um exemplo de reticulação por interação de cargas. Sendo um composto carregado negativamente, esse polímero interage muito bem com íons positivos, e um conhecido agente reticulador do Alg é o íon  $\text{Ca}^{2+}$  (KUMAR; DWEVEDI; KAYASTHA, 2009).

A Qs é um biopolímero com várias possibilidades de reticulação, a disponibilidade de nitrogênio na sua cadeia possibilita uma reticulação por genipina (GONÇALVES et al., 2017) e o uso de enzimas vem sendo bem explorado nos últimos anos (CHOI et al., 2018a). Entretanto sua interação com o Alg não é via formação de ligações covalentes, mas sim por interação eletrostática entre os

grupamentos de carga oposta, os ácidos carboxílicos do Alg junto com as aminas da Qs, formando pontes de hidrogênio.

#### 4.5 TECNICAS DE FORMAÇÃO DE ARCABOUÇOS

A partir do uso desses materiais e suas respectivas características, várias metodologias foram criadas para confecção de seus arcabouços. Wan et al., (2003) usa uma técnica que dissolve a forma quiral “L” do PLA (PLLA) 5% em solvente orgânico e então leva-lo ao vácuo por 48h em temperatura ambiente para formar um filme que será usado para cultivo celular. Autores que usam colágeno ou gelatina, colágeno hidrolisado, como material utilizam técnicas de mistura e liofilização para formação do arcabouço, com o uso de glutaraldeído como agente reticulador, (HAN et al., 2014). Diferente de Han, Choi et al., (2018b) usa uma técnica enzimática para reticular seu arcabouço de gelatina e Qs, o uso de tirosinase permite dispensar o glutaraldeído, o que propicia uma baixa toxicidade.

Outra técnica versátil utilizada na engenharia de tecidos é a eletrospiação, do inglês “electrospinning”, uma solução é alimentada por uma seringa chamada fieira e uma alta tensão é aplicada a ponta, essa tensão gera um acúmulo de repulsão eletrostática que ejeta um fio de polímero. Uma placa ou haste com carga oposta atrai as fibras de polímero formando uma estrutura altamente porosa (RUJITANAROJ; PIMPHA; SUPAPHOL, 2008). O uso dessa técnica foi provado ser eficaz por El-Assar et al., (2015), quando usada para formar uma mistura de polivinil, dióxido de titânio e alguns outros materiais para formação de nanofibras aplicadas à engenharia de tecido.

Uma das técnicas mais utilizadas para a confecção de arcabouços de biopolímeros é baseada em liofilização. Liofilização consiste no congelamento de uma solução emulsificada e exposição ao vácuo para remoção do gelo por sublimação, assim possibilitando a obtenção de um polímero seco e firme (PROSAPIO; NORTON; MARCO, 2017). Essa técnica é amplamente utilizada para a formação de arcabouços como mostrado por (OLAD; FARSHI AZHAR, 2014; ULLAH; ZAINOL; IDRUS, 2017).

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAIS

Neste trabalho foram usados Qs de médio peso molecular, Alg de sódio foram obtidos através da Sigma Aldrich©. Préfiltro e filtros Millipore© 0,8 µM, ácido acético, hidróxido de sódio, nitrito de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, Fosfato de Potássio, ácido clorídrico, entre outros de serão de grau analítico. A produção dos arcabouços, bem como os ensaios foram realizadas no Laboratório de Tecnologia em Biopolímeros (LTB), DHE-CB/UFPE.

As células Vero (linhagem contínua de fibroblastos), provenientes do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), foram utilizadas para o ensaio de adesão e têm sido mantidas e armazenadas no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT-DHE). Essa linhagem é recomendada para estudos de citotoxicidade e para interações célula-substrato com biomateriais (WAN et al., 2003).

### 5.2 PURIFICAÇÃO E DESPOLIMERIZAÇÃO DA QUITOSANA

A purificação da Qs foi realizada diluindo-a em ácido acético 1% sob agitação magnética constante por 16 horas, para uma concentração final de 1%. Foi então filtrada em préfiltro 3,0 µM e em seguida filtro Millipore 0,8 µM. Posteriormente foi ressuspensa pela adição de hidróxido de sódio 40% até atingir o pH 8,0. O material suspenso foi centrifugado a 15000 rpm durante 20 minutos em temperatura ambiente, em seguida foram realizadas três lavagens com água e uma com álcool à 15000 rpm por 20 minutos cada. Uma parte do material foi armazenada e a outra foi levada para despolimerização.

A Qs purificada foi ressolubilizada em ácido acético 1% por agitação magnética sendo sua concentração final de 10 mg/ml. Foi adicionado Nitrito de sódio 0,1 M na solução na proporção de 200 µL para cada 4 ml de Qs 10 mg/ml durante uma hora em temperatura ambiente. Após uma hora de reação a Qs despolimerizada (Qsdp) foi precipitada com hidróxido de sódio à 40% e centrífuga a 15000 rpm por 20 minutos, em seguida foram realizadas três lavagens com água e uma com álcool à 15000 rpm por 20 minutos (MAO et al., 2004).

Uma solução “estoque” de Qs purificada e uma despolimerizada foram preparadas diluindo-a em ácido acético 1% de modo que a concentração final seja de 1,5%. Alg de sódio foi diluído em água destilada para uma concentração final de

1,5%. As soluções de Alg e Qs foram misturadas em concentrações e proporções diferentes para obtenção de várias conformações de arcabouço.

### 5.3 PREPARO DOS ARCABOUÇOS EM CAMADA ÚNICA

Os arcabouços de Qs e Alg foram preparados em diversas condições, como segue: As variáveis de formulação das soluções base foram às concentrações dos biopolímeros, de modo que foram testadas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5%, a proporção entre eles, que variava entre 2:1, 1:1 e 1:2 de Qs respectivamente em relação ao Alg, que foi adicionado nas concentrações de 0,75, 1,0 e 1,5%, e a Qs que poderia ser despolimerizada ou não despolimerizada. Em um Becker, foi adicionado 0,66 ml da solução de Qs, sendo adicionados 0,66ml da solução de Alg na mesma concentração e, por fim, mais 0,66 ml de Qs ou Alg, biopolímero que equilibra a proporção desejada, sendo o volume final aproximadamente 2 ml. A solução é agitada por 5 minutos em agitador magnético, depositada na placa de 24 poços e então liofilizada por 5 dias.

### 5.4 PREPARO DOS ARCABOUÇOS EM CAMADAS

Outra variável estudada foi à formulação de um arcabouço em camadas, semelhante ao apresentado por Algul et al., (2015). 0,66 ml de Qs ou Qsdp na concentração de (0,5% e 1,5%) foi depositada na placa de 24 poços e em seguida congelada à -4° C por 30 minutos, em seguida uma camada de Alg (0,75% e 1,5%) foi adicionada e congelada seguindo a mesma metodologia, e por último uma camada de quitosana, o produto final foi levado ao liofilizador (LU et al., 2018; SAJESH et al., 2013).

### 5.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ARCABOUÇOS

Os arcabouços foram levados à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O material foi cortado em fragmentos de 1 mm de espessura e 5 mm de altura e largura e coberto com uma fina camada de ouro paládio (J. S. CRUSCA, A. C. B. OLIVEIRA, J. R. PERUSSI, 2014).

A avaliação do tamanho do poro foi realizada com o auxílio do software Image-J, durante a microscopia fotos foram tiradas aleatoriamente de sua estrutura, no final 5 dessas fotos foram levadas ao software e em cada fotografia todos poros tiveram seu maior diâmetro medido. O resultado da mensuração foi transformado em um gráfico para avaliar qual a população de diâmetro de poros mais presente naquela conformação de arcabouço.

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ARCABOUÇOS

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi conduzida numa escala de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ . O intumescimento dos arcabouços foi realizado depositando-os em Erlenmeyer com 5 mL de tampão de ácido clorídrico e cloreto de potássio (pH 1,4), tampão fosfato de sódio (pH 7,2) e em água MilliQ (pH 6,93) todos na temperatura de 37°C, foram avaliados os pesos após de 30 minutos, uma hora, uma hora e meia, duas horas e a cada 24 horas seguintes até um máximo de 96 horas. Para calcular o percentual de absorção da água foi usada a equação:

$$W_{sw} = \left( \frac{W_1 - W_0}{W_0} \right) \times 100$$

Onde  $W_{sw}$  é a porcentagem de absorção da água,  $W_1$  é o peso do arcabouço após o intumescimento e  $W_0$  é o peso do arcabouço seco (HUGLIN; LIU; VELADA, 1997).

## 5.7 CULTURA DE CÉLULAS VERO

As células Vero foram descongeladas em banho-maria e posteriormente, centrifugadas sob refrigeração. O *pellete* celular foi ressuspenso em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino e mistura de antibióticos (100 UI de penicilina e 100  $\mu\text{m}/\text{mL}$  de estreptomicina, Sigma®). As células foram cultivadas e mantidas em estufa de  $\text{CO}_2$  a 5 %, 37 °C e 85 % de umidade controlada. Posteriormente, foram contadas e plaqueadas ( $1 \times 10^5$  células/mL) em placas de seis poços contendo os arcabouços de Qs e Alg. Para manutenção da cultura e a

garantia do estabelecimento das mesmas foram realizadas expansões em garrafas com 75 cm<sup>2</sup> livres de quaisquer biomateriais.

#### 5.8 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE E SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS VERO

A contagem e a viabilidade das células em cultura foram realizadas com o auxílio de câmara hematimétrica. Após a incubação (48 horas), uma alíquota da suspensão de células foi retirada e diluída em Azul de Trypan (0,2 %, Sigma). As células viáveis se apresentaram incolores e as inviáveis coradas no tom de azul (BHATIA; YETTER, 2008).

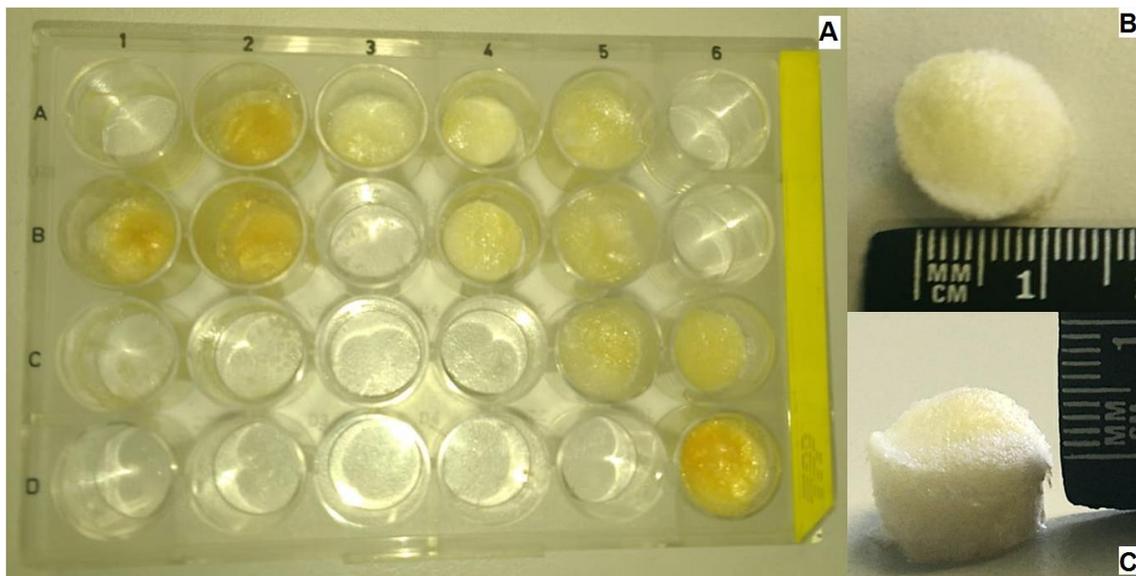
#### 5.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS VERO ADERIDAS AOS ARCABOUÇOS DE QUITOSANA E ALGINATO

A morfologia das células, aderidas aos arcabouços tridimensionais de Qs/Alg, foi avaliada com 72 horas de cultivo através de sistema vídeo-microscopia com o auxílio do microscópio invertido com contraste de fase LEICA (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera (MOTICAM BA 2000, Campinas, Brasil). Fotografias digitais foram realizadas utilizando-se o *software Motic Images Plus 2.0*.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 PREPARO DOS ARCABOUÇOS

O processo de liofilização resultou em uma estrutura semelhante a uma esponja, de cor amarelada que altera de intensidade conforme a metodologia aplicada (**Figura 1**). Foi constatado que algumas formulações de arcabouços não formaram uma estrutura firme e se desfizeram ao toque, outras apresentavam coágulos ou precipitados, esses arcabouços foram descartados. Esses efeitos provavelmente ocorreram devido à interação entre os dois polímeros não ser forte o suficiente para manter uma estrutura tridimensional estável e/ou pela baixa concentração aplicada.



**Figura 1:** Arcabouços pós-liofilização. A) Placa de 24 poços contendo as formulações de arcabouços nas colunas 1 e 2 da placa estão a formulação Qsdp 1,5% Alg 1,5% 2:1, nas colunas 3 e 4 Qs 1,5% Alg 1,5% 2:1, nas colunas 5 e 6 estão as formulações em camadas Qs 1,5% Alg 1,5% Qs 1,5% e na D6 um arcabouço de alginato puro. B) arcabouço Qs 1,5% Alg 1,5% 2:1 visão superior. C) arcabouço Qs 1,5% Alg 1,5% 2:1 visão lateral.

Nota-se que apenas arcabouços em camada única com concentração maior que 1% de polímero formaram suportes satisfatórios. Aqueles em camadas triplas conseguiram manter sua estrutura mesmo em concentrações menores que 1%.

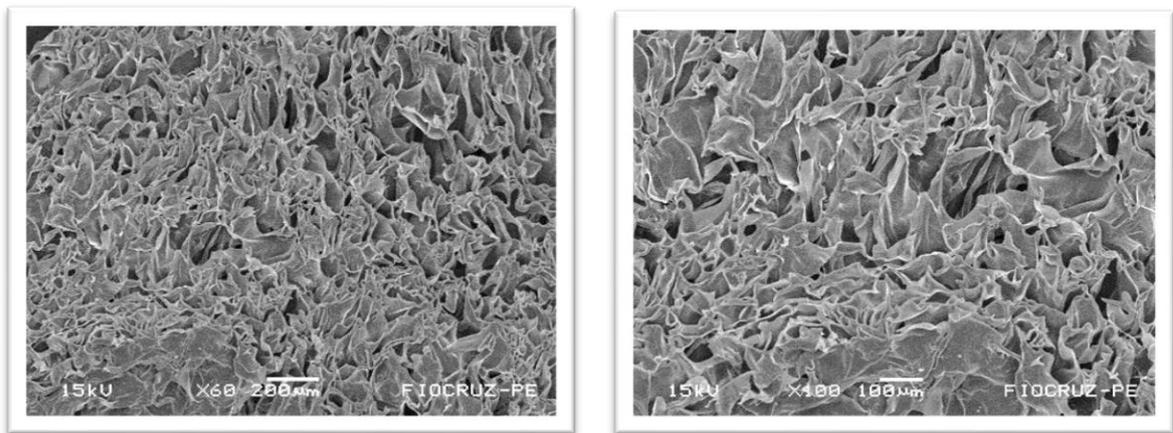
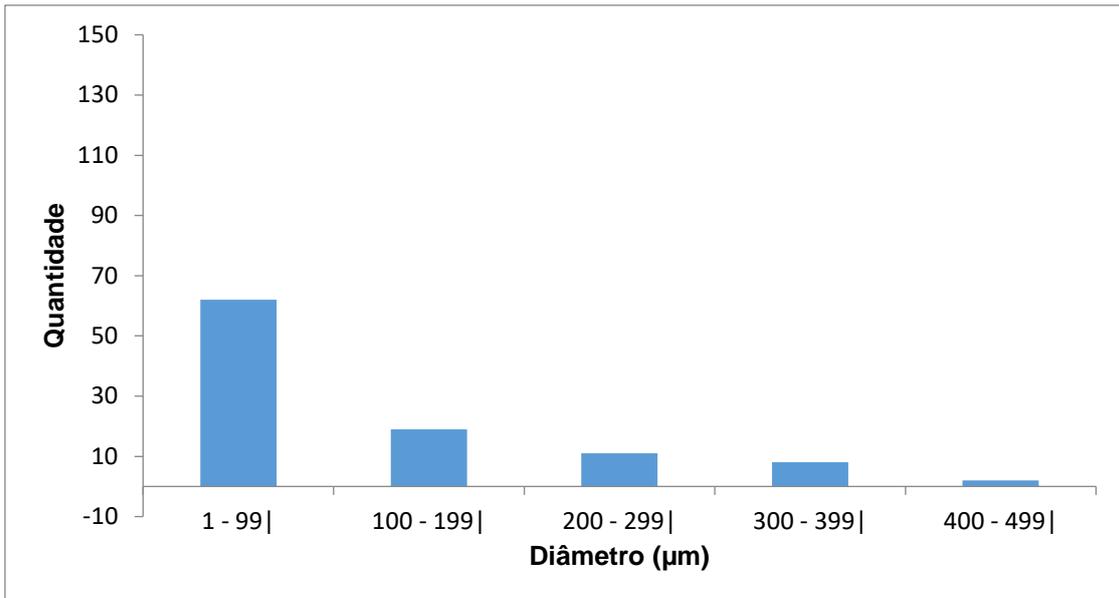
Foi notado que as proporções de 1:1 de polímero não formaram arcabouços estáveis após a liofilização. As demais análises não mostraram correlação entre a proporção dos polímeros do arcabouços e suas características físico-químicas. Assim, apenas as amostras selecionadas (**Tabela 1**) seguiram para as análises.

**Tabela 1:** Formulações dos arcabouços selecionados para as análises.

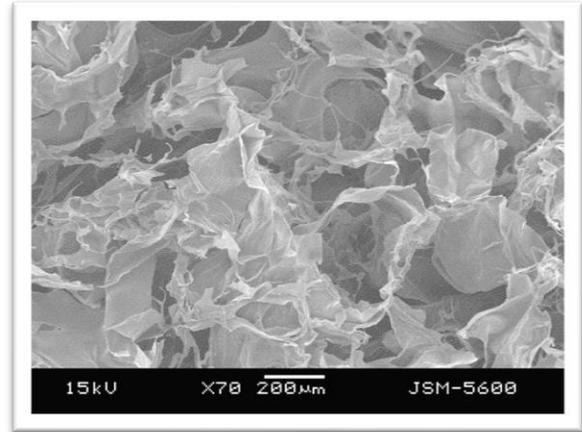
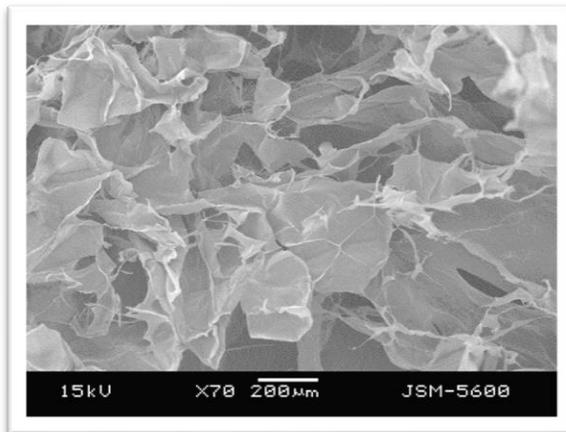
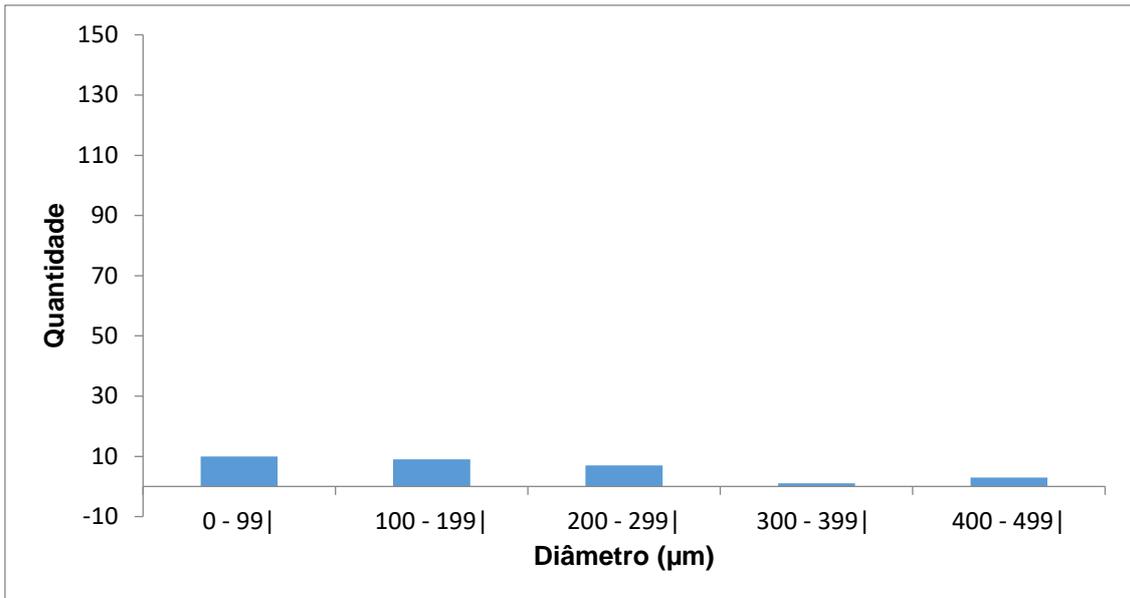
FORMULAÇÃO	QS (%)	Alg (%)	PROPORÇÃO
<b>CAMADA ÚNICA</b>			
Qsdp 1,5 %	1,5	-	-
Qs 1,5 %			
Qs 1 % Alg 1 %	1	1	1:2
Qsdp 1 % Alg 1 %	1	1	1:2
Qs 1,5 % Alg 1,5 %	1,5	1,5	2:1
Qsdp 1,5 % Alg 1,5 %	1,5	1,5	2:1
<b>CAMADA TRIPLA</b>			
Qsdp 0,5 % Alg 0,75 % Qsdp 0,5 %	0,5	0,5	-
Qs 1,5 % Alg 1,5 % Qs 1,5 %	1,5	1,5	-

## 6.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

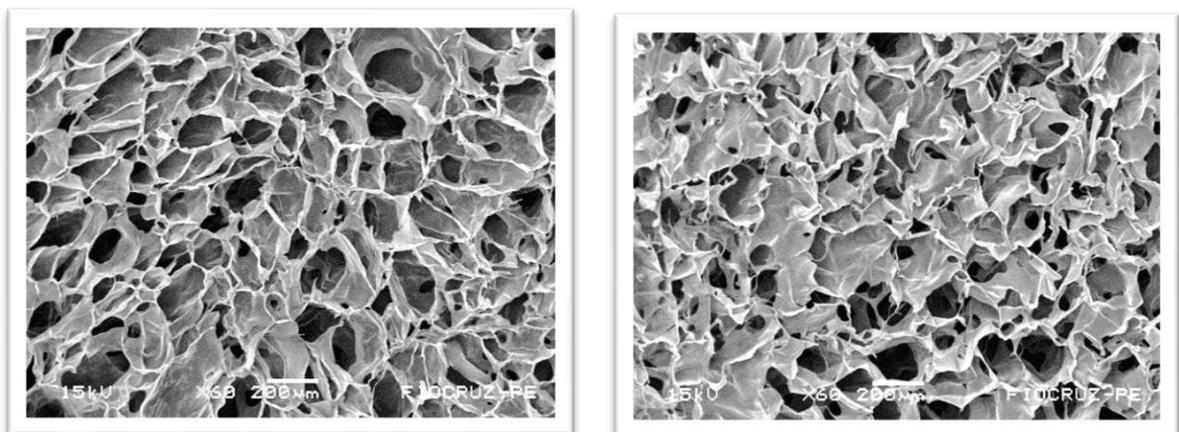
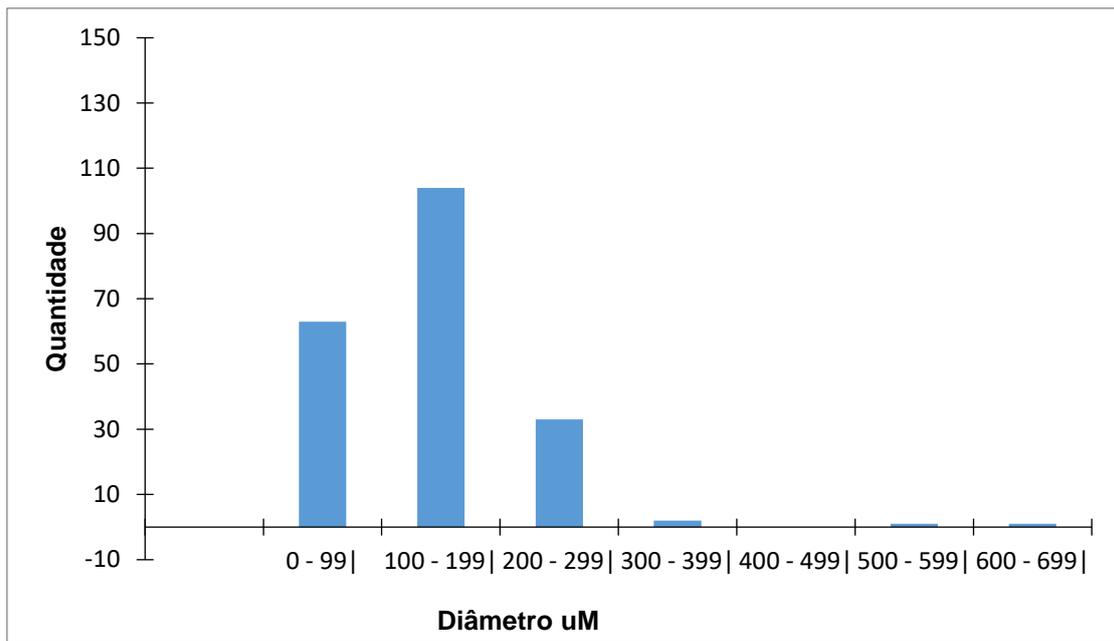
O MEV foi utilizado para caracterizar morfologicamente os arcabouços como tamanho e interconexão dos poros. Segundo Kim et al., (2015), um arcabouço ideal para o cultivo celular tem poro médio que varia de 100 - 400  $\mu\text{m}$ . Um arcabouço eficiente para cultivo celular tem alta porosidade e poros interligados entre si que aumentam à resposta biológica e a adesão da célula a estrutura (ALGUL et al., 2015; SANTOS et al., 2019). As imagens sugerem que as amostras de arcabouços despolimerizados (**Figuras 2 e 4**) têm uma maior população de poros e um menor diâmetro como observado nas amostras Qsdp 1% Alg 1% 1:2 e Qsdp 1,5% Alg 1,5%, em comparação com suas contrapartes não despolimerizadas (**Figuras 3 e 5**). Uma importante conjectura sobre os arcabouços obtidos é que tanto a concentração de polímero quanto o tamanho de cadeia afetam sua estrutura, tamanho de poro, que variaram de 10 a 600  $\mu\text{m}$ , e porosidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Yang et al., (2010), que notou que os poros de seu arcabouço de Qs aumentavam na medida em que diminuía a concentração do polímero, enquanto uma concentração de 1,25 % gerava uma população de poros média de 100  $\mu\text{m}$ , uma concentração de 1,8 % formava uma população de poros média de 50  $\mu\text{m}$ . Logo a metodologia aplicada nesse trabalho permite uma grande maleabilidade do arcabouço, podendo ser moldado de acordo com a sua função proposta.



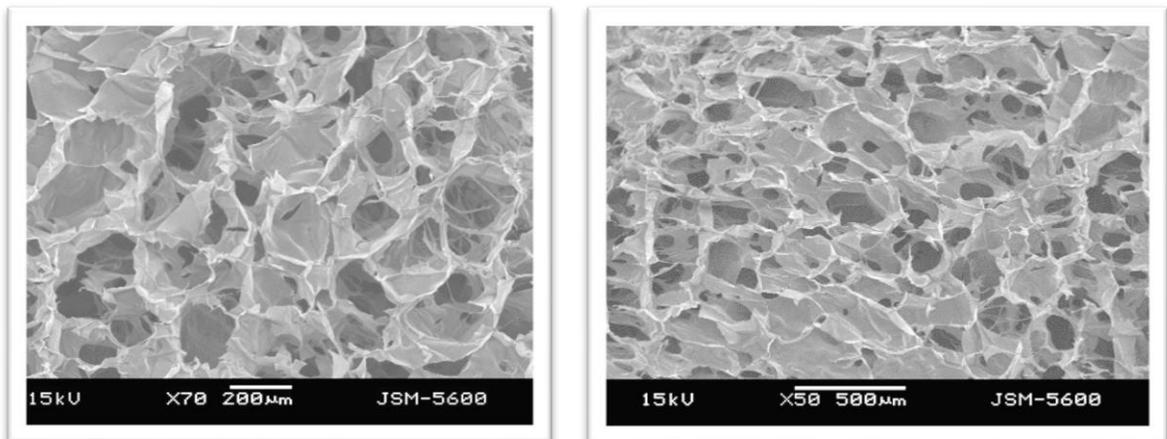
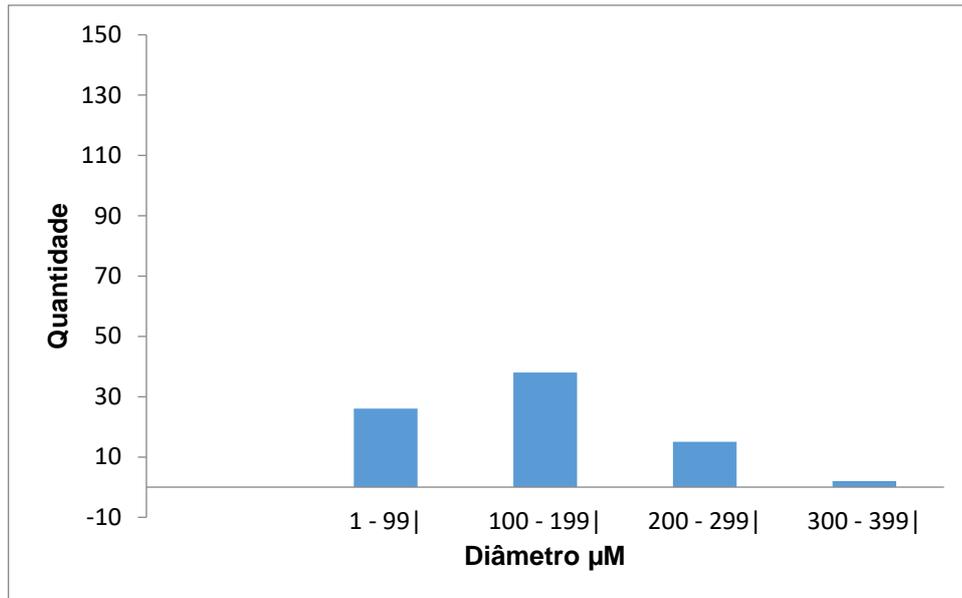
**Figura 2:** Análise morfológica do arcabouço Qsdp 1% Alg 1% 1:2. O gráfico refere-se à distribuição dos diâmetros dos poros do arcabouço. Escala de 200 µm na figura da esquerda e de 100 µm na figura da direita.



**Figura 3:** Análise morfológica do arcabouço Qs 1% Alg 1% 1:2. O gráfico refere-se à distribuição dos diâmetros dos poros do arcabouço. Escala de 200 μm.



**Figura 4:** Análise morfológica do arcabouço Qsdp 1,5% Alg 1,5% 2:1. O gráfico refere-se à distribuição dos diâmetros dos poros do arcabouço. Escala de 200 μm.



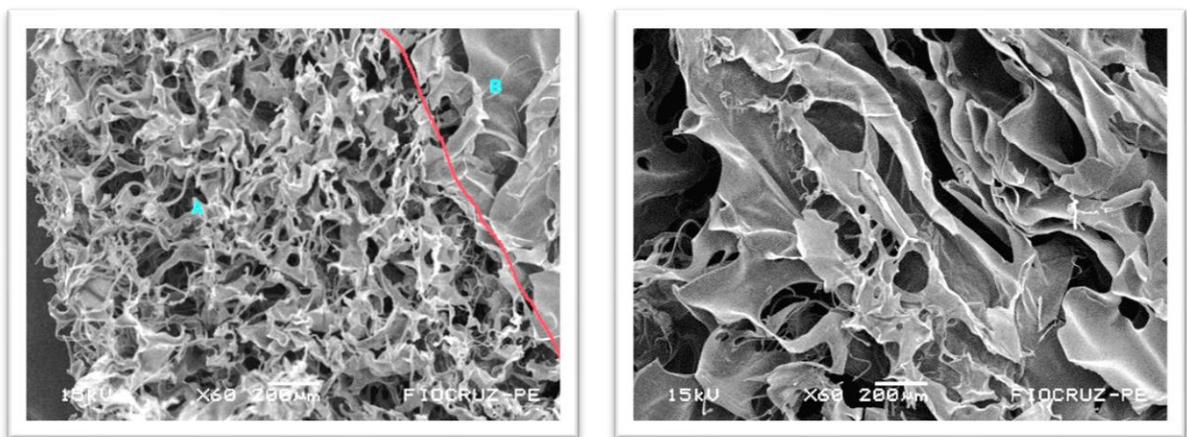
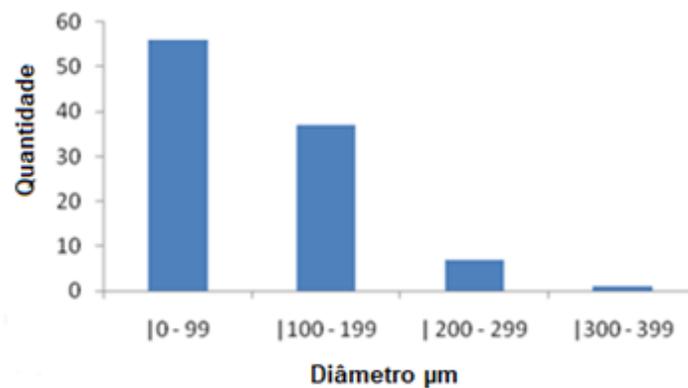
**Figura 5:** Análise morfológica do arcabouço Qs 1,5% Alg 1,5% 1:2. O gráfico refere-se à distribuição dos diâmetros dos poros do arcabouço. Escala de 200  $\mu\text{m}$  na figura da esquerda e 500  $\mu\text{m}$  na figura da direita.

Ainda ressalta-se a amostra Qs 1,5% Alg 1,5% Qs 1,5% (**Figura 7**), que em comparação com a amostra Qsdp 1,5% Alg 1,5% Qsdp 1,5% (**Figura 8**), arcabouços em camadas, apresentou uma população mais heterogênea de poros, assim como poucas evidências de interconexão entre eles.

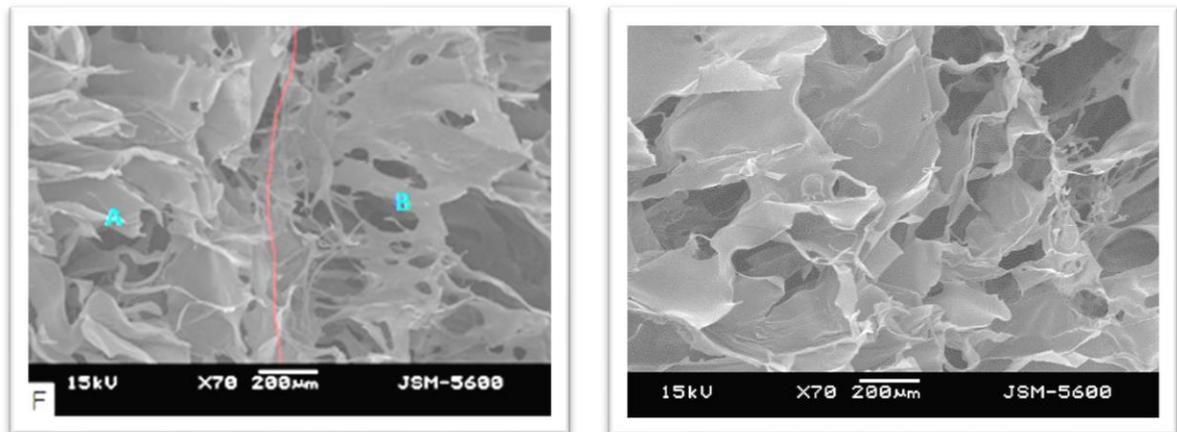
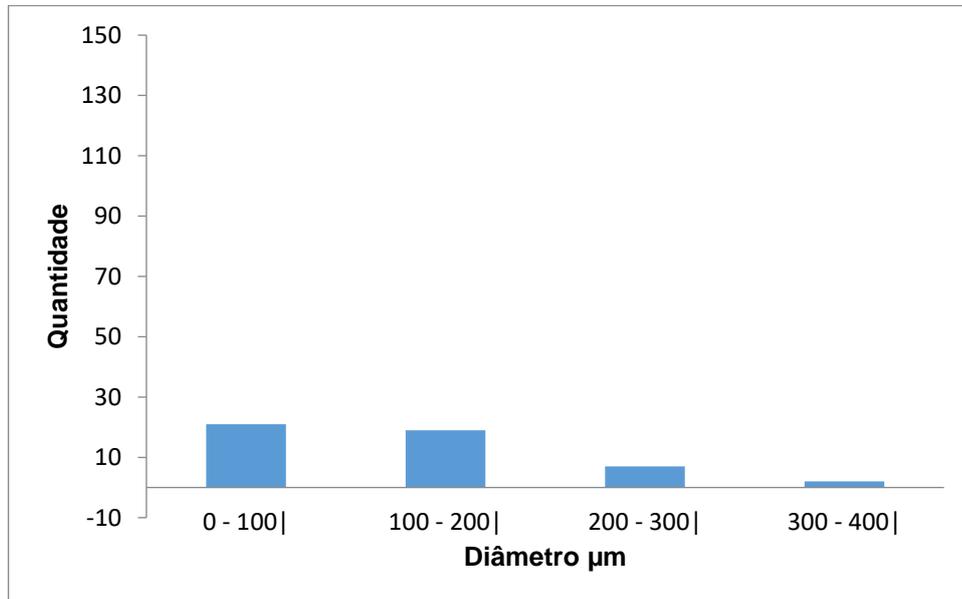
A concentração influencia no MEV de modo que os arcabouços preparados com menos de 1% de polímero demonstraram uma porosidade insatisfatória, tendo uma população aleatoriamente distribuída e poros pouco interconectados (dados não apresentados). Os poros das amostras produzidas na concentração de 1% ou

mais dos polímeros se mostraram promissoras, no caso dos arcabouços em camada única.

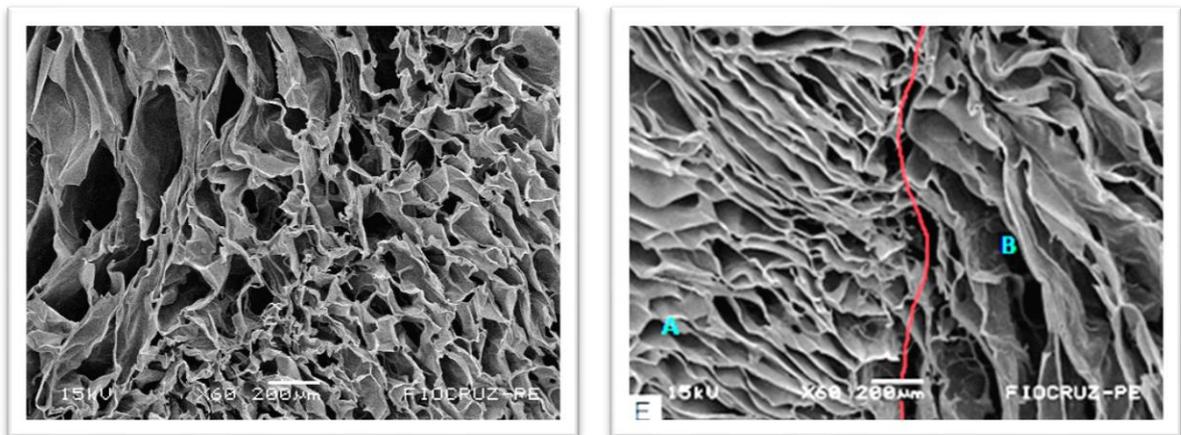
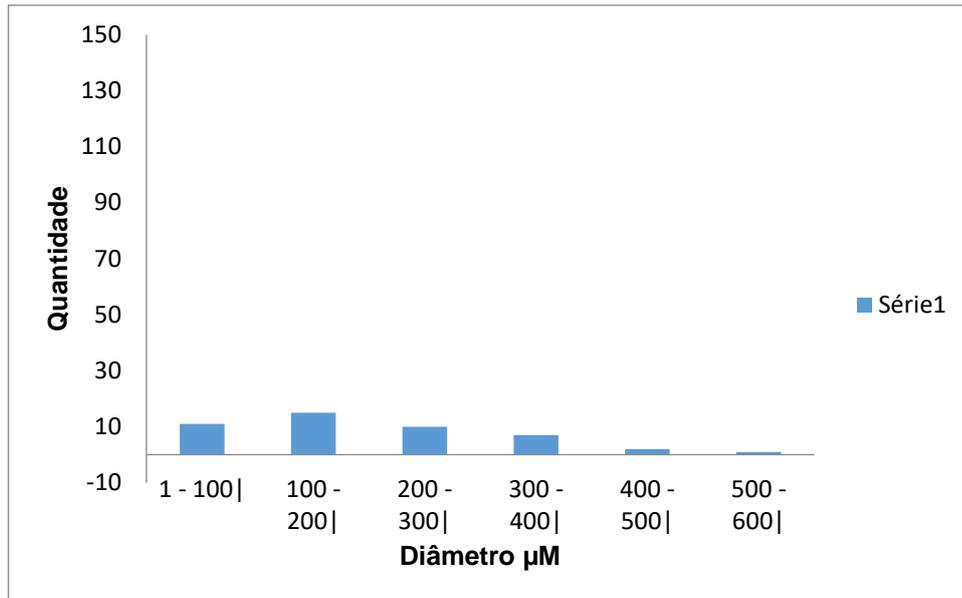
Os arcabouços em tripla camada demonstraram uma porosidade maior quando comparados àqueles constituídos com camada única. Quando em menor concentração (**Figura 6**), notou-se que a formulação Qsdp 0,5% Alg 0,75% Qsdp 0,5% apresentou uma maior população de poros, com uma predominância no intervalo de 01-99  $\mu\text{m}$  de diâmetro; enquanto a formulação Qsdp 1,5% Alg 1,5% Qsdp 1,5% (**Figura 8**) mostrou uma menor quantidade de poros, além de apresentar poros alongados, com populações de diâmetros variados e poucos sinais de interconexão.



**Figura 6:** Análise morfológica do arcabouço em camadas Qsdp 0,5% Alg 0,75% Qsdp 0,5%. O gráfico refere-se à distribuição dos diâmetros dos poros do arcabouço. A) Camada de quitosana B) Camada de alginato. Escala de 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 7:** Análise morfológica do arcabouço em camadas Qs 1,5% Alg 1,5% Qs 1,5%. O gráfico refere-se à distribuição dos diâmetros dos poros do arcabouço. A) Camada de quitosana B) Camada de alginato. Escala de 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 8:** Análise morfológica do arcabouço em camadas Qsdp 1,5% Alg 1,5% Qsdp 1,5%. O gráfico refere-se à distribuição dos diâmetros dos poros do arcabouço. A) Camada de quitosana B) Camada de alginato. Escala de 200  $\mu\text{m}$ .

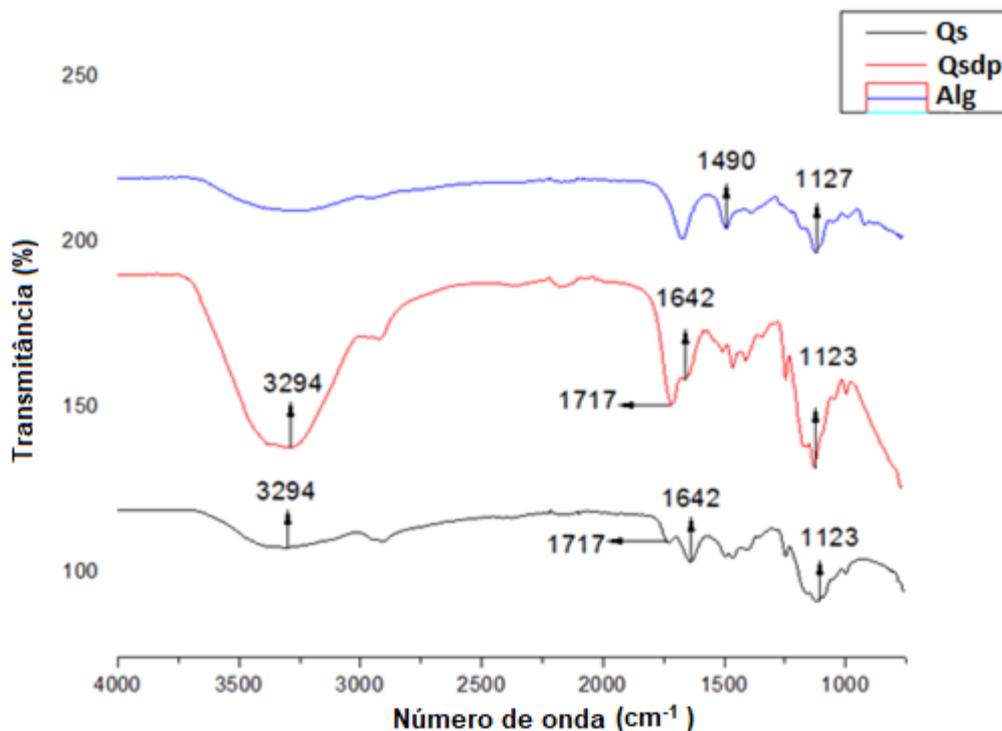
Interconectividade é uma característica fundamental para a formação de um arcabouço para crescimento celular ideal (OTSUKI et al., 2006). É possível notar que algumas amostras (**Figuras 2, 4, 5, 6 e 8**) demonstram alta interconectividade sugerindo uma promissora aplicação para suporte de crescimento celular.

### 6.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os picos característicos da Qs são exibidos na faixa de  $1642\text{ cm}^{-1}$  (amida-I) e um pico médio e agudo a  $1123 - 1127\text{ cm}^{-1}$ , também observados no Alg, indica

ligações C-C como descrito por Sartori et al., (1997) (**Figura 9**). O pico a  $1490\text{ cm}^{-1}$  no Alg corresponde às ligações -COOH.

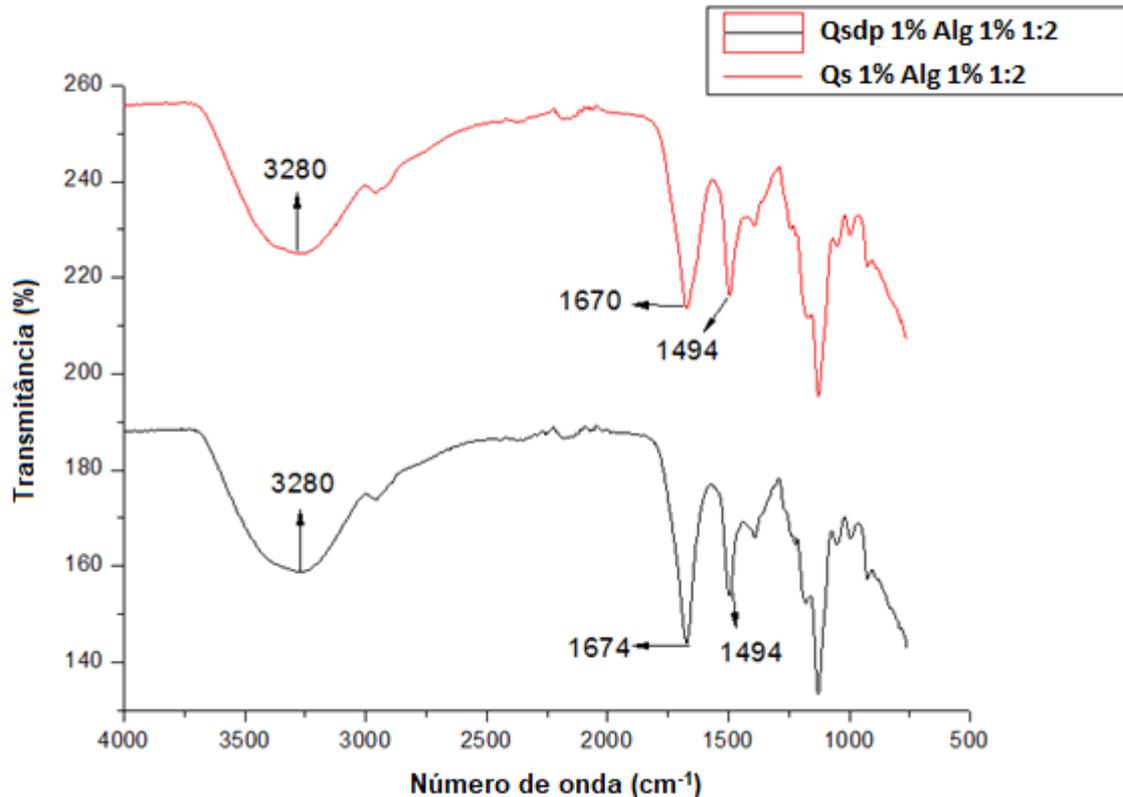
O espectro de FTIR demonstrou uma alteração no perfil da Qsdp em relação à Qs na faixa de  $3294\text{ cm}^{-1}$  essa faixa é representativa das ligações -OH, e a intensificação do pico  $1717\text{ cm}^{-1}$  representante das ligações C=O, essas intensificação dos picos são esperadas em uma amostra despolimerizada como evidenciado por Mao et al., (2004) (**Figura 9**).



**Figura 9:** Espectros de FTIR referente aos pós das amostras dos biopolímeros Alg (azul), Qsdp (vermelho), Qs (preto).

Nas amostras dos arcabouços, os picos de amida I ( $1670$  e  $1674\text{ cm}^{-1}$ ) e da carboxila ( $1494\text{ cm}^{-1}$ ) estão intensificados, assim como os picos a  $3280\text{ cm}^{-1}$ , com uma discreta alteração na localização. As alterações sugerem uma interação iônica entre os dois polímeros, onde os grupamentos carregados negativamente do Alg (COOH-) interagem com os grupamentos positivos da Qs (-NH<sub>2</sub>) como sugerido por Li et al., (2005) (**Figura 10**).

O espectro de FTIR não demonstrou nem uma diferença em relação às amostras independente de sua concentração (dados não apresentados).



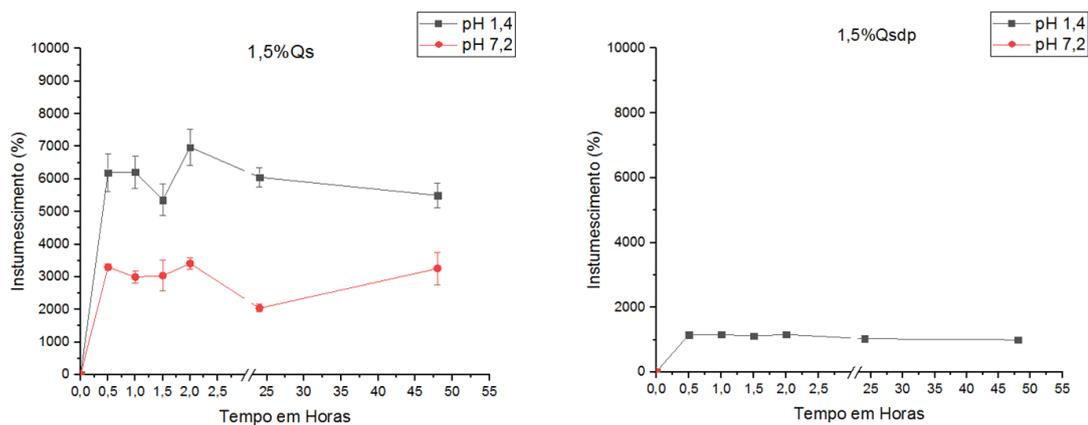
**Figura 10:** Espectros de FTIR referente as amostras dos arcabouços Qsdp 1 % Alg 1 % 1:2 (vermelho) e Qs 1 % Alg 1 % 1:2 (preto).

#### 6.4 INTUMESCIMENTO

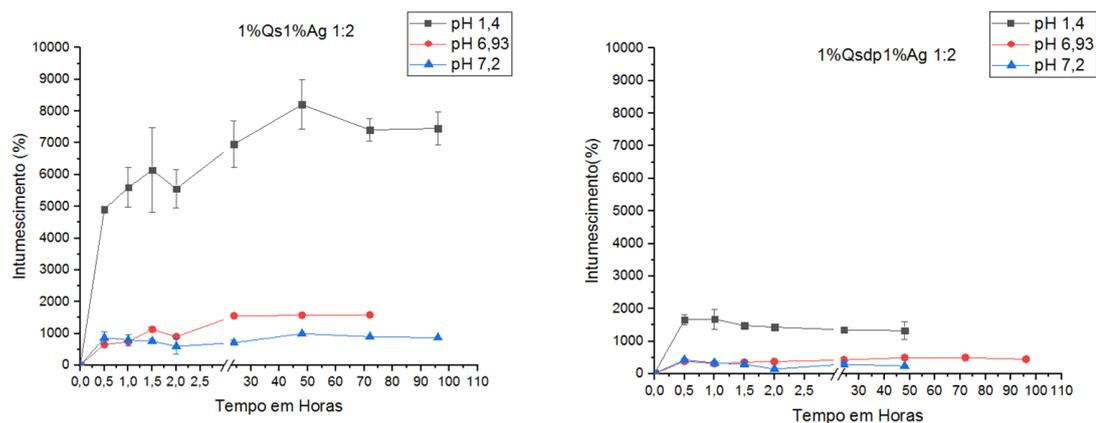
A capacidade de absorção de água é uma propriedade fundamental nas funções de difusão e absorção de líquidos do arcabouço (OLAD; FARSHI AZHAR, 2014). É notada uma correlação com a despolimerização e sua capacidade de intumescimento (**Figuras 11 e 12**), os arcabouços não despolimerizados mostraram maior capacidade de absorção e retenção de água em relação aos despolimerizados, tendo a amostra Qs 1% Alg 1% 1:2 atingindo mais de 8000% de intumescimento, contrastando com sua forma despolimerizada, as amostras demonstraram maior intumescimento em pH 1,4 em comparação com pH 7,2. Esse comportamento era esperado, devido ao  $PK_a$  da quitosana (5,5) e do alginato (2,5), que afetam a solubilidade e permeabilidade do arcabouço. Resultados semelhantes foram encontrados por Barroso et al., (2014), onde os arcabouços de Qs 1,5 % e colágeno 1,5 % reticulado com glutaraldeído sofreram maior intumescimento em pH 5,0 em relação ao pH 7,4. Evidencia-se também que o arcabouço de Qsdp pura (**Figura 11 a direita**) não manteve sua integridade, dissolvendo completamente no

pH 7,2. Os arcabouços em camadas tiveram um comportamento semelhante independente de sua despolimerização (**Figura 11**)

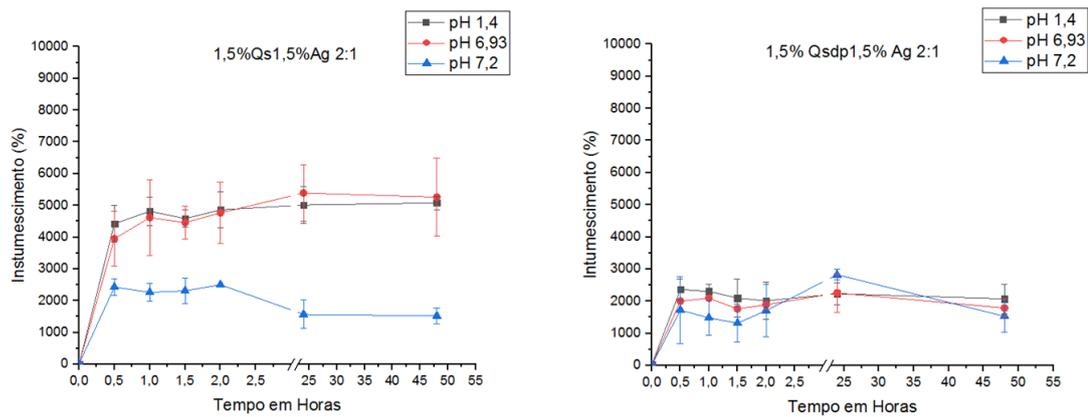
O intumescimento das amostras demonstrou uma leve diferença de comportamento em relação à concentração dos arcabouços. Os arcabouços com concentração de 1% demonstraram maior afinidade pelo pH mais ácido (**Figura 11**), já os arcabouços produzidos com 1,5% de polímero têm uma afinidade semelhante entre diferentes faixas de pH (1,4 e 6,93). Ambos ainda com maior afinidade por pH ácidos (**Figura 12**).



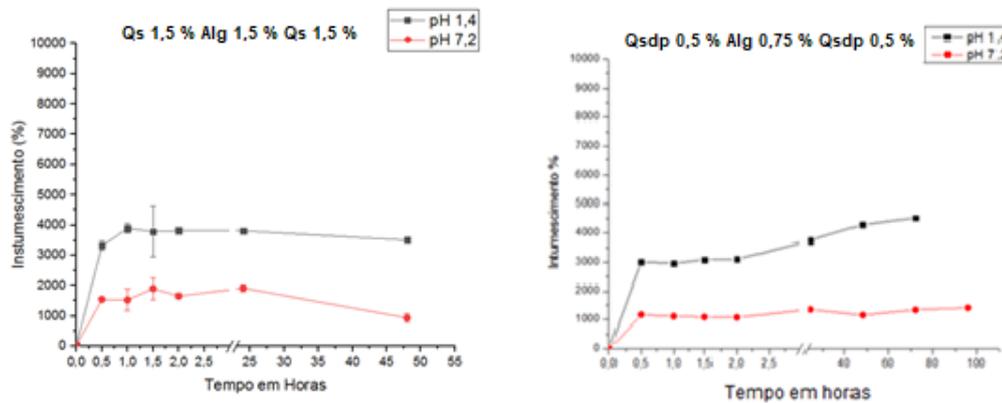
**Figura 11:** Comparação dos intumescimentos dos arcabouços baseados apenas em Qs e Qsdp. À esquerda arcabouço de Qs 1,5 % não despolimerizados; À direita arcabouço de Qs 1,5 % Despolimerizado. Linha preta pH ácido (1,4); Linha vermelha pH levemente alcalino (7,2).



**Figura 12:** Comparação dos intumescimentos dos arcabouços baseados em Qs e Alg 1 %. À esquerda arcabouço de Qs 1 % Alg 1 % 1:2 não despolimerizados; À direita arcabouço de Qsdp 1 % Alg 1 % 1:2 Despolimerizado. Linha preta pH ácido (1,4); Linha Vermelha pH levemente ácido (6,93); Linha azul pH levemente alcalino (7,2).



**Figura 13:** Comparação dos intumescimentos dos arcabouços de Qs e Alg 1,5 %. À esquerda arcabouço de Qs 1,5 % Alg 1,5 % 2:1 não despolimerizados; À direita arcabouço de Qsdp 1,5 % Alg 1,5 % 2:1 Despolimerizado. Linha preta pH ácido (1,4); Linha Vermelha pH levemente ácido (6,93); Linha azul pH levemente alcalino (7,2).



**Figura 14:** Comparação dos intumescimentos dos arcabouços em camadas Qs 0,5 % e Alg 0,75 %. À esquerda arcabouço de Qs 1,5 % Alg 1,5 % Qs 1,5 % não despolimerizado; À direita arcabouço de Qsdp 0,5 % Alg 0,75 % Qsdp 0,5 % despolimerizados. Linha preta pH ácido (1,4); Linha Vermelha pH levemente ácido (6,93); Linha azul pH levemente alcalino (7,2).

## 6.5 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

Duas amostras dos arcabouços foram utilizadas no ensaio de adesão celular com células Vero (Qsdp 1 % Alg 1 % 1:2 e Qsdp 0,5 % Alg 0,75 % Qsdp 0,5 %). Os arcabouços foram selecionados em com base nos ensaios de intumescimento e das características estruturais avaliadas através da MEV.

**Na figura 15,** observamos que as células Vero, em contato com o arcabouço de tripla camada e baixa concentração de polímeros (Qsdp 0,5 % Alg 0,75 % Qsdp

0,5 %), proliferaram e com 72 horas de cultivo encontravam-se aderidas ao biomaterial, que apresentou uma maior população de poros e interconectividade entre eles num prévio estudo com MEV. Áreas transversais do arcabouço foram observadas através de microscópio invertido com contraste de fase e revelaram a presença de células Vero aderidas e alinhadas à disposição das fibras poliméricas da estrutura analisada (**Figura 15 A, B, D e F**); assim como agrupamentos celulares interconectados, possivelmente em função da presença de poros (**Figura 15 C e D**).

Patel et al. (2008) referem que as dimensões macroscópicas e microscópicas dos arcabouços, assim como o diâmetro dos poros nesses biomateriais, influenciam no comportamento celular com importantes repercussões no transporte de nutrientes e conseqüentemente, na formação de um tecido, quando aplicáveis à engenharia de tecidos. Todavia, apenas a presença de poros no arcabouço com dimensões apropriadas para o crescimento tecidual não é suficiente; os poros também necessitam ser abertos e interconectados (KIDOAKI; KWON; MATSUDA, 2005).

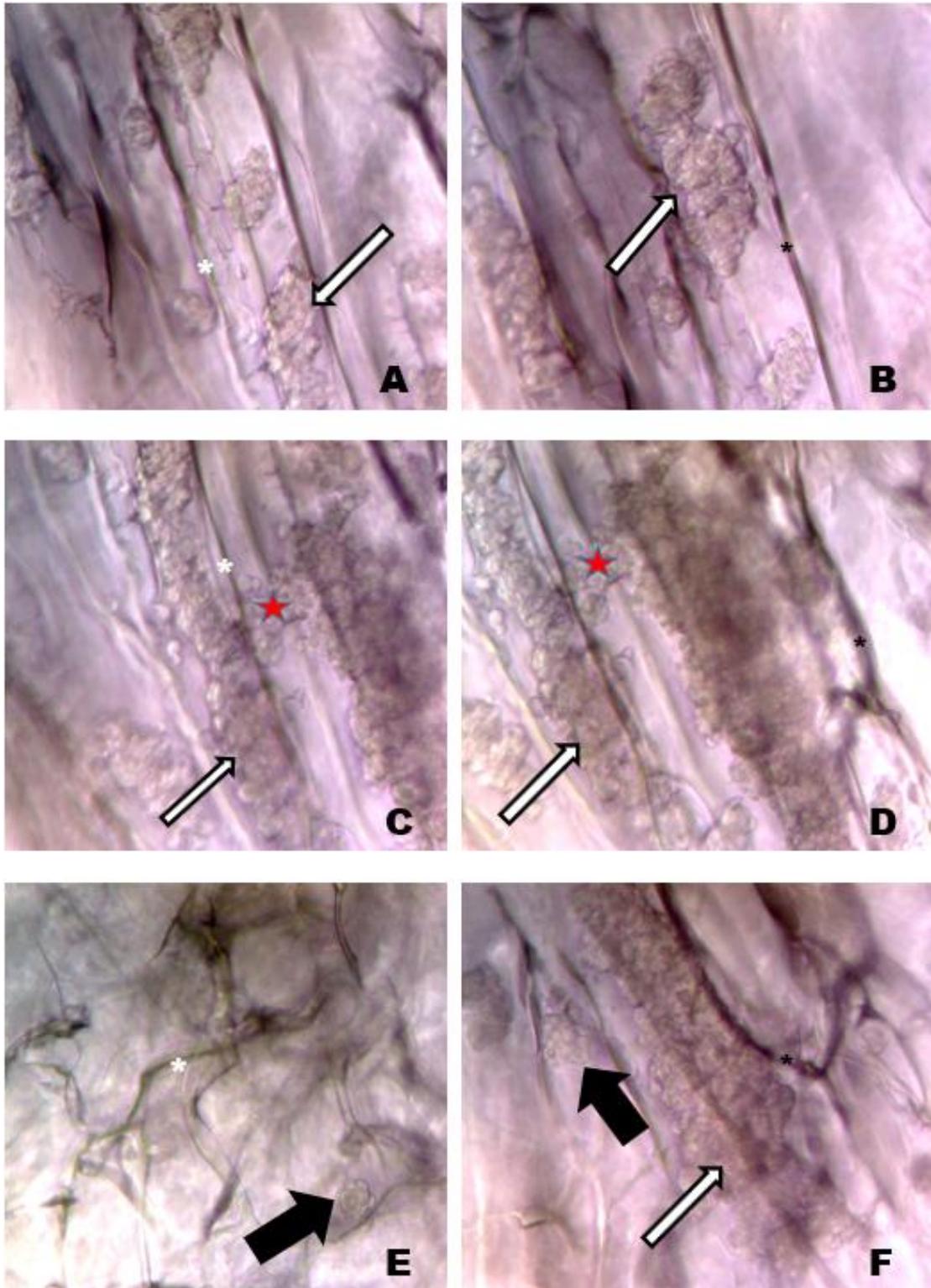
A interconectividade entre os poros, demonstrada pela disposição das células Vero na **Figura 15 (C e D)**, é uma das principais características da porosidade e tem sido demonstrada em vários estudos, como sendo responsável pela manutenção e crescimento dos tecidos, pelo transporte de nutrientes e drenagem de líquidos intersticiais (JONES et al., 2007; KUBOKI et al., 1998; OTSUKI et al., 2006; PATEL et al., 2008; RATNER, 2004).

Os resultados da análise via MEV com relação a avaliação do compósito (Qsdp 0,5% Alg 0,75% Qsdp 0,5%) revelaram uma maior população de poros e corroboram com o estudo realizado por de Algul et al., (2015), que referiram ser um arcabouço ideal para a cultura de células, aquele com maior porosidade, presença de poros interconectados e de diferentes tamanhos; capazes de promover a adesão celular e conseqüentemente influenciar na resposta biológica.

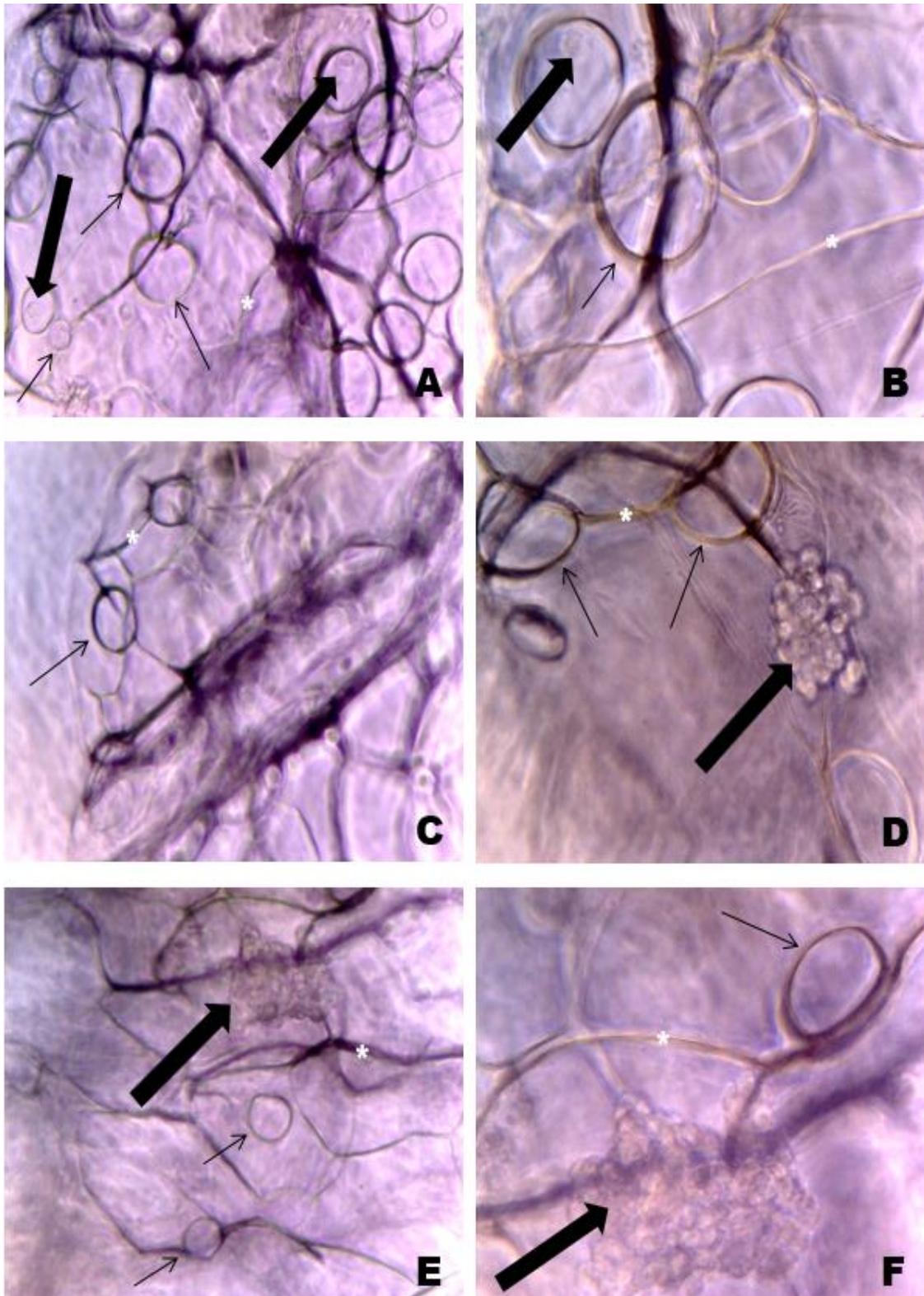
A análise do arcabouço de camada única (Qsdp 1% Alg 1% 1:2) por meio da microscopia invertida com contraste de fase revelou estruturas circulares semelhantes a anéis (**Figura 16**), possivelmente devido ao entrelaçamento dos fios de polímero durante o processo de confecção do biosuporte. Nesse arcabouço, as

células Vero apresentaram-se aderidas formando conglomerados isolados em determinadas regiões das fibras poliméricas.

O arcabouço de tripla camada e baixa concentração de polímero (Qsdp 0,5 % Alg 0,75 % Qsdp 0,5 %) promoveu melhor adesão e proliferação das células Vero, quando comparado ao arcabouço de camada única (Qsdp 1 % Alg 1 % 1:2). Possivelmente, a capacidade de intumescimento dos arcabouços tenha considerável influência no processo de adesão das células. De acordo com Thien-Han; Misra, (2009), a absorção de água facilita a infiltração das células dentro dos arcabouços durante o procedimento de cultura; maximiza a adesão celular; aumenta o tamanho do poro e a porosidade total do arcabouço incrementando a área interna dos mesmos, o que contribui para o crescimento celular e favorece o transporte de nutrientes e resíduos metabólicos.



**Figura 15:** Fotomicrografias de células Vero cultivadas por 72h em contato com o arcabouço Qsdp 0,5 % Alg 0,75 % Qsdp 0,5 %, observadas através de microscópio invertido com contraste de fase. **A, B, D e F:** notam-se aglomerados de células arredondadas aderidas e alinhadas em função da disposição das fibras poliméricas (setas brancas longas); em **C e D:** denota-se com precisão células interconectadas (estrelas) e em **E:** devido ao desalinhamento das fibras, observam-se células num arranjo em roseta (setas pretas grossas). Magnitude das imagens: aumento de 100x (**A, C e E**); aumento de 400x (**B, D e F**). Os asteriscos indicam as fibras poliméricas.



**Figura 16:** Fotomicrografias de células Vero cultivadas por 72h em contato com o arcabouço Qsdp 1 % Alg 1 % 1:2, observadas através de microscópio invertido com contraste de fase. **A, B, C, D e F:** observam-se fibras poliméricas em arranjos circulares (setas pretas e finas) e filamentosos (asteriscos); em **D, E e F:** notam-se células Vero formando aglomerados isolados e aderidas firmemente às fibras poliméricas (setas pretas e alongadas). Magnitude das imagens: aumento de 100x (**A, C e E**); aumento de 400x (**B, D e F**).

## 7. CONCLUSÃO

A metodologia empregada para o preparo dos arcabouços se provou eficaz e foram obtidos materiais com estruturas porosas e interconectadas. A caracterização físico-química via FTIR dos arcabouços produzidos revelou a interação entre os polímeros utilizados, Qs e Alg, e o processo de despolimerização além de bem sucedido, não alterou o espectro da Qsdp em relação à Qs. O ensaio de intumescimento demonstrou grande potencial de absorção em todas as amostras testadas, além de alta afinidade por ambientes ácidos. As imagens de MEV mostraram que as amostras testadas apresentam poros de tamanho adequado, além de interconectividade e sugerem que o processo de despolimerização aumenta a porosidade dos arcabouços. Ambas as amostras de arcabouços demonstraram-se eficientes em promover a adesão celular e as microfotografias da amostra Qsdp 0,5 % Alg 0,75 % Qsdp 0,5 % mostraram que o suporte promove a ampla colonização pelas células Vero. A composição química, a identificação de poros e a confirmação da biocompatibilidade indicam que os arcabouços produzidos pela metodologia proposta podem ter amplo potencial de aplicação na engenharia de tecidos e mais estudos devem ser realizados para garantir a aplicabilidade desses novos biosuportes.

## REFERÊNCIAS

ALGUL, Derya; SIPAHI, Hande; AYDIN, Ahmet; KELLECI, Feyza; OZDATLI, Sukran; YENER, Fatma Gulgun. Biocompatibility of biomimetic multilayered alginate-chitosan/ $\beta$ -TCP scaffold for osteochondral tissue. **International journal of biological macromolecules**, [S. l.], v. 79, p. 363–9, 2015. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813015003311>.

BANKOTI, Kamakshi; RAMESHBABU, Arun Prabhu; DATTA, Sayanti; MAITY, Priti Prasanna; GOSWAMI, Piyali; DATTA, Pallab; GHOSH, Sudip Kumar; MITRA, Analava; DHARA, Santanu. Accelerated healing of full thickness dermal wounds by macroporous waterborne polyurethane-chitosan hydrogel scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, [S. l.], v. 81, p. 133–143, 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2017.07.018. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092849311632848X>.

BARROSO, Telma; VIVEIROS, Raquel; CASIMIRO, Teresa; AGUIAR-RICARDO, Ana. Development of dual-responsive chitosan-collagen scaffolds for pulsatile release of bioactive molecules. **Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 94, p. 102–112, 2014. DOI: 10.1016/j.supflu.2014.07.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.005>.

BHATIA, Sujata K.; YETTER, Ann B. Correlation of visual in vitro cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. **Cell Biology and Toxicology**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 315–319, 2008. DOI: 10.1007/s10565-007-9040-z.

CHOI, Dong Jin; PARK, Sang Jun; GU, Bon Kang; KIM, Young Jin; CHUNG, Seok; KIM, Chun Ho. Effect of the pore size in a 3D bioprinted gelatin scaffold on fibroblast proliferation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [S. l.], v. 67, p. 388–395, 2018. a. DOI: 10.1016/j.jiec.2018.07.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.07.013>.

CHOI, Yoo Rae; KIM, Eun Hae; LIM, Sujin; CHOI, Yoo Seong. Efficient preparation of a permanent chitosan/gelatin hydrogel using an acid-tolerant tyrosinase.

**Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 129, p. 50–56, 2018. b. DOI: 10.1016/j.bej.2017.10.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.10.016>.

CUI, Li; JIA, Junfang; GUO, Yi; LIU, Yun; ZHU, Ping. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 99, p. 31–38, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.08.048. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.048>.

DHIMAN, Harpreet K.; RAY, Alok R.; PANDA, Amulya K. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. **Biomaterials**, [S. l.], v. 26, n. 9, p. 979–986, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.012.

EL-ASSAR, M. R.; EL-FAWAL, G. F.; EL-DEEB, Nehal M.; HASSAN, H. Shokry; MO, Xiumei. Electrospun Polyvinyl Alcohol / Pluronic F127 Blended Nanofibers Containing Titanium Dioxide for Antibacterial Wound Dressing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 178, p. 1488–1502, 2015. DOI: 10.1007/s12010-015-1962-y.

FOMBY, Paula et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and diseases: Conference report. **Annals of the American Thoracic Society**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 181–204, 2010. DOI: 10.1002/term. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2010.06.007>.

GARCIA, Lana Glerieide Silva et al. Antifungal activity of different molecular weight chitosans against planktonic cells and biofilm of *Sporothrix brasiliensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 143, p. 341–348, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.031. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.031>.

GHOSAL, Kajal; AGATEMOR, Christian; ZDENKO, Š.; THOMAS, Sabu; KNY, Erich. Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-

titanium dioxide nanocomposites. *[S. I.]*, v. 358, n. September 2018, p. 1262–1278, 2019. a. DOI: 10.1016/j.cej.2018.10.117.

GHOSAL, Kajal; AGATEMOR, Christian; ZDENKO, Š.; THOMAS, Sabu; KNY, Erich. Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposites. **Chemical Engineering Journal**, *[S. I.]*, v. 358, n. September 2018, p. 1262–1278, 2019. b. DOI: 10.1016/j.cej.2018.10.117.

GONÇALVES, Idalina; NUNES, Cláudia; MENDES, Sónia; MARTINS, Lígia O.; FERREIRA, Paula; COIMBRA, Manuel A. CotA laccase-ABTS/hydrogen peroxide system: An efficient approach to produce active and decolorized chitosan-genipin films. **Carbohydrate Polymers**, *[S. I.]*, v. 175, p. 628–635, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.08.029.

HAN, Fei; DONG, Yang; SU, Zhen; YIN, Ran; SONG, Aihua; LI, Sanming. Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. **International Journal of Pharmaceutics**, *[S. I.]*, v. 476, n. 1, p. 124–133, 2014. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.036. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.036>.

HAN, Jing; ZHOU, Ziyou; YIN, Ruixue; YANG, Dongzhi; NIE, Jun. Alginate – chitosan / hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds : Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, *[S. I.]*, v. 46, p. 199–205, 2010. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2009.11.004.

HOSSEINI-ASHTIANI, Nafiseh; TADJARODI, Azadeh; ZARE-DORABEI, Rouholah. Low molecular weight chitosan-cyanocobalamin nanoparticles for controlled delivery of ciprofloxacin: Preparation and evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, *[S. I.]*, v. 176, p. 459–467, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.093.

HUGLIN, Malcolm B.; LIU, Yan; VELADA, José L. Thermoreversible swelling behaviour of hydrogels based on N-isopropylacrylamide with acidic comonomers.

**Polymer**, [S. l.], v. 38, n. 23, p. 5785–5791, 1997. DOI: 10.1016/S0032-3861(97)00135-3.

INTINI, Claudio et al. 3D-printed chitosan-based scaffolds : An in vitro study of human skin cell growth and an in-vivo wound healing evaluation in experimental diabetes in rats. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 199, n. April, p. 593–602, 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.07.057. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.057>.

J. S. CRUSCA, A. C. B. OLIVEIRA, J. R. PERUSSI, Et al. **Avaliação Citotóxica De Esponja De Colágeno E Quitosana**. [s.l: s.n.]

JONES, Julian R.; POOLOGASUNDARAMPILLAI, Gowsihan; ATWOOD, Robert C.; BERNARD, Dominique; LEE, Peter D. Non-destructive quantitative 3D analysis for the optimisation of tissue scaffolds. **Biomaterials**, [S. l.], v. 28, n. 7, p. 1404–1413, 2007. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.014.

KIDOAKI, Satoru; KWON, Il Kuen; MATSUDA, Takehisa. Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. **Biomaterials**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 37–46, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.063.

KIEVIT, Forrest M.; FLORCZYK, Stephen J.; LEUNG, Matthew C.; VEISEH, Omid; PARK, James O.; DISIS, Mary L.; ZHANG, Miqin. Biomaterials Chitosan e alginate 3D scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment. **Biomaterials**, [S. l.], v. 31, n. 22, p. 5903–5910, 2010. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.062. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.062>.

KIM, Hye-Lee; JUNG, Gil-Yong; YOON, Jun-Ho; HAN, Jung-Suk; PARK, Yoon-Jeong; KIM, Do-Gyoon; ZHANG, Miqin; KIM, Dae-Joon. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, [S. l.], v. 54, p. 20–25, 2015. DOI: 10.1016/j.msec.2015.04.033. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092849311530031X>.

KONG, Lijun; GAO, Yuan; LU, Guangyuan; GONG, Yandao; ZHAO, Nanming; ZHANG, Xiufang. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **European Polymer Journal**, [S. l.], v. 42, n. 12, p. 3171–3179, 2006. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2006.08.009.

KRUSE, Carla R.; SAKTHIVEL, Dharaniya; SINHA, Indranil; HELM, Douglas; SØRENSEN, Jens A.; ERIKSSON, Elof; NUUTILA, Kristo. Evaluation of the efficacy of cell and micrograft transplantation for full-thickness wound healing. **Journal of Surgical Research**, [S. l.], v. 227, p. 35–43, 2018. DOI: 10.1016/j.jss.2018.02.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.02.004>.

KUBOKI, Y.; TAKITA, H.; KOBAYASHI, D.; TSURUGA, E.; INOUE, M.; MURATA, M.; NAGAI, N.; DOHI, Y.; OHGUSHI, H. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis. **Journal of Biomedical Materials Research**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 190–199, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199802)39:2<190::AID-JBM4>3.0.CO;2-K.

KUMAR, Sandeep; DWEVEDI, Alka; KAYASTHA, Arvind M. Immobilization of soybean (*Glycine max*) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 58, n. 1–4, p. 138–145, 2009. DOI: 10.1016/j.molcatb.2008.12.006.

LI, Zhensheng; RAMAY, Hassna R.; HAUCH, Kip D.; XIAO, Demin; ZHANG, Miqin. Chitosan – alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. [S. l.], v. 26, p. 3919–3928, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.062.

LIU, Zonghua; JIAO, Yanpeng; WANG, Yifei; ZHOU, Changren; ZHANG, Ziyong. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 60, n. 15, p. 1650–1662, 2008. DOI: 10.1016/j.addr.2008.09.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.001>.

LU, Min; LIU, Yi; HUANG, Yung Chi; HUANG, Chun Jen; TSAI, Wei Bor. Fabrication

of photo-crosslinkable glycol chitosan hydrogel as a tissue adhesive. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 181, n. August, p. 668–674, 2018. DOI:

10.1016/j.carbpol.2017.11.097. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.097>.

MAHMOUDZADEH, Aziz; MOHAMMADPOUR, Hemn. Tumor cell culture on collagen–chitosan scaffolds as three-dimensional tumor model: A suitable model for tumor studies. **Journal of Food and Drug Analysis**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 620–626, 2016. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.02.008. Disponível em:

10.1016/j.jfda.2016.02.008. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2016.02.008>.

MAO, Shirui; SHUAI, Xintao; UNGER, Florian; SIMON, Michael; BI, Dianzhou; KISSEL, Thomas. The depolymerization of chitosan: Effects on physicochemical and biological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 281, n. 1–2, p. 45–54, 2004. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.05.019.

MCBANE, Joanne E.; CAI, Kuihua; LABOW, Rosalind S.; SANTERRE, J. Paul. Co-culturing monocytes with smooth muscle cells improves cell distribution within a degradable polyurethane scaffold and reduces inflammatory cytokines. **Acta Biomaterialia**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 488–501, 2012. DOI:

10.1016/j.actbio.2011.09.018. Disponível em:

10.1016/j.actbio.2011.09.018. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.018>.

OLAD, Ali; FARSHI AZHAR, Fahimeh. The synergetic effect of bioactive ceramic and nanoclay on the properties of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite–montmorillonite scaffold for bone tissue engineering. **Ceramics International**, [S. l.], v. 40, n. 7, p. 10061–10072, 2014. DOI: 10.1016/j.ceramint.2014.04.010. Disponível em:

10.1016/j.ceramint.2014.04.010. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884214005380>.

OTSUKI, Bungo; TAKEMOTO, Mitsuru; FUJIBAYASHI, Shunsuke; NEO, Masashi; KOKUBO, Tadashi; NAKAMURA, Takashi. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: Three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. **Biomaterials**, [S. l.], v. 27, n. 35, p. 5892–5900, 2006. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.013.

PATEL, Zarana S.; YOUNG, Simon; TABATA, Yasuhiko; JANSEN, John A.; WONG, Mark E. K.; MIKOS, Antonios G. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. **Bone**, [S. l.], v. 43, n. 5, p. 931–940, 2008. DOI: 10.1016/j.bone.2008.06.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2008.06.019>.

PAYNE, Rachael M.; QUIROGA, Luis; COONEY, Carisa M.; CAFFREY, Julie A. Use of Vascular Clips to Approximate Skin Grafts on the Burned Hand Department of Plastic and Reconstructive Surgery , Johns Hopkins Hospital , 601 North Caroline  
Corresponding Author : United States of America. **Burns Open**, [S. l.], n. November, 2017. DOI: 10.1016/j.burnso.2017.11.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.burnso.2017.11.005>.

PICCHIO, Matías L.; LINCK, Yamila Garro; MONTI, Gustavo A.; GUGLIOTTA, Luis M.; MINARI, Roque J.; ALVAREZ IGARZABAL, Cecilia I. Casein films crosslinked by tannic acid for food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 84, p. 424–434, 2018. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.06.028.

PROSAPIO, Valentina; NORTON, Ian; MARCO, Iolanda De. 6093 words  
Optimization of freeze-drying using a Life Cycle Assessment approach : strawberries ' case study. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.09.125.

RAMAY, Hassna Rehman; ZHANG, Miqin. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods. **Biomaterials**, [S. l.], v. 24, n. 19, p. 3293–3302, 2003. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00171-6.

RATNER, BD. Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine. 2nd Edition. Academic Press. *In*: [s.l.: s.n.].

RUJITANAROJ, Pim-on; PIMPHA, Nuttaporn; SUPAPHOL, Pitt. Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun gelatin fiber mats containing silver nanoparticles. [S. l.], v. 49, p. 4723–4732, 2008. DOI:

10.1016/j.polymer.2008.08.021.

SAJESH, K. M.; JAYAKUMAR, R.; NAIR, Shantikumar V.; CHENNAZHI, K. P.  
Biocompatible conducting chitosan/polypyrrole-alginate composite scaffold for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 62, p. 465–471, 2013. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.09.028. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.028>.

SANTOS, Abraão Italo Lima Dos; JOSÉ ALBUQUERQUE SILVA, Yuri; MARIA LAPA MONTENEGRO, Lílian; VALÉRIA DA SILVA AMORIM, Rosa; VALÉRIA AMORIM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA, Rosa.  
DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN-ALGINATE  
SCAFFOLD AS POTENTIAL FOR WOUND HEALING \*Corresponding Author.  
**WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES SJIF  
Impact Factor**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 74–86, 2019. DOI: 10.20959/wjpps201911-14947. Disponível em: [www.wjpps.com](http://www.wjpps.com).

SHAMEKHI, Mohammad Amin; RABIEE, Ahmad; MIRZADEH, Hamid; MAHDAVI, Hamid; MOHEBBI-KALHORI, Davod; ESLAMINEJAD, Baghaban. Fabrication and characterization of hydrothermal cross-linked chitosan porous scaffolds for cartilage tissue engineering applications. **Materials Science & Engineering C**, [S. l.], v. 80, p. 532–542, 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.194. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.194>.

SIMON, Eric. NIH PHASE I FINAL REPORT : FIBROUS SUBSTRATES FOR CELL CULTURE. [S. l.], n. May 1988, 2017.

SOPPIMATH, Kumaresh S.; AMINABHAVI, Tejraj M.; KULKARNI, Anandrao R.  
Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. [S. l.], v. 70, p. 1–20, 2001.

SORIANO-RUIZ, José L.; GÁLVEZ-MARTÍN, Patricia; LÓPEZ-RUIZ, Elena; SUÑER-CARBÓ, Joaquim. Design and evaluation of mesenchymal stem cells seeded chitosan / glycosaminoglycans quaternary hydrogel scaffolds for wound healing

applications. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 570, n. August, p. 118632, 2019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118632. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118632>.

THEIN-HAN, W. W.; MISRA, R. D. K. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 1182–1197, 2009. DOI: 10.1016/j.actbio.2008.11.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2008.11.025>.

ULLAH, S.; ZAINOL, I.; IDRUS, R. H. Incorporation of zinc oxide nanoparticles into chitosan-collagen 3D porous scaffolds: Effect on morphology, mechanical properties and cytocompatibility of 3D porous scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 104, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.080.

WAN, Yuqing; YANG, Jian; YANG, Junlin; BEI, Jianzhong; WANG, Shenguo. Cell adhesion on gaseous plasma modified poly-(L-lactide) surface under shear stress field. **Biomaterials**, [S. l.], v. 24, n. 21, p. 3757–3764, 2003. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00251-5.

XU, Kailei; GANAPATHY, Kavya; ANDL, Thomas; WANG, Zi; COPLAND, John A.; CHAKRABARTI, Ratna; FLORCZYK, Stephen J. Biomaterials 3D porous chitosan-alginate scaffold stiffness promotes differential responses in prostate cancer cell lines. [S. l.], v. 217, n. April, 2019. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119311.

YANG, Bing et al. Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 80, n. 3, p. 860–865, 2010. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.12.044. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.044>.

ZHOU, Yingshan; ZHANG, Can; LIANG, Kaili; LI, Jun; YANG, Hongjun; LIU, Xin; YIN, Xianze; CHEN, Dongzhi; XU, Weilin. Photopolymerized Water-soluble Maleilated Chitosan/Methacrylated Poly (vinyl alcohol) Hydrogels as Potential Tissue Engineering Scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], p. 2–8, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.002. Disponível em:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017321700>.

PATEL, A.; MEQUANINT, K. Synthesis and characterization of polyurethane-blockpoly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels and their surface modification to promote cell affinity. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 26, p. 114, 2011.