UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TÊXTIL E MODA

DANIELA CAMARGO FURUYA

Desenvolvimento e caracterização de *scaffolds* à base de fibras de alginato e quitosana para aplicações médicas

São Paulo

2015

DANIELA CAMARGO FURUYA

Desenvolvimento e caracterização de *scaffolds* à base de fibras de alginato e quitosana para aplicações médicas

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Escola de Artes Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Têxtil e Moda
Área de Concentração: Materiais e Processos Têxteis.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Sirlene Maria da Costa

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO
(Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades. Biblioteca)

Furuya, Daniela Camargo
Desenvolvimento e caracterização de *scaffolds* à base de fibras de alginato e quitosana para aplicações médicas / Daniela Camargo Furuya ; orientadora, Sirlene Maria da Costa. – São Paulo, 2015
106 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Têxtil e Moda, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo
Versão corrigida

1. Tecnologia têxtil. 2. Tecidos (Indústria têxtil). 3. Fibras têxteis. 4. Alginatos. 5. Quitosana. 6. *Scaffolds*. I. Costa, Sirlene Maria da, orient. II. Título.

CDD 22.ed. – 677

Nome: FURUYA, Daniela Camargo

Título: Desenvolvimento e caracterização de *scaffolds* à base de fibras de alginato e quitosana para aplicações médicas

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em: 14/08/2015.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a oportunidade de vivenciar tudo isso até hoje;

À Profa. Dra. Sirlene Maria da Costa pela excelente orientação e dedicação durante este estudo e todos aqueles que tivemos a oportunidade de trabalhar juntas. E por todo o conhecimento e sabedoria passados durante esses anos;

À Profa. Dra. Silgia Aparecida da Costa por todo o conhecimento passado com tanto carinho em todo o período que trabalhamos juntas e pela colaboração fundamental neste estudo;

Aos Prof. Dr. Rodrigo Cardoso, do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, do Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade de São Paulo, pelo aprendizado e realização do ensaio de viabilidade celular;

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior, do Departamento de Ciências Farmacêuticas FCF/USP, pela cooperação e utilização do laboratório no processo de liofilização;

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz, do Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia da FCF/USP pela Calorimetria Exploratória Diferencial e Termogravimetria;

À Profa. Dra. Júlia Barúque Ramos, da Escola de Artes, Ciências e Humanidades, pelos ensaios mecânicos e microscopia óptica;

À Sheila Schuindt do Carmo, do Laboratório de Caracterização Tecnológica LCT do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, pela Microscopia eletrônica de varredura realizada;

À CAPES pelo suporte financeiro;

Aos meus pais, por todo o amor e apoio durante a minha vida. E pelo exemplo maravilhoso que me foi proporcionado diariamente e a quem tenho maior admiração;

Ao meu irmão, por ser uma grande fonte de inspiração e à minha avó, pela presença essencial na minha vida;

Aos meus colegas e técnicos do laboratório, pela constante ajuda quando necessário. E especialmente ao técnico Ervin Sriubas Jr., pela amizade gerada nesses anos no laboratório;

Aos meus amigos pelo apoio incondicional e por estarem sempre presentes.

RESUMO

FURUYA, D.C. **Desenvolvimento e caracterização de *scaffolds* à base de fibras de alginato e quitosana para aplicações médicas**. 2015. 106 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, 2015.

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de *scaffolds* à base de fibras têxteis de alginato, quitosana e híbridas sem e com glicerol para aplicação em engenharia de tecido ósseo. As fibras foram produzidas e utilizadas para o desenvolvimento dos *scaffolds* e caracterizadas quanto ao título, tenacidade, alongamento e tração. Para a produção dos *scaffolds* foram testadas quatro metodologias de secagem: à temperatura ambiente, à 25ºC, à 45ºC e por congelamento em *ultrafreezer* e liofilização. A metodologia de congelamento em *ultrafreezer* e liofilização apresentou estruturas mais regulares e foi a selecionada para reprodução dos *scaffolds*. Os *scaffolds* foram produzidos com fibras de alginato, quitosana e híbridas sem e com glicerol e caracterizados por: microscopia óptica e eletrônica de varredura, viabilidade celular, DSC/TG, absorção de água e perda de massa, estudo de biomineralização e biodegradação. Os resultados obtidos com o teste de tração das fibras mostraram que as fibras híbridas apresentaram um valor de tenacidade 27,3% maior que as de alginato e 55,2% que de quitosana, indicando que a interação entre os polímeros melhorou a tenacidade. Os ensaios de viabilidade celular realizados tanto com MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) quanto com cristal violeta mostraram que todos os *scaffolds* não apresentaram toxicidade, e que nos *scaffolds* de quitosana sem e com glicerol pode ter ocorrido proliferação celular. Com relação aos ensaios de DSC/TG, os resultados mostraram que nos *scaffolds* híbridos houve indícios de interação entre os polímeros alginato e quitosana, devido ao deslocamento dos picos endotérmicos e exotérmicos dos híbridos em relação aos de alginato e quitosana, como observado na DSC/TG. Quanto à capacidade de absorção de água e perda de massa os resultados indicaram a possibilidade do glicerol ter funcionado como um estabilizante, pois os *scaffolds* que o continham em suas estruturas apresentaram maior percentual de absorção de água e menor perda de massa comparados aos que não o continham. No estudo de biomineralização foi detectada presença de hidroxiapatita desde o terceiro dia nos *scaffolds* de quitosana sem e com glicerol e híbrido sem glicerol. No estudo de biodegradação foi observado um aumento gradual de degradação até o sétimo dia, em que ocorreu um pico de degradação dos *scaffolds*, seguido por uma estabilidade no décimo dia. Por meio das microscopias realizadas pôde ser observado o ataque da enzima nas estruturas das fibras, também comprovado pelo resultado de concentração dos açúcares redutores. Comparando os *scaffolds* sem e com glicerol, a presença do glicerol pode ter influenciado na estabilidade das estruturas dos *scaffolds*. Levando em consideração todos os resultados, pode-se concluir que o *scaffold* híbrido apresentou bons resultados mecânicos e biológicos, indicando que a mistura dos dois polímeros pode ser considerada um avanço no desenvolvimento do biomaterial.

Palavras-chave: Fibras têxteis. *Scaffolds*. Alginato. Quitosana. Regeneração óssea.

ABSTRACT

FURUYA, D.C. **Development and characterization of *scaffolds* based on alginate, chitosan and hybrid fibers for medical applications**. 2015. 104 f. Dissertation (Master of Science) - Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

This study aimed the development and characterization of *scaffolds* based on alginate, chitosan and hybrids textile fibers with and without glycerol for bone tissue engineering. The fibers were produced and used for the development of *scaffolds* and characterized as the title, tenacity, elongation and traction. For the production of *scaffolds* four drying methodologies were tested: at room temperature, at 25ºC, at 45ºC and freeze-drying. The freeze-drying method. The results of freeze-drying method showed more regular structures and this methodology was selected to reproduce the *scaffolds*. The *scaffolds* were produced with alginate, chitosan and hybrids fibers with and without glycerol and characterized by: optical and scanning electron microscopy, cell viability, DSC/TG, water absorption and weight loss, biomineralization study and biodegradation. The results obtained with the fibers of the tensile test showed that the hybrid fibers presented better toughness values, comparing to polymers alginate and chitosan: 27.3% higher that alginate and 55.2% that of chitosan, indicating that the interaction between the polymers improved toughness. Cell viability assays performed with MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyl-tetrazolium) and crystal violet showed that all *scaffolds* showed no toxicity, and that in *scaffolds* of chitosan with and without glycerol may have occurred cell proliferation. The results of DSC/TG tests showed that the hybrid *scaffolds* presented evidence of interaction between chitosan and alginate polymers, due to the displacement of the endothermic and exothermic peaks of the hybrid in relation to alginate and chitosan, as observed in the DSC/TG. Regarding water absorption capacity, and weight loss results indicate the possibility of glycerol have worked as a stabilizer, because the *scaffolds* that contain it in their structures showed a higher percentage of low water absorption and less percentage of weight loss compared to those not contained. In biomineralization study was detected the presence of hydroxyapatite from the third day on *scaffolds* of chitosan with and without glycerol and hybrid without glycerol. It was observed in the study of biodegradation a gradual increase of degradation up to the seventh day that there was a peak of degradation of the *scaffolds*, followed by stability in the tenth day. Through microscopy performed could be observed the enzyme attack on the fiber structures also proved by the result of concentration of reducing sugars. Comparing the *scaffolds* with and without glycerol, the glycerol presence may have influenced the stability of the structures of *scaffolds*. Considering all the results, it can be concluded that the hybrid scaffold exhibited good mechanical and biological results, indicating that mixing of the two polymers can be considered an advance in the development of biomaterial.

Keywords: Textile fibers. *Scaffolds*. Alginate. Chitosan. Bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma fibras têxteis 17
Figura 2 - Estrutura química do alginato 35
Figura 3 - Estrutura química da quitosana 40
Figura 4 - Estrutura da glucosamina, monômero da quitosana. 41
Figura 5 - Esquema de solubilidade da quitosana de acordo com os pHs 41
Figura 6 - Metodologia de secagem à temperatura ambiente: *scaffold* à base de alginato (a); *scaffold* híbrido (b); *scaffold* à base de quitosana (c) em molde de 15 mm de profundidade 67
Figura 7 - Metodologia de secagem à 25ºC: *scaffold* à base de alginato (a); *scaffold* híbrido (b); *scaffold* à base de quitosana (c) em molde de 15 mm de profundidade 68
Figura 8 - Metodologia de secagem à 45ºC: *scaffold* à base de alginato (a); *scaffold* híbrido (b); *scaffold* à base de quitosana (c) em molde de 15 mm de profundidade 69
Figura 9 - Metodologia de congelamento em *ultrafreezer* e liofilização: *scaffold* à base de alginato (a); *scaffold* híbrido (b); *scaffold* à base de quitosana (c) em molde de 15 mm de profundidade 69
Figura 10 –*Scaffolds* de alginato sem glicerol (a), alginato com glicerol (b), híbrido sem glicerol (c), híbrido com glicerol (d), quitosana sem glicerol (e) e quitosana com glicerol (f) em foto digital e Microscopia óptica com ampliação de 20x produzidos em molde de 15 mm de profundidade..... 71
Figura 11 - Microscopia óptica com ampliação de 20x dos *scaffolds* de alginato sem glicerol (a), alginato com glicerol (b), híbrido sem glicerol (c), híbrido com glicerol (d), quitosana sem glicerol (e) e quitosana com glicerol (f) em molde de 6,4 mm de profundidade 71
Figura 12 - MEV dos *scaffolds* sem glicerol de alginato (a), híbrido (b) e quitosana (c) e EDS (a^I-c^I) no terceiro dia de ensaio de biomineralização 89
Figura 13 - MEV dos *scaffolds* com glicerol de alginato (a), híbrido (b) e quitosana (c) e EDS (a^I-c^I) no terceiro dia de ensaio de biomineralização 90
Figura 14 - MEV dos *scaffolds* híbrido sem glicerol (a) e híbrido com glicerol (b) no sétimo dia e dos *scaffolds* de quitosana sem glicerol (c) e quitosana com glicerol (d) no décimo quinto dia de ensaio de biomineralização..... 91
Figura 15 - MEV dos *scaffolds* híbrido sem glicerol (a), híbrido com glicerol (b), quitosana sem glicerol (c) e quitosana com glicerol (d) no sétimo dia de ensaio de degradação 93
Figura 16 - MEV *scaffolds* de quitosana sem glicerol (a), quitosana com glicerol (b), híbrido sem glicerol (c) e híbrido com glicerol (d) no décimo dia de ensaio de degradação 94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Valores das propriedades mecânicas materiais de tecidos duros 23
Quadro 2 - Produtos aprovados em regeneração óssea 27
Quadro 3 - Solubilidade dos alginatos em diferentes solventes 38
Quadro 4 - Concentrações de lisozima encontradas no corpo humano 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados do setor no Brasil referente a 2013 20
Tabela 2 - Metodologias de secagem dos *scaffolds* 57
Tabela 3 - Divisão dos grupos experimentais 59
Tabela 4 - Composição da solução PBS..... 62
Tabela 5 - Composição da solução simulada de fluidos corporais - SBF 63
Tabela 6 - Valores das propriedades mecânicas das fibras, com desvio-padrão..... 66
Tabela 7 - Valores de temperatura, entalpia e picos dos polímeros alginato e quitosana e dos *scaffolds* sem e com glicerol 75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem de crescimento no Brasil de 2006 a 2013..... 20
Gráfico 2 - Número de publicações relativas ao uso de alginato para engenharia de tecido ósseo 39
Gráfico 3 - Processo regenerativo ósseo relativo ao tempo 49
Gráfico 4 - Curva padrão de glicose para determinação da concentração de açúcares redutores..... 65
Gráfico 5 - Análise da redução do MTT de células NIH3T3 tratadas com meio condicionado com *scaffolds*; além dos controles positivo e negativo, nos períodos de 24 e 48 horas *= p<0,05..... 73
Gráfico 6 - Análise da incorporação do cristal violeta de células NIH3T3 tratadas com meio condicionado com *scaffolds*; além dos controles positivo e negativo, nos períodos de 24 e 48 horas *= p<0,05..... 74
Gráfico 7 - Curvas de DSC dos polímeros alginato e quitosana..... 75
Gráfico 8 - Curvas de DSC dos *scaffolds* sem glicerol de alginato, quitosana e híbrido 76
Gráfico 9 - Curvas de DSC dos *scaffolds* com glicerol de alginato, quitosana e híbrido 76
Gráfico 10 - Curvas de DSC dos *scaffolds* de alginato com e sem glicerol 77
Gráfico 11 - Curvas de DSC dos *scaffolds* de quitosana com e sem glicerol 77
Gráfico 12 - Curvas de DSC dos *scaffolds* híbridos com e sem glicerol..... 78
Gráfico 13 - TG do polímero alginato 79
Gráfico 14 - TG do polímero quitosana 79
Gráfico 15 - TG e DTG do *scaffold* de alginato sem glicerol..... 80
Gráfico 16 - TG e DTG do *scaffold* alginato com glicerol..... 80
Gráfico 17 - TG e DTG do *scaffold* quitosana sem glicerol..... 81
Gráfico 18 - TG e DTG do *scaffold* quitosana com glicerol..... 81
Gráfico 19 - TG e DTG do *scaffold* híbrido sem glicerol 82
Gráfico 20 - TG e DTG do *scaffold* híbrido com glicerol 82
Gráfico 21 - Curvas de TG dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido sem glicerol 83
Gráfico 22 - Curvas de TG dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido com glicerol 83
Gráfico 23 - Capacidade de absorção *scaffolds* quitosana sem glicerol em solução de PBS e em água 84

Gráfico 24 - Perda de massa *scaffolds* de quitosana sem glicerol em solução de PBS e em água 85
Gráfico 25 - Capacidade de absorção de água dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido sem glicerol 85
Gráfico 26 - Capacidade de absorção de água dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido com glicerol 86
Gráfico 27 - Perda de massa dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido sem glicerol 87
Gráfico 28 - Perda de massa dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido com glicerol 87
Gráfico 29 - pHs dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido sem e com glicerol ao longo de 30 dias em contato com a solução de SBF 92
Gráfico 30 - Concentração de açúcares redutores dos *scaffolds* de quitosana e híbridos sem e com glicerol 95

LISTA DE ABREVIAÇÕES, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

3DP : *Three-Dimensional Printing*
ABDI : Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial
ABINT : Associação Brasileira da Indústria de Nãotecidos e Têxteis Técnicos
ASTM : *American Society for Testing and Material*
BMP-2 : *Bone morphogenetic protein* 2, Proteína morfogenética 2
BMP-7 : *Bone morphogenetic protein* 7, Proteína morfogenética 7
CGEE : Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
cGMP : *Current Good Manufacturing Practices*
CNPq : Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CSD : *Critical Size Defects*
DBM : *Demineralized bone matrix*
DMA : Dimetil amina
DMEM : *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DMF : Dimetilformamida
DMSO : Dimetilsulfóxido
DNS : *3,5-Dinitrosalicylic acid*
DSC : *Differential Scanning Calorimetry,* Calorimetria Exploratória Diferencial
ECM : *Extracellular matrix,* matruz extracelular
EDS : Espectroscopia de energia dispersive
EDTA : Ácido etilenodiamino tetra-acético
EG : Etilenoglicol
FFFB : *Function-focus fibrous product*
FTIR : Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GPa : Giga pascal
HA : Hidroxiapatita
HEMA : Hidroximetilmetacrilato
IPT : Instituto de Pesquisas Tecnológicas
ISO : *International Organization for Standardization*
MEV : Microscopia Eletrônica de Varredura
MPa : Megapascal
MTT : Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

NBR	: Norma Brasileira
PBS	: *Phosphate buffer solution*
PD&I	: Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
PGA	: Ácido poliglicólico
PLA	: Ácido polilático
PMMA	: Polimetilacrilato
SBF	: *Simulated body fluids*
SFB	: Soro fetal bovino
TBA	: Tetrabutilamônio
TBAF	: Fluoreto de tetrabutilamônio
TCP	: Fosfato tricálcico
TG	: Termogravimetria
TPP®	: *Techno Plastic Products*
UHMW	: *Ultra high molecular weight polyethylene*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
2 OBJETIVOS 16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
3.1 Fibras 17
3.2 Têxteis técnicos 18
3.2.1 Têxteis médicos 21
3.2.1.1 Têxteis implantáveis 21
3.3 Engenharia de tecidos 24
3.3.1 Engenharia de tecido ósseo 25
3.4 *Scaffolds* 28
3.4.1 Parâmetros a serem analisados em um *scaffold* 30
3.4.2 Métodos de produção de *scaffolds* 31
3.4.3 Utilização de fibras para desenvolvimento de *scaffolds* 32
3.5 Biomateriais 33
3.6 Alginato 34
3.6.1 Estrutura do alginato 34
3.6.2 Aplicações do alginato 35
3.6.3 Propriedades do alginato 37
3.6.4 Utilização de alginato em engenharia de tecidos 38
3.7 Quitosana 39
3.7.1 Estrutura da quitosana 40
3.7.2 Aplicações da quitosana 42
3.7.3 Propriedades da quitosana 43
3.7.4 *Scaffolds* de quitosana 45
3.8 *Scaffolds* de alginato e quitosana 45
3.9 Glicerol 46
3.10 Tecido ósseo 47
3.10.1 Regeneração óssea 48
3.11 Lisozima 50
3.12 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC 51
3.13 Termogravimetria – TG 52
3.14 Ensaio de absorção de água e perda de massa 53
4 MATERIAIS E MÉTODOS 54
4.1 Materiais 54
4.2 Preparo das fibras 54
4.2.1 Fibras de alginato com solução de NaOH sem e com glicerol 54
4.2.2 Fibras de quitosana sem e com glicerol 54
4.2.3 Fibras híbridas sem e com glicerol 55
4.3 Ensaios mecânicos 55
4.3.1 Determinações do título das fibras 55
4.3.2 Ensaio da carga de ruptura das fibras 56
4.3.3 Tenacidade das fibras 56
4.4 Preparo dos *scaffolds* 57
4.4.1 *Scaffolds* produzidos à partir das fibras de alginato, quitosana e híbridas 57
4.5 Microscopia óptica 58

4.6 Cultura de células 58
4.6.1 Cultivo e expansão dos fibroblastos (NIH3T3) 58
4.6.2 Preparo dos grupos experimentais 58
4.6.3 Análise da viabilidade celular 59
4.6.3.1 Plaqueamento celular 59
4.6.4 Redução do MTT 59
4.6.5 Cristal Violeta 60
4.6.6 Análise dos resultados dos ensaios de viabilidade celular 60
4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Análises por Dispersão de Energia (EDS) 61
4.8 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC e Termogravimetria – TGA 61
4.9 Ensaios de absorção e perda de massa 61
4.9.1 Ensaio de absorção e perda de massa em solução de PBS 61
4.9.2 Ensaio de absorção e perda de massa em água 62
4.9.3 Análise dos dados de absorção e perda de massa 62
4.10 Estudo de biomineralização 63
4.11 Estudo de degradação da quitosana em solução PBS contendo lisozima 64
4.11.1 Determinação dos açúcares redutores pelo método DNS 64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 66
5.1 Tenacidade das fibras 66
5.2 Preparo dos *scaffolds* 67
5.3 Estudo de viabilidade celular 72
5.3.1 Redução do MTT 72
5.3.2. Cristal Violeta 73
5.4 Calorimetria Exploratória Diferencial 74
5.5 Termogravimetria 78
5.6 Ensaio de absorção e perda de massa em solução de PBS e em água 83
5.7 Ensaio de biomineralização 88
5.8 Ensaio de degradação com lisozima 92
5.8.1 Concentração de açúcares redutores 94
5.8.3 Absorção de água e perda de massa no ensaio de degradação 96
6 CONCLUSÕES 98
7 SUGESTÕES DE DESENVOLVIMENTOS FUTUROS 99
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 99

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida está relacionado com a ocorrência de problemas ósseos, principalmente aqueles que necessitam de procedimentos complexos, como a implantação de enxertos. Entretanto, esse procedimento possui alguns problemas, como a falta de tecidos suficientes para todos os pacientes, problemas de contaminação e até maior tempo de recuperação. Para tal, a engenharia de tecidos busca alternativas para essas questões (BOSE et al., 2012; VACANTI; VACANTI, 2014). No Brasil, em 2008, a expectativa de vida correspondia a 73 anos. Estima-se que no ano de 2020 existirão mais de 30 milhões brasileiros com mais de 60 anos. Portanto é de grande relevância o desenvolvimento de estudos de novos materiais na área da saúde, especialmente aqueles voltados à engenharia de tecidos, ou medicina regenerativa (CGEE, 2010).

A engenharia de tecidos visa o desenvolvimento de materiais para servirem como substitutos dos tecidos que auxiliem no processo regenerativo. O *scaffold*, ou pela tradução, arcabouço, possui um papel fundamental na regeneração de tecidos, pois fornece um suporte para as células durante a formação tecidual e garante estrutural e morfologicamente uma direção para o processo regenerativo. O objetivo principal do *scaffold* é permitir que o organismo reconheça a matriz artificial introduzida para regenerar o tecido necessário. Portanto, uma maneira de projetar *scaffolds* é a partir da imitação das matrizes extracelulares naturais (VACANTI; VACANTI, 2014).

A engenharia de tecidos e a engenharia têxtil estão se aproximando cada vez mais, em busca de soluções para questões biomédicas. A utilização de fibras é de grande interesse, devido às suas propriedades, como leveza, porosidade e um módulo elástico melhor ajustável que um material metálico. Existem no mercado alguns produtos têxteis para aplicações biomédicas, como o enxerto para vasos sanguíneos (Gore-tex®), estruturas de suporte de malha para cirurgias cardíacas (Acorn CorCap™), etc. (DOSER; PLANCK, 2011; AYAZ et al., 2014). A escolha por polímeros naturais para o desenvolvimento desses materiais possui vantagens em relação aos sintéticos, principalmente pela minimização de riscos de rejeição do organismo e adesão celular mais garantida (HEINEMANN et al., 2008).

Portanto no presente estudo foram utilizados dois polímeros naturais para o desenvolvimento de *scaffolds* à base de fibras para engenharia de tecidos ósseos. A escolha dos polímeros alginato e quitosana se deu pelas propriedades

biocompatíveis e biodegradáveis que ambos possuem e pela forte interação proporcionada pela combinação dos dois. Isso ocorre devido à ligação das cargas negativas do alginato com as cargas positivas da quitosana, criando um complexo eletrolítico, melhorando a resistência mecânica das estruturas (HU; YU, 2013; SIMSEK-EGE et al., 2003). Foi adicionado glicerol às estruturas, com o propósito de estudar a utilização de um plastificante para melhorar a tenacidade das fibras e funcionar como estabilizante das mesmas (BRADBURY; JAKOBY, 1972; VAGENENDE et al., 2009). Em termos de pesquisa, outros estudos (IWASAKI et al., 2004; SHAO; HUNTER, 2007) já utilizaram a combinação entre alginato e quitosana, mas para aplicação em engenharia tecidual de cartilagem. Entretanto, foi escolhido como escopo deste trabalho a engenharia de tecidos ósseos, devido à capacidade da quitosana em gerar hidroxiapatita em contato com fluido corporal simulado (SBF), ou também chamado de plasma humano sintético. Essa formação de hidroxiapatita é de grande interesse, por ser o componente inorgânico de maior abundância encontrado no osso.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi produzir e caracterizar *scaffolds* à base de fibras têxteis obtidas a partir de alginato, quitosana e híbridas sem e com glicerol visando aplicação em engenharia de tecido ósseo.

Para atingir o objetivo principal, foram propostas as seguintes etapas:

- Obter as fibras de alginato, quitosana e híbridas alginato e quitosana com e sem adição de glicerol;
- Estudar as propriedades físicas das fibras;
- Preparar os *scaffolds* em moldes pré-determinados*;*
- Estudar a viabilidade celular dos *scaffolds;*
- Estudar a estabilidade térmica;
- Avaliar microestruturas, porosidades e degradação, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Estudar a capacidade de absorção de água e perda de massa;
- Estudar a biomineralização dos *scaffolds* e capacidade de formação de hidroxiapatita e
- Estudar a degradação de quitosana pela enzima lisozima.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

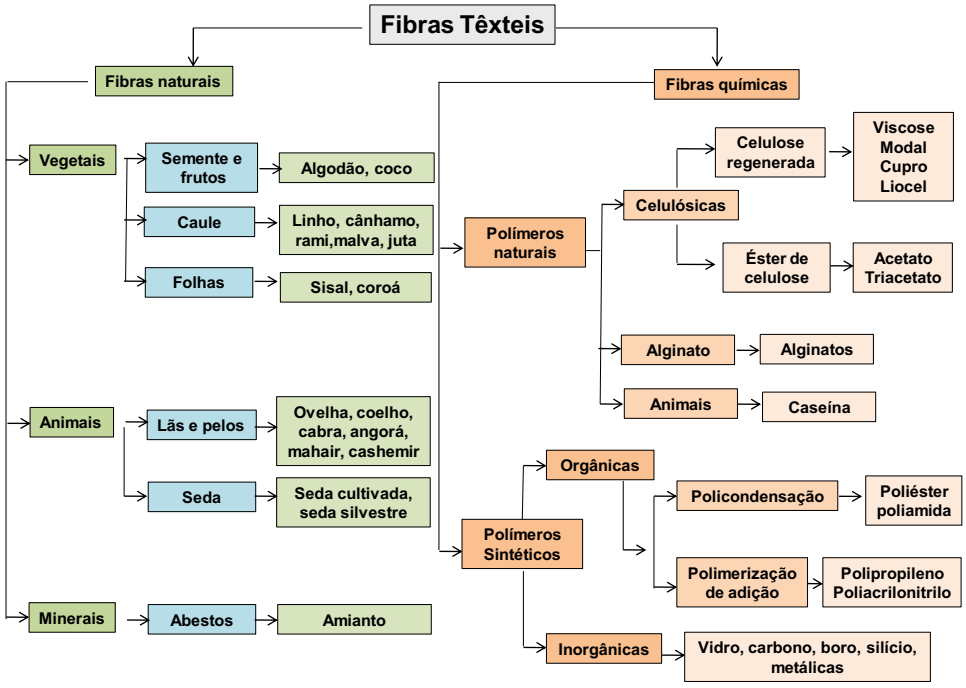
3.1 Fibras

Fibras são materiais naturais ou químicos que apresentam resistência e proporção entre seu comprimento e diâmetro (HONGU et al., 2005). Segundo a ASTM - *American Society for Testing and Material* (D123-91a), é denominado como fibra, um termo genérico para o material caracterizado com um comprimento de pelo menos 100 vezes seu diâmetro e que forma a base de um têxtil.

A Figura 1 apresenta a classificação das fibras de acordo com a origem. Elas são divididas em naturais e químicas, sendo que as naturais possuem três diferentes fontes (HONGU et al., 2005):

- Animais: podem ser obtidas por secreção, como é o caso da seda, ou por meio do pelo, como a lã e a angorá;
- Vegetais: podem ser obtidas através do caule, como o linho e a juta; pela semente, como o algodão; pela folha, como o sisal e o abacá; e pelo fruto, como o coco;
- Minerais: o amianto representa essa categoria.

Figura 1 - Fluxograma fibras têxteis



Fonte: COSTA et al., (2014 apud SALEM, 2010)

As fibras químicas podem ser produzidas por polímeros naturais e por polímeros sintéticos. As fibras produzidas por polímeros naturais podem ser de

origem celulósica ou não. Como exemplo de fibras celulósicas tem-se: a viscose, o modal e o acetato e como exemplo de fibra não celulósica tem-se o alginato e a caseína. Por outro lado, as fibras sintéticas são produzidas a partir de derivados do petróleo, tendo como exemplo as fibras de polipropileno, poliéster, poliamida e vidro (SALEM, 2010).

No que diz respeito às estruturas que os materiais fibrosos podem formar, as fibras podem ser aplicadas em diferentes construções, como em têxteis técnicos, tecidos, malhas e nãotecidos (ABINT, 2014).

3.2 Têxteis técnicos

Têxteis técnicos são estruturas de alto desempenho desenvolvidas para aplicação específica em determinadas áreas. Dentre elas são destacadas (ARAÚJO et al., 2001; HORROCKS; ANAND, 2000):

- Construção civil: apresentam funções de proteção, drenagem, reforço e separação. Os geotêxteis representam essa categoria, sendo estruturas permeáveis aplicadas com o solo, água e pedras que apresentam boa resistência para suportar as condições do ambiente, como sol, chuva e neve;
- Têxteis médicos: divididos em três grupos, podem ser materiais cirúrgicos, como suturas; materiais para sistemas extra-corporais, como órgãos artificiais; e produtos de higiene e saúde, como vestuário cirúrgico e roupa de cama hospitalar;
- Transportes: estão presentes em automóveis, aviões, trens e transportes marinhos. Em um carro pode ser encontrado na parte interna como acabamento, além de estar presente em itens de proteção, como cintos de segurança e *air bags.* Outro elemento que apresenta materiais têxteis é o pneu, representando boa propriedade mecânica e baixo peso;
- Esportes: materiais com características específicas para auxiliar o desempenho do atleta, influenciando, por exemplo, a melhora do conforto térmico durante a atividade física, permitindo a passagem do suor para a camada exterior enquanto a interior continua seca. Além do vestuário, podem ser encontrados em outras aplicações como equipamentos, raquetes de tênis, bicicletas, *skis* e pranchas de *surf*;

- Militar e defesa: vestuário de proteção e elementos de defesa, como coletes à prova de balas, capacetes, roupas de proteção química, assim como materiais utilizados na fabricação de mísseis, aviões e pára-quedas;
- Agroindústria: podem ser encontrados em redes de proteção de cultivo e drenagem por meio de geotêxteis. O vestuário de proteção em lavouras também é constituído de têxteis técnicos.

Os têxteis técnicos surgiram da necessidade de materiais com uma performance com melhores resultados que os têxteis tradicionais. Diferentemente dos tradicionais, os têxteis técnicos possuem diferentes tipos de performance, e em diferentes níveis, dependendo da aplicação desejada. Por isso é difícil estabelecer os parâmetros desse rendimento, devido a esse alto nível de especificidade que o material é utilizado. Entretanto, algumas características servem como parâmetro, como durabilidade, estabilidade dimensional e resistência mecânica (MOGAHZY, 2009).

O termo têxtil técnico também pode ser visto como "têxtil industrial", mais comumente nos Estados Unidos. Mogahzy (2009) prefere utilizar o prefixo FFFP: *Function-focus fibrous product*, por se tratar de um material de utilização específica de acordo com o foco, e por não ser utilizado somente para fins industriais. Outro termo utilizado é "*tech-textile*", introduzido em Frankfurt, na EXPO para materiais têxteis industriais, e seguido posteriormente no Japão (HONGU et al., 2005).

Segundo a pesquisa "*Technical Textiles Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends And Forecast 2012 - 2018*", publicada pela *Transparency Market Research*, o mercado de têxteis técnicos demonstra representatividade econômica, principalmente devido à versatilidade do produto e potencial inovativo. A Ásia tem representado significância na demanda desse tipo de mercado, que tradicionalmente era representado apenas pela Europa e América do Norte (REUTERS, 2013).

No Brasil, a situação dos têxteis técnicos é apresentada na Tabela 1. A tabela mostra dados divulgados pela ABINT - Associação Brasileira da Indústria de Nãotecidos e Têxteis Técnicos em relação ao ano de 2013.

Tabela 1 - Dados do setor no Brasil referente a 2013

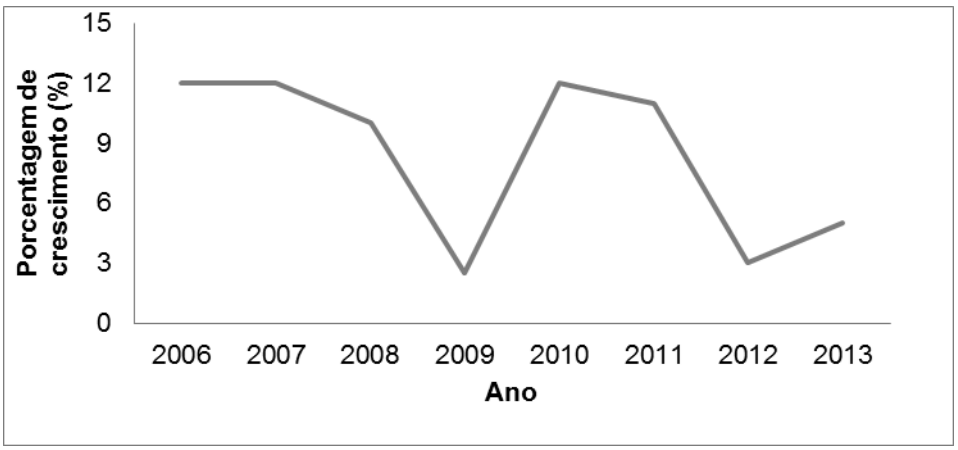
Têxteis Técnicos	
Consumo Aparente	400.880 toneladas (US$ 2,31 bilhões)
Produção	359.630 toneladas
Exportação	51.673 toneladas
Mão-de-obra direta	26.058 pessoas

Fonte: ABINT, 2014

Em relação aos dados apresentados referentes à produção de 359.630 toneladas de têxteis técnicos, o consumo per capita/ano equivale a 1,99 kg/hab. O principal mercado é representado pelo setor de *big bags* e embalagens, com 45%, seguido pelo setor industrial, com 7%, de lonas e coberturas arquitetônicas, com 6%, do setor de esportes, com 4% e de roupas de segurança, com 3%. Os investimentos no setor de têxteis técnicos nos últimos dois anos foram maiores que US$ 120 milhões aproximadamente, e previstos para dois anos estão em torno de US$ 100 milhões (ABINT, 2014).

O Gráfico 1 demonstra a taxa de crescimento desse setor ao longo dos anos no cenário brasileiro. Houve oscilações, sendo que os anos de maior crescimento foram os de 2006 e 2007 (ABINT, 2014).

Gráfico 1 - Porcentagem de crescimento no Brasil de 2006 a 2013



Fonte: ABINT, 2014

Devido ao baixo crescimento nos últimos seis anos, com 2,5% em 2009, reflexo da crise internacional (ABDI, 2009), 3% em 2012 e alcançando uma taxa de

aproximadamente 5% no ano de 2013, o incentivo às novas pesquisas, como os têxteis técnicos se torna de grande relevância para o desenvolvimento do setor.

3.2.1 Têxteis médicos

Os têxteis médicos representam um segmento dos têxteis técnicos e são estruturas desenvolvidas para utilização dentro da área médica, desde máscaras cirúrgicas a órgãos artificiais. Apresentam papel importante nesse campo, podendo ser encontrados em diversas aplicações. São divididos em três categorias (ARAÚJO et al., 2001):

- Têxteis cirúrgicos
  - Implantáveis: utilizados em aplicações internas no corpo, como implantes ósseos, cardiovasculares, tendões e suturas;
  - Não implantáveis: utilizados em aplicações externas ao corpo, como compressas, gazes e ligaduras;
- Têxteis para sistemas extra-corporais: órgãos artificiais, e
- Produtos de higiene e saúde: vestuário cirúrgico, artigos de cama, fraldas de incontinência, vestuário de proteção, etc.

Esses materiais devem apresentar certas propriedades de acordo com cada aplicação, mas em sua grande maioria devem ser biocompatíveis, atóxicos, bactericidas, altamente absorventes, apresentar boas propriedades mecânicas, conforto e capacidade de esterilização (ARAÚJO et al., 2001).

Devido à possibilidade de contaminação, muitas vezes pelo contato com bactérias, a capacidade de esterilização dos materiais assume grande importância. Pode ser realizada por óxido de etileno, radiação – como, por exemplo, radiação gama, e autoclave (ARAÚJO et al., 2001).

Os têxteis médicos podem ser encontrados como fibras e nanofibras, filamentos, filmes, matrizes, *scaffolds*, hidrogéis, membranas, entre outros (PETRULYTE; PETRULIS, 2011).

3.2.1.1 Têxteis implantáveis

Os têxteis implantáveis representam uma categoria dentro dos têxteis médicos e são utilizados no interior do organismo, funcionando como os substitutos artificiais. A utilização desses materiais têxteis apresentam algumas vantagens como: nas propriedades mecânicas, flexibilidade e elasticidade, e na possibilidade

em desenvolver estruturas com boa porosidade. Essas propriedades se devem ao fato das fibras poderem ser desenvolvidas em diferentes diâmetros e geometrias, e possuírem capacidade de ser degradável ou não (PETRULYTE; PETRULIS, 2011).

As propriedades que um têxtil implantável deve apresentar segundo Araújo et al. (2001) são :

- Boa aderência na superfície do material para promover o crescimento e adesão celular;
- Porosidade suficiente para haver o encapsulamento do implante e o crescimento do tecido;
- Biodegradabilidade dependendo da necessidade de aplicação;
- Diâmetro das fibras condizente com a aplicação, preferencialmente, menor que o das células, para possibilitar a aderência das mesmas. Além disso, a adesão ocorre com maior facilidade em secções transversais circulares que não sejam irregulares;
- Biocompatibilidade e não toxicidade;
- Propriedades mecânicas condizentes com a devida aplicação.

O uso de fibras têxteis para aplicação em implantáveis é constantemente foco de estudos e pesquisas, podendo ser encontrados anéis de válvula cardíaca, enxertos vasculares, dispositivos percutâneos e malhas de reparo para hérnia. Além disso, as fibras têm sido utilizadas na medicina regenerativa (ALMEIDA et al., 2013).

A utilização de fibras em engenharia de tecidos ósseos apresenta pontos positivos que são, boa porosidade, são mais leves e possuem módulo elástico melhor ajustável que um produto metálico, o que melhora a regeneração tecidual óssea (DOSER; PLANCK, 2011).

Para a utilização de têxteis implantáveis em aplicações como em tecidos rígidos, todas as exigências anteriormente citadas são essenciais. Mas a resistência mecânica do material é a propriedade com uma importância fundamental, pois o material deve prover ao ambiente implantado todo o suporte que a região hospedeira supria (BOSE et al., 2012). O Quadro 1 apresenta valores das propriedades mecânicas de materiais de tecidos duros (ARAÚJO et al., 2001).

Quadro 1 - Valores das propriedades mecânicas materiais de tecidos duros

		Resistência à tração (Mpa)	Módulo de resistência à tração (Gpa)	Resistência à compressão (Mpa)	Resistência à flexão (Mpa)
Osso	Osso cortical	70	16	140	150
Dente	Dentina Esmalte	53 11	19 84	300 390	- -
Cerâmicos	Hidroxiapatita Carbono	115 200	90 12	520 800	130 170
Metais	SUS 316 Titânio	518 406	200 110	- -	- -
Polímeros	Polimetil-acrilato	46	2	77	100
	UHMW	200	0,7	-	-
	Ácido poli-L-lactide	50	6	-	-
	Silicone	7	60	-	-

Fonte: ARAÚJO et al., 2001

SUS 316: Stainless steel grade 316, ou aço inoxidável com graduação 316

UHMW: Ultra high molecular weight polyethylene (Polietileno de ultra-peso molecular).

A resistência à tração de um osso cortical, também conhecido como osso compacto, que representa a parte densa do tecido ósseo, ou seja, mais dura, é de 70 Mpa. Comparativamente com os materiais apresentados no Quadro 1, os materiais que apresentam número superior a ele são os metais (SUS 316 – aço inoxidável e titânio), os cerâmicos (hidroxiapatita e carbono) e o polietileno de ultra-alta massa molar (UHMW) como polímero.

Os polímeros, com exceção do UHMW, apresentaram valores abaixo dos apresentados pelo osso cortical em todas as categorias de propriedades mecânicas. Por exemplo, a resistência à tração do osso cortical apresentada é 34,3% maior que a do polimetilacrilato, 28,6% maior que o poli (L-ácido lático) e 90% maior que o silicone. Por essa razão, em muitos dos casos, os polímeros são utilizados combinados com outros materiais, como cerâmicos, desenvolvendo compósitos com a finalidade de melhorar as propriedades interfaciais (ARAÚJO et al., 2001).

3.3 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos surgiu devido à necessidade de substitutos teciduais. Embora a realização de transplantes de um paciente para outro seja uma alternativa viável, a acessibilidade e quantidade de tecidos necessária para todos os casos não é suficiente. A engenharia de tecidos busca aprimorar o desenvolvimento de um substituto e funcional que reproduza as condições do tecido hospedeiro (VACANTI; VACANTI, 2014). Esse é um campo de estudo interdisciplinar emergente, que começou a ascender em meados dos anos 80 (LAURENCIN et al., 2014).

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que visa o desenvolvimento de um material que estimule a regeneração tecidual. Existem duas estratégias diferentes na engenharia de tecidos, a estratégia celular e acelular. A estratégia celular consiste na semeadura de células *in vitro* antes da implantação. Portanto as células já inseridas dentro do *scaffold* se misturam com o tecido no local implantado e estimulam a integração do novo tecido, ao mesmo tempo que isso ocorre, o polímero vai se degradando. Após a degradação completa do polímero, apenas restará o novo tecido gerado. Por outro lado, a diferença entre acelular e celular está na implantação de um *scaffold* não semeado, ou seja, na estratégia acelular não há semeadura de células. A regeneração tecidual assim pode ser estimulada por moléculas de sinalização localizadas dentro do *scaffold*, apoiando e controlando as células inatas (macrófagos, células-tronco da medula óssea, etc.) a partir do fluxo sanguíneo e do tecido do meio, ou seja, permitindo a infiltração de novos vasos sanguíneos e fibras nervosas (CHEN et al., 2013).

O termo engenharia de tecidos foi utilizado pela primeira vez pelo professor da Universidade da Califórnia, Yuan-Cheng Fung em um evento da *National Science Foundation* em 1987. O termo foi usado novamente no ano seguinte em outro evento, e sendo assim é utilizado até hoje. Uma variação para esse termo, seria medicina regenerativa. Ambos os termos são aceitos (NEREM; SCHUTTE, 2014).

Diversas são as áreas de aplicação beneficiadas com a engenharia de tecidos, como pele (HAN et al., 2014), osso (SOWJANYA et al., 2013; PARK et a., 2013; KYLLONEN, 2015), cartilagem (IWASAKI et al., 2004), vasos sanguíneos (JANA et al., 2014), sistema oftálmico (KHAOW; OYEN, 2013; MCCABE; LANZA, 2014), nervoso (WAHLBERG, 2014), respiratório (BESNARD; WHITSETT, 2014), cardiovascular (AYAZ et al., 2014), etc.

3.3.1 Engenharia de tecido ósseo

Restauração da forma e função são os maiores objetivos da regeneração tecidual, portanto a engenharia de tecidos ósseos objetiva o desenvolvimento de um material que seja capaz de restaurar a forma e função originais da região danificada, no caso, o tecido ósseo, levando à regeneração do mesmo (CHEN et al., 2013; ANITHA et al., 2014).

Os avanços no desenvolvimento de *scaffolds* para engenharia de tecidos ósseos estão relacionados ao uso de fármacos, biomoléculas (proteínas que auxiliam o processo de recrutamento e diferenciação das células osteoprogenitoras), células-tronco, genes (BOSE et al., 2012).

Os materiais mais utilizados para essa modalidade da engenharia de tecidos são os polímeros, os cerâmicos e a combinação de ambos (ANITHA et al., 2014).

Polímeros naturais comumente utilizados: alginato, quitosana, colágeno, seda, ácido hialurônico e fibrina (BOSE et al., 2012). A quitosana é um polissacarídeo com propriedades de grande valia para sua utilização em engenharia de tecido ósseo, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, entretanto, é mecanicamente fraca e instável (ANITHA et al., 2014).

Com relação às questões relacionadas ao aprimoramento dos *scaffolds* à base de polímeros, estudos em relação à biocompatibilidade e força mecânica ainda se faz necessário. Além disso, deve ser mais investigado o controle do grau de degradação combinado com o nível de regeneração da região danificada (BOSE et al., 2012). As alternativas clínicas de tratamento para reparo ósseo são: autoenxerto, aloenxerto e xenoenxerto. No autoenxerto o material é colhido do local doador do próprio paciente para posterior implante na região óssea danificada do mesmo. Usualmente o local de retirada é a crista ilíaca, ou seja, o osso do quadril. Essa prática possui muitos pontos positivos, pois esse tipo de enxerto se enquadra dentro dos critérios para regeneração óssea, pois apresenta vascularização, promove a osteocondução por ser osteocondutivo e osteoindutivo e possui riscos pequenos de sequelas imunológicas por se tratar de ser uma parte do próprio paciente. Entretanto é uma prática muito invasiva, pela retirada de material do corpo do próprio paciente, causando inflamação, dor e infecção em alguns casos. Além disso, apresenta quantidade limitada e restrição das formas. Já no aloenxerto, o material é colhido de outros doadores humanos e é conservado para posterior aplicação no paciente. O benefício dessa prática está na exclusão de uma cirurgia de retirada de material.

Entretanto, por se tratar de um enxerto de outro indivíduo, pode haver uma resposta imunológica no paciente enxertado, ou seja, pode ocorrer a transmissão de doenças. Outro ponto negativo é a diminuição do potencial osteogênico do material, pela necessidade do mesmo de passar por uma série de procedimentos para evitar a contaminação, como liofilização, lavagem e esterilização por óxido de etileno ou radiação gama. E por fim, no xenoenxerto, o material é colhido de espécies não humanas, comumente de animais como o porco e a vaca. O risco de transmissão de doenças é diminuído pelo processamento do material, com o objetivo de garantir biocompatibilidade e esterilidade. Entretanto não é uma prática muito utilizada por questões éticas e pelo risco de transmissão de doenças, mesmo que esse seja mínimo (SHRIVATS et al., 2014):

Essas técnicas de enxertos possuem vantagens e desvantagens, sendo o maior problema relacionado aos autoenxertos a insuficiência de locais do próprio paciente para realizar a retirada de material e posterior implante, e dos aloenxertos, uma possível transmissão de doenças. Portanto, a engenharia de tecidos estuda o desenvolvimento de alternativas para desafios como esses (VENKATESAN et al., 2015).

Dentre as pesquisas desenvolvidas com alternativas para a engenharia de tecidos estão (JAKOB et al., 2013):

- Fatores de crescimento: são constante objeto de pesquisa, mas em estágio de serem testados em ambientes clínicos, existem as proteínas osteogênicas BMP-2 e BMP-7, que estimulam a regeneração óssea;
- Células-tronco mesenquimais: podem ser combinadas com *scaffolds* injetáveis ou semeados em estruturas porosas. Podem ser utilizadas oriundas de várias fontes, como do tecido adiposo e da medula óssea;
- Tecnologia de biorreator: novos sistemas de biorretaores são projetados e desenvolvidos, como o sistema de perfusão, que utiliza a rodagem de sistemas e frascos através de *spinners* para melhorar a qualidade dos tecidos gerados. Aspectos a serem levados em consideração na produção desses materiais são as propriedades mecânicas, biológicas e fisiológicas do tecido a ser gerado *in vitro*. Essa tecnologia é de grande relevância para a reprodução em série de *scaffolds* com redução de tempo de produção e para o desenvolvimento de *scaffolds* personalizados de acordo com os diferentes tipos de paciente, modificados com o auxílio de células-tronco.

A engenharia de tecidos ósseos enfrenta ainda alguns desafios, como problemas na vascularização em enxertos grandes, problemas na osseointegração com o osso hospedeiro, possibilidade de infecção, rigidez e resistência deficientes e a capacidade de sincronizar a degradação e absorção do material com o processo regenerativo (LIU et al., 2013). Existem produtos no mercado aprovados para o uso em regeneração óssea, como pode ser observado no Quadro 2.

Quadro 2 - Produtos aprovados em regeneração óssea

Produto	Empresa	Composição	Aplicação
AlloFuse™	AlloSource	Gel injetável de copolímero com DBM	Preenchimento de cavidades ósseo
Biomet Microfixation	Biomet, Inc	PMMA revestido com HEMA, impregnado com hidróxido de cálcio	Aplicações cranianas
BioSet™	Regeneration Technologies	DBM combinado com transportador de gelatina natural como pasta injetável e tiras com chips esponjosos/corticais	Preenchimento de cavidades ósseo
Collagraft Bone Graft Substitute	Zimmer	HA, TCP e colágeno bovino em tiras	Preenchimento de cavidades ósseo em extremidades, espinha e pelve
GRAFTON®	Osteotech	Fibras de DBM com cubos de cortical desmineralizado, e DBM em seringa	Preenchimento de cavidades ósseo e substituto de enxerto ósseo
Osteoplug, Osteomesh	Osteopore	70% ß-TCP/20% colágeno/ 10% vidro bioativo, PCL poroso	Preenchimento de cavidades ósseo para aplicações cranianas
OSTEOSET®	Wright Medical Technology	DBM integrado em esferas de sulfato de cálcio	Lesões ósseas traumáticas da coluna, ossos longos e pelve
VIAGRAF	Smith & Nephew	DBM combinado com glicerol como gel	Preenchimento de cavidades ósseo

Fonte: LIU et al., 2013

DBM: *Demineralized bone matrix*, matriz óssea desmineralizada;

PMMA: Polimetilacrilato; HA: Hidroxiapatita; HEMA: Hidroximetilmetacrilato; TCP: Fosfato tricálcico

Além desses produtos apresentados, existem outros *scaffolds* produzidos por empresas diferentes, entretanto, a companhia Osteopore, segundo a ISO 13485, é a única que produz *scaffolds* clinicamente aprovados sob instalações cGMP (*Current Good Manufacturing Practices*, ou Boas Práticas de Manufatura). E outra questão relevante se refere à falta de uma melhor integridade mecânica por parte desses materiais e à composição de alguns, que não são biodegradáveis, podendo ocasionar infecções a longo prazo (LIU et al., 2013).

3.4 *Scaffolds*

Scaffolds, ou arcabouços, são estruturas tridimensionais biocompatíveis que promovem a adesão, proliferação e diferenciação celular, estimulando a formação tecidual. Um *scaffold* ideal deve conter as seguintes propriedades para o complexo processo de engenharia de tecido ósseo: bioreabsorção, biocompatibilidade, propriedades mecânicas de acordo com a aplicação, porosidade e permeabilidade (BOSE et al., 2012).

No que diz respeito à bioreabsorção, além de fornecer as propriedades necessárias para o ambiente implantado, o *scaffold* deve se degradar ao mesmo tempo em que haja um grau de reabsorção controlado e espaço para o crescimento do novo osso. E para isso ocorrer, ele deve ser biocompatível, apresentando capacidade de auxiliar a atividade celular e ser osteocondutivo, ou seja, incentivar a adesão e proliferação celular enquanto forma a matriz extracelular e induz a formação óssea. E por fim, as propriedades mecânicas devem combinar as propriedades necessárias do osso hospedeiro com a transferência de carga adequada, entretanto os valores variam de acordo com o tipo de osso: esponjoso ou cortical, dificultando a criação de um *scaffold* ideal. O Módulo de Young de um osso esponjoso varia entre 0,1 a 2 GPa, enquanto um osso cortical varia entre 15 a 20 GPa (BOSE et al., 2012).

Dentre as propriedades de um *scaffold*, a porosidade é uma das principais características de um *scaffold*. A dimensão dos poros deve apresentar no mínimo diâmetro de 100 μm para realizar uma difusão de oxigênio e nutrientes bem sucedida. Entretanto, uma dimensão dos poros entre 200-350 μm é considerada boa para ossos em crescimento. Ou seja, a porosidade de um *scaffold* representa um papel importante na osteogênese (HU; YU, 2013). A distribuição desses poros, assim como porosidade volumétrica são outros aspectos relevantes a serem considerados (SHRIVATS et al., 2014). Essa porosidade que o *scaffold* deve apresentar não precisa ser uniforme, ou seja, os poros não precisam apresentar o mesmo tamanho. Além disso, a estrutura deve apresentar uma rede porosa interconectada para promover a migração e proliferação celular (HYLAND et al., 2011). Na grande maioria dos *scaffolds* desenvolvidos, os poros são distribuídos uniformemente, o que não é necessário, pois em comparação com a estrutura óssea, o osso natural não apresenta essa uniformidade na distribuição dos poros.

Há maior porosidade no centro da estrutura, sendo o exterior mais denso (BOSE et al., 2012).

A permeabilidade auxilia o processo do crescimento ósseo, sendo que altos valores de permeabilidade melhoram o crescimento ósseo, assim como baixos valores o reduzem e induzem a formação de um tecido cartilaginoso e não ósseo (DIAS et al., 2014).

Na regeneração de tecidos ósseos, o objetivo de um *scaffold* biodegradável é servir como um esqueleto temporário inserido na área do osso danificado, funcionando como suporte e auxiliando na regeneração do tecido ósseo gradualmente, ao mesmo tempo em que o biomaterial vai se degradando para dar lugar à parte regenerada (SOWJANYA, 2013).

Em relação ao desenvolvimento de um *scaffold* ideal, as interações célula-matriz influenciam em diversos processos, como em mudanças morfológicas, disseminação, proliferação e diferenciação. Se as células sofrem incapacidade de adesão à matriz, a apoptose em vários tipos de células é induzida, ou seja, ocorrerá uma autodestruição celular (CHEN et al., 2013).

O processo de fixação célula-matriz tem a presença de integrinas, que são proteínas que se ligam a aminoácidos presentes nas proteínas da ECM (matriz extracelular), colágeno, que proporciona resistência à matriz e fibronectina, que intercede à adesão celular. Além do processo mediado pelas proteínas, a adesão celular é influenciada por propriedades físicas e químicas da superfície dos biomateriais, como a hidrofilicidade. Portanto, a modificação da superfície do material é um fator importante para a biocompatibilidade (CHEN et al., 2013).

Outro fator importante para o desenvolvimento desses biomateriais é a matéria-prima utilizada. O uso de polímeros sintéticos para o desenvolvimento de *scaffolds* tem sido recorrente e com sucesso. Algumas aplicações ocorreram na engenharia de tecidos ósseos, válvulas de coração e cartilagens. Entretanto esses materiais apresentam problemas, como a adesão insuficiente de células de polímeros não modificados, ou seja, polímeros que apresentam a superfície hidrofóbica e não são tratados para reverter isso. Outros pontos negativos são a superfície hidrofóbica, que evita o crescimento interno da célula, a decorrência de complicações, devido à falta de resíduos químicos e em alguns casos, a degradação de ácidos pode causar inflamações (HEINEMANN et al, 2008).

A utilização de polímeros naturais na produção de *scaffolds* é muito promissora, devido às propriedades que esses materiais apresentam, diminuindo as complicações que os sintéticos apresentam. Um exemplo de material natural é o colágeno, que apresenta biocompatibilidade, boas propriedades mecânicas e baixa imunogenicidade. Outro polímero que pode ser utilizado é a quitosana, polissacarídeo biocompatível, biodegradável e não tóxico. A utilização de quitosana na produção de *scaffolds* pode ser a partir de fibras (HEINEMANN et al., 2008). Também pode ser ultilizado o alginato.

A utilização de alginato aliado à quitosana é de grande interesse, principalmente no que diz respeito à produção de *scaffolds*, pois enquanto o alginato oferece grupos funcionais à regeneração celular, a quitosana desempenha um papel de apoio para a estrutura do *scaffold*, como demonstrou Iwasaki et al. (2004) em seu trabalho, onde utilizou fibras híbridas de alginato e quitosana na produção de *scaffolds* para engenharia tecidual de cartilagem e essas produziram uma resposta biológica favorável aos condrócitos implantados no estudo. Além disso, alginato e quitosana combinados melhoram suas propriedades mecânicas (BAYSAL et al., 2013). A união entre quitosana, um polímero catiônico com o alginato, um polímero aniônico cria uma ligação estável, resultando em uma melhora da força mecânica do *scaffold*, levando em conta a utilização dos polímeros separados (LEE et al., 2014; JIN et al., 2012).

3.4.1 Parâmetros a serem analisados em um *scaffold*

Os parâmetros e ensaios utilizados para análise de um *scaffold* comumente são (COLLINS; BIRKINSHAW, 2013):

- Propriedades físicas: testes de tração e compressão
- Propriedades biológicas: adesão, proliferação e viabilidade celular *in vivo* e *in vitro* e incorporação proteica;
- Propriedades de degradação: enzimática ou ensaios de absorção e perda de massa com PBS - *phosphate buffer solution;*
- Propriedades químicas: degradação térmica: DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial e Análise Termogravimétrica - TGA. Composição do material: Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR.

A análise de bioatividade de um material deve ser realizada com SBF - *Simulated Body Fluid*, ou seja, fluido corporal simulado, que é uma solução de

concentração semelhante ao plasma humano. A bioatividade depende de cada material, quanto mais bioativo, menor será o tempo de adesão do implante no organismo, portanto o desempenho do biomaterial será satisfatório (MUNDSTOCK et al., 2012).

Outra análise indispensável para um biomaterial é a viabilidade celular, ou seja, a realização do ensaio de citotoxicidade do material, que avalia a biocompatibilidade do mesmo, evidenciando se há efeitos tóxicos causados ao sistema biológico. A partir desse teste é possível a confirmação da presença de substâncias que poderiam ser prejudiciais às células e provocar uma eventual morte celular. A ISO 10993-5 aponta diferentes maneiras de realizar esse ensaio *in vitro*, como o teste de contato direto, teste de contato indireto e teste de extrato (MUNDSTOCK et al., 2012).

3.4.2 Métodos de produção de *scaffolds*

Há diversas maneiras de produção de *scaffolds*, como por exemplo, a prototipação rápida, eletrofiação, métodos de extrusão, *gas foaming*, laminação de membranas, *meltspinning*, *freeze-drying*, separação de fases, lixiviação de partículas e polimerização *in situ* (TRACHTENBERG et al., 2014).

A prototipação rápida ou 3DP – *Three-Dimensional Printing* consiste na deposição de material camada por camada por meio de um software. Podem ser utilizados vários materiais com uma reprodutibilidade precisa, possui arquitetura e porosidade bem definidas e capacidade de incorporação de células e moléculas bioativas. Mas ainda é um processamento demorado (BOSE et al., 2013; TRACHTENBERG et al., 2014).

A eletrofiação ou *electrospinning* consiste na extrusão de fibras poliméricas por meio de alta voltagem. Pode-se produzir fibras muito finas e nanofibras. Mas apresenta pouco controle na porosidade e deposição de fibras, assim como uma resistência mecânica deficiente (BRAGHIROLLI et al., 2014).

A metodologia de extrusão consiste no processo de deposição do polímero com o auxilio de uma agulha, em que ocorre a polimerização do material devido ao contato com uma solução de precipitação. Também pode ser realizado por meio de pressão e derretimento. Pode produzir estruturas tubulares. Mas dependendo do caso necessita de altas temperaturas e pressões, e pode produzir um material com pouca resistência mecânica. Essa metodologia de derretimento é utilizada no

meltspinning/*melt molding*, que consiste na extrusão do polímero em sua temperatura de fusão e acomodação em um molde. Apresenta facilidade no controle do formato e geometria da estrutura, devido à utilização do molde. Mas necessita de altas temperaturas, e pode gerar baixa interconectividade porosa (NIEKRASZEWICZ; NIEKRASZEWICZ, 2009; TRACHTENBERG et al., 2014).

A técnica de *gas foaming* consiste na exposição do polímero a gás de alta pressão. Essa metodologia apresenta limitação em relação ao tamanho dos poros e interconectividade dos mesmos. Entretanto, elimina a necessidade de solventes orgânicos, e possibilita uma boa adesão celular. Diferentemente da laminação de membrana que pode apresentar solventes tóxicos num processo demorado. Esse método consiste na fusão de finas camadas porosas de polímero. E apresenta geometria bem definida. Outros métodos de produção que pode apresentar resíduos de solventes e limitação dos poros são: a separação de fases, que consiste na dissolução do polímero em um solvente e processos de resfriamento, congelamento e sublimação do solvente, e a lixiviação de partículas, que consiste na deposição de solução polimérica com sal aterrado dentro do molde e evaporação do solvente seguida da lixiviação dos cristais de sal, formando os poros. Apresenta alto grau de porosidade, mas sem interconectividade e pequena quantidade de material envolvido, mas com possibilidade de resíduos do solvente. Por fim, a técnica de *Freeze-drying* consiste no processo de congelamento da estrutura polimérica dentro do molde. Apresenta interconectividade porosa, mas essa porosidade é menor que outros procedimentos. E a polimerização *in situ* consiste na polimerização após a implantação do polímero no local injetado. Representa uma implantação imediata, com a necessidade de poucos processos para tal. Mas apresenta limitação quanto à porosidade, propriedades mecânicas e escolha de materiais (TRACHTENBERG et al., 2014).

3.4.3 Utilização de fibras para desenvolvimento de *scaffolds*

Existem diferentes técnicas de produção de *scaffolds* à base de fibras, como: *electrospinning, wetspinning, meltspinning, biospinning e microfluidic spinning.*

A técnica de *electrospinning* ou eletrofiação produz fibras em uma escala de nanômetros a micrômetros. Consiste na produção de uma fibra por meio de uma solução polimérica ativada por alta voltagem, ou seja, a agulha e o coletor criam um campo elétrico ao mesmo tempo em que a bomba projeta a saída do fluido

polimérico. Um jato de fluido é projetado da agulha, adquirindo velocidade e espessura até ir de encontro ao coletor. Um ponto negativo da utilização do método de *electrospinning* na produção de fibras para aplicação em *scaffolds* é a dificuldade em se controlar o tamanho dos poros, principalmente se há a necessidade de poros de grande dimensão (BRAGHIROLLI et al., 2014; AGARWAL et al., 2013).

O *Wetspinning* ou fiação molhada consiste na extrusão do polímero com o auxílio de uma agulha em uma solução de precipitação. Ao realizar a extrusão, o polímero em contato com o banho polimeriza, resultando na formação de uma fibra. A vantagem da utilização dessa técnica em comparação com a de *electrospinning* para a produção de *scaffolds* se dá pela porosidade e tamanho dos poros. Os *scaffolds* desenvolvidos por meio da técnica de *wetspinning* apresentam tamanho dos poros de aproximadamente 250-500 μm, o que auxilia no processo de adesão e proliferação celular (TAMAYOL et al., 2013; NIEKRASZEWICZ; NIEKRASZEWICZ, 2009).

A metodologia de *meltspinning* consiste na extrusão do polímero em sua temperatura de fusão, ou seja, o polímero é derretido e extrudado através de uma fieira formando uma fibra. Essa técnica é utilizada para produção de fibras sintéticas (TAMAYOL et al., 2013; JAFFE; EAST, 2007).

Biospinning é o processo que gera as fibras de seda. Pode ser obtido através dos bichos de seda ou de aranhas (WORK, 1977; TAMAYOL et al., 2013).

Microfluidic spinning é uma técnica que tem o princípio parecido com a técnica de *wetspinning*, ou seja, consiste na extrusão da fibra através de um agente de *crosslinking*. Entretanto, esse agente *crosslinking* é fornecido pelo fluxo coaxial, no lugar da solução de precipitação. Para não ocorrer a polimerização dentro do micro canal, é utilizado um sistema micro fluídico (TAMAYOL et al., 2013).

3.5 Biomateriais

Biomateriais são materiais naturais ou sintéticos utilizados em aplicações biomédicas que interagem com o sistema biológico. Podem ser desenvolvidos a partir de polímeros, cerâmicos, metais e compósitos. Os polímeros são materiais versáteis, ou seja, são quimicamente diversos, apresentam facilidade de processamento, podendo formar géis, fibras, microesferas, filmes e sólidos. Apresentam propriedades biocompatíveis e biodegradáveis em alguns casos e podem ser utilizados puros, juntamente com outros materiais, e até mesmo de

revestimento. Por apresentarem essas propriedades, são utilizados em aplicações médicas (PETRULYTE; PETRULIS, 2011; MEDINE et al., 2012).

Os biomateriais apresentam papel importante na engenharia de tecidos por imitar a matriz extracelular, proporcionando um ambiente favorável à regeneração (HU; YU, 2013).

Algumas estratégias relativas ao material podem auxiliar no desenvolvimento de um biomaterial para engenharia tecidual, como: trabalhar com a superfície do material, ou seja, a hidrofilicidade ou hidrofobicidade, que influenciam na absorção proteica e na fixação celular; trabalhar com a inclusão de fatores de crescimento, e por exemplo, programar uma sequência de adesão com base peptídica (SHRIVATS et al., 2014).

3.6 Alginato

O alginato é um polímero natural proveniente das algas marrons – *Phaeophyta*. Existem vários tipos de algas, sendo a mais comum encontrada nas costas da América do Norte e América do Sul, a alga *Macrocystis pyfera*. Podem ser encontradas em praias rochosas ou no fundo do oceano, também rochoso. Além disso, as algas também podem ser cultivadas em fazendas marinhas, como é o caso da China (GARCIA-CRUZ, 2008). A produção industrial de alginato é de aproximadamente 30000 toneladas métricas por ano, o que evidencia sua abundância na natureza, e estima-se que esses números figuram menos de 10% do material de alginato biossintetizado (PAWAR; EDGAR, 2012).

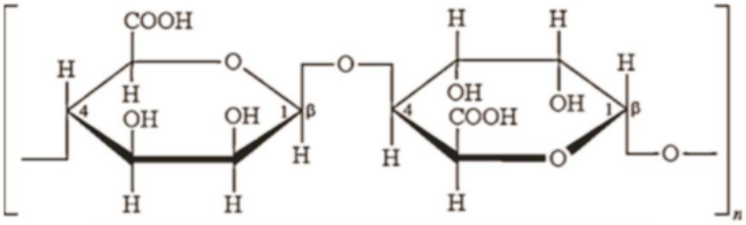
O alginato é um polímero com grande capacidade de formar hidrogéis, devido à formação de pontes iônicas das unidades G em sua estrutura, o que é de grande interesse para o campo médico e farmacêutico. Além de possuir propriedades, como boa absorção de água, biocompatibilidade e abundância na natureza (SIKAREEPAISAN et al., 2011).

3.6.1 Estrutura do alginato

O alginato é um copolímero constituído de ácidos α-L-gulurônicos e β-D-manurônicos em ligações β(1-4), formando o ácido algínico. Possui resíduos manurônicos (M) e gulurônicos (G), tendo suas propriedades ligadas à proporção e dimensão dos blocos gulurônicos (G) na cadeia (WANG et al., 2015). A estrutura química do alginato é representada pela Figura 2.

O ácido algínico é solúvel em água em altas temperaturas, mas em temperatura ambiente, torna-se insolúvel (GARCIA-CRUZ, 2008).

Figura 2 - Estrutura química do alginato



Ácido D-manurônico Ácido L-gulurônico

Fonte: WANG et al., 2015

O alginato é composto por grupos hidroxílicos, e um grupo carboxílico, como é evidenciado anteriormente.

A massa molar do alginato é um fator que influencia em seu grau de degradação, assim como nas propriedades mecânicas. Quanto maior a massa molar, menor o número de posições reativas disponíveis para a degradação por hidrólise, tornando assim a taxa de degradação mais lenta. E as propriedades mecânicas são influenciadas pela degradação, devido às mudanças estruturais causadas (SUN; TAN, 2013).

3.6.2 Aplicações do alginato

O alginato possui inúmeras aplicações, como na indústria coméstica, alimentícia e na área têxtil. Além de seu interesse dentro da área médica, devido a suas propriedades. A alta compatibilidade desse polissacarídeo reforça sua utilização na engenharia de tecidos, incluindo a regeneração de ossos, pele e cartilagem (SHALUMON et al., 2011).

Na indústria alimentícia, o alginato é utilizado em sorvetes e produtos lácteos. Pode também ser colocado em polpas de frutas e carnes, para reestruturá-los. Na indústria de bebidas, por exemplo, na cerveja, auxilia a estabilizar a espuma. Na indústria têxtil por sua vez, ajuda a aderência e deposição de tintas sobre os tecidos (MULLER et al., 2011).

Além disso, o alginato possui potencial aplicação em curativos por suas propriedades antimicrobianas, não toxicidade e pela capacidade de absorver o

exsudato da ferida, criando um ambiente adequado e estimulando a cicatrização (LIAKOS et al., 2013).

Outros estudos atentam para o alginato produzido por microrganismos. Afirma-se que o alginato bacteriano é significante em termos ambientais, pois as principais fontes de produção industrial do alginato são as algas *Laminaria hyperborea* e *Macrocystis pyrifera*, que constituem o ecossistema *kelp*. Essas algas se desenvolvem em latitutes de 40 a 60°C nos dois hemisférios. E estudos realizados na Califórnia e na Tasmânia alertam para as mudanças climáticas e pesca comercial afetando esse ecossistema. Portanto, a produção de alginato por microrganismos se torna interessante como alternativa para extração do alginato sem agredir ou alterar o ecossistema em questão. Além disso, o alginato produzido por microrganismos tem a capacidade de trabalhar com estruturas poliméricas específicas. Os tipos de microrganismos que produzem esse biomaterial são: *Pseudomonas* e *Azotobacter*. Os alginatos produzidos possuem propriedades determinadas pelo seu grau de polimerização e distribuição dos resíduos manurônicos e gulurônicos em sua cadeia.

Outra característica importante é a possibilidade de produzir o alginato com algumas propriedades pré-estabelecidas, através de manipulações genéticas (MULLER et al., 2011).

A produção de *scaffolds* utilizando-se o alginato na área médica é estudada devido a suas propriedades biocompatíveis e biodegradáveis. O *scaffold* coopera para o desenvolvimento celular e instauração do tecido. E deve se adequar às características estruturais, se adaptando em diferentes situações, como em tecidos duros e moles (REZENDE et al., 2009).

Assim como em *scaffolds*, o alginato pode ser verificado em nanocápsulas que realizam o transporte de substâncias. Pesquisas avaliam se esse biomaterial poderia atuar como nanopartículas inaláveis, sendo utilizado para problemas respiratórios (ZAHOOR et al., 2005). Outros estudos alertam o fato do alginato poder ser utilizado no transplante de células. Além de todas essas aplicações, o alginato também pode ser utilizado como espessante, agente de gelificação e de formação de fibras e estabilizante de emulsões (MULLER et al., 2011).

O alginato possui um papel importante na progressão da fibrose cística, utilizando-se biofilmes, formados a partir do gel do polímero. E a utilização do gel,

além da produção de fibras, pode-se fazer o encapsulamento, no caso, de ilhotas de Langerhans, utilizadas no tratamento de diabetes (PAWAR; EDGAR, 2012).

3.6.3 Propriedades do alginato

O alginato possui inúmeras propriedades de grande importância para sua utilização em biomateriais, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, solubilidade, suas ligações *crosslinking* e propriedades químicas (PAWAR; EDGAR, 2012).

Além de ser biocompatível e biodegradável, o alginato possui a capacidade de absorver água de 200-300 vezes mais que seu próprio peso. Essa capacidade de absorção em ambiente molhado auxilia no processo de liberação de fármacos, por exemplo, que é de grande interesse para sua utilização no *Drug Delivery System*, ou sistema de liberação controlada de fármacos. Possui também propriedades cicatrizantes, e possui a capacidade de ativar os macrófagos, gerando uma resposta inflamatória do organismo e iniciando o processo de cura do ferimento (LIAKOS et al., 2014).

O alginato ao ser utilizado como curativo agrega um grande valor, por possuir elevada capacidade de absorção e produzir um eficiente estímulo à granulação, que são características vantajosas do polímero. Sua indicação se dá para feridas abertas, com bastante secreção, inclusive sangue e altamente exsudativas, devido ao seu alto potencial de absorção (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Dentre as propriedades físicas do alginato, a solubilidade é uma das mais importantes a ser tratada. Há três parâmetros que devem ser notados: a força iônica do meio, o pH do solvente e a presença de íons gelificantes no solvente. Para o alginato ser solúvel em água, seu pH deve estar acima do valor crítico e os grupos de ácido carboxílico devem ser desprotonados. A solubilidade do alginato depende dos grupos de ácidos carboxílicos. E alterar a força iônica do meio pode causar problemas na viscosidade, alterando assim a solubilidade (PAWAR; EDGAR, 2012). O Quadro 3 apresenta a solubilidade de diferentes alginatos em alguns solventes com concentração de 15mg/mL.

Quadro 3 - Solubilidade dos alginatos em diferentes solventes

	H_2O	EG	DMAc	DMF	DMSO	DMAc/ LiCl	DMF/ TBAF	DMSO / TBAF	DMAc/ TBAF	DMI/ TBAF
Ácido algínico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alginato de sódio	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TBA-alginato	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+

Fonte: PAWAR; EDGAR, 2012

(+) solubilidade completa; (-) solubilidade parcial ou não é solúvel; EG: etilenoglicol

DMA: dimetil amina; DMF: dimetilformamida; DMSO: dimetilsulfóxido; LiCl: cloreto de lítio

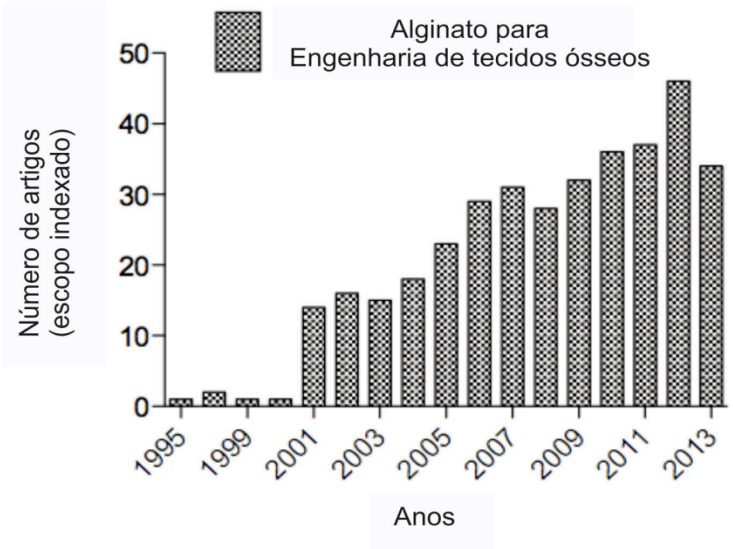
TBAF: Fluoreto de Tetrabutilamônio; TBA-alginato: Tetrabutilamônio-alginato

No estudo de solubilidade realizado por Pawar; Edgar (2012), como mostra o Quadro 3, a solubilidade dos alginatos depende dos grupos carboxílicos. Ácido algínico com os seus grupos de ácidos carboxílicos na sua forma protonada não foi totalmente solúvel em qualquer solvente examinado, incluindo água. O alginato de sódio foi dissolvido em água, mas não foi totalmente solúvel em qualquer meio orgânico examinados. TBA-alginato foi completamente solúvel em água, etileno glicol e solventes apróticos polares contendo TBAF, mas não se dissolveu em quaisquer outros sistemas de solventes sob consideração.

3.6.4 Utilização de alginato em engenharia de tecidos

Durante os últimos 20 anos houve um aumento no número de publicações e pesquisas acerca da utilização de alginato para engenharia de tecidos. O Gráfico 2 mostra dados em que explicita essa questão, em relação à utilização do alginato para engenharia de tecidos ósseos (VENKATESAN et al., 2015).

Gráfico 2 - Número de publicações relativas ao uso de alginato para engenharia de tecido ósseo



Fonte: VENKATESAN et al., 2015

O alginato apresenta inúmeras propriedades relevantes para sua utilização como *scaffold* para engenharia tecidual, como dito anteriormente. Sua hidrofilicidade é uma dessas propriedades, que influencia a simulação do ambiente aquoso da matriz extracelular, devido à capacidade desse material de manter a água (HU; YU, 2013).

Uma desvantagem que o alginato apresenta é a baixa adsorção proteica, tornando difícil a interação celular, o que não é recomendado, pois um *scaffold* deve promover adesão celular (HU; YU, 2013).

O método tradicional de produção de *scaffolds* para engenharia de tecidos é o de congelamento e liofilização e é o mais encontrado nas publicações (VENKATESAN et al., 2015).

3.7 Quitosana

A quitosana é um polímero de origem natural proveniente da desacetilação parcial da quitina. Esta por sua vez, é de grande abundância na natureza, ficando atrás apenas da celulose. É encontrada no exoesqueleto dos crustáceos e na parede dos fungos. A quitina comercial é obtida do processamento de crustáceos da indústria alimentícia e possui importância ambiental, por aproveitar os resíduos da indústria pesqueira (AZEVEDO et al., 2007; WAN; TAI, 2013).

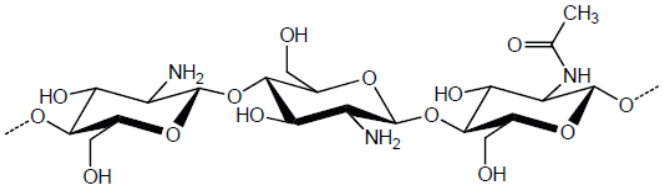
A quitosana, como um biomaterial proveniente da quitina, possui um valor comercial considerável devido a algumas propriedades, como sua alta porcentagem de nitrogênio, comparada aos substitutos sintéticos da celulose, sendo importante para a produção de géis e filmes, além de sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (CHIN; AHMAD, 2010).

A quitosana começou a ser estudada em 1859, com C. Rouget, que analisou as formas de desacetilação da quitina (DASH et al., 2011). O processo de desacetilação da quitina, que proporciona o seu mais importante derivado – a quitosana – pode ser químico ou enzimático. A desacetilação total raramente é realizada, por causar a despolimerização. A reação mais utilizada, principalmente em laboratórios de pesquisa ou industrialmente é a desacetilação a partir de suspensão de solução aquosa de hidróxido de sódio. Alguns fatores são determinantes para a bem-sucedida desacetilação e atributos da quitosana adquiridos, como: concentração da solução alcalina, tamanho das partículas de quitina e temperatura e tempo de reação (CAMPANA-FILHO et al, 2007). Grande parte da quitosana comercial possui normalmente um grau de desacetilação superior a 70%. (CHIN; AHMAD, 2010).

3.7.1 Estrutura da quitosana

A quitosana é um polissacarídeo linear e semicristalino, quimicamente formada por N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina (CROISIER; JEROME, 2013). E suas propriedades, como biodegradabilidade dependem dos grupos amino protonados da cadeia (ALVARENGA, 2011). A estrutura química do polímero é representada pela Figura 3.

Figura 3 - Estrutura química da quitosana

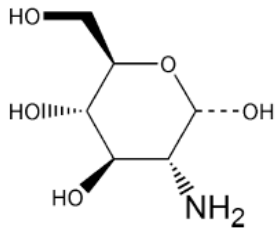


Fonte: ALVARENGA, 2011

A quitosana, por ser um polímero, possui inúmeros monômeros, a glucosamina. O seu grupo amino é responsável, principalmente, por sua solubilidade

(PILLAI et al. 2009). A estrutura química da glucosamina é representada pela Figura 4.

Figura 4 - Estrutura da glucosamina, monômero da quitosana.

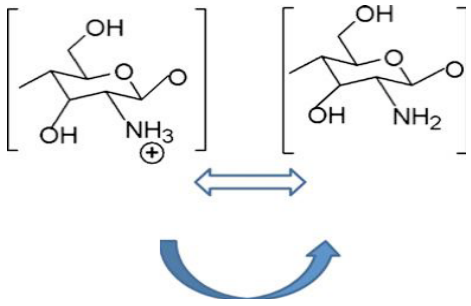


Fonte: PILLAI et al., 2009

O monômero da quitosana é composto quimicamente por um grupo amino e grupos hidroxílicos. Alterar esses grupos significa modificar a funcionalidade do material, ou até mesmo melhorar certas características, como a solubilidade do mesmo (CHIN; AHMAD, 2010).

A quitosana é normalmente insolúvel na maioria dos solventes orgânicos. Além disso, apresenta um comportamento bastante variável em relação à sua solubilidade e diferentes pHs. Quando o pH apresenta valor menor que 6 – os grupos amino são protonados e ficam com carga positiva, tornando a quitosana solúvel em água. Diferentemente de pHs acima de 6,5 – ocorrendo o contrário, tendo os grupos aminos desprotonados, e transformando a quitosana insolúvel, como representado na Figura 5 (DASH et al., 2011).

Figura 5 - Esquema de solubilidade da quitosana de acordo com os pHs



Solúvel Insolúvel

Fonte: DASH et al., 2011

3.7.2 Aplicações da quitosana

A quitosana possui muitas aplicações. De acordo com a literatura, pode ser utilizada na indústria alimentícia como conservante, devido à sua propriedade antimicrobiana (ALVARENGA, 2011). Possui propriedades biodegradáveis e biocompatíveis, sendo de grande valia para suas muitas aplicações. De acordo com a literatura, pode ser utilizada na agricultura – adubagem, e na área médica. Nesta última, a quitosana aparece como bandagens, curativos, e até enxertos.

Outras utilizações são no tratamento de água e na indústria de cosméticos (AZEVEDO et al, 2007). Além disso, ela pode ser utilizada como um sistema de liberação de fármacos (*Drug Delivery System*), podendo ser para transporte de antibióticos e anti-inflamatórios (DASH et al., 2011). Para essa liberação de fármacos ocorrer, a quitosana deve apresentar hidrosolubilidade e cargas positivas para poder interagir com o meio negativo em meio aquoso e liberar o medicamento. Estudos apontam para diferentes usos de liberação, como na mucosa ou via oral (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

A quitosana além de poder ser utilizada como uma fibra, pode também ser vista como membranas, microesferas, *scaffolds*, nanofibras e esponjas (JAYAKUMAR et al., 2011).

Em relação aos *scaffolds*, a quitosana pode ser utilizada na engenharia de tecidos para a criação de pele artificial, auxiliando aqueles que sofrem com a reabilitação de cicatrizes muito grandes e profundas. É um difícil trabalho, pois para criar um tecido compatível para restaurar a região depende de um complexo processo biológico. A engenharia de tecidos trabalha para criar um tecido substituto para áreas teciduais danificadas ou até órgãos. Os *scaffolds* de biomateriais podem servir tanto como transporte desses bioativos, como suporte para as células (CHIN ; AHMAD, 2010).

A utilização da quitosana em implantes previne a criação de biofilmes nos implantes, que são bactérias e fungos que formam uma pequena camada e são resistentes a antibióticos. Quando a situação se acarreta, na maioria dos casos é necessária a intervenção cirúrgica para a retirada desses biofilmes. Estudos avaliam se um revestimento de quitosana destrói esses microrganismos, evitando sua deposição, e diminuindo a taxa de infecções (AZEVEDO et al., 2007).

O monômero da quitosana, a glucosamina também possui uma aplicação de interesse biomédico, que é sua utilização no tratamento de artrite. O sulfato de

glucosamina pode ser utilizado contra doenças reumáticas. E esse monossacarídeo pode ser obtido pela hidrólise ácida da quitina (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

3.7.3 Propriedades da quitosana

Algumas propriedades de grande importância desse material são sua biodegradabilidade, ação antimicrobiana, coagulante e hemostática, analgésica, cicatrizante, oteocondutiva, inflamatória e mucoadesiva (CROISIER; JEROME, 2013; CHIN; AHMAD, 2010).

Na ação biodegradável a quitosana é degradada *in vivo* por algumas proteases, principalmente, a lisozima. A degradação da quitosana gera oligossacarídeos não tóxicos, que podem ser incorporados no metabolismo ou excretados (CROISIER; JEROME, 2013).

A ação antimicrobiana (bactericida e fungicida) consiste no princípio que a quitosana impossibilita o desenvolvimento de microrganismos, como o *E. coli, Salmonella typhimurium e Micrococcus luteus*, dentre outros. Em relação a essa ação, autores explicam a atividade antimicrobiana devido ao contato entre os grupos amínicos da quitosana e os grupos aniônicos do microrganismo, sendo que os primeiros aglutinam as células do segundo. Por outro lado, outros estudos atribuem a ação devido às propriedades físico-químicas da quitosana (SILVA et al., 2006).

Em relação à ação coagulante e hemostática, estudos mostraram que a quitosana, assim como a quitina reduzem o tempo de coagulação. A quitosana que possui carga positiva age com os eritrócitos, de carga negativa. A ação do biopolímero se dá pela agregação plaquetária, estimulando a coagulação (OKAMOTO et al., 2003; CROISIER; JEROME, 2013).

Na ação analgésica, estudos mostraram a relação do efeito com a intercepção de hidrogênios ácidos do local inflamado (OKAMOTO et al., 2002). Os grupos animo da D-glucosamina podem protonar na presença de íons protonados liberados na região inflamada (CROISIER; JEROME, 2013). A quitosana em contato com a ferida auxilia no processo de amenizar a dor causada, acarretando um efeito calmante e agradável ao paciente. Exemplos de feridas que podem ser aliviadas com a ação da quitosana são: queimaduras, regiões de pele enxertada e úlceras cutâneas (CHIN; AHMAD, 2010).

Na ação de aceleração de cicatrização, o contato entre a quitosana com macrófago ativa a proliferação de fibroblastos, auxiliando o colágeno (SILVA et al.,

2006). Além disso, a quitosana auxilia no processo de reepitelização da pele e estimula a homeostase (CHIN; AHMAD, 2010). E na ação osteocondutiva a quitosana auxilia na aceleração do processo de formação óssea (LEE et al., 2014).

A N-acetil-glicosamina é sintetizada no corpo humano pela glicose e funciona como anti-inflamatório. Além disso, inibe a ação da citocina inflamatória, o que indica sua ação anti-inflamatória (CHIN; AHMAD, 2010).

E a ação mucoadesiva: os grupos amino carregados positivamente presentes na quitosana interagem com os resíduos negativamente carregados (ácido siálico) presentes na mucina, glicoproteína do muco. Essa propriedade se relaciona diretamente com o grau de desacetilação da quitosana. Quanto maior o grau de desacetilação, consequentemente, maior o número de cargas positivas, maior será a mucoadesão (CROISIER; JEROME, 2013).

Além das características mencionadas acima, a quitosana é insolúvel em água, possui alta viscosidade e grande tendência a coagular com proteínas a um pH elevado. Outra característica é sua alta capacidade de adsorção em ambientes aquosos, podendo, no caso do sistema de liberação de drogas, causar uma rápida liberação (CHIN; AHMAD, 2010).

A quitosana possui propriedades interessantes voltadas à saúde e bem estar, como auxiliar no processo de redução de colesterol e diminuição do peso, pois absorve a gordura (AZEVEDO et al., 2007).

Outra propriedade desse material que deve ser estudada é sua capacidade de esterilização. Há vários tipos de esterilização, como com vapor saturado, calor seco, irradiação gama e autoclavagem que são utilizados em materiais médicos. A quitosana deve ser esterilizada após contato, principalmente, com fluidos corporais, ou seja, deve ser levado em conta esse processo de esterilização de produtos compostos por quitosana, principalmente aqueles biomédicos, que necessitam da esterilização, essencial para matar os microrganismos e retirar os resíduos deixados. Mas é imprescindível que as propriedades do biomaterial não sejam perdidas, ou os efeitos causados sobre o material devem ser mínimos. Métodos utilizando altas temperaturas são danosos ao biomaterial, resultando em alterações no desempenho do mesmo (CHIN; AHMAD., 2010).

A não toxicidade é outra característica a ser levada em conta na quitosana e é passível de testes. Exames de citotoxicidade avaliam a reposta da célula a substâncias tóxicas e estão relacionadas à biocompatibilidade do material. O teste

avalia se pode haver uma irritação da pele. Esses testes são comumente realizados *in vitro* (CHIN; AHMAD, 2010).

3.7.4 *Scaffolds* de quitosana

A quitosana é alvo de estudos para aplicações médicas, especialmente na engenharia de tecidos, devido às propriedades já apresentadas anteriormente. Aproximadamente 892 publicações relacionadas à quitosana aplicada em biomateriais foram encontradas na *Medline data-base* entre os anos de 2002 a 2012 (WAN; TAI, 2013).

A degradação desse polímero tem como produtos a glucosamina e a N-acetilglucosamina, que são derivados da glicose, ou seja, açúcares encontrados no organismo humano (HYLAND et al., 2011). Sua similaridade com glicosaminoglicanos, encontrados na matriz extracelular cartilaginosa e óssea influencia positivamente a adesão e proliferação celular (PARK et al., 2013).

Além disso, a quitosana é degradada enzimaticamente *in vivo* pela lisozima, resultando na absorção completa sem reações colaterais ou respostas inflamatórias crônicas. Diferentemente da degradação de outros polímeros, como o PGA (ácido poliglicólico) e PLA (ácido polileatico), em que há a liberação de ácidos na degradação, o que pode ocasionar inflamações (PARK et al., 2013).

Uma propriedade significativa para a escolha do uso da quitosana em engenharia de tecidos ósseos é sua osteocondutividade e auxílio na formação óssea (LEE et al., 2014). Entretanto, a quitosana apresenta uma resistência mecânica insatisfatória (PARK et al., 2013).

3.8 *Scaffolds* de alginato e quitosana

A utilização de alginato aliado à quitosana é de grande interesse, principalmente no que diz respeito à produção de *scaffolds*, pois enquanto o alginato oferece grupos funcionais à regeneração celular, a quitosana desempenha um papel de apoio para a estrutura do *scaffold*, como demonstrou Iwasaki et al. (2004) em seu trabalho.

A combinação dos dois polímeros proporciona a ligação aniônica do alginato com as cargas positivas dos grupos amino da quitosana, criando uma forte conexão entre os dois. Esses dois polímeros formam um complexo eletrolítico, que pode ser obtido quando um polímero catiônico é misturado com um aniônico em solução

aquosa, havendo a precipitação. Ao fazer essa mistura entre soluções poliméricas ácidas com básicas, há precipitação mútua. Portanto, esse complexo eletrolítico pode ser obtido através da interação entre essas cargas opostas (SIMSEK-EGE et al., 2003). Além disso, o alginato é um polissacarídeo hidrofílico que promove pouca adsorção proteica, diferentemente da quitosana, um polissacarídeo menos hidrofílico (que o alginato) que promove boa adsorção proteica. Ou seja, ambos os materiais se completam com propriedades opostas (HU; YU, 2013; HYLAND et al., 2011). Outra vantagem que essa combinação polimérica proporciona, devido a essa ligação estável entre as cargas de ambos, é uma melhora na resistência mecânica da estrutura desenvolvida (LEE et al., 2014).

Existem diferentes estudos envolvendo a aplicação desses dois polímeros juntos para o desenvolvimento de *scaffolds* para engenharia de tecidos. Lee et al (2014) desenvolveram biocompósitos com liberação de quitosana. Li et al (2005) produziram um *scaffold* híbrido para engenharia tecidual óssea, e Baysal et al (2013) produziram hidrogéis com o objetivo de crescimento celular.

Outros estudos aliaram outros materiais a esses dois, como Sajesh et al (2013), que inseriu polipirrol no desenvolvimento de um compósito para engenharia tecidual óssea. Sowjanya et al (2013) inseriram nanosilica, e Venkatesan et al (2014) inseriram fucoidan. Já Jin et al (2012) produziram compósitos a base de hidroxiapatita, alginato e quitosana.

No caso desse trabalho além dos polímeros alginato e quitosana, foi realizado um estudo da adição do glicerol.

3.9 Glicerol

O glicerol é um triálcool composto por três carbonos (1,2,3-propanotriol). Sendo os três grupos hidroxila responsáveis por sua solubilidade em água (PAGLIARO; ROSSI, 2008).

A aplicação do glicerol como plasticizante é relevante, principalmente em sua adição a polímeros, pois aumenta a flexibilidade e melhora o comportamento de processamento do material. Isso ocorre devido à diminuição de viscosidade de fusão, módulo de Young e temperatura de transição vítrea (JOST et al., 2014).

O glicerol possui diversas aplicações na indústria, como em fármacos, cosméticos, alimentação, produção de tintas e biodiesel (BEATRIZ et al., 2011). Seu uso em aplicações biomédicas é de grande interesse, por sua capacidade em

conferir estabilidade na estrutura de materiais biológicos, principalmente funcionando como um estabilizador de enzimas (BRADBURY; JAKOBY, 1972).

Outro efeito do glicerol está relacionado com a associação e dissociação das subunidades aldeído desidrogenase. Portanto, é possível a interferência na integridade da enzima, sem alteração na estrutura das subunidades (BRADBURY; JAKOBY, 1972; VAGENENDE et al., 2009).

Portanto no presente estudo foi adicionado glicerol nos *scaffolds*, devido à suas propriedades apresentadas, principalmente no que diz respeito ao aumento da resistência mecânica do material e à capacidade de estabilizar a estrutura sob ação enzimática.

3.10 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo composto por células e pela matriz óssea, que é um material extracelular calcificado. As células que compõe o tecido ósseo são (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004):

- Osteócitos: encontrados no interior da matriz óssea, essas células achatadas são essenciais para a manutenção da matriz;
- Osteoblastos: participam da mineralização da matriz, pois são capazes de concentrar fosfato de cálcio. Além disso, sintetizam a parte orgânica da matriz (colágeno tipo I, glicoproteínas);
- Osteoclastos: são células móveis e ramificadas que funcionam como células de reabsorção óssea, onde secretam hidrolases, colagenases e ácido, dissolvendo os cristais de sais de cálcio e digerindo a matriz, dentro da zona clara, microambiente fechado de adesão da célula com a matriz óssea.

O osso faz parte do sistema músculo-esquelético juntamente com músculos, tendões, articulações e ligamentos (JAKOB et al., 2013).

A matriz óssea é constituída por componentes orgânicos, como fibras colágenas, glicoproteínas e proteoglicanas, e por componentes inorgânicos, sendo que estes representam 50% do peso da matriz, onde são encontrados íons fosfato e cálcio. A combinação de colágeno com a hidroxiapatita é responsável pela resistência e dureza do tecido ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, apresentando a função de suporte para partes moles, como os músculos, proteção dos órgãos e da medula óssea, que forma as células do sangue. Além disso, funciona como depósito de

cálcio, fosfato, mantendo a concentração desses íons nos líquidos corporais (JAKOB et al., 2013).

Há dois tipos diferentes de tecido ósseo (BOSE et al., 2013):

- Osso compacto: também pode ser reconhecido como osso cortical, representa a parte externa, sendo a camada densa, apresentando menos de 10% de porosidade;
- Osso esponjoso: também reconhecido como osso trabecular, representa a parte interna e apresenta de 50-90% de porosidade.

A hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ é o componente inorgânico de mais abundância nos ossos e dentes (ANITHA et al., 2014). Além de hidroxiapatita, o osso é constituído por colágeno. Então ele pode ser considerado um compósito natural (BOSE et al., 2012).

Tanto os ossos compactos como os esponjosos passam pelos processos de remodelação, diferenciação e reabsorção, ações comandadas pelas células que compõe o tecido ósseo, ou seja, ostoblastos, osteoclastos e osteócitos (BOSE et al., 2013).

E por apresentar uma geometria complexa, as estruturas ósseas são componentes de difícil reprodução idêntica ao natural (BOSE et al., 2012).

Um defeito ósseo pode ser definido como um problema na integridade óssea, podendo abranger microfraturas, macrofraturas, defeitos congênitos, traumas e ressecção cirúrgica. O tecido ósseo possui potencial para regenerar em um estado indistinguível daquele provindo da embriogênse, ou seja, possui a capacidade de atingir seu estado natural (SHRIVATS et al., 2014).

3.10.1 Regeneração óssea

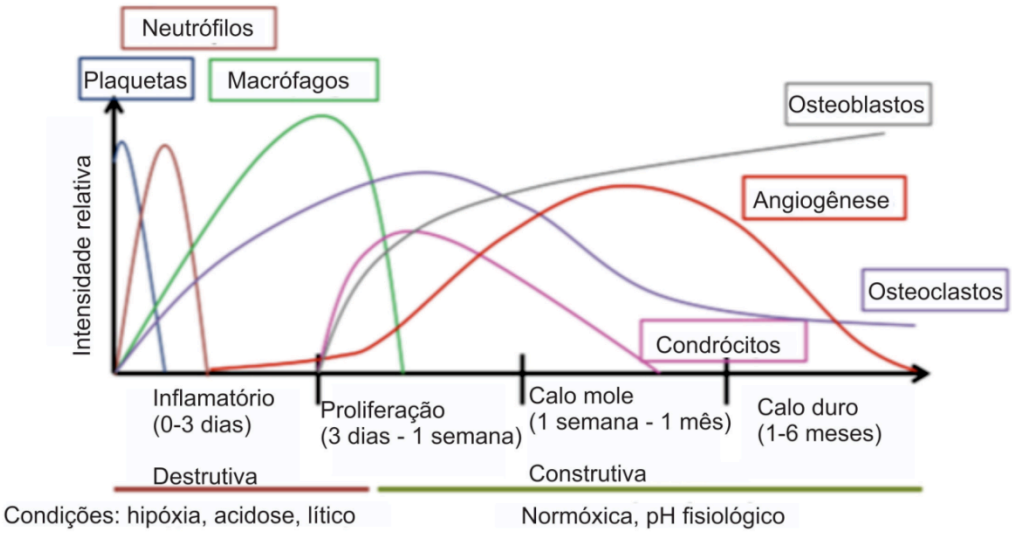
O processo de regeneração óssea consiste na formação do novo osso ao mesmo tempo em que ocorre a reabsorção do tecido já existente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). É composto por três fases: inflamatória, reparo e remodelação (SHRIVATS et al., 2014).

Quando ocorre uma fratura óssea, no local há hemorragia ocasionada pela lesão dos vasos sanguíneos, morte das células ósseas e destruição da matriz extracelular. Portanto, para que a regeneração comece, os restos celulares, da matriz e o coágulo sanguíneo devem ser retirados pela ação dos macrófagos. O primeiro evento após a fratura é a inflamação, seguida da formação de um tecido

rico em células osteoprogenitoras em torno da região fraturado, que penetram entre as extremidades rompidas do osso. Nesse local surge o tecido ósseo imaturo (desenvolvido pela ossificação endocondral de pedaços cartilaginosos e pela ossificação intermembranosa) que vai evoluindo até, após algum tempo, aparecer o calo ósseo, constituído por esse tecido ósseo imaturo que une provisoriamente as extremidades do osso fraturado. O processo de remodelação simboliza o processo de crescimento e formação do osso como sua forma original, portanto, se no período de regeneração da fratura as trações e pressões exercidas sobre o osso foram similares àquelas exercidas antes da fratura, a estrutura do osso tende a ser a mesma que a de anteriormente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SHRIVATS et al., 2014; AMINI et al., 2012).

Todo o processo regenerativo ósseo é sintetizado e relacionado quanto ao tempo conforme o esquema ilustrado no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Processo regenerativo ósseo relativo ao tempo



Fonte: SHRIVATS et al., 2014

O tempo ideal de degradação total de um material encontra-se acerca de duas a quatro semanas, baseado no esquema, pois o material deve ter sido totalmente degradado até a formação do calo mole. Se a degradação ocorre muito rapidamente, a região não apresentará força mecânica suficiente para o apoio requerido. Inversamente, se a degradação for muito demorada, a regeneração não ocorrerá (SHRIVATS et al., 2014).

Devido a essa sincronização entre a ação do material e o processo regenerativo natural do osso é de grande relevância o desenvolvimento de um *scaffold* que atenda a todas essas questões, por exemplo, não é recomendado que o material se degrade antes de uma semana, pois ele deve fornecer força mecânica suficiente para apoiar a região danificada. Portanto estudos de biodegradação se fazem necessários para simular o tempo de degradação do material em determinado período de tempo. O uso de enzimas como a lisozima é de grande interesse, por ser encontrada nos fluidos corporais (BAYRAMOGLU et al., 2015).

3.11 Lisozima

A lisozima é uma proteína (hidrolase glicosídica) abundante na clara de ovo, e está presente no corpo humano. Possui capacidade de hidrolisar a ligação β (1-4) entre a N-acetilglucosamina e a glucosamina, de acordo com a distribuição do grupo N-acetil da quitosana (HAN et al., 2012). É utilizada como agente antibacteriano, devido a suas propriedades bactericidas e bacteriostáticas, e por possuir um mecanismo de ação de decompor a parede celular bacteriana, catalisando a hidrólise das ligações β (1-4) entre os ácidos murâmico e N-acetilglicosamina, como mencionado (BAYRAMOGLU et al., 2015). Pode ser encontrada em fluidos corporais, como a saliva, a lágrima, o sérum e até mesmo em fluidos que cercam a cartilagem, como apresentado no Quadro 4 (MARTINS et al., 2008).

Quadro 4 - Concentrações de lisozima encontradas no corpo humano

Localização	Concentração (mg/L^{-1})
Sérum	7-13
Saliva	450-1230
Lágrima	450-1230

Fonte: MARTINS et al., 2008

A quitosana é um polissacarídeo que se degrada em pequenas moléculas de resíduos pela ação da lisozima, devido à sua composição, que apresenta ligações glicosídicas (CROISIER; JÉRÔME, 2013). A cinética da reação de degradação da quitosana pela enzima é inversamente relacionada com seu grau de desacetilação. Um baixo grau de desacetilação é degradado mais rapidamente comparado com um alto. Além da lisozima, a quitosana se degrada com outras enzimas, como leucina aminopeptidase, pectinase, entre outras. Em vertebrados, esse polímero é

degradado predominantemente pela lisozima (BALAN; VERESTIUC, 2014; COSTA-PINTO et al., 2014; HAN et al., 2012).

A realização de um estudo acerca a degradação enzimática de um material possui grande importância, pois além de representar uma forma de analisar a biodegradabilidade do mesmo, indica reações geradas no organismo, como no processo inflamatório algumas células, como macrófagos e neutrófilos liberam enzimas, como a lisozima (COSTA-PINTO et al., 2014).

Além de estudos de degradação, outros ensaios (térmicos, biológicos, físicos, etc) se fazem necessários para a caracterização de um material. O ensaio de Calorimetria Exploratória Diferencial é um exemplo de caracterização térmica, em que é avaliada a transferência de calor para a amostra (WENDLANDT, 1986).

3.12 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

DSC é a sigla para *Differential Scanning Calorimetry*, e sua tradução para o português é Calorimetria Exploratória Diferencial. Este ensaio acompanha a variação de energia entre a amostra e a referência. Há dois tipos de equipamentos: DSC de fluxo de calor e DSC de compensação de potência (CANEVAROLO JR., 2004).

Nesse estudo o ensaio foi realizado com o DSC de fluxo de calor, em que é medida a diferença de temperatura entre a amostra e o material de referência em um ambiente com rigoroso controle de temperatura. A amostra e a referência são colocadas em cápsulas iguais sobre um disco termoelétrico e aquecidas por uma fonte de calor.

Na DSC são detectados eventos térmicos, que podem ser de primeira e segunda ordem. Os eventos de primeira ordem simbolizam variação de entalpia (endotérmica e exotérmica) e são identificadas por meio de picos. Os picos endotérmicos podem representar fusão, perda de massa da amostra, reações de redução e dessorção. Os picos exotérmicos podem representar cristalização, reações de polimerização, oxidação, degradação oxidativa, entre outros. A entalpia correponde à energia em forma de calor trocada pelo sistema. As transições de segunda ordem simbolizam uma variação calorífica sem variação de entalpia e são representadas em forma de S na linha base, tendo como exemplo de evento característico a transição vítrea. (CANEVAROLO JR., 2004).

Alguns fatores podem afetar as curvas de DSC, como fatores instrumentais e

características da amostra. Como fatores instrumentais podem ser citados (WENDLANDT, 1986):

- Taxa de aquecimento: quando esta é lenta, há melhor separação dos eventos, apresentando picos menores e mais largos, e quando é rápida, há baixa resolução de eventos, com picos mais finos e maior amplitude;
- Atmosfera do forno: quando esta é estática, ou seja, sem gás fluente, a temperatura dos eventos é mais alta em comparação com uma atmosfera dinâmica, há acúmulo de voláteis sobre a amostra e a atmosfera é de difícil reprodução. E quando é dinâmica, ou seja, com gás fluente sobre a amostra, a composição da atmosfera do forno é mantida constante, devido ao arrastamento dos voláteis para fora da célula de DSC;
- Tipo de gás fluente: quando são inertes, ou seja, N_2, He ou Ar, funcionam como gás de arraste, e quando são reativos, ou seja, ar, O_2 ou H_2, há interação do gás com a amostra;
- Condutividade térmica do gás de arraste: quando esta é alta, ou seja, com He ou H_2, os picos apresentam melhor resolução e área menor, e quando é baixa, ou seja, como N_2 ou Ar, tanto a sensibilidade como a área dos picos é aumentada.

  E como características da amostra, tem-se (WENDLANDT, 1986):
- Massa: quando pequena é possível combinar com razões de aquecimento mais altas e a resolução de picos muito próximos é melhorada. E quando grande, os picos maiores tem menor resolução e há deslocamento dos picos para temperaturas mais altas;
- Forma: podem ser encontradas como pó, fibras, pasta e corpo único. A vantagem da utilização de fibras se dá pela melhora do contato entre a cápsula e o setor, aumentando a sensibilidade.

3.13 Termogravimetria – TG

A termogravimetria é uma técnica cuja mudança de massa do material estudado é medida em função da temperatura por meio de uma programação controlada (CANEVAROLO JR., 2004). Pode ser utilizada para o estudo de condições físicas, como a evaporação de um componente, e químicas, como a degradação térmica, que causem a perda de gases voláteis (PRICE et al., 2000).

A partir das curvas termogravimétricas podem ser analisados dados relativos à decomposição dos materiais, sendo que cada polímero apresenta sua característica particular, podendo ser encontradas pequenas variações nos termogramas, na estrutura, composição química ou arquitetura molecular dos elementos. Por exemplo, comumente o *onset* da perda de massa, ou seja, o início da curva que indica a perda de massa do material, refere-se ao maior limite da estabilidade térmica do mesmo (KITTUR et al., 2002).

3.14 Ensaio de absorção de água e perda de massa

A avaliação da capacidade de absorção de um material é muito importante, pois essa habilidade é responsável pela expansão da matriz polimérica, modificando e aumentando o tamanho dos poros e assim criando uma variação da morfologia do *scaffold*. Quando o inchamento ocorre em excesso, o *scaffold* tende a ficar mais flexível, podendo levar ao seu colapso (KAVYA et al., 2013). Além disso, a avaliação da perda de massa também auxilia a mensurar a biocompatibilidade de um material, pois está relacionado com o seu caráter hidrofílico, maleabilidade, flexibilidade e baixa tensão interfacial com os tecidos e fluidos ao redor (VALENTE et al., 2012).

A capacidade de absorção é também um parâmetro da performance do material na absorção dos fluidos corporais e transmissão de nutrientes (LEE et al., 2014). Essa difusão de nutrientes indica um parâmetro importante, pois a estrutura porosa formada, principalmente em função da atividade das enzimas presentes no corpo humano irá permear a condição de penetração das células dentro dos *scaffolds* (MARTINS et al., 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Foi utilizado o alginato, um produto comercial (Sigma Aldrich, St. Louis USA), em forma de pó branco, com viscosidade entre 20.000 – 40.000 cps.

A quitosana utilizada neste estudo é um produto comercial (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), procedente da purificação de quitina extraída de cascas de caranguejos com no mínimo 85% de desacetilação. Todos os solventes utilizados neste estudo foram de grau analítico.

4.2 Preparo das fibras

4.2.1 Fibras de alginato com solução de NaOH sem e com glicerol

O gel para a produção das fibras de alginato foi preparado solubilizando-se 5% (m/v) de alginato de sódio em 100 mL de hidróxido de sódio 0,1 M. Foram separados 50 g do gel para adição de 1,25 g de glicerol. A extrusão das fibras foi por meio de fiação úmida realizada em uma solução de precipitação contendo cloreto de cálcio 2% (m/v) utilizando seringas hipodérmicas de polipropileno, ponta Luer-lock, capacidade 10 mL, graduada, 25 x 7 mm e agulha Ø 0,6 x L 2,5 mm. As fibras foram mantidas na solução por 24 h, sendo posteriormente lavadas com água destilada.

Após a produção do gel foi realizada a determinação de seu pH. O pH do gel de alginato sem glicerol foi de 13,04 e do gel de alginato com glicerol foi de 13,02, Foi realizada a neutralização do pH das fibras de alginato após sua produção. No processo de neutralização foi adicionada gota a gota uma solução de ácido acético 2% até a obtenção do pH 7.

4.2.2 Fibras de quitosana sem e com glicerol

O gel para produção das fibras de quitosana foi preparado solubilizando a quitosana em ácido acético a 2% (v/v) e mantido sob agitação por 24 horas). Após este período de tempo o gel foi filtrado utilizando-se uma bomba a vácuo. Foram separados 50 g do gel para adição de 1,25 g de glicerol. A extrusão das fibras ocorreu por meio de fiação úmida em uma solução de precipitação contendo 300 mL sulfato de sódio 0,5 M, 100 mL hidróxido de sódio 1 M e 600 mL água destilada, utilizando seringas hipodérmicas de polipropileno, ponta Luer-lock, capacidade 10 mL, graduada, 25 x 7 mm e agulha Ø 0,6 x L 2,5 mm). As fibras foram mantidas na solução por 24 h, e colocadas em uma solução de metanol 50%, onde ficaram por

mais 2 h e depois foram lavadas com água destilada.

Após a produção do gel foi realizada a determinação de seu pH. O pH do gel de quitosana sem glicerol foi de 5,76 e o do gel de quitosana com glicerol foi de 6,29.

4.2.3 Fibras híbridas sem e com glicerol

As fibras híbridas foram preparadas a partir do gel de alginato (item 4.2.1). O revestimento ou também chamado de *coating* de quitosana ocorreu com a extrusão das fibras que foi realizada em uma solução de precipitação contendo 50% de cloreto de cálcio a 2% (m/v) e 50% de gel de quitosana 0,02% (m/v) diluído em ácido acético 2% (m/v). A produção foi realizada por meio de fiação úmida, técnica com seringa (seringas hipodérmicas de polipropileno, ponta Luer-lock, capacidade 10 mL, graduada, 25 x 7 mm e agulha Ø 0,6 x L 2,5 mm). As fibras híbridas foram mantidas na solução de precipitação durante 24 h. Após esse periodo permaneceram por mais 2 h em uma solução de metanol 50%. Ao término deste tempo as fibras foram lavadas com água destilada.

Em todos os casos, parte das fibras produzidas com alginato, quitosana e hibridas foram enroladas em cones de polipropileno, secas a temperatura ambiente e caracterizadas quanto aos ensaios mecânicos (item 4.3) e parte foram utilizadas para produção dos *scaffolds* e caracterizadas quanto à viabilidade celular (item 4.6), DSC/TG (item 4.8), absorção de água e perda de massa (item 4.9), estudo de bioineralização (item 4.10) e estudo de degradação (item 4.11).

4.3 Ensaios mecânicos

A resistência mecânica e módulo das fibras foi avaliada em um equipamento *Instron* 5569, certificado de calibração: DNM-01, com célula de carga de 10 N, de acordo com a norma ASTM D5024-95-A. O ensaio foi realizado no Laboratório da Escola de Artes, Ciências e Humanidas, EACH-USP.

4.3.1 Determinações do título das fibras

O título é uma relação utilizada para expressar o diâmetro dos fios. Este é representado por um número que expressa à relação entre a massa do fio e seu comprimento (MALUF; KOLBE, 2003). Para determinação do título das fibras. As fibras foram acondicionadas a temperatura de 20 ºC ± 2 e umidade relativa de 65 ± 4

por um período de 24 h, segundo a norma ISO 5084:1996. Depois desse período foram cortadas 20 amostras para cada tipo de fibra de alginato, quitosana e hibridas com 30 cm de comprimento, medidas em uma régua graduada e elas foram pesadas em uma balança analítica (AUW220D, Shimadzu). Para o cálculo do título, foi utilizada a Equação 1.

$$Ttex = \frac{m}{L} \times 1000$$

(Equação 1)

Em que:

m= massa individual da meada condicionada, em gramas;

L= comprimento individual da meada, em metros;

Os sistemas mais usuais para expressar o título são (MALUF; KOLBE, 2003):

- g/polegada – dado pelo aparelho *Micronaire*;
- dtex – g/10.000 m de fibras;
- den – g/9.000 m de fibras;

4.3.2 Ensaio da carga de ruptura das fibras

Este ensaio consiste em fixar um dado comprimento de fibra nas garras de um dinamômetro, acioná-lo até a ruptura da fibra e registrar a carga e o alongamento de ruptura. Para determinação da carga de ruptura das fibras foram utilizadas 20 amostras de cada tipo de fibra com o título conforme item 4.3.1. Os corpos-de-prova foram acondicionados à temperatura de 20 C ± 2 e umidade relativa de 65 ± 4 por um período de 24 h. Os testes foram realizados de acordo com a norma ASTM D 3822 (2007) em um equipamento Instron (modelo 5569, Norwood-MA, USA) com célula de carga de 10 N, velocidade de separação da garra móvel de 100 mm/min e distância entre as garras de 200 mm. Efetuou-se a leitura a partir do rompimento dos corpos-de-prova.

4.3.3 Tenacidade das fibras

A tenacidade das fibras é representada pelo quociente da carga de ruptura pelo título de ruptura de fibras ou fios. Determina-se sua carga de ruptura e divide-se este valor pelo título da fibra, obtendo-se a sua tenacidade, que é praticamente independente de seu título ou finura (MALUF; KOLBE, 2003). Para determinação da

tenacidade das fibras foram cortadas 20 amostras de 30 cm medidas em uma régua graduada e pesadas em uma balança analítica (AUW220D, Shimadzu).

4.4 Preparo dos *scaffolds*

4.4.1 *Scaffolds* produzidos à partir das fibras de alginato, quitosana e híbridas

Na preparação dos *scaffolds* foram utilizados dois tipos diferentes de moldes, ambos com dimensões externas de 8,54 x 12,76 cm. O molde para produção de estruturas grandes correspondia à placa de cultura de células de 12 poços e apresentava um diâmetro e profundidade de aproximadamente 15 mm por poço. O molde para produção de estruturas pequenas correspondia à placa de cultura de células de 96 poços com profundidade dos poços de 6,4 mm. Foram testadas quatro metodologias de secagem para a a produção dos *scaffolds*. As fibras previamente preparadas foram pesadas em aproximadamente 0,2550 g e submetidas aos diferentes métodos de secagem (Tabela 2):

Tabela 2 - Metodologias de secagem dos *scaffolds*

Metodologia	Descrição
1	Secagem em ambiente fechado e em temperatura ambiente por 24 h
2	Secagem em estufa à 25ºC por 24 h
3	Secagem em estufa à 45ºC por 24 h
4	Congelamento em *ultrafreezer* à -67ºC por aproximadamente 2 h seguido de liofilização à -30ºC por 65-70 h em um liofilizador L101, Liotop

A metodologia 4 da Tabela 2 que utiliza a técnica de congelamento em *ultrafreezer* à -67°C por aproximadamente 2 h, seguido de liofilização à -30°C foi selecionada para reprodução dos novos *scaffolds*.

Os *scaffolds* produzidos nos moldes grandes foram caracterizados quanto à viabilidade celular (item 4.6), DSC/TGA (item 4.8) e absorção e perda de massa (item 4.9). Enquanto que os *scaffolds* produzidos em moldes pequenos foram caracterizados quanto à biomineralização (item 4.10), degradação com lisozima (item 4.11) e MEV/EDS (item 4.7).

O processo de secagem por congelamento em *ultrafreezer* e liofilização foi realizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas FCF/USP.

4.5 Microscopia óptica

A análise foi realizada em estéreo-microscópio (Leica, modelo MS5, Alemanha) acoplado a vídeo-câmara de captação digital de imagens (Vista, Protos IV, modelo VPC 122/CH, 1/2'' CCD, Grã-Bretanha). As ampliações correspondem a 20 e 32x. As imagens foram captadas e processadas pelo sistema Video Analyser 2000 code 250 (Mesdan, Itália).

4.6 Cultura de células

4.6.1 Cultivo e expansão dos fibroblastos (NIH3T3)

Para esse estudo foram utilizados fibroblastos da linhagem NIH3T3 (ATCC). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco – *Gibco®)* suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino - *NUTRICELL*), e incubadas em estufa a 37ºC contendo 5% de CO_2. Após atingirem a subconfluência, as células foram repicadas utilizando-se a enzima tripsina, responsável por dissociar as células do frasco de cultura (0,25% tripsina, 1 mM EDTA- *Sigma-Aldrich®*), mantidas por 5 minutos na estufa de CO_2 a 37ºC, em seguida a tripsina foi inativada com meio de cultura DMEM com 10% SFB . As células foram transferidas para um tubo falcon de 15 ml (TPP® - Techno Plastic Products) e centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos a 4ºC. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em um novo meio DMEM com 10% SFB. Após isso, fez-se a contagem celular por meio do protocolo do azul de tripan. Este corante é responsável por corar as células inviáveis. Posteriormente, as células foram utilizadas para os ensaios experimentais.

4.6.2 Preparo dos grupos experimentais

Nesse experimento foram utilizados 6 grupos experimentais correspondentes aos *scaffolds* (Grupo I – *Scaffold* híbrido com glicerol; Grupo II – *Scaffold* híbrido sem glicerol; Grupo III – *Scaffold* quitosana com glicerol; Grupo IV – *Scaffold* quitosana sem glicerol; Grupo V – *Scaffold* alginato com glicerol; Grupo VI – *Scaffold* alginato sem glicerol), além dos grupos controles positivo (10% de soro) e negativo (1% de soro).

Seguindo as recomendações da ISO nº 10.993-5, as concentrações usadas para o experimento foram de 10 mg do extrato (amostra) por 1 mL de DMEM 10% SFB. As amostras foram adicionadas no meio DMEM 10% SFB (proporção de

10mg/1mL) e incubados em estufa à 37ºC por 24 h. Dos extratos obtidos foram usados os extratos brutos e os grupos experimentais foram divididos conforme mostra a Tabela 3.

Além dos grupos experimentais, foram realizados os grupos controle positivo (Meio DMEM 10% SFB) e controle negativo (Meio DMEM 1% SFB). Todos os experimentos foram realizados em octuplicatas.

Tabela 3 - Divisão dos grupos experimentais

Grupos	Tipo
I	*Scaffold* híbrido com glicerol
II	*Scaffold* híbrido sem glicerol
III	*Scaffold* quitosana com glicerol
IV	*Scaffold* quitosana sem glicerol
V	*Scaffold* alginato com glicerol
VI	*Scaffold* alginato sem glicerol
Controle positivo	Meio DMEM 10% SFB
Controle negativo	Meio DMEM 1% SFB

4.6.3 Análise da viabilidade celular

4.6.3.1 Plaqueamento celular

Para os ensaios de viabilidade foram plaqueadas $2x10^3$ células/poço em placas de 96 poços. Após incubação por 24h, o meio de cultivo foi substituído por meio DMEM complementado por 10% de SFB e condicionado com os *scaffolds*. Cada placa foi analisada em um tempo experimental de 24 e 48 horas após a adição do meio condicionado. Após cada período experimental, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e em seguida foi realizado o ensaio de redução do MTT e Cristal violeta.

4.6.4 Redução do MTT

A análise da atividade mitocondrial das células foi realizada pelo método da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio) (MOSSMAN, 1983). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e, então, sua concentração pode ser determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro. Em cada período experimental (24 e 48 horas) as células foram lavadas com PBS, em seguida as células foram incubadas numa solução de 0,5 mg de MTT para 1 mL de DMEM sem SFB, essa solução foi preparada no momento do seu uso e foi filtrada em filtro *Millipore* (0,22 µm) antes de ser adicionado nas placas.

Após esse procedimento, as placas foram deixadas por 4h a 37°C; em seguida removeu-se a solução, o pigmento insolúvel reduzido intracelularmente foi extraído em DMSO (dimetilsulfóxido) e deixado em temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, a absorbância foi mensurada a 562 nm (*LEITORA SYNERGY H1 MONOCHROMATOR-BASED BIOTEK*).

4.6.5 Cristal Violeta

Em cada período experimental (24, 48 e 72 horas), os meios de cultura de todos os grupos experimentais foram removidos, as células foram lavadas duas vezes com PBS e em seguida foi adicionado metanol 100% durante 10 minutos. Após esse período retirou-se o metanol e adicionou-se a solução de cristal violeta 0,2% em etanol 20% por 3 minutos. Em seguida removeu-se a solução e lavou-se novamente duas vezes os poços com PBS para remover o excesso do corante. Por fim, acrescentou-se a solução de citrato de sódio 0,05 $mol.L^{-1}$ com etanol 50% durante 10 minutos. A absorbância foi determinada a 540nm (*LEITORA SYNERGY H1 MONOCHROMATOR-BASED BIOTEK*).

Para o ensaio de Cristal Violeta o cálculo da proporção de amostra e meio de cultura utilizados, foi realizada uma adaptação da ISO nº 10.993-5 (100mg/mL). E foram Utilizados 10mg/ml de meio de cultura DMEM a 10% SFB, devido ao peso das amostras. A Linhagem celular utilizada foi NIH3T3.

4.6.6 Análise dos resultados dos ensaios de viabilidade celular

As análises estatística dos ensaios MTT e Cristal Violeta foram feitas no *software GraphPad Prism 4* selecionando o teste estatístico *one-way* ANOVA, pós-teste Tukey, com indicação de $p<0,05$.

As análises de viabilidade celular foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade de São Paulo.

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Análises por Dispersão de Energia (EDS)

As amostras de *scaffolds* com e sem proliferação de células foram avaliadas por MEV e EDS. As amostras foram colocadas em um suporte com fita de carbono e revestidas com platina. Foi utilizado um microscópio Quanta 600 FEG da marca FEI do Laboratório de Caracterização Tecnológica LCT do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. A amplitude utilizada para a análise das foi de 50 a 5000 vezes.

4.8 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC e Termogravimetria – TGA

Foram pesadas 2 mg das amostras de *scaffold* que foram colocadas em porta amostra de alumínio hermeticamente fechados e submetidas a análise em Calorímetro de Varredura DSC 7020 (Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão) com atmosfera de nitrogênio de 50 mL min^{-1} e na razão de aquecimento de 10 °C min^{-1}, na faixa de temperatura de 25 a 350°C. O elemento químico Índio foi utilizado como padrão para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

A Termogravimetria foi realizada por meio da termobalança TG/DTA 7200 (Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão) com atmosfera de nitrogênio de 100 mL min^{-1}, utilizando uma massa de amostra de *scaffold* com cerca de 3,5 mg, acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a 600ºC, na razão de aquecimento de 10°C min^{-1}. Antes dos ensaios, foi verificada a calibração do instrumento empregando-se um padrão de oxalato de cálcio.

4.9 Ensaios de absorção e perda de massa

4.9.1 Ensaio de absorção e perda de massa em solução de PBS

O ensaio foi realizado em triplicata com os *scaffolds* de alginato, híbridos e de quitosana sem e com glicerol. Foram pesados em aproximadamente 0,1000 g e imersos em 10 mL de solução tampão de PBS (*Phosphate Buffer-saline*), contendo os compostos apresentados na Tabela 4:

Tabela 4 - Composição da solução PBS

Composição	Quantidades
Na_2HPO_4	1,44 g
KH_2PO_4	0,24 g
KCl	0,2 g
NaCl	8 g
H_2O destilada	800 mL

Os frascos com as amostras foram selados com parafilme e colocados em um banho com agitação (60 rpm) a 37°C. Após os períodos de tempo determinados (1, 3, 5, 7, 15, 21, 30 dias) as amostras foram removidas e determinadas suas massas.

Ao fim de cada teste as amostras foram submetidas à secagem a 40°C e novamente pesadas para se determinar a massa seca final.

4.9.2 Ensaio de absorção e perda de massa em água

O ensaio foi realizado em triplicata com os *scaffolds* de alginato, híbridos e de quitosana sem e com glicerol. Foram pesados com aproximadamente 0,1000 g e imersos em 10 mL de H_2O destilada. Os frascos com as amostras foram selados com parafilme e colocados em um banho com agitação (60 rpm) a 37°C. Após os períodos de tempo determinados (1, 3, 5, 7, 15, 21, 30 dias) as amostras foram removidas e determinadas suas massas.

Ao fim de cada teste as amostras foram submetidas à secagem a 40°C e novamente pesadas para se determinar a massa seca final.

4.9.3 Análise dos dados de absorção e perda de massa

A quantidade de água absorvida foi calculada pela equação 2:

$$\%\ \text{água absorvida} = \left(\frac{mw - mi}{mi}\right) \times 100$$

(Equação 2)

Em que:

mi = massa inicial da amostra;

mw = a massa da amostra úmida.

A perda de massa foi calculada segundo a equação 3:

$$\% \text{ perda de massa} = \left(\frac{mi - mf}{mi}\right) \times 100$$

(Equação 3)

Em que:

mf = massa final da amostra após a secagem;

mi = massa inicial da amostra.

4.10 Estudo de biomineralização

O ensaio de biomineralização foi realizado em triplicata com os *scaffolds* de alginato, híbridos e de quitosana sem e com glicerol. Para este ensaio foi utilizada a solução simulada de fluidos corporais (SBF), contendo os compostos descritos na Tabela 5:

Tabela 5 - Composição da solução simulada de fluidos corporais - SBF

Composição	Quantidades
NaCl	16,072 g
$NaHCO_3$	0,704 g
KCl	0,450 g
$K_2HPO_4.3H_2O$	0,460 g
$MgCl_2.6H_2O$	0,622 g
$CaCl_2$	0,586 g
Na_2SO_4	0,144 g
TRIS	12,236 g
HCl	75 mL

Ao longo dos anos, a solução SBF passou por vários ajustes e, neste estudo, foi utilizada a solução de SBF corrigida (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). A formação de hidroxiapatita está associada à capacidade de osseointegração de um material. A norma ISO 23.317 indica a solução SBF corrigida para a análise da capacidade de formação de hidroxiapatita *in vitro*, na superfície de materiais implantáveis (SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011). O ensaio foi realizado em triplicata e as amostras foram pesadas e colocadas individualmente em tubos de Falcon e adicionados 10 mL da solução SBF. As amostras foram acondicionadas a 37°C e retiradas em 1, 3, 5, 7, 15, 21 e 30 dias. As amostras retiradas permaneceram por 24 h a 40°C.

Para verificação da formação de hidroxiapatita foi realizada a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) (item 4.7).

4.11 Estudo de degradação da quitosana em solução PBS contendo lisozima

Para investigar a influência da enzima lisozima nas propriedades físico-químicas dos *scaffolds* de quitosana e híbridos sem e com glicerol, as estruturas pesando aproximadamente 0,0100 g foram incubadas em tampão PBS (*Phosphate buffer solution*) pH 7,4 ± 0,02 contendo a enzima lisozima (EC 3.1.2.17, *chicken egg white*, 40000 U/mg, Sigma) a 37°C por diferentes períodos de tempo (1, 3, 5, 7 e 10 dias) sob condições estáticas. O ensaio foi realizado em triplicata e a concentração da enzima lisozima utilizada nesse estudo foi de 13 mg/L, correspondente à concentração encontrada no sérum humano, e a mesma utilizada no estudo de Martins et al (2008).

Foi determinada a concentração de açúcares redutores pelo método DNS (GHOSE, 1987), de acordo com o item 4.11.1. A capacidade de absorção e perda de massa também foram determinadas conforme descrito no item 4.9.3.

4.11.1 Determinação dos açúcares redutores pelo método DNS

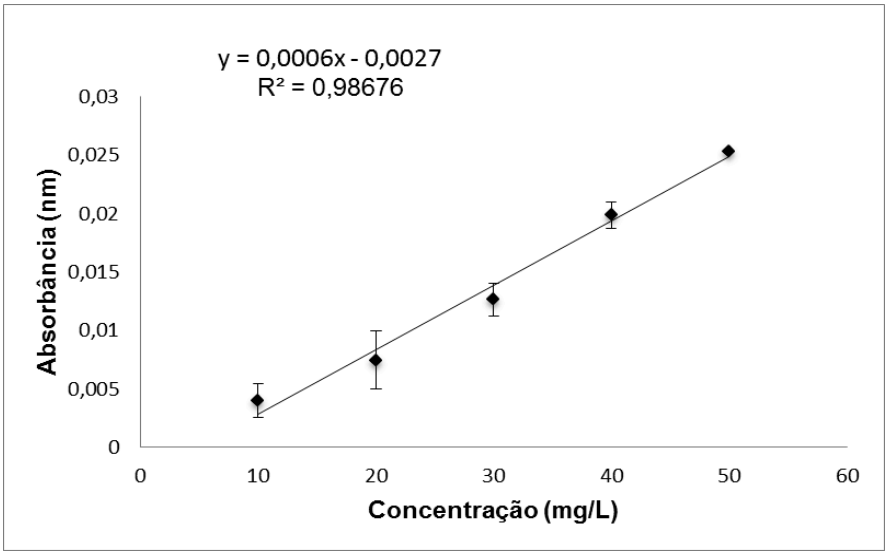
A solução de DNS foi preparada com 2,5 g de ácido 3,5-dinitrosalisílico dissolvidos em 50 mL de NaOH 2 N e 125 mL de água destilada. A solução permaneceu em banho-maria a 80ºC para solubilização. Foram adicionados 75 g de tartarato duplo de sódio e potássio (sal de La Rochelle) e permaneceu sob agitação até a completa dissolução do sal. A solução foi transferida para um balão de 250 mL e o volume foi completado com água destilada e armazenada em frasco escuro. A curva padrão (Gráfico 4) foi obtida pela diluição de solução de glicose 100 mg/L nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L por meio dos pontos para cálculo da equação da reta (Equação 4).

Para a leitura das amostras (em triplicata), foram pipetadas 750 µL de tampão de fosfato (branco) e de cada uma das concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 mg/L) em tubos de ensaio. Em cada tubo foi adicionado 500 µL de DNS e levados a banho-maria à 100ºC por 5 min. Após os 5 min., foram adicionados 5 mL de água destilada em cada um dos tubos e a mistura foi agitada em Vortex. A leitura das amostras foi realizada a 540 nm no espectrofotômetro (Beckman).

$$C(mg/L)=\frac{ABS-0,0027}{0,0006}$$

(Equação 4)

Gráfico 4 - Curva padrão de glicose para determinação da concentração de açúcares redutores



Após os períodos de tempo determinados, para a leitura das amostras (em triplicata) foram pipetados em cada tubo 750 µL de solução de amostra, foram adicionados 500 µL de DNS e levados a banho-maria à 100ºC por 5 min. Após os 5 min., foram adicionados 5 mL de água destilada em cada um dos tubos e a mistura foi agitada em Vortex. A leitura das amostras foi realizada a 540 nm no espectrofotômetro (Beckman).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tenacidade das fibras

As propriedades mecânicas das fibras são de grande valor para o entendimento do comportamento das mesmas e de seu desempenho no produto final. A avaliação da tensão, ou seja, o seu comportamento sob forças e deformações aplicadas ao longo de seu eixo é uma das características mais importantes em relação às propriedades mecânicas (MORTON; HEARLE, 2008).

Os valores obtidos com as fibras produzidas podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores das propriedades mecânicas das fibras, com desvio-padrão

Fibras	Título (tex)	Carga de ruptura (N)	Tenacidade (cN/tex)	Tensão de ruptura na quebra (%)	Módulo (N/tex)
Alginato	22,3 ± 0,98	1,63 ± 0,11	7,25 ± 0,51	4,89 ± 2,43	4,77 ± 0,49
Alginato com glicerol	17,1 ± 0,63	1,35 ±0,25	7,77 ± 1,39	5,41 ± 0,45	5,02 ± 0,45
Quitosana	17,2 ± 0,7	0,77 ± 0,05	4,47 ± 0,28	1,45 ± 0,97	4,16 ± 1,01
Quitosana com glicerol	17,2 ± 0,65	1,49 ± 0,08	8,64 ± 0,51	4,25 ± 2,83	5,55 ± 0,41
Híbrida	23,4 ± 1,8	2,23 ± 0,24	9,97 ± 0,99	6,86 ± 1,32	5,64 ± 0,94
Híbrida com glicerol	20,9 ± 2,01	2,09 ± 0,12	10 ± 0,58	6,58 ± 1,91	5,73 ± 0,64

As fibras de alginato apresentaram tenacidade de 7,25 cN/tex, enquanto as de alginato com glicerol apresentaram uma pequena variação, ficando em 7,77 cN/tex, ou seja, o uso do glicerol melhorou em 6,6% a tenacidade das fibras de alginato.

As fibras de quitosana obtiveram um valor de tenacidade de 4,47 cN/tex, e as fibras de quitosana com glicerol 8,64 cN/tex. Nesse caso, o uso do glicerol melhorou em 48,3% a tenacidade das fibras de quitosana.

As fibras híbridas apresentaram um valor de tenacidade de 9,97 cN/tex, enquanto as híbridas com glicerol, 10 cN/tex. Comparando com as fibras de alginato e quitosana, as fibras híbridas apresentaram valores de tenacidade superiores 27,3% e 55,2%, respectivamente. E em relação às fibras de alginato e quitosana

com glicerol, as fibras híbridas com glicerol apresentaram valores de tenacidade superiores em 22,3% e 13,6%, respectivamente. Portanto os resultados mostraram que a fibra híbrida apresenta uma melhora no desempenho de tenacidade do que as fibras obtidas dos polímeros utilizados sozinhos.

De acordo com os valores de tenacidade observados na literatura por Niekraszewicz; Niekraszewicz (2009), o alginato apresenta tenacidade variando de 11-18 cN/tex, com 5% de alongamento e a quitosana apresenta de 10-15 cN/tex de tenacidade, com 10% de alongamento. Esses valores podem variar em função da fonte do polímero utilizado e processos de produção.

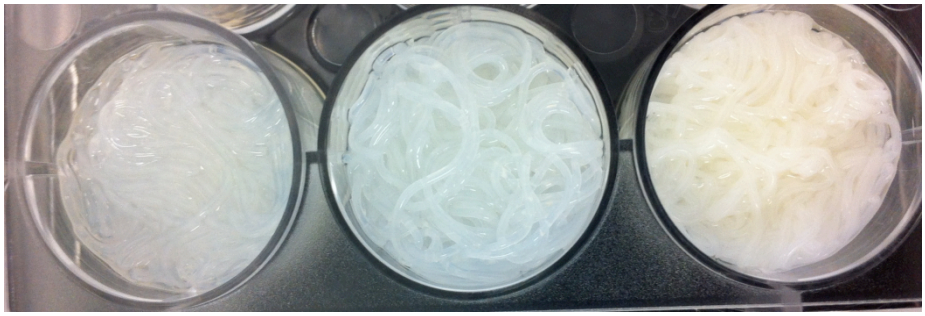
5.2 Preparo dos *scaffolds*

De acordo com as quatro metodologias de secagem descritas na Tabela 2, utilizadas para o desenvolvimento de *scaffolds* à base de alginato, quitosana e híbrido, foram obtidos os resultados:

- Metodologia 1: Secagem à temperatura ambiente por 24 h

Após o período de 24 h a temperatura ambiente, as estruturas acomodadas no molde não secaram. As fibras ainda apresentaram muita umidade na estrutura. E, após dois dias mantidas sob as mesmas condições, a situação não foi alterada, ou seja, as estruturas não secaram, como mostra a Figura 6. Os *scaffolds* também não apresentaram mudança de tamanho, devido à secagem incompleta.

Figura 6 - Metodologia de secagem à temperatura ambiente: *scaffold* à base de alginato (a); *scaffold* híbrido (b); *scaffold* à base de quitosana (c) em molde de 15 mm de profundidade



(a) (b) (c)

- Metodologia 2: Secagem na estufa à 25ºC por 24 h

Após o período de 24 h na estufa à 25ºC as estruturas acomodadas no molde não secaram, como pode ser observado na Figura 7. As fibras ainda apresentaram umidade na estrutura. Devido à secagem incompleta dos *scaffolds*, estes não apresentaram mudança na coloração, comparados com as estruturas secas à 45ºC. E em relação ao peso, houve uma diminuição da massa dos *scaffolds* de 30 – 50% após secagem.

Figura 7 - Metodologia de secagem à 25ºC: *scaffold* à base de alginato (a); *scaffold* híbrido (b); *scaffold* à base de quitosana (c) em molde de 15 mm de profundidade

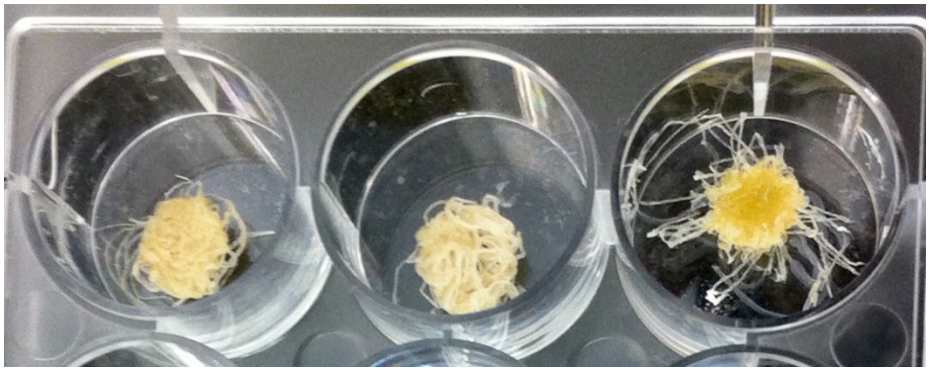
(a) (b) (c)

- Metodologia 3: Secagem na estufa à 45ºC

Após o período de 24 h na estufa à 45ºC, as estruturas secaram, mas se apresentaram quebradiças, como pode ser observado na Figura 8. As fibras se condensaram no interior da estrutura e algumas fibras secas ficaram remanescentes. A estrutura de quitosana em comparação com as outras de alginato e híbrida não manteve a integridade das fibras, sendo que as mesmas se agruparam no interior do *scaffold*, formando uma camada achatada de polímero.

Todos os *scaffolds* tiveram uma diminuição de aproximadamente 90 a 150% no peso das estruturas após a secagem, comparando com as fibras recém colocadas no molde, e apresentaram coloração amarelada.

Figura 8 - Metodologia de secagem à 45ºC: *scaffold* à base de alginato (a); *scaffold* híbrido (b); *scaffold* à base de quitosana (c) em molde de 15 mm de profundidade



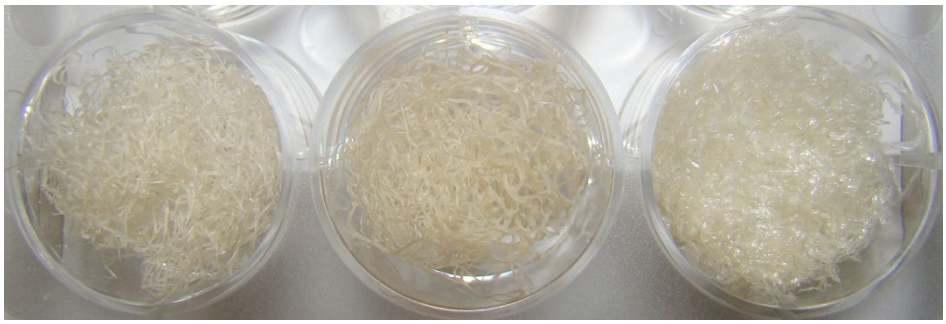
(a) (b) (c)

- Metodologia 4: Congelamento em *ultrafreezer* à -67ºC seguido de liofilização

Após a liofilização, os *scaffolds* tiveram uma diminuição no peso em aproximadamente 250a 300%, ou seja, essas estruturas ficaram mais leves comparadas às estruturas secas à 45 ºC. As fibras mantiveram sua integridade intacta e se moldaram de acordo com a estrutura do poço da placa de cultura de células, como apresenta a Figura 9.

Quando comprimidas manualmente, as estruturas apresentaram um toque suave e menos áspero, diferentemente das outras.

Figura 9 - Metodologia de congelamento em *ultrafreezer* e liofilização: *scaffold* à base de alginato (a); *scaffold* híbrido (b); *scaffold* à base de quitosana (c) em molde de 15 mm de profundidade



(a) (b) (c)

Dentre as metodologias testadas, as estruturas que obtiveram melhor resultado foram aquelas que passaram pelo processo de congelamento e liofilização. Os *scaffolds* ficaram no formato modelado e as fibras não sofreram nenhum tipo de dano. Ambos os processos a 25ºC e a temperatura ambiente os *scaffolds* não secaram. E as estruturas secas na estufa a 45ºC comparadas com o

processo de congelamento e liofilização ficaram mais quebradiças e apresentaram um formato mais achatado, diferentemente das estruturas do outro processo, onde a integridade das fibras não foi alterada.

A utilização da metodologia de secagem na estufa foi anteriormente utilizada por Malafaya et al. (2005), onde foram produzidos compósitos à base de microesferas de quitosana. Após o desenvolvimento das partículas, as mesmas foram moldadas e passaram por um período de secagem de 72 horas em uma estufa a 50ºC. Outro estudo que utilizou essa metodologia de secagem foi realizado por Costa Jr. (2008) em que hidrogéis de quitosana/PVA foram desenvolvidos realizando uma secagem inicial de 48 horas em temperatura ambiente e secagem final a 40ºC em uma estufa por 24 horas. Além disso, nos trabalhos desenvolvidos por Liuyun et al. (2009) e Liu et al. (2012), foram utilizadas as duas metodologias: *freeze drying* e secagem à estufa. No primeiro, foram desenvolvidos compósitos à base de nanohidroxiapatita/quitosana/carboximetilcelulose, e no outro, *scaffolds* de quitosana e colágeno reticulados com glutaraladeído.

Em relação à metodologia de secagem por congelamento em *ultrafreezer* e liofilização, há grande utilização da mesma, sendo considerada a metodologia tradicional de produção de *scaffolds* (SAJESH et al., 2013; SOWJANYA et al., 2013; VENKATESAN et al., 2015)

Foram desenvolvidos dois tipos de *scaffolds* (molde grande, correspondendo à 15 mm de profundidade, e pequeno, correspondendo à 6,4 mm de profundidade) com a metodologia de secagem por congelamento em *ultrafreezer* e liofilização. Os resultados das estruturas podem ser observados por meio da microscopia óptica realizada nas Figuras 10 e 11.

Figura 10 –*Scaffolds* de alginato sem glicerol (a), alginato com glicerol (b), híbrido sem glicerol (c), híbrido com glicerol (d), quitosana sem glicerol (e) e quitosana com glicerol (f) em foto digital e Microscopia óptica com ampliação de 20x produzidos em molde de 15 mm de profundidade

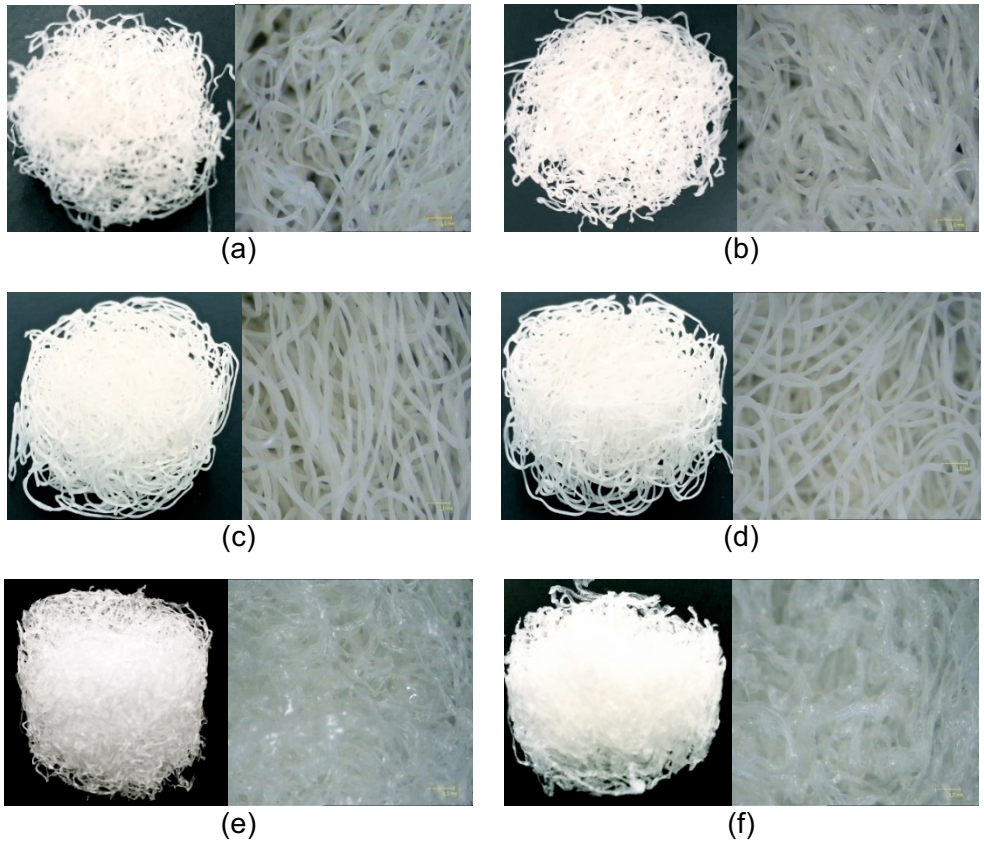
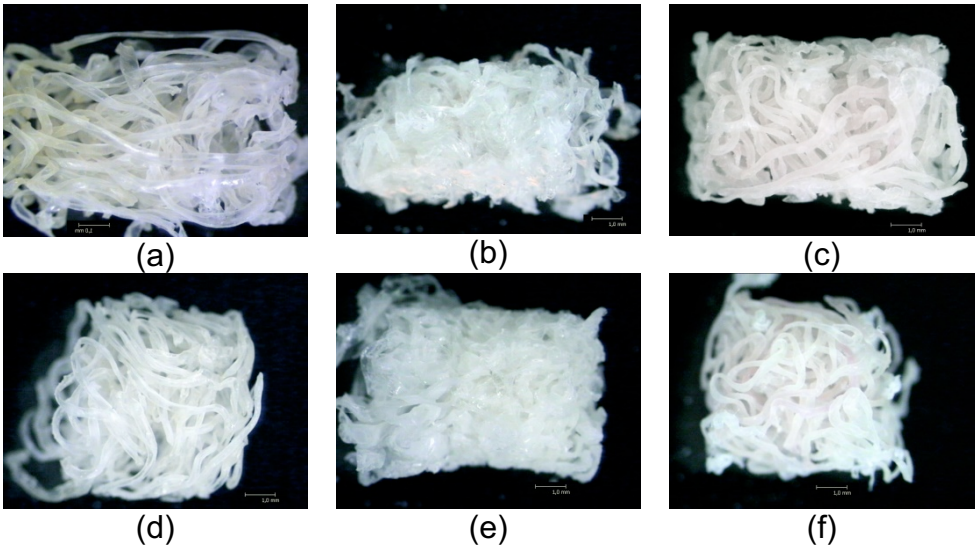


Figura 11 - Microscopia óptica com ampliação de 20x dos *scaffolds* de alginato sem glicerol (a), alginato com glicerol (b), híbrido sem glicerol (c), híbrido com glicerol (d), quitosana sem glicerol (e) e quitosana com glicerol (f) em molde de 6,4 mm de profundidade



Como observado nas Figuras 10 e 11, os *scaffolds* apresentaram uma rede fibrosa interconectada porosa, como consta na literatura (BOSE et al., 2012; HYLAND et al., 2011)

5.3 Estudo de viabilidade celular

5.3.1 Redução do MTT

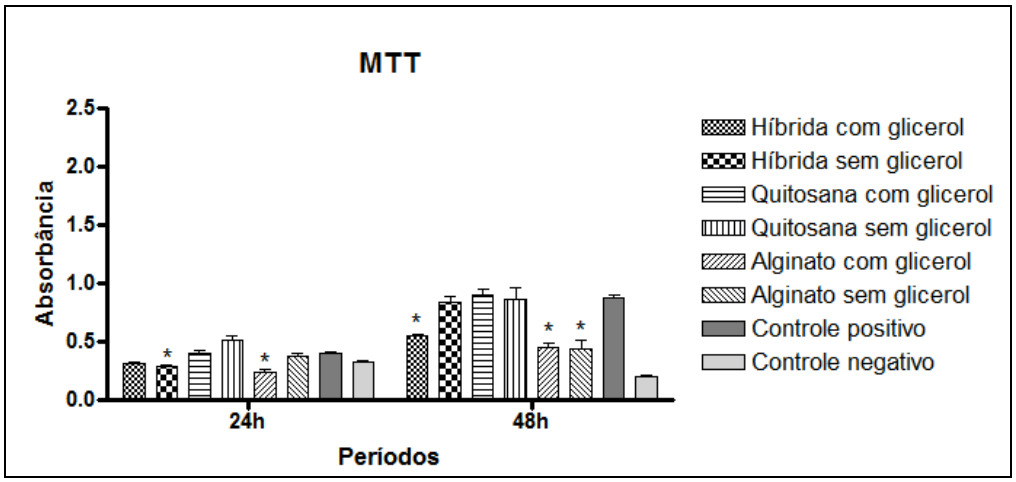
Comparando os resultados obtidos no período de 24 h com o de 48 h, o primeiro apresentou valores de absorbância menores que o segundo. No período de 48 horas três grupos merecem destaque por apresentarem as maiores taxas de viabilidade, próximos e/ou superiores ao controle positivo, os grupos híbridos sem glicerol, com 3,67% abaixo do controle positivo, e quitosana com glicerol, com 3,11% superior ao controle positivo e sem glicerol, com 0,46% inferior ao controle positivo. Enquanto que os grupos alginato com glicerol apresentou 48,73% inferior ao controle positivo e sem glicerol apresentou 49,65% inferior ao controle positivo (Gráfico 6).

Os resultados de absorbância apresentados pelos *scaffolds* de quitosana sem e com glicerol que foram superiores ao controle positivo indicam a ocorrência de proliferação celular. Assim como o *scaffold* híbrido sem glicerol, que apresentou valores de absorbância próximos ao controle positivo, e comprovando que esse biomaterial não é tóxico às células.

Nos dois períodos 24 e 48 h, os grupos quitosana com e sem glicerol foram os que apresentaram maiores valores de absorbância, ou seja, maior taxa de viabilidade celular, até mesmo superior ao grupo controle, utilizado como parâmetro de comparação. E nenhum grupo apresentou valores menores que os controles negativos após 48 h.

Realizando uma comparação com o trabalho realizado por Shao; Hunter (2007), que desenvolveu um *scaffold* fibroso à base de alginato/quitosana para problemas no disco intervertebral, o *scaffold* híbrido sem glicerol desenvolvido no presente estudo apresentou um valor 28% superior de absorbância que o *scaffold* híbrido produzido no estudo citado, ou seja, melhores resultados que o *scaffold* produzido por Shao; Hunter (2007).

Gráfico 5 - Análise da redução do MTT de células NIH3T3 tratadas com meio condicionado com *scaffolds*; além dos controles positivo e negativo, nos períodos de 24 e 48 horas *= p<0,05



5.3.2. Cristal Violeta

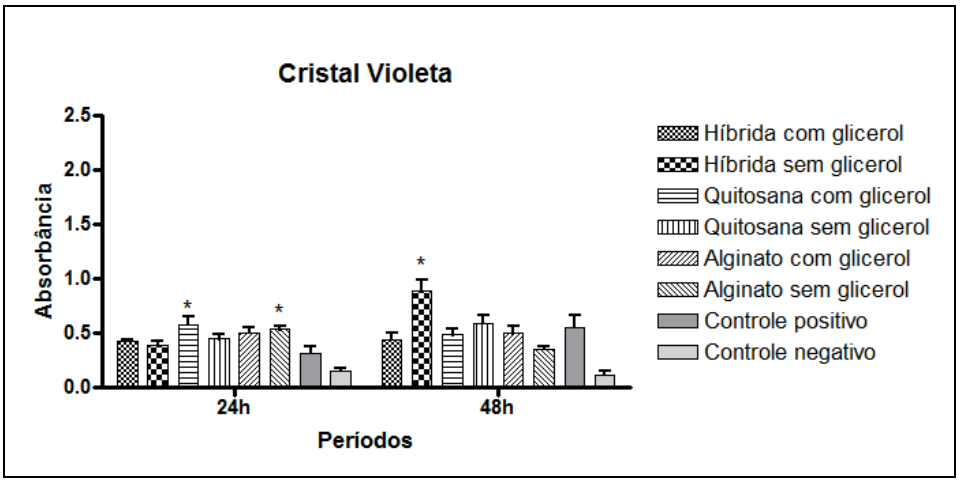
Nos resultados com o cristal violeta no período de 24 horas notou-se que a viabilidade celular dos grupos tratados com o meio condicionado com os *scaffolds*, não apresentou nenhum valor abaixo do controle negativo. Realizando uma comparação com o trabalho realizado por Fernandes et al. (2012), que desenvolveu um *scaffold* à base de quitosana e colágeno para engenheria tecidual de cartilagem, o *scaffold* de quitosana sem glicerol desenvolvido no presente estudo obteve um valor de absorbância de 0,575 no primeiro dia, enquanto o *scaffold* de quitosana produzido no estudo citado obteve um valor na faixa de 0,15-0,2 apenas.

Todos os grupos apresentaram taxas de viabilidade celular superiores aos grupos controles positivo e negativo, destaque para o grupo quitosana com glicerol que apresentou maior valor de absorbância (45,22% superior ao controle negativo em 24 h), quando comparado aos demais grupos.

No período de 48 horas houve um comportamento similar ao período anterior, entretanto a maior taxa de absorbância foi observada no grupo híbrida sem glicerol, apresentando um valor de 37,6% superior ao controle positivo.

A menor taxa de viabilidade celular foi observada no grupo alginato sem glicerol, nesse mesmo período, 48 h, sendo que o controle positivo apresentou um valor de 37,3% superior. Mas mesmo assim, esse grupo apresentou valores superiores que o controle negativo (Gráfico 7).

Gráfico 6 - Análise da incorporação do cristal violeta de células NIH3T3 tratadas com meio condicionado com *scaffolds*; além dos controles positivo e negativo, nos períodos de 24 e 48 horas *= p<0,05



Analisando os dois ensaios (MTT e cirstal violeta), os resultados do *scaffold* híbrido apresentaram resultados satisfatórios em ambos os experimentos, com valores de absorbância próximos e superiores ao controle positivo, respectivamente. O que indica além de boa compatibilidade por parte do material, bom potencial biológico por não ser tóxico às células.

5.4 Calorimetria Exploratória Diferencial

O ensaio foi realizado com os polímeros de alginato e quitosana, e com os *scaffolds* de alginato, quitosana e híbridos com e sem glicerol. Os resultados encontrados podem ser observados na Tabela 7.

A partir dos resultados obtidos apresentados na Tabela 7, foram desenvolvidas curvas relacionando o fluxo de calor e a temperatura. No Gráfico 7 pode-se observar uma comparação entre as curvas encontradas para os polímeros alginato e quitosana.

Tabela 7 - Valores de temperatura, entalpia e picos dos polímeros alginato e quitosana e dos *scaffolds* sem e com glicerol

	Variável	**Pal**	**Pq**	**Al**	**Al gl**	**Q**	**Q gl**	**H**	**H gl**
ENDO	ΔT	-	190,2ºC	122,4ºC 195,6ºC	1718,4ºC	181ºC	118,3ºC	174,2ºC	173,9ºC
	ΔH	-	50,7 mJ/mg	311 mJ/mg 31,1 mJ/mg	357 mJ/mg	171 mJ/mg	324 mJ/mg	366 mJ/mg	409 mJ/mg
	Onset	-	170,2ºC	94,6ºC 194,5ºC	156,9ºC	161,7ºC	95,5ºC	149,3ºC	162,5ºC
	Endset	-	218,7ºC	146,7ºC 200,7ºC	202,1ºC	220,3ºC	146,6ºC	202,4ºC	195,6ºC
EXO	ΔT	212,5ºC	302,8ºC	271,7ºC	274,6ºC	304,1ºC	302,8ºC	277,7ºC	277,5ºC
	ΔH	-120 mJ/mg	-124 mJ/mg	-132 mJ/mg	-123 mJ/mg	-136 mJ/mg	-116 mJ/mg	-98,9 mJ/mg	-128 mJ/mg
	Onset	204,4ºC	282,4ºC	231,6ºC	202,1ºC	287,1ºC	286,3ºC	242,1ºC	244,6ºC
	Endset	227,3ºC	317,5ºC	306,9ºC	301,7ºC	316,9ºC	315,9ºC	304,8ºC	307,3ºC

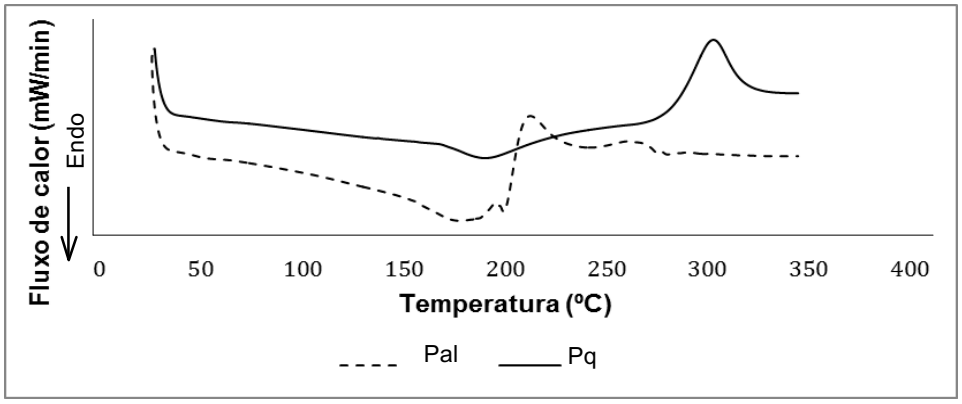
Pal: polímero alginato; Pq: polímero quitosana;

Al: *scaffold* de alginato sem glicerol; Al gl: *scaffold* de alginato com glicerol;

Q: *scaffold* de quitosana sem glicerol; Q gl: *scaffold* de quitosana com glicerol; H: *scaffold* híbrido sem glicerol; H gl: *scaffold* híbrido com glicerol.

ΔT: Temperatura; ΔH: Entalpia.

Gráfico 7 - Curvas de DSC dos polímeros alginato e quitosana

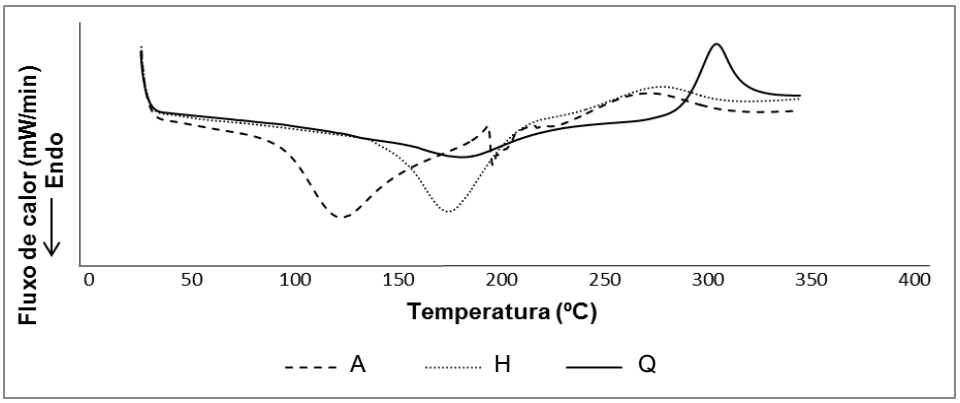


Pal: alginato; Pq: quitosana

De acordo com o Gráfico 7, o alginato apresenta um pico exotérmico a 212,5ºC, relativo à degradação do polímero. A quitosana apresenta um pico endotérmico a 190,2ºC e um pico exotérmico a 302,8ºC. O primeiro relacionado à evaporação da água absorvida e o segundo à degradação do polímero (degradação do anel sacarídeo, despolimerização e decomposição das unidades acetilada e desacetilada da quitosana).

O Gráfico 8 apresenta uma comparação entre as curvas obtidas dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbridos sem glicerol.

Gráfico 8 - Curvas de DSC dos *scaffolds* sem glicerol de alginato, quitosana e híbrido

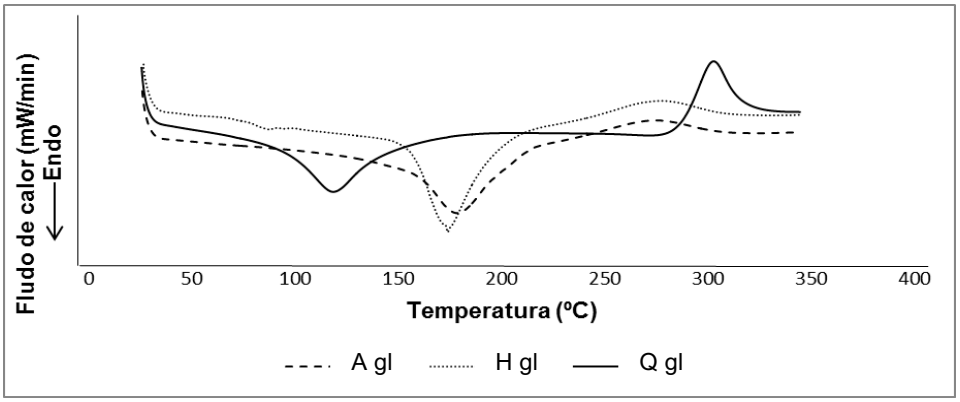


A: alginato; H: híbrido; Q: quitosana

Comparando-se os picos endotérmicos do alginato (o primeiro a 122,4ºC e o segundo a 195,6ºC) com o de quitosana (a 181ºC) e com o pico híbrido (a 174,2ºC), o pico híbrido encontra-se em uma temperatura entre os picos dos polímeros isolados. O pico exotérmico do *scaffold* híbrido ocorreu a 277,7ºC, sendo que o pico do alginato ocorreu a 271,7ºC e o da quitosana a 304,1ºC. Nota-se que há deslocamento dos picos híbridos (endo e exo) em relação aos polímeros utilizados sozinhos, o que indica a formação de novas ligações químicas e a interação entre alginato e quitosana.

O Gráfico 9 também apresenta uma comparação entre os *scaffolds* de alginato, quitosana e híbridos, mas nesse caso, com glicerol.

Gráfico 9 - Curvas de DSC dos *scaffolds* com glicerol de alginato, quitosana e híbrido

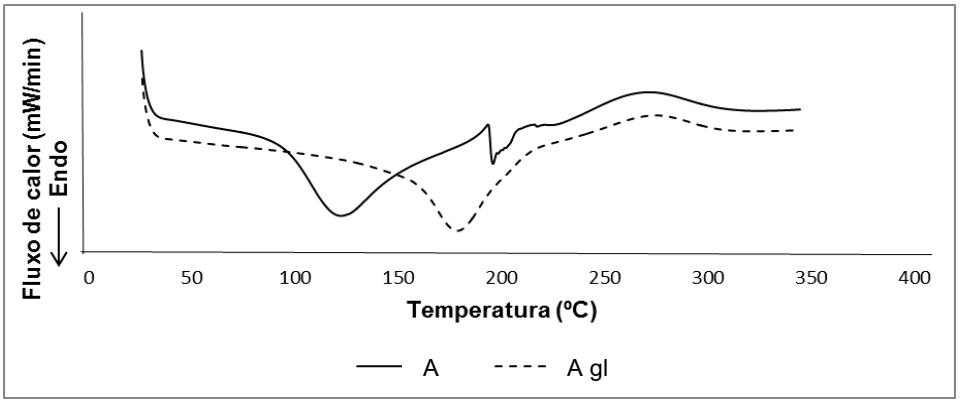


A gl: alginato com glicerol; H gl: híbrido com glicerol; Q gl: quitosana com glicerol

Assim como nas curvas dos *scaffolds* sem glicerol (Gráfico 9), o comportamento dos *scaffolds* híbridos com glicerol também apresentam um deslocamento em relação dos polímeros utilizados isoladamente. O pico endotérmico do *scaffold* híbrido foi de 173,9ºC e o exotérmico foi 277,5ºC. A presença de glicerol também indicou um deslocamento comparando com os *scaffolds* que não o continham.

A partir os Gráficos 10, 11 e 12 pode-se observar o comportamento dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido sem glicerol comparados com os *scaffolds* com glicerol.

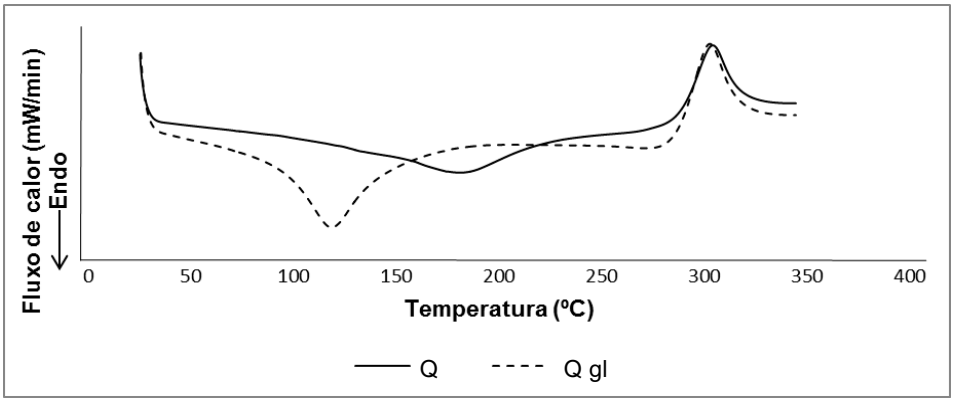
Gráfico 10 - Curvas de DSC dos *scaffolds* de alginato com e sem glicerol



A: alginato sem glicerol; A gl: alginato com glicerol

Pode-se verificar um deslocamento do *scaffold* sem glicerol comparando com o *scaffold* com glicerol. O primeiro pico endotérmico do *scaffold* sem glicerol ocorreu a 122,4ºC e o segundo a 195,6ºC, sendo que do *scaffold* com glicerol ocorreu a 178,4ºC. Já o pico exotérmico do *scaffold* sem glicerol foi a 271,7ºC e o do *scaffold* com glicerol foi a 274,6ºC.

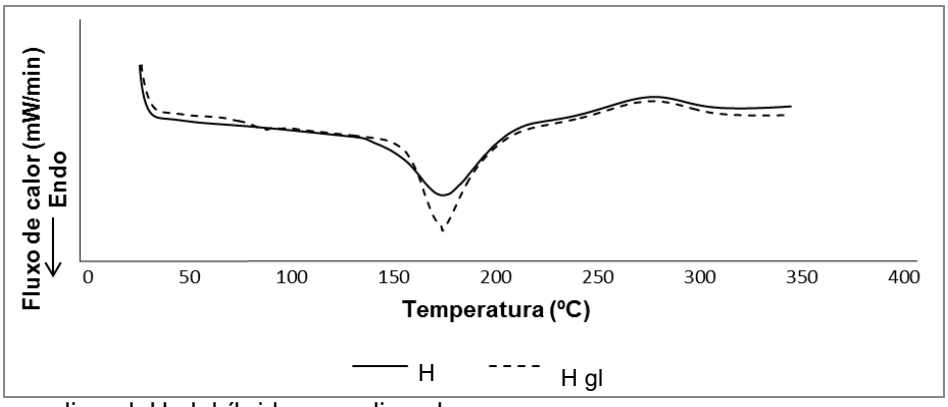
Gráfico 11 - Curvas de DSC dos *scaffolds* de quitosana com e sem glicerol



Q: quitosana sem glicerol; Q gl: quitosana com glicerol

Pode-se verificar um deslocamento do *scaffold* sem glicerol comparando com o *scaffold* com glicerol. O pico endotérmico do *scaffold* sem glicerol ocorreu a 181ºC e o do *scaffold* com glicerol ocorreu a 118,3ºC, relacionados à perda de água. Já o pico exotérmico do *scaffold* sem glicerol foi a 304,1ºC, estando relacionado à degradação da quitosana, assim como apresentou o gráfico de TG (Gráfico 17). E o pico exotérmico do *scaffold* com glicerol foi a 302,8ºC.

Gráfico 12 - Curvas de DSC dos *scaffolds* híbridos com e sem glicerol



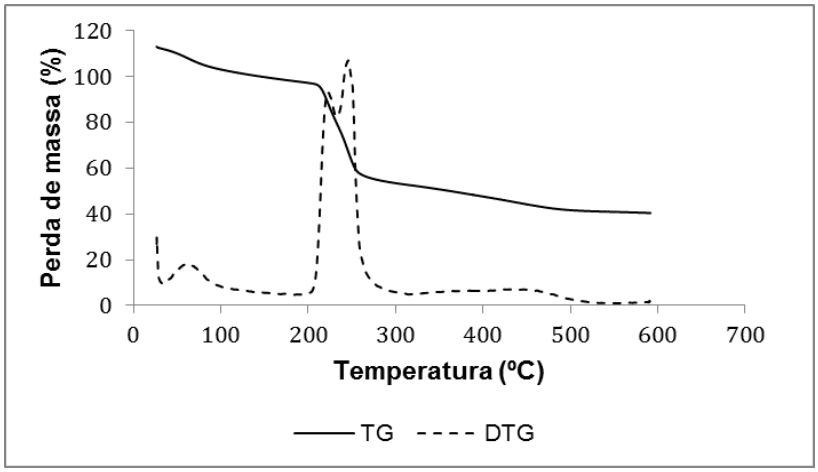
H: híbrido sem glicerol; H gl: híbrido com glicerol

Pode-se verificar um comportamento similar em relação ao *scaffold* sem glicerol com o *scaffold* com glicerol. O pico endotérmico do *scaffold* sem glicerol ocorreu a 174,2ºC e o do *scaffold* com glicerol ocorreu a 173,9ºC. Já o pico exotérmico do *scaffold* sem glicerol foi a 277,7ºC e do *scaffold* com glicerol foi a 277,5ºC. Essa similaridade encontrada nas curvas indica que a presença de glicerol nos *scaffolds* híbridos não apresentou alteração no comportamento térmico do material.

5.5 Termogravimetria

Nos Gráficos 13 e 14 pode-se observar a perda de massa em função do tempo dos polímeros alginato e quitosana, respectivamente.

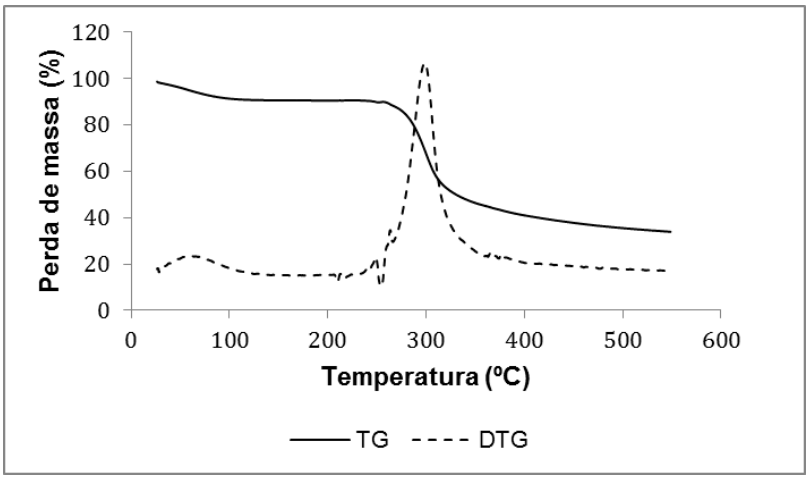
Gráfico 13 - TG do polímero alginato



TG: curva termogravimétrica; DTG: curva da derivada termogravimétrica

O polímero alginato apresentou três perdas de massa, indicadas pela curva da TG, a primeira de água, perdendo 9,9% do início do ensaio até aproximadamente 200ºC. A segunda perda de massa foi de 39,9% no intervalo de 200ºC a 255ºC e a terceira 16,7% até 537,2ºC. Os picos exotérmicos, indicados pela derivada da TG ocorreram a 62,9ºC, 221,6ºC e 245,8ºC.

Gráfico 14 - TG do polímero quitosana

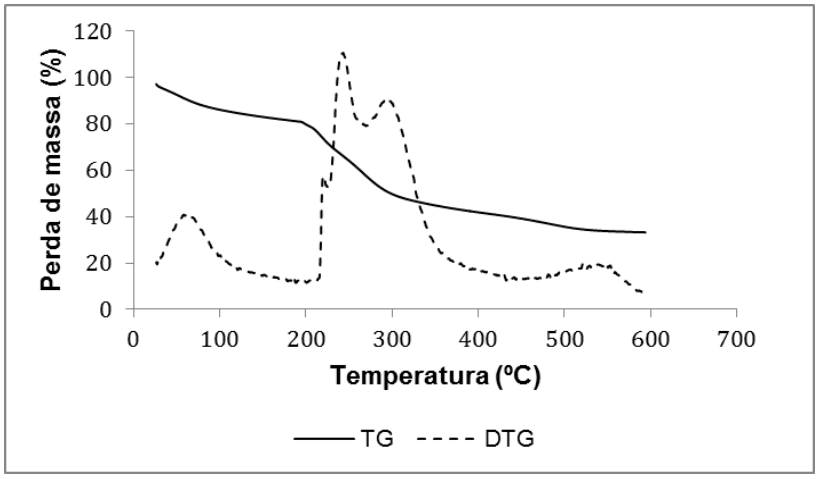


TG: curva termogravimétrica; DTG: curva da derivada termogravimétrica

O polímero quitosana diferentemente do alginato apresentou apenas duas perdas de massa, indicadas pela curva da TG, a primeira de 7,8%, relacionado com a perda de água, e a segunda de 57,4%, relacionada com a degradação do polímero. Os dois picos exotérmicos apresentados ocorreram a 61,1ºC e a 299,6ºC.

Os Gráficos 15 e 16 apresentam as curvas de perda de massa em função do tempo dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbridos sem e com glicerol.

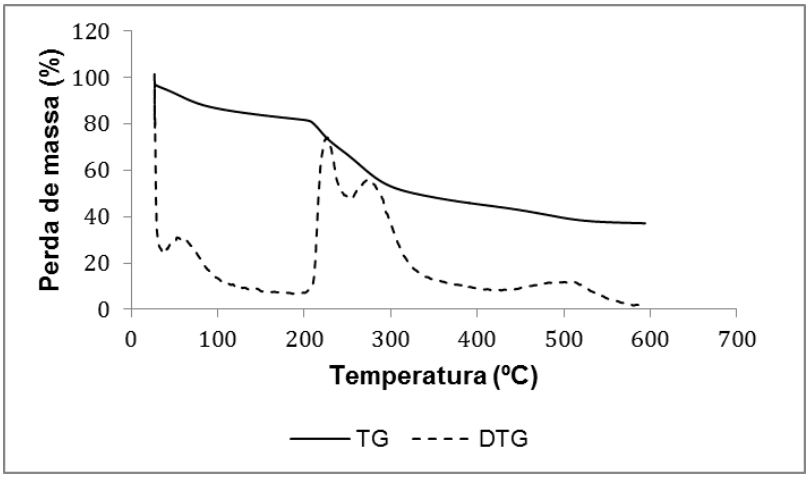
Gráfico 15 - TG e DTG do *scaffold* de alginato sem glicerol



TG: curva termogravimétrica; DTG: curva da derivada termogravimétrica

No caso do Gráfico 15 também podem ser observadas três perdas de massa, indicadas pela curva da TG, sendo a primeira apresentando uma perda de água de 14,4%, do início do ensaio até aproximadamente 170ºC. A segunda perda de massa foi de 37,7% no intervalo de 170ºC até 353,8ºC e a última 11,3% até 579,2ºC. Os picos exotérmicos indicados pela derivada da TG ocorreram a 50,9ºC, 197,5ºC, 216,8ºC e 269,5ºC.

Gráfico 16 - TG e DTG do *scaffold* alginato com glicerol

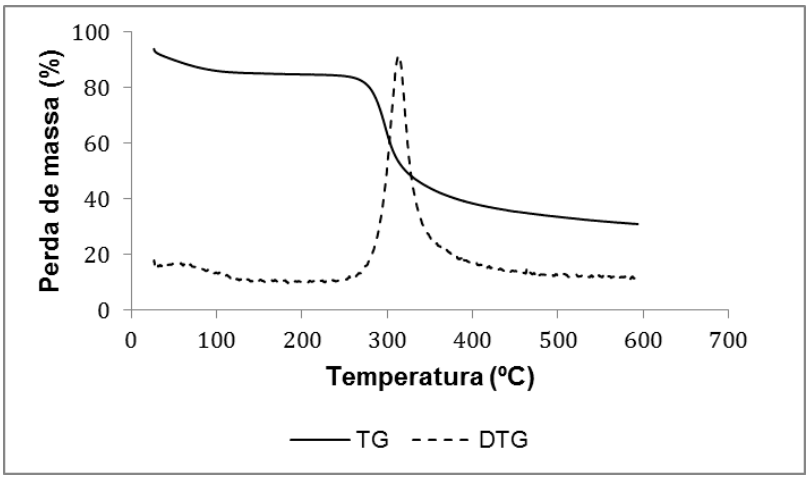


TG: curva termogravimétrica; DTG: curva da derivada termogravimétrica

No Gráfico 16, a curva de TG evidencia que o *scaffold* de alginato com glicerol sofreu três perdas de massa, a primeira representou uma perda de água de

15,0%, desde o início do ensaio até aproximadamente 180ºC. A segunda perda de massa foi de 34,8% até 360,6ºC e a terceira 10,2% até 585ºC. Enquanto a derivada da TG apresenta os três picos exotérmicos sofridos pelo material a 55ºC, 219,4ºC e 264,3ºC.

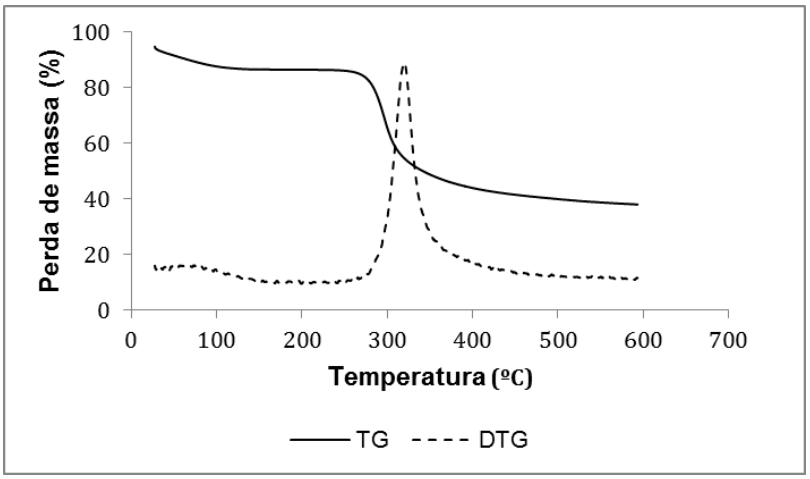
Gráfico 17 - TG e DTG do *scaffold* quitosana sem glicerol



TG: curva termogravimétrica; DTG: curva da derivada termogravimétrica

O *scaffold* de quitosana sem glicerol apresentou duas perdas de massa, a primeira, de água, de 8% e a segunda de 53,4%. O único pico exotérmico ocorreu a 296,8ºC, relacionado com o processo de desidratação de anéis sacarídeos, decomposição das unidades de acetilados e desacetilados da quitosana e despolimerização, assim como apresenta o estudo de Lima et al (2013).

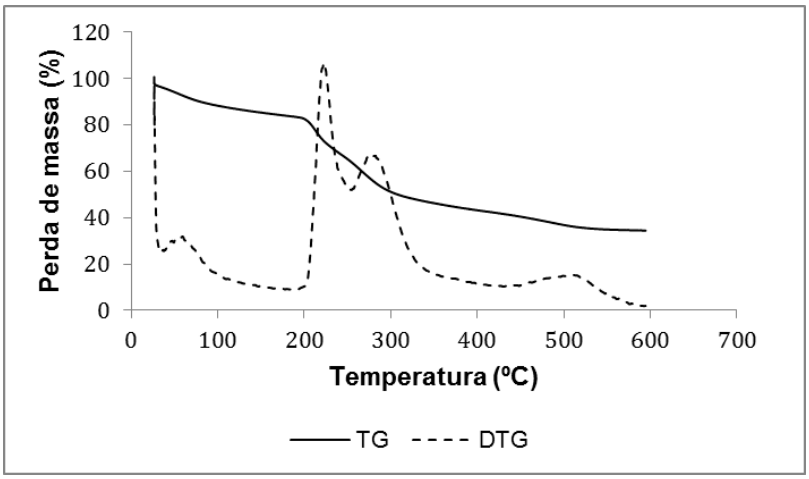
Gráfico 18 - TG e DTG do *scaffold* quitosana com glicerol



TG: curva termogravimétrica; DTG: curva da derivada termogravimétrica

Os dados da termogravimetria do *scaffold* de quitosana com glicerol mostram que ocorreram duas perdas de massa, a primeira de 7,8% e a segunda de 48,2%. Sendo que o pico exotérmico ocorreu a 296ºC.

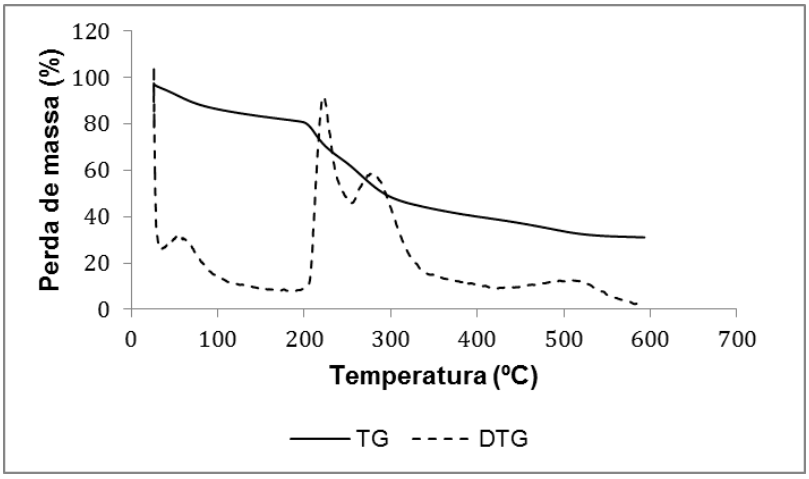
Gráfico 19 - TG e DTG do *scaffold* híbrido sem glicerol



TG: curva termogravimétrica; DTG: curva da derivada termogravimétrica

O *scaffold* híbrido com glicerol apresentou um comportamento semelhante ao *scaffolds* à base de alginato, contendo três perdas de massa, detectadas pela TG, sendo a primeira de 12%, seguida de 40,5% e por último, 10,1%. Enquanto a derivada da TG apresentou também três picos exotérmicos. O primeiro a 56ºC, o segundo a 212,8ºC e o terceiro a 266,7ºC.

Gráfico 20 - TG e DTG do *scaffold* híbrido com glicerol

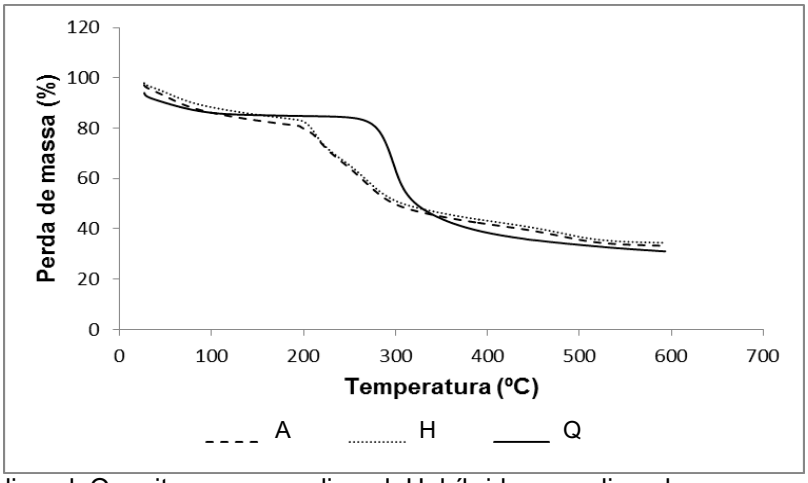


TG: curva termogravimétrica; DTG: curva da derivada termogravimétrica

Os dados apresentados no Gráfico 20 do *scaffold* híbrido com glicerol demonstraram que houve três perdas de massa, assim como os *scaffolds* à base de

alginato. A primeira perda foi de 13,6ºC, a segunda 41,3º e a última 11%. Já os picos exotérmicos, indicados pela derivada da TG ocorreram a 56,9ºC, 213ºC e 266,2ºC.

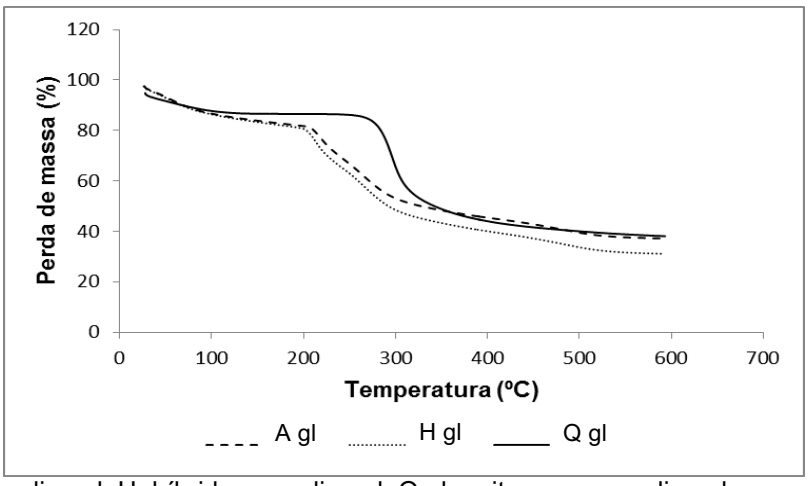
Gráfico 21 - Curvas de TG dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido sem glicerol



A: alginato sem glicerol; Q: quitosana sem glicerol; H: híbrido sem glicerol

No Gráfico 21 pode ser observado que as curvas dos *scaffolds* de alginato e híbrido sem glicerol apresentam um perfil semelhante, diferentemente da quitosana.

Gráfico 22 - Curvas de TG dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido com glicerol



A gl: alginato com glicerol; H: híbrido com glicerol; Q gl: quitosana com glicerol

As curvas encontradas no termograma de TG dos *scaffolds* com glicerol apresentaram um perfil semelhante à todos os *scaffolds* sem glicerol, o que pode indicar que a presença de glicerol não apresentou alterações significativas nos resultados.

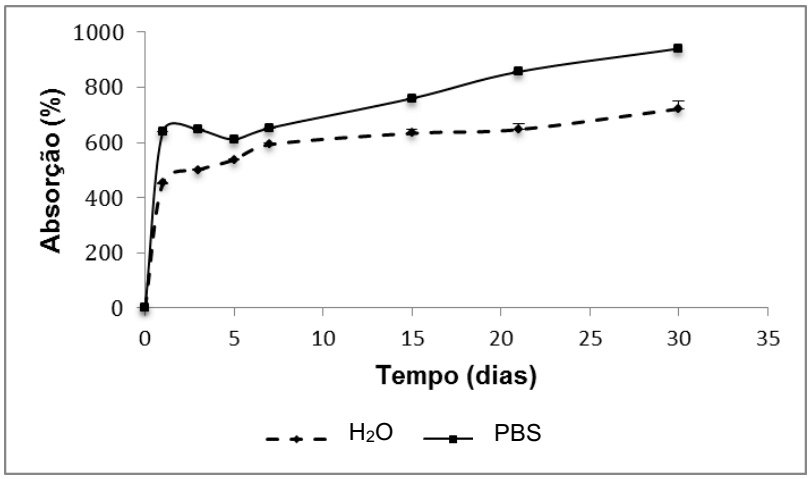
5.6 Ensaio de absorção e perda de massa em solução de PBS e em água

A porcentagem de absorção e perda de massa dos *scaffolds* foi avaliada com

o ensaio em solução de PBS e em água, de acordo com os cálculos apresentados no item 4.9.3.

Durante o experimento em solução de PBS os *scaffolds* de alginato e híbridos alginato/quitosana se desfizeram desde o primeiro dia, sendo impossibilitado o manuseio dos mesmos, portanto o ensaio com PBS foi realizado apenas com os *scaffolds* de quitosana. Em contrapartida, o ensaio realizado em água pôde ser concluído com todos os tipos de *scaffolds*.

Gráfico 23 - Capacidade de absorção *scaffolds* quitosana sem glicerol em solução de PBS e em água



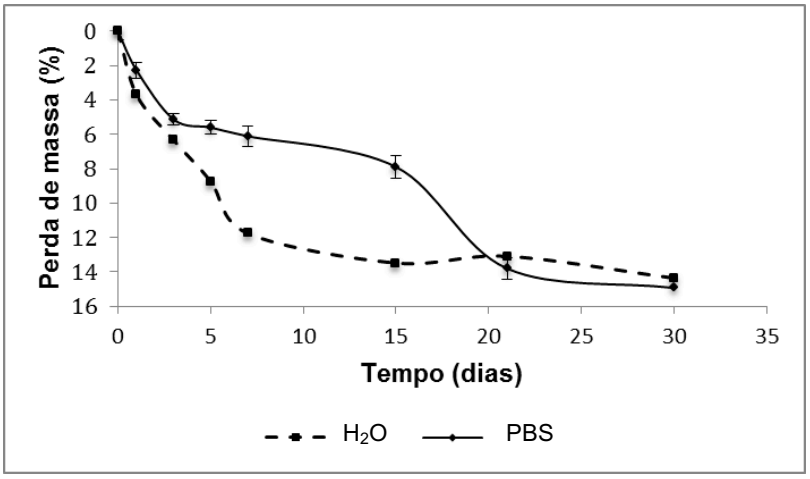
De acordo com o Gráfico 23, pode-se observar que desde o primeiro dia de ensaio, os *scaffolds* de quitosana sem glicerol em contato com ambas soluções (PBS e água) apresentaram um de absorção com 640% em solução de PBS e 452,5% em água.

Em relação ao trigésimo dia, a absorção do *scaffold* em solução de PBS foi de 940%, enquanto a absorção em água foi de 721,8%. Ou seja, a absorção em PBS se mostrou 23,28% superior do que em água.

Comparando-se as diferenças de absorção entre o primeiro e o último dia de ensaio, em solução de PBS o *scaffold* apresentou um aumento de 46,8% na absorção, enquanto em água, apresentou um aumento de 63,2%.

Assim como mencionado anteriormente, a perda de massa está relacionada com a biocompatibilidade do material, devido à hidrofilicidade que o mesmo apresenta (VALENTE et al., 2012). O resultado obtido da perda de massa dos *scaffolds* de quitosana sem glicerol (em PBS e em água) em função do tempo podem ser observados no Gráfico 24.

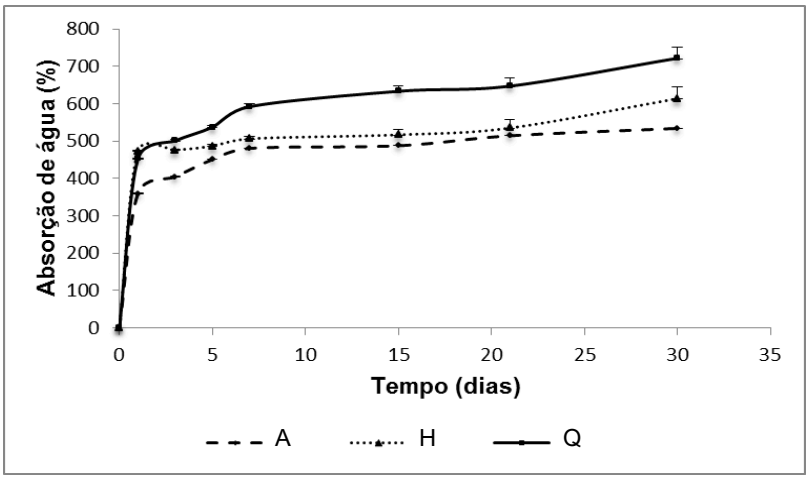
Gráfico 24 - Perda de massa *scaffolds* de quitosana sem glicerol em solução de PBS e em água



A perda de massa observada nos dois ensaios foi diferente, sendo que no vigésimo primeiro dia as curvas se encontraram, apresentanado um comportamento similar, em que os *scaffolds* de quitosana em contato com PBS apresentaram 13,8% de perda de massa, e os *scaffolds* em contato com água apresentaram 13,09%. Assim como no trigésimo dia, em que os *scaffolds* em PBS apresentaram 14,93% de perda e os em contato com água 14,36%.

Os resultados de absorção obtidos no ensaio realizado com água podem ser observados nos Gráficos 25 e 26, em que são apresentadas comparações entre as curvas dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido sem e com glicerol, respectivamente.

Gráfico 25 - Capacidade de absorção de água dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido sem glicerol

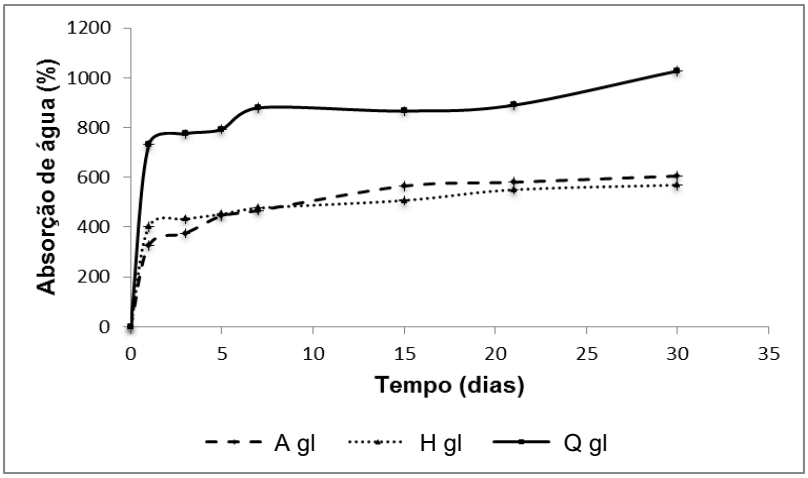


A: alginato sem glicerol; H: híbrido sem glicerol; Q: quitosana sem glicerol

De acordo com o Gráfico 25, no primeiro dia o *scaffold* híbrido apresentou uma absorção de 473%, sendo que o *scaffold* de quitosana apresentou 452,5% e o de alginato 359,5%. Entretanto, no trigésimo dia o *scaffold* de quitosana apresentou maior absorção de água em comparação com os *scaffolds* híbrido e de alginato, com 721,8% de absorção contra 613,7% e 534%, respectivamente.

Realizando uma comparação com os resultados obtidos dos *scaffolds* com glicerol, as estrutras que continham o platificante apresentaram maiores porcentagens de absorção. No trigésimo dia de ensaio o *scaffold* de alginato com glicerol apresentou 13,4% superior em comparação com o *scaffold* de alginato sem glicerol. O mesmo ocorreu com o *scaffold* de quitosana com glicerol, com 42,35% superior de absorção comparando com o *scaffold* sem glicerol.

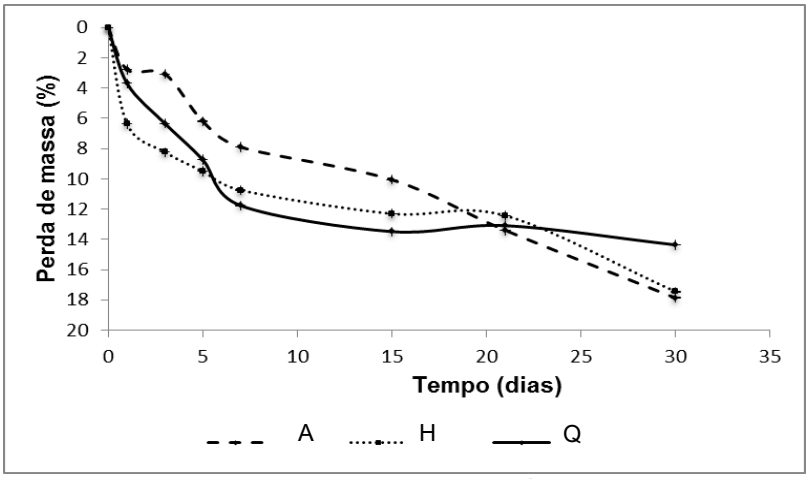
Gráfico 26 - Capacidade de absorção de água dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido com glicerol



A: alginato com glicerol; H: híbrido com glicerol; Q: quitosana com glicerol

Após cada periodo de tempo, os *scaffolds* foram retirados e pesados a úmido, os mesmos foram colocados para secagem a 40ºC por 24 h e realizado o procedimento para determinação do peso seco. Os reultados obtidos podem ser observados nos Gráficos 27 e 28, que apresentam a porcentagem de perda de massa dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido em função do tempo.

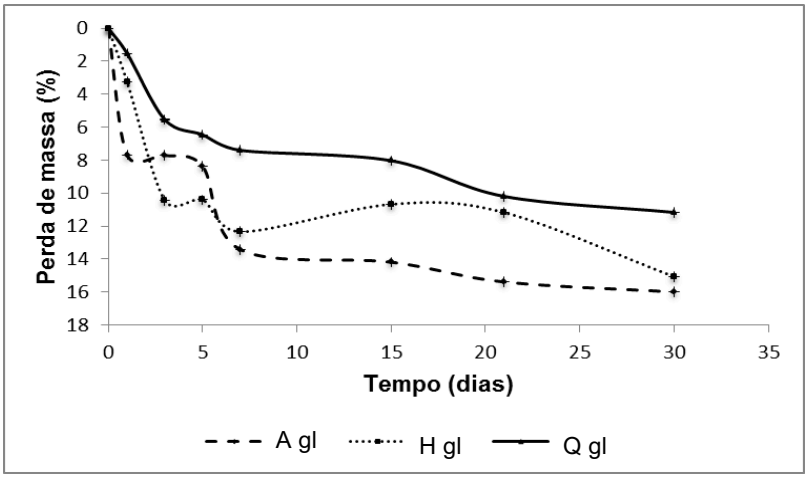
Gráfico 27 - Perda de massa dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido sem glicerol



A gl: alginato sem glicerol; H gl: híbrido sem glicerol; Q gl: quitosana sem glicerol

O *scaffold* híbrido apresentou maior perda de massa no primeiro dia, com uma perda de 6,36% em comparação com 3,7% do *scaffold* de quitosana e 2,78% do *scaffold* de alginato. Entretanto, no trigésimo dia o *scaffold* de alginato apresentou 17,87% de perda de massa enquanto o *scaffold* híbrido apresentou 17,45% e o de quitosana apenas 14,36%.

Gráfico 28 - Perda de massa dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido com glicerol



A: alginato com glicerol; H: híbrido comm glicerol; Q: quitosana com glicerol

A maior perda de massa obtida foi do *scaffold* de alginato, com 16% de perda no trigésimo dia, comparando com 15% do *scaffold* híbrido e 11,1% do *scaffold* de quitosana.

Comparando-se os resultados obtidos dos *scaffolds* sem e com glicerol, as estruturas que continham o platificante na estrutura apresentaram uma perda de massa inferior comparada com as estruturas que não continham. Isso pode indicar que o glicerol funcionou como estabilizador das estruturas (BRADBURY; JAKOBY, 1972; VAGENENDE et al., 2009), pois os *scaffolds* apresentaram porcentagens superiores na absorção de água, mas inferiores na perda de massa.

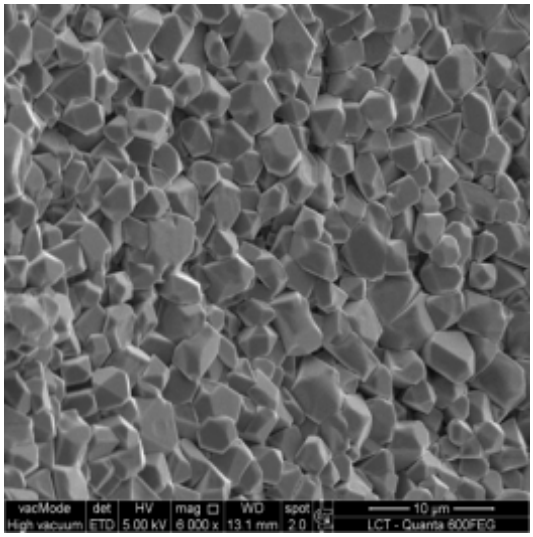
5.7 Ensaio de biomineralização

O estudo da biomineralização dos *scaffolds* foi realizado pela imersão dos mesmos em solução de SBF, como pode ser observado na Figura 12.

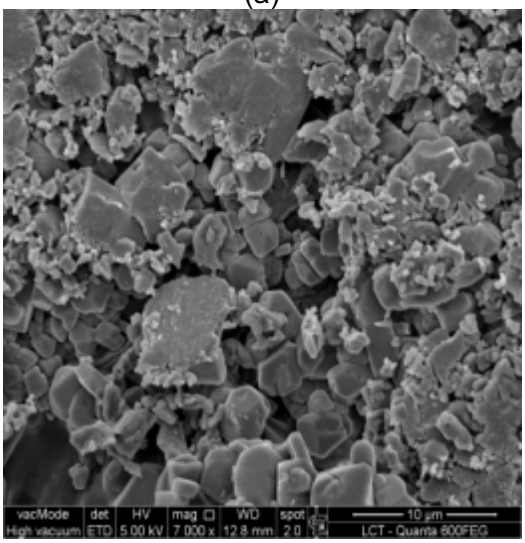
Os *scaffolds* de quitosana sem e com glicerol e os *scaffolds* híbridos sem glicerol apresentaram incidência de formação de hidroxiapatita desde o terceiro dia de ensaio, como pode ser observado nas Figura 12 e 13. O EDS realizado com as mesmas estruturas comprovou essa evidência, devido à presença de Ca, P, Mg e K detectados na leitura das amostras de quitosana sem e com glicerol. Os *scaffolds* híbridos sem glicerol apresentaram indícios da formação de hidroxiapatita na Figura 12b, mas o EDS realizado (Figura 12b^{I}) não pôde detectar os componentes, devido à limitação do aparelho em alcançar a região necessária e por ser uma fina camada.

Figura 12 - MEV dos *scaffolds* sem glicerol de alginato (a), híbrido (b) e quitosana (c) e EDS (a^I-c^I) no terceiro dia de ensaio de biomineralização

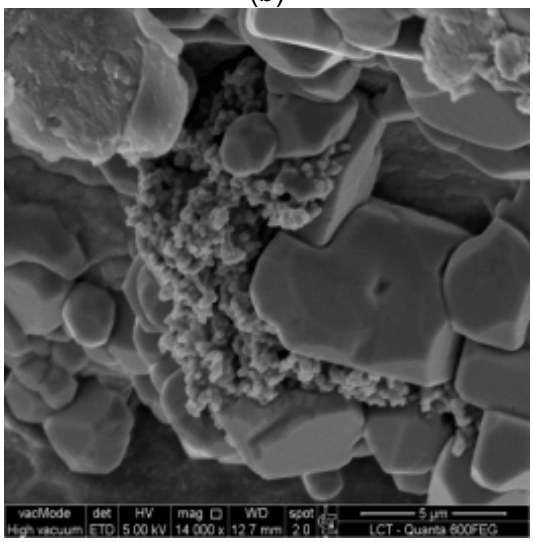
MEV



(a)

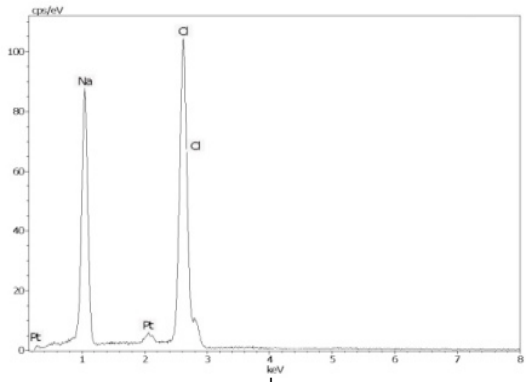


(b)

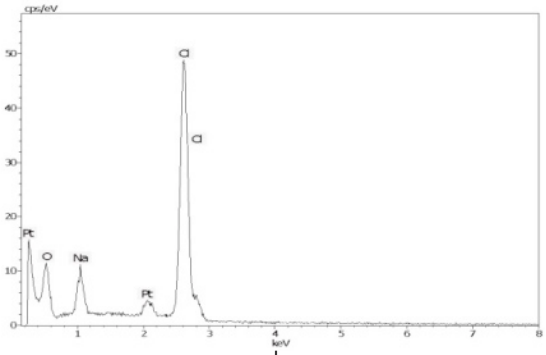


(c)

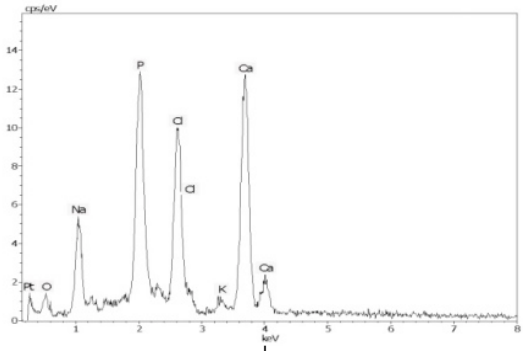
EDS



(a^I)

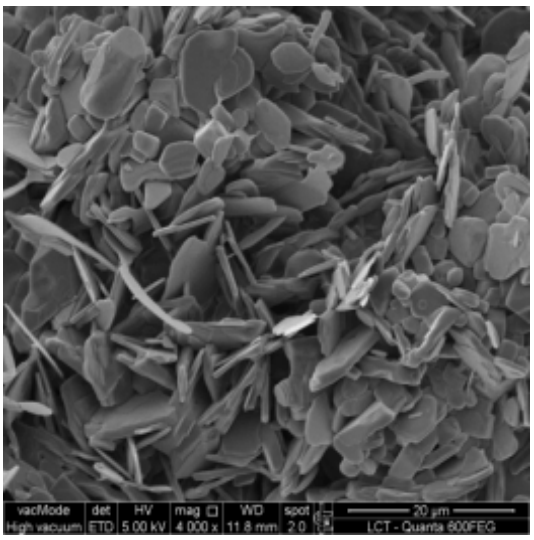


(b^I)

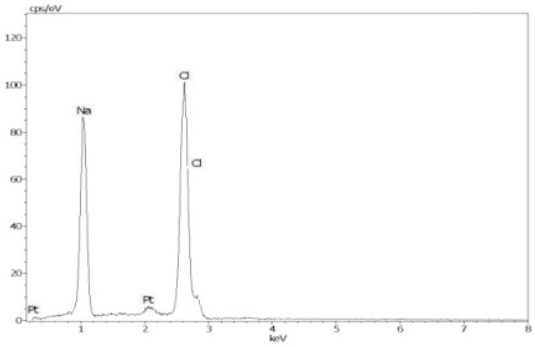


(c^I)

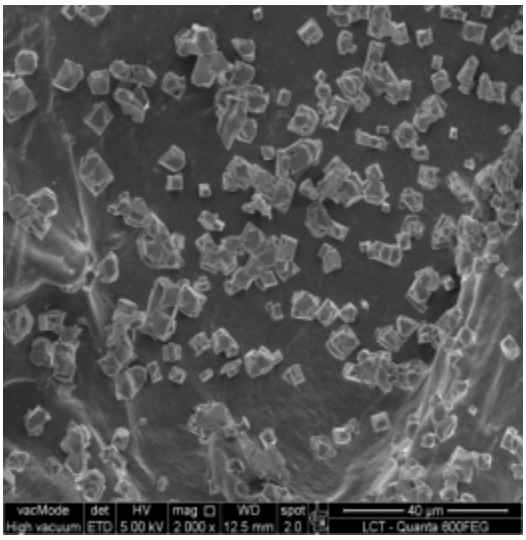
Figura 13 - MEV dos *scaffolds* com glicerol de alginato (a), híbrido (b) e quitosana (c) e EDS (a^I-c^I) no terceiro dia de ensaio de biomineralização



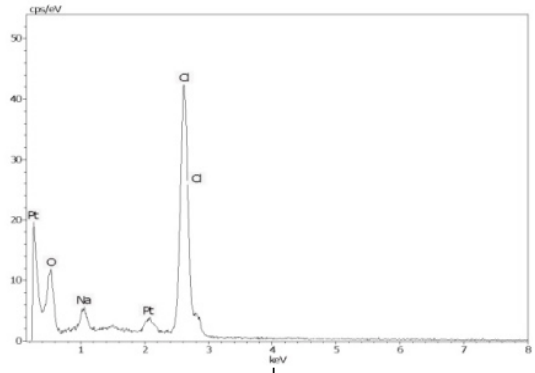
(a)



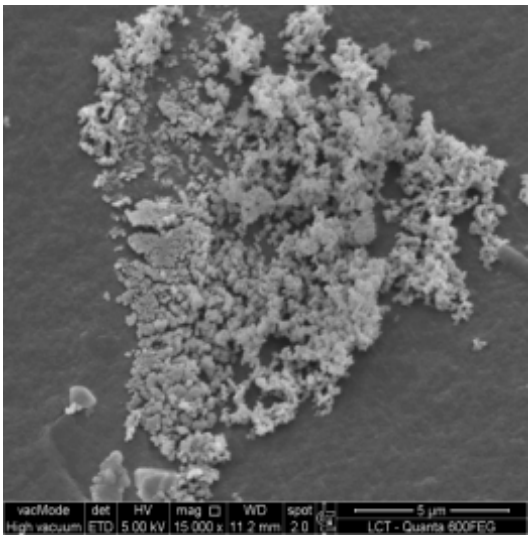
(a^I)



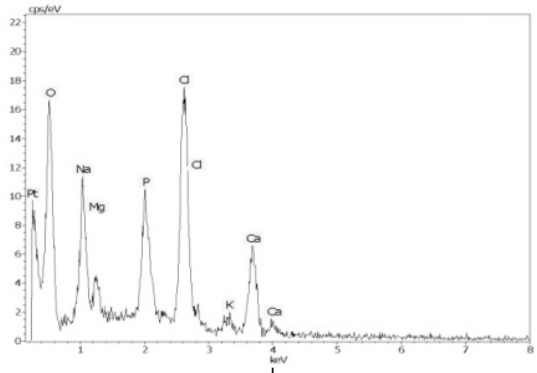
(b)



(b^I)



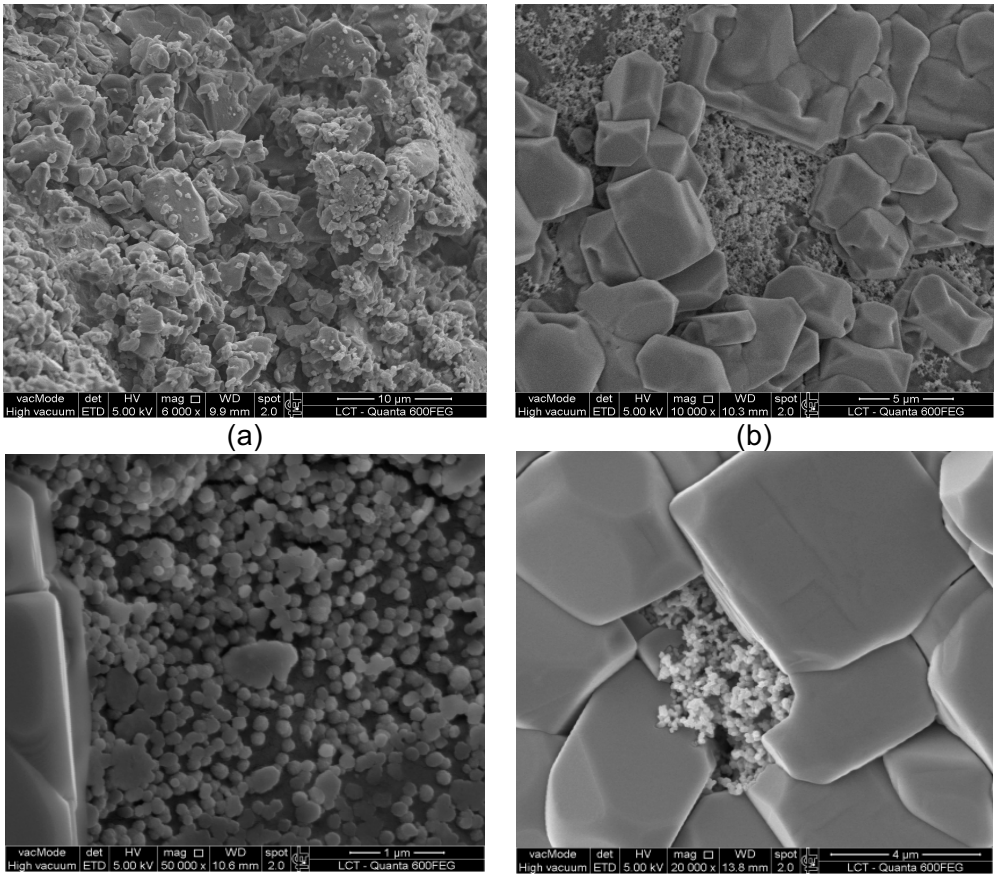
(c)



(c^I)

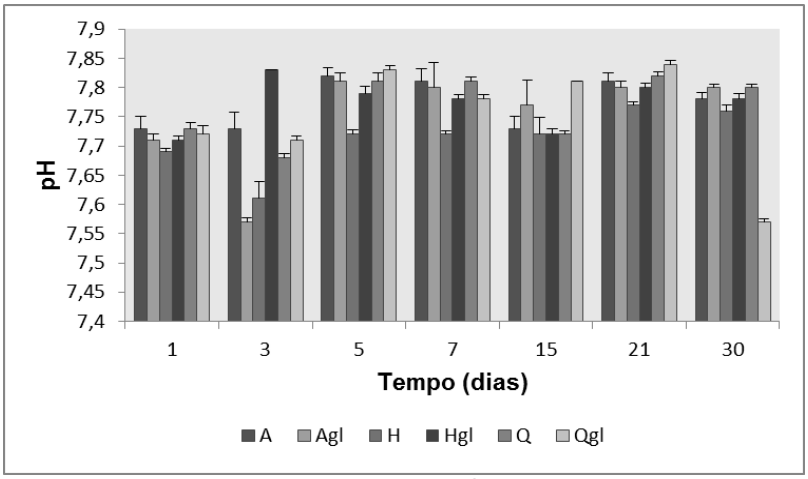
Os *scaffolds* de alginato sem e com glicerol apresentaram em sua superfície NaCl, mas não foi observada a presença de hidroxiapatita, diferentemente dos *scaffolds* de quitosana. No sétimo dia de ensaio foi observada uma grande formação de cristais de apatita nos *scaffolds* híbridos sem e com glicerol. Assim como no décimo quinto dia também foi observada a presença de formação de hidroxiapatita nos *scaffolds* de quitosana sem glicerol (Figura 14).

Figura 14 - MEV dos *scaffolds* híbrido sem glicerol (a) e híbrido com glicerol (b) no sétimo dia e dos *scaffolds* de quitosana sem glicerol (c) e quitosana com glicerol (d) no décimo quinto dia de ensaio de biomineralização



Durante todo o ensaio de biomineralização, os pHs da solução em contato com todos os *scaffolds* foram medidos e os resultados podem ser observados no Gráfico 29.

Gráfico 29 - pHs dos *scaffolds* de alginato, quitosana e híbrido sem e com glicerol ao longo de 30 dias em contato com a solução de SBF



A: alginato sem glicerol; H: híbrido sem glicerol; Q: quitosana sem glicerol
A gl: alginato com glicerol; H gl: híbrido com glicerol; Q gl: quitosana com glicerol

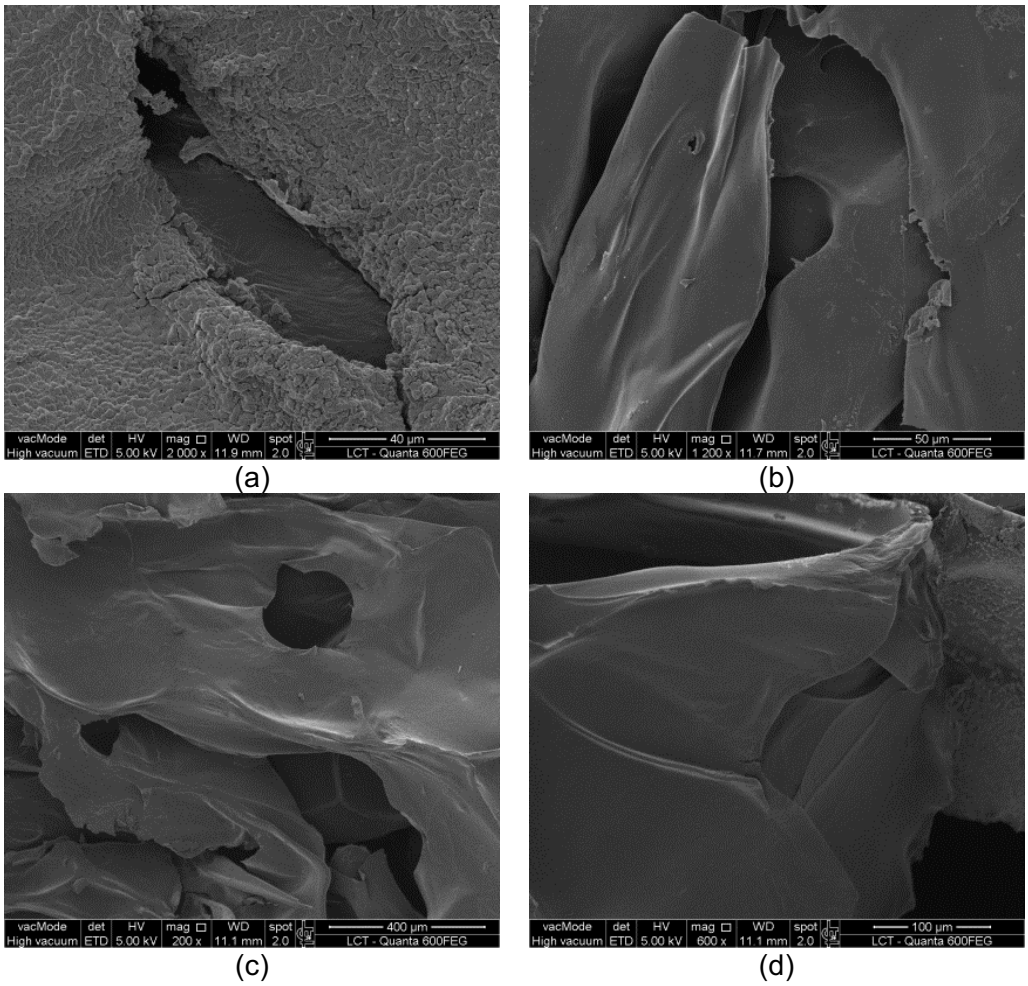
Pode-se observar que durante todo o experimento o pH da solução em contato com todos os *scaffolds* não sofreu grande variação, ficando na faixa de 7,4-7,8.

5.8 Ensaio de degradação com lisozima

O estudo da degradação do material é um parâmetro importante para o desenvolvimento de *scaffolds* para engenharia de tecidos ósseos, pois está relacionado com a formação de espaços na estrutura, o que influencia no crescimento do novo tecido ósseo, assim como na deposição da matriz extracelular.

A escolha da lisozima para esse estudo é de grande relevância, por ser encontrada em diferentes partes do corpo humano e devido ao seu papel de degradação da quitosana *in vivo*. Ela é responsável por atacar a ligação β (1-4) entre a N-acetilglucosamina da quitosana (SOWJANYA et al., 2013; HAN et al., 2012; BAYRAMOGLU et al., 2015). A MEV dos *scaffolds* híbrido e de quitosana sem e com glicerol após sete e dez dias de ensaio podem ser observados nas Figuras 15 e 16.

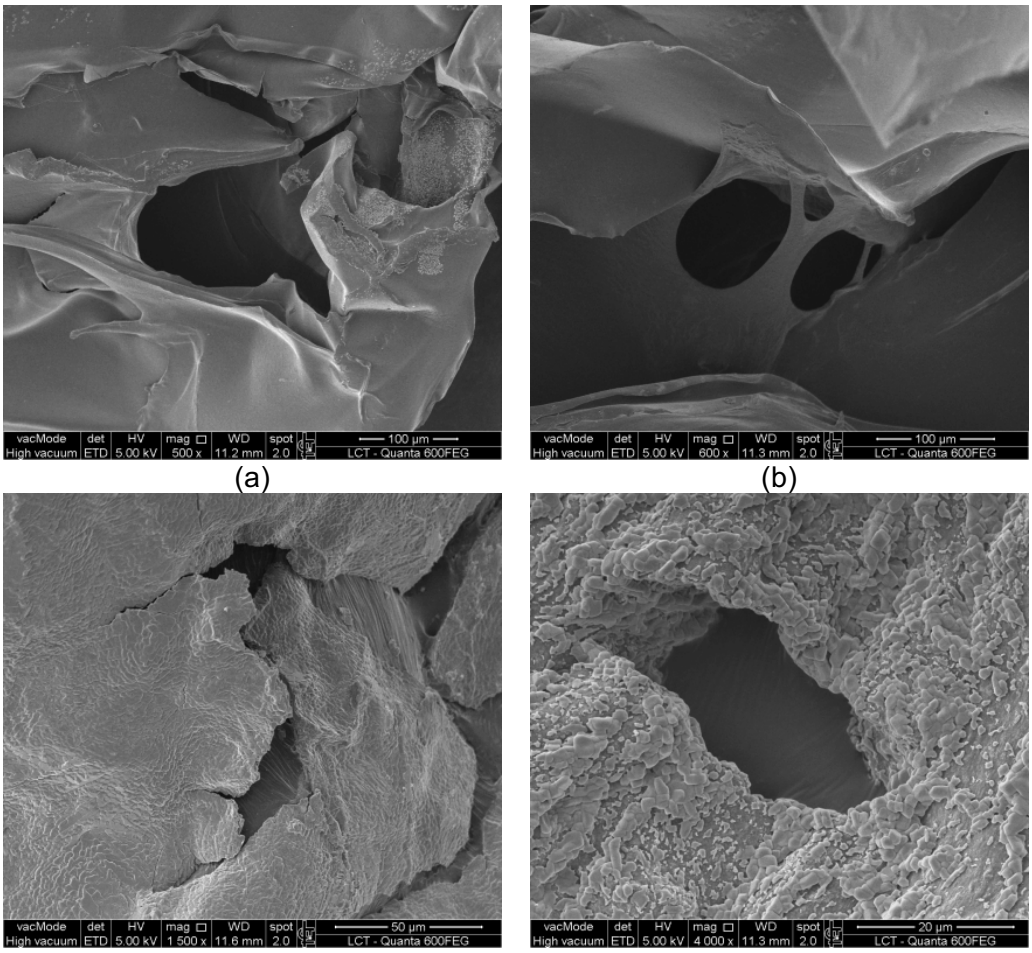
Figura 15 - MEV dos *scaffolds* híbrido sem glicerol (a), híbrido com glicerol (b), quitosana sem glicerol (c) e quitosana com glicerol (d) no sétimo dia de ensaio de degradação



No sétimo dia de ensaio foi observado o maior pico de degradação, como também foi notado no resultado de concentração de açúcares redutores (Gráfico 30). Todos os *scaffolds* apresentaram sinais de degradação em suas estruturas, indicando a ação da lisozima. O *scaffold* de quitosana com glicerol apresentou menos indícios de degradação em comparação com o *scaffold* de quitosana sem glicerol.

No décimo dia de ensaio também pôde-se observar indícios de degradação, como apresenta a Figura 15.

Figura 16 - MEV *scaffolds* de quitosana sem glicerol (a), quitosana com glicerol (b), híbrido sem glicerol (c) e híbrido com glicerol (d) no décimo dia de ensaio de degradação



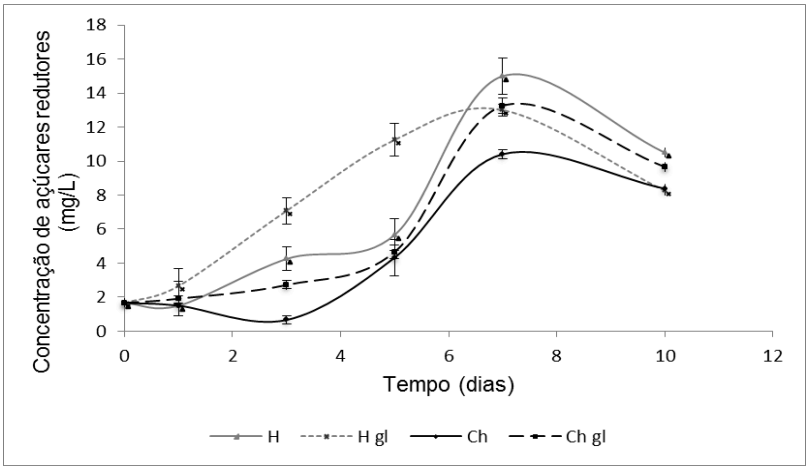
Assim como no sétimo dia, todos os *scaffolds* híbrido e de quitosana sem e com glicerol apresentaram sinais de degradação, indicando ataque da enzima nas estruturas.

Realizando uma comparação entre os *scaffolds* produzidos sem e com glicerol, foi notada uma degradação maior naqueles que não apresentavam glicerol em suas estruturas. Isso pode indicar que o glicerol talvez tenha funcionado como um estabilizador da estrutura (BRADBURY; JAKOBY, 1972; VAGENENDE et al., 2009).

5.8.1 Concentração de açúcares redutores

Durante o experimento de degradação foi avaliada a concentração de açúcares redutores pelo método de DNS. Os resultados podem ser observados no Gráfico 30.

Gráfico 30 - Concentração de açúcares redutores dos *scaffolds* de quitosana e híbridos sem e com glicerol

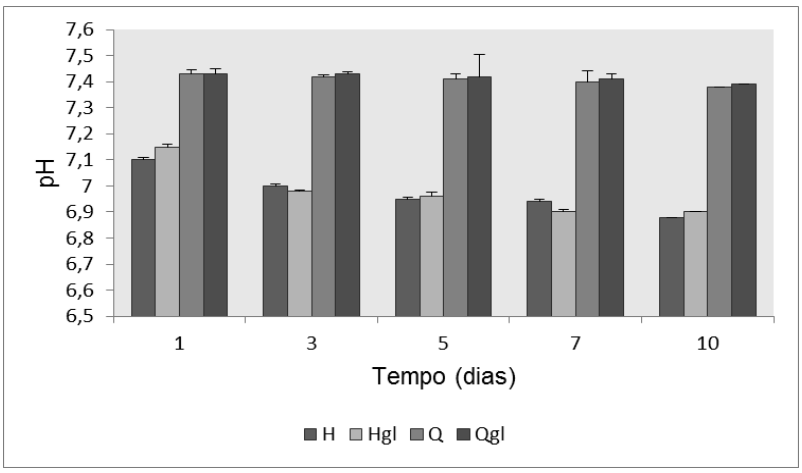


H: híbrido sem glicerol; H gl: híbrido com glicerol
Q: quitosana sem glicerol; Q gl: quitosana com glicerol

Como pode ser observado no Gráfico 30, todos os *scaffolds* apresentam um perfil semelhante, em que as estruturas estão sendo degradadas por um período de dez dias. No sétimo dia há um pico na concentração dos açúcares redutores, indicando um possível aumento na degradação, seguido por uma estabilidade até o décimo dia. Essa degradação também pôde ser comprovada com as MEVs realizadas com as estruturas (Figuras 14 e 15).

Foram medidos os pHs das soluções em que os *scaffolds* estavam em contato nos dias (1, 3, 5, 7 e 10), como pode ser observado no Gráfico 31.

Gráfico 31 - pHs das soluções contendo lisozima em contato com os *scaffolds* de quitosana e híbrido sem e com glicerol



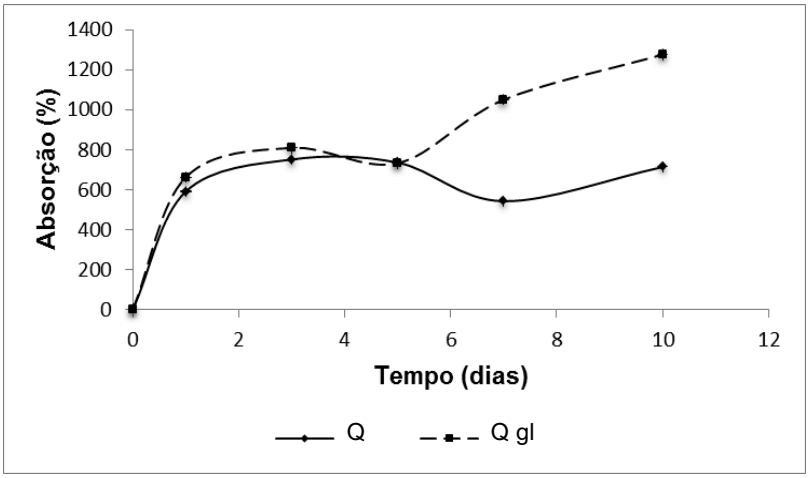
H: híbrido sem glicerol; H gl: híbrido com glicerol
Q: quitosana sem glicerol; Q gl: quitosana com glicerol

No dia em que o ensaio foi lançado, o pH da solução em que os *scaffolds* foram imersos era de 7,4. No decorrer de todos os dias de experimento, os *scaffolds* de quitosana sem e com glicerol apresentaram uma variação com pHs na faixa de 7,43-7,38. Enquanto os *scaffolds* híbrido sem e com glicerol apresentaram um decréscimo em comparação com o dia inicial, apresentando pHs na faixa de 7,1-6,8.

5.8.3 Absorção de água e perda de massa no ensaio de degradação

Os *scaffolds* de quitosana sem e com glicerol foram pesados durante os dias de ensaio de biodegradação, e os resultados de absorção de água e perda de massa podem ser observados nos Gráficos 32 e 33.

Gráfico 32 - Capacidade de absorção dos *scaffolds* de quitosana sem e com glicerol em solução de PBS com lisozima



Q: quitosana sem glicerol; Q gl: quitosana com glicerol

Como pode ser observado no Gráfico 32, a capacidade de absorção dos *scaffolds* de quitosana sem e com glicerol do início do ensaio até o quinto dia apresentou um comportamento similar. Entretanto, no sétimo dia o *scaffold* sem glicerol apresentou um decréscimo de aproximadamente 35% na absorção, diferentemente do *scaffold* com glicerol que apresentou um aumento de 43,2% em relação ao dia anterior.

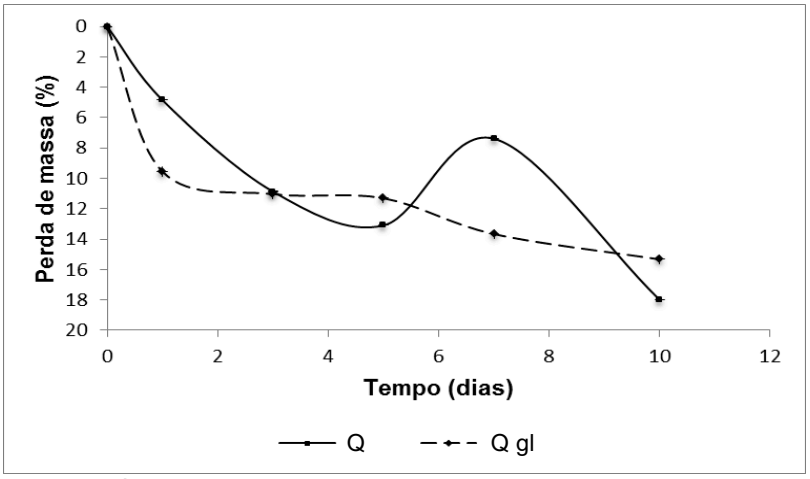
Essa capacidade de retenção e permeabilidade de água que o material apresenta influencia na absorção dos fluidos corporais e na transferência de nutrientes. Sendo que essa transferência está relacionada com a facilitação da penetração celular através dos *scaffolds*, graças à estrutura porosa, intensificada

com a absorção do material em conjunto com a ação das enzimas presentes no organismo (MARTINS et al., 2008).

Realizando uma comparação entre a absorção dos *scaffolds* de quitosana em solução de PBS e água com a absorção dos *scaffolds* em solução de PBS com lisozima, os *scaffolds* em contato com a solução contendo a enzima apresentaram um perfil superior em ambos os casos. Por exemplo, no sétimo dia em ambos os experimentos, os *scaffolds* com glicerol em solução com a enzima apresentaram um aumento de 19,3% na absorção em relação aos que estavam em água. No quinto dia comparando os *scaffolds* sem glicerol em solução de PBS com a enzima apresentaram uma capacidade de absorção superior 20,3% em relação aos que estavam apenas em PBS.

Analisando a perda de massa dos *scaffolds* de quitosana dos experimentos em que as estruturas ficaram em contato com lisozima em PBS (Gráfico 33), pode-se observar que no décimo dia o *scaffold* sem glicerol apresentou uma perda de massa 17,6% superior em relação ao *scaffold* com glicerol.

Gráfico 33 - Perda de massa dos *scaffolds* de quitosana sem e com glicerol em solução de PBS com lisozima



Q: quitosana sem glicerol; Q gl: quitosana com glicerol

A capacidade de degradação do material juntamente com a formação do novo tecido é um parâmetro importante para o desenvolvimento de um *scaffold* para engenharia de tecidos (KAVYA et al., 2013). O grau de degradação representado pela perda de massa dos *scaffolds* de quitosana apresentado no Gráfico 33 indica que a presença de glicerol na estrutura quase não apresentou influência nessa capacidade.

6 CONCLUSÕES

Foram preparadas fibras de alginato, quitosana e híbridas sem e com glicerol, e as mesmas foram caracterizadas quanto ao titulo, tração, alongamento e tenacidade. Essas fibras foram utilizadas no preparo dos *scaffolds,* que foram produzidos utilizando quatro metodologias diferentes de secagem das estruturas e com isso pode-se concluir:

Em relação ao ensaio de tração realizado, os resultados apresentados foram diferentes aos da literatura, pois esses valores podem variar em função da fonte do polímero utilizado e processos de produção. Mas os resultados obtidos com as fibras híbridas apresentaram uma melhora na tenacidade em comparação com os polímeros utilizados puros.

O desenvolvimento dos *scaffolds* utilizando a metodologia de congelamento em *ultrafreezer* e liofilização apresentou boa estruturação e as fibras não sofreram danos em sua integridade, como ocorreu com as metodologias de secagem na estufa e a temperatura ambiente. Devido ao melhor resultado dos *scaffolds* com essa metodologia, apenas as estruturas produzidas dessa forma foram reproduzidas e caracterizadas. As microscopias ópticas apresentaram que os *scaffolds* possuíam uma estrutura porosa interconectada devido ao entrelaçamento das fibras.

Ambos os ensaios de viabilidade celular realizados, com MTT e cristal violeta não apresentaram toxicidade em nenhum dos *scaffolds* estudados. Os valores relacionados aos *scaffolds* encontrados foram maiores que os controles positivos e negativos, com exceção dos *scaffolds* à base de alginato. E no ensaio de MTT, os *scaffolds* de quitosana apresentaram possibilidade de proliferação celular após 48 h.

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de DSC e TG apresentaram que as curvas dos *scaffolds* híbridos indicam que há uma interação entre os polímeros alginato e quitosana. Essa interação pode ser observada no deslocamento dos picos endotérmicos e exotérmicos dos *scaffolds* híbridos em relação aos de alginato e quitosana, em que este apresentou um perfil intermediário entre os dois polímeros.

A partir do ensaio de absorção com água, o glicerol pode ter funcionado como um estabilizante, pois os *scaffolds* que o continham em suas estruturas apresentaram maior percentual de absorção de água e menor perda de massa comparados aos que não o continham.

Nos estudos de biomineralização as estruturas de quitosana apresentaram desde o terceiro dia de ensaio aparecimento de cristais de hidroxiapatita, comprovado pelo EDS realizado com as mesmas amostras.

No estudo de biodegradação foi observado um pico de degradação dos *scaffolds* híbrido e de quitosana sem e com glicerol no sétimo dia de ensaio, por meio dos valores encontrados da concentração de açúcares redutores e pelas microscopias das estruturas.

Levando-se em consideração todos os dados apresentados e a revisão literária realizada, os *scaffolds* híbridos produzidos confirmaram a formação de um complexo polieletrolítico, pois apresentaram uma estrutura mecanicamente mais resitente que os polímeros alginato e quitosana. Além disso, os ensaios biológicos, apresentaram bons resultados, em que o *scaffold* híbrido sem glicerol mostrou uma absorbância 37,6% superior que o controle positivo no ensaio de viabilidade celular com cristal violeta e a presença de cristais de hidroxiapatita no ensaio de biomineralização verificado por MEV/EDS. Portanto, o *scaffold* híbrido apresentou bons resultados mecânicos e biológicos, indicando que a mistura dos dois polímeros pode ser considerada um avanço no desenvolvimento do biomaterial.

7 PERSPECTIVAS DE DESENVOLVIMENTOS FUTUROS

Estudar a possibilidade de incorporação de princípios ativos nas estruturas;

Testar outras concentrações de glicerol ou outros platicizantes;

Estudar materiais mais flexíveis para utilização como molde para produção dos *scaffolds*;

Estudar outras formas de degradação dos *scaffolds*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Relatório de acompanhamento setorial** (número 4): Têxtil e Confecção, 2009, 12 p.

ABINT – Associação Brasileira da Indústria de Nãotecidos e Têxteis Técnicos. Disponível em: <http://www.abint.org.br/naotecidos.html>. Acesso em: 25 out. 2014.

AGARWAL, S.; GREINER, A.; WENDORFF, J.H. **Functional materials by electrospinning of polymers**. Progress in Polymer Science, v. 38, p. 963-991, 2013.

ALMEIDA, L.R.; MARTINS, A.R.; FERNANDES, E.M.; OLIVEIRA, M.B.; CORRELO, V.M.; PASHKULEVA, I.; MARQUES, A.P.; RIBEIRO, A.S.; DURÃES, N.F.; SILVA, C.J.; BONIFÁCIO, G.; SOUSA, R.A.; OLIVEIRA, A.L.; REIS, R.L. **New biotextiles**

for tissue engineering: Development, characterization and in vitro cellular viability. Acta Biomaterialia, v. 9, p. 8167–8181, 2013.
ALVARENGA, E.S. **Characterization and Properties of Chitosan**. Biotechnology of Biopolymers. InTech, v. 1, p. 91-108, 2011.
AMINI, A.R.; LAURENCIN, C.T.; NUKAVARAPU, S.P.; **Bone tissue engineering: recent advances and challenges**. Journal of Critical Reviews in Biomedical Engineering, v. 40, n. 5, p. 363-408, 2012.
ANITHA, A.; SOWMYA, S.; KUMAR, P.T.S.; DEEPTHI, S.; CHENNAZHI, K.P.; EHRLICH, H.; TSURKAN, M.; JAYAKUMAR, R. **Chitin and chitosan in selected biomedical applications**. Progress in Polymer Science, v. 39, p. 1645-1646, 1648-1650, 2014.
ARAÚJO, M.; FANGUEIRO, R.; HONG, H. **Têxteis Técnicos: Materiais do Novo Milénio**, Ed. Williams, Ltda, Ministério da Economia, v. 2, p. 167, 2001.
AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Test Method for Tensile Properties of Single Textile Fibers. **ASTM D 3822 (2007)**.
AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Test Method for Plastics: Dynamic Mechanical Properties: In Compression. **ASTM D5024-95-A (2015).**
AYAZ, H.G.S.; PERETS, A.; AYAZ, H.; GILROY, K.D.; GOVINDARAJ, M.; BROOKSTEIN, D.; LELKES, P.I. **Textile-templated electrospun anisotropic *scaffolds* for regenerative cardiac tissue engineering**. Biomaterials, v. 35, p. 8540-8552, 2014.
AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; FOOK, M.V.; COSTA, A.C.F.M. **Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
BALAN, V.; VERESTIUC, L. **Strategies to improve chitosan hemocompatibility: a review**. European Polymer Journal, v. 53, p. 171-188, 2014.
BAYRAMOGLU, G.; TEKINAY, T; OZALP, C.; ARICA, M.Y. **Fibrous polymer grafted magnetic chitosan beads with strong poly (cation-exchange)l groups for single step purification of lysozyme.** Journal of Chromatography B, v. 990, p. 84-95, 2015.
BAYSAL, K.; AROGUZ, A.Z.; ADIGUZEL, Z.; BAYSAL, B.M. **Chitosan/alginate crosslinked hydrogel: Preparation, characterization and application for cell growth purposes**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 59, p. 342-348, 2013.
BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y.J.K.; LIMA, D.P. **Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses etereosseletivas**. Química Nova, v. 32, n. 2, p. 306-319, 2011.
BESNARD, V.; WHITSETT, J.A. Tissue engineering for the respiratory epithelium: cell-based therapies for treatment of Lung disease. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 4ª ed. London: Elsevier Inc., 2014, cap. 73, p. 1543-1561.
BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. **Recent advances in bone tissue engineering *scaffolds***. Trends in Biotechnology, v. 30, n. 10, p. 546-549, 2012.
BOSE, S.; VAHABZADEH, S.; BANDYOPADHYAY, A. **Bone tissue engineering using 3D printing**. Materials Today, v. 16, n. 12, p. 496-504, 2013.
BRADBURY, S.L.; JAKOBY, W.B. **Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: effects on aldehyde dehydrogenase**. Proceedings of National Academy of Sciences., v. 69, n. 9, p. 2373-2376, 1972.

BRAGHIROLLI, D.I.; STEFFENS, D.; PRANKE, P. **Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics**. Drug Discovery Today, v. 19, n. 6, p. 743-754, 2014.

CAMPANA-FILHO, S.P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.R.; CARDOSO, M.B.; BATTISTI, M.V.; SIM, P.C.; GOY, R.C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. **Extração, estruturas e propriedades de α- e β-quitina**. Química Nova, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CANEVAROLO JR, S.V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**, Editora ArtLiber, São Paulo, 2004, 448p.

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Materiais Avançados para Saúde Médico-odontológica. In: **Materiais avançados no Brasil 2010-2022**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, cap. 7, p. 297-331, 2010.

CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G.A. **Elastomeric biomaterials for tissue engineering**. Progress in Polymer Science, v. 38, p. 586-591, 2013.

CHIN, K.L.; AHMAD, S.H. **Biomedical-Grade Chitosan in Wound Management and Its Biocompatibility *in Vitro***. Biopolymers. Scyo, v. 1, p. 19-36, 2010.

COLLINS, M.N.; BIRKINSHAW, C. **Hyaluronic acid based *scaffolds* for tissue engineering – a review**. Carbohydrate Polymers, v. 92, p. 1263-1266, 2013.

COSTA, S.M.; AGUIAR, A.; LUZ, S.M.; PESSOA JR, A.; COSTA, S.A. Sugarcane straw and its cellulosic fraction as raw materials for obtainment of textile fibers and other bioproducts. **Polysaccharides, Bioactivity and Biotechnology**, Capítulo aprovado em fase de produção SpringerReference, Chapter 53-1, DOI: 10.1007/978-3-319-03751-6_53-1, p. 1-19, 2014.

COSTA JR, E.S. **Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial**. Minas Gerais: PPGEM-UFMG, 2008. 133 p.

COSTA-PINTO, A.R.; MARTINS, A.M.; CASTELHANO-CARLOS, M.J.; CORRELO, V.M.; SOL, P.C.; LONGATTO-FILHO, A.; BATTACHARYA, M.; REIS, R.L.; NEVES, N.M. **In vitro degradation and in vivo biocompatibility of chitosan-poly (butylene succinate) fiber mesh *scaffolds***. Journal of bioactive and compatible polymers, v. 29, n. 2, p. 137-151, 2014.

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

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E. **Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications**. Progress in Polymer Science, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DIAS, M.R.; GUEDES, J.M.; FLANAGAN, C.L.; HOLLISTER, S.J.; FERNANDES, P.R. **Optimization of *scaffold* design for bone tissue engineering: A computational and experimental study**. Medical Engineering & Physics, v. 36, p. 448–457, 2014.

DOSER, M.; PLANCK, H. Textiles for implants and regenerative medicine. In: BARTELS, V.T. **Handbook of medical textiles**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2011, cap. 5, p. 132-152.

FERNANDES, L.L; RESENDE, C.X.; TAVARES, D.S.; SOARES, G.A.; CASTRO, L.O.; GRANJEIRO, J.M. **Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan *scaffolds* for tissue engineering**. Polímeros, v. 21, n.1, p. 1-6, 2011.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L.F. **Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado**. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, v.35, n.3, p.203-206, 2008.

GARCIA-CRUZ, C.H.; FOGGETTI, U.; SILVA da, A.N. **Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção**. Química Nova, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

GHOSE, T.K. **Measurement of cellulose activities**. Pure Applied Chemistry, v. 59, p. 257-268, 197.

HAN, F.; DONG, Y.; SU, Z.; YIN, R.; SONG, A.; LI, S. **Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge *scaffold* as skin tissue engineering material**. International Journal of Pharmaceutics, v. 476, p. 124-133, 2014.

HAN, T.; NEW, N.; FURUIKE, T.; TOKURA, S.; TAMURA, H. **Methods of N-acetylated chitosan *scaffolds* and its in vitro biodegradation by lysozyme**. Journal of Biomedical Science and Engineering, v. 5, p. 15-23, 2012.

HEINEMANN, C.; HEINEMANN, S.; BERNHARDT, A.; WORCH, H.; HANK, T. **Novel Textile Chitosan *Scaffolds* Promote Spreading, Proliferation, and Differentiation of Osteoblasts.** Biomacromolecules v. 9, p. 2913-2920, 2008.

HONGU, T.; PHILLIPS, G.O.; TAKIGAMI, M. Searching the routes of fibers. **New millennium fibers**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2005, cap. 1, p. 1-31.

HORROCKS, A.R.; ANAND, S. C. **Handbook of technical textiles**. Manchester: CRC PressI Llc, 2000, 559 p.

HU, W-W.; YU, H-N. **Coelectrospinning of chitosan/alginate fibers by dual-jet system for modulating material surfaces**. Carbohydrate Polymers, v. 95, p. 716–727, 2013.

HYLAND, L.L.; TARABAN, M.B.; HAMMOUDA, B.; YU, Y.B. **Mutually reinforced multicomponent polysaccharide networks**. Biopolymers, v. 95, n. 12, p. 840-851, 2011.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARLIZATION – ISO. Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **ISO 10.993-5:2009 (2009).**

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARLIZATION – ISO. Determination of thickness of textiles and textile products. **ISO 5084:1996 (1996).**

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARLIZATION – ISO. Implants for surgery -- In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials. **ISO 23.317:2007 (2007).**

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARLIZATION – ISO. Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes. **ISO 13.485:2003 (2003).**

IWASAKI, N.; YAMANE, S-T.; MAJIMA, T.; KASAHARA, Y.; MINAMI, A.; HARADA, K.; NONAKA, S.; MAEKAWA, N.; TAMURA, H.; SHIONO, M.; MONDE, K.; NISHIMURA, S. **Feasibility of Polysaccharide Hybrid Materials for *Scaffolds* in Cartilage Tissue Engineering: Evaluation of Chondrocyte Adhesion to Polyion Complex Fibres Prepared from Alginate and Chitosan**. Biomacromolecules, v. 5, p. 828-833, 2004.

JAFFE, M.; EAST, A.J. PET Processing – Melt Spinning. In: LEWIN, M. **Handbook of Fiber Chemistry**, 3ª Edition, Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group, 2007, p. 5-10.

JAKOB, F.; EBERT, R.; IGNATIUS, A.; MATSUSHITA, T.; WATANABE, Y.; GROLL, J., WALLES, H. **Bone tissue engineering in osteoporosis**. Maturitas, v. 75, p. 118–124, 2013.

JANA, S.; SIMARI, R.D.; SPOON, D.B.; LERMAN, A. **Drug delivery in aortic valve tissue engineering**. Journal of Controlled Release, v. 196, p. 307-323, 2014.

JAYAKUMAR, J.; PRABAHARAN, M.; SUDHEESH KUMAR, P.T.; NAIR, S.V.; TAMURA, H. **Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications**. Biotechnology advanvances, v. 29, n. 3, p. 322-337, 2011.

JIN, H-H.; KIM, D-H.; KIM, T-W.; SHIN, K-K.; JUNG, J.S. ***In vivo* evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan-alginate composite *scaffolds* for bone tissue engineering**. International Journal of Biological Macromolecules, v.51, 1079, 2012.

JOST, V.; KOBSIK, K.; SCHMID, M.; NOLLER, K. **Influence of plasticizer on the barrier, mechanical and grease properties of alginate cast films**. Carbohydrate Polymers, v. 110, p. 309-319, 2014.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10a. Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004, cap. 8, p. 180-197.

KAVYA, K.C.; JAYAKUMAR, R.; NAIR, S.; CHENNAZHI, K.P. **Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nSiO_2 composite *scaffold* for bone tissue engineering**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 59, p. 255-263, 2013.

KHAOW, T.; OYEN, M.L. **Composite electrospun gelatin fiber-alginate gel *scaffolds* for mechanically robust tissue engineered cornea**. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, v. 21, p. 185-194, 2013.

KITTUR, F.S.; PRASHANTH, K.V.H.; SANKAR, K.U.; THARANATHAN, R.N. **Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry**. Carbohydrate Polymers, v. 49, p. 185-193, 2002.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. **How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?** Biomaterials, v. 17, n. 15, p. 2907-2915, 2006.

KYLLONEN, L.; D'ESTE, M.; ALINI, M.; EGLIN, D. **Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone**. Acta Biomaterialia, v. 11, p. 412-434, 2015.

LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.de T. **Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico**. Química Nova, v.32, n.3, p.672-678, 2009.

LAURENCIN, C.T.; ASHE, K.M.; HENRY, N.; KAN, H.M.; LO, K.W-H. **Delivery of small molecules for bone regenerative engineering: preclinical studies and potential clinical applications**. Drug Discovery Today, v. 19, n. 6, p. 794-800, 2014.

LEE, K.; AHN, S.; CHOI, C.H.; LEE, D.; JUNG, W-K.,; KIM, G. **Functionallized alginate/chitosan biocomposites consisted of cylindrical struts and biologically designed for chitosan release**. Current Applied Physics, v.14, p.1105-1106, 2014.

LI, Z.; RAMAY, H.R.; HAUCH, K.D.; XIAO, D.; ZHANG, M. Chitosan-alginate hybrid *scaffolds* for bone tissue engineering. Biomaterials, v. 26, p. 3919-3928, 2005.

LIAKOS, I.; RIZZELLO, L.; BAYER, I.S.; POMPA, P.P.; CINGOLANI, R. **Controlled antiseptic release by alginate polymer films and beads**. Carbohydrate Polymers, v.92, p.176-178, 2013.

LIAKOS, I.; RIZZELLO, L.; SCURR, D.J.; POMPA, P.P.; BAYER, I.S; ATHANASSIOU, A. **All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties**. International Journal of Pharmaceutics, v.463, n.2, p.137-138, 2014.

LIMA, P.A.L.; RESENDE, C.X.; SOARES, G.D.A.; ANSELME, K.; ALMEIDA, L.E. **Preparation, characterization and biological testo f 3D-*scaffolds* based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering**. Materials Science and Engineering C, v.33, p. 3389-3395, 2013.

LIU, Y.; LIM, J.; TEOH, S-H. **Review: Development of clinically relevant *scaffolds* for vascularized bone tissue engineering**. Biotechnology Advances, v. 31, p. 688-705, 2013.

LIU, Y.; MA, L.; GAO, C. **Facile fabrication of the glutaraldehyde cross-linked collagen/chitosan porous *scaffold* for skin tissue engineering**. Materials Science and Engineering C, v. 32, p. 2361-2366, 2012.

LIUYUN, J.; YUBAO, L.; CHENGDONG, X. **Preparation and biological properties of a novel composite *scaffold* of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose for bone tissue engineering**. Journal of Biomedical Science, v. 16, n. 65, doi:10.1186/1423-0127-16-65, 2009.

MALAFAYA, P.B.; PEDRO, A.J.; PETERBAUER, A.; GABRIEL, C.; REDL, H.; REIS, R.L. **Chitosan particles agglomerated *scaffolds* for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 16, p. 1077-1085, 2005.

MALUF, E.; KOLBE, W. **Manual de Dados Técnicos para a Indústria Têxtil**. São Paulo: Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção ABIT and Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 2003, p. 37.

MARTINS, A.M.; SANTOS, M.I.; AZEVEDO, H.S.; MALAFAYA, P.B. REIS, R.L. **Natural origin *scaffolds* with in situ pore forming capability for bone tissue engineering applications**. Acta Biomaterialia, v. 4, p. 1637-1645, 2008.

MCCABE, K.L.; LANZA, R. Corneal Replacement Tissue. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 4ª ed. London: Elsevier Inc., 2014, cap. 67, p. 1413-1427.

MEDINE, C.N.; KHAN, F.; PERNAGALLO, S.; ZHANG, R.; TURA, O.; BRADLEY, M.; HAY, D.C. Identification and application of polymers as biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine. In: RAMALINGAM, M.; RAMAKRISHNA, S.; BEST, S. **Biomaterials and stem cells in regenerative medicine**. Boca Raton: CRC Press, 2012, cap. 1, p. 1-30.

MOGAHZY, E.E. Introduction: textile fiber-to-fabric engineering. In: **Engineering textiles. Integrating the design and manufacture of textile products**. Cambridge: Woodhead Publishing Limted, 2009, cap. 1, p.3-17.

MOSSMAN T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal of Immunological Methods, v.65, p. 55-63, 1983.

MORTON, W.E.; HEARLE, W.S. **Physical properties of textile fibres**. Fourth edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, p. 274-319 2008.

MULLER, J.M.; SANTOS dos, R.L.; BRIGIDO, R.V. **Produção de Alginato por Microrganismos**. Polímeros, v.21, n.4, p.305-310, 2011.

MUNDSTOCK, K.B.; OLIVEIRA, A.P.N.; HOTZA, D.; ROGERO, S.O. **Avaliação da biocompatibilidade de vidro e vitrocerâmica do sistema SNCP (SiO_2-Na_2O-CaO-P_2O_5)**. Química Nova, v.35, n.4, p.665-670, 2012.

NEREM, R.M.; SCHUTTE, S.C. The challenge of imitating nature. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 4ª ed. London: Elsevier Inc., 2014, cap. 1, p. 9-24.

NIEKRASZEWICZ, B.; NIEKRASZEWICZ, A. The structure of alginate, chitin and chitosan fibres. In: **Handbook of textile fibre structure** Volume 2: Natural, regenerated, inorganic and specialist fibres. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2009, cap. 8, p. 266-306.

OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYATAKE, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. **Effects of chitin and chitosan on blood coagulation**. Carbohydrate Polymers, v. 53, p. 337–342, 2003.

PAGLIARO, M.; ROSSI, M. **The future od glycerol: new uses of a versatile raw material**. Cambridge: RSC Publishing, 104p., 2008.

PARK, H.; CHOI, B.; NGUYEN, J.; FAN, J.; SHAFI, S.; KLOKKEVOLD, P.; LEE, M. **Anionic carbohydrate-containing chitosan *scaffolds* for bone regeneration**. Carbohydrate Polymers, v. 97, p. 587–596, 2013.

PAWAR, S.N.; EDGAR, K.J. **Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications**. Biomaterials, v. 33, p.3281-3283, 2012.

PETRULYTE, S.; PETRULIS, D. Modern textiles and biomaterials for healthcare. In: BARTELS, V.T. **Handbook of Medical Textiles**, Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2011, cap. 1, p. 1-37.

PILLAI, C.K.S.; PAUL, W.; SHARMA, C.P. **Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation**. Progress in Polymer Science, v.34, n.7, p.641-678, 2009.

PRICE, D.M.; HOURSTON, D.J.; DUMONT, F. Thermogravimetry of Polymers. In: MEYERS, R.A. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000, p. 8094-8105.

REUTERS. Research and Markets: Global Technical Textiles Market Report 2013 – 2018. Disponível em: <http://www.reuters.com/article/2013/11/26/research-and-markets-idUSnBw265546a+100+BSW20131126>. Acesso em: 20 nov. 2013.

REZENDE, R.A.; BÁRTOLO, P.J.; MENDES, A.; FILHO, R.M. **Análise do comportamento mecânico do alginato como biomaterial para a fabricação de *scaffolds* na engenharia de tecidos**. Chemical Engineering Transactions, v.17, p.1305-1310, 2009.

SAJESH, K.M.; JAYAKUMAR, R.; NAIR, S.V.; CHENNAZHI, K.P. **Biocompatible conducting chitosan/polypirrole-alginate composite *scaffold* for bone tissue engineering**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 62, p. 465-471, 2013.

SALEM, V. (Ed.). Classificação geral. In: **Tingimento têxtil: fibras, conceitos e tecnologia.** São Paulo: Blucher: Golden Tecnologia, 2010, cap. 2, p. 29-40.

SHALUMON, K.T.; ANULEKHA, K.H.; NAIR, SREEJA V.; NAIR, S.V.; JAYAKUMAR, R. **Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings**. International Journal of Biological Macromolecules, v.49, p.247-250, 2011.

SHAO, X.; HUNTER, C.J.; **Developing an alginate/chitosan hybrid fiber *scaffold* for annulus fibrosus cells**. Journal of Biomedical Materials Research Part A. In: Wiley Interscience, p. 701-710, 2007.

SHRIVATS, A.R.; ALVAREZ, P.; SCHUTTE, L.; HOLLINGER, J.O. Bone Regeneration. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 4ª ed. London: Elsevier Inc., 2014, cap. 55, p. 1201-1222.

SIKAREEPAISAN, P.; RUKTANONCHAI, U.; SUPAPHOL, PITT. **Preparation and characterization of asiaticoside-loaded alginate films and their potential for use as effectual wound dressing**. Carbohydrate Polymers, v.83, p.1457-1460, 2011.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. **Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços**. Química Nova, v.29, n.4, p.776-785, 2006.

SIMSEK-EGE, F.A.; BOND, G.M.; STRINGER, J. **Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH**. Journal of Polymer Science, v. 88, n. 2, p. 346-351, 2003.

SIQUEIRA, R.L.; ZANOTTO, E.D. **Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade**. Química Nova, v. 34, n. 7, p. 1231-1241, 2011.

SOWJANYA, J.A.; SINGH, J.; MOHITA, T.; SARVANAN, S.; MOORTHI, A. **Biocomposite *scaffolds* containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering**. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, v.109, p.294-300, 2013.

SUN, J.; TAN, H. **Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications**. Materials, v. 6, n. 4, p. 1285-1309, 2013.

TAMAYOL, A.; AKBARI, M.; ANNABI, N.; PAUL, A.; KADHEMHOSSEINI, A.; JUNCKER, D. **Fiber-based tissue engineering: progress, challenges and opportunities**. Biotechnology Advances, v. 31, p.670-675, 2013.

TRACHTENBERG, J.E.; KASPER, F.K.; MIKOS, A.G. Polymer Sacffold Fabrication. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 4ª ed. London: Elsevier Inc., 2014, cap. 22, p. 423-441.

VACANTI, J.P.; VACANTI, C.A. The History and Scope of Tissue Engineering. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 4ª ed. London: Elsevier Inc., 2014, cap. 1, p. 3-8.

VAGENENDE, V.; YAP, M.G.; TROUT, B.L. **Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol**. Biochemistry, v. 48, n. 46, p. 11084-11096, 2009.

VALENTE, J.F.A.; VALENTE, T.A.M.; ALVES, P.; FERREIRA, P.; SILVA, A.; CORREIA, I.J. **Alginate based *scaffolds* for bone tissue engineering**. Materials Science and Engineering C, v. 32, p. 2596-2603, 2012.

VENKATESAN, J.; BHATNAGAR, I.; MANIVASAGAN, P. **Alginate composites for bone tissue engineering: A review**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 72, p. 269–281, 2015.

VENKATESAN, J.; BHATNAGAR, I.; KIM, S-K. **Chitosan-alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering**. Marine Drugs, v.12, p. 300-316, 2014.

WAHLBERG, L.U. Brain implants. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 4ª ed. London: Elsevier Inc., 2014, cap. 62, p. 1329-1339.

WAN, A.C.A.; TAI, B.C.U. **Chitin - A promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies**. Biotechnology Advances, v. 31, p. 1776–1785, 2013.

WANG, P.; TAWIAH, B.; TIAN, A.; WANG, C.; ZHANG, L.; FU, S. **Properties of alginate fiber spun-dyed with fluorescent pigment dispersion**. Carbohydrate Polymers, v. 118, p. 143–149, 2015.

WENDLANDT, W.W. **Thermal Analysis**. 3ª edição, John Wiley & Sons Inc, New York, 1986, 832p.

WORK, R.W. **Dimensions, birefringences and force-elongation behavior of major and minor ampullate silk fibres from orb web spinning spiders – The effects of wetting on these properties**. Textile Research Journal, v. 47, p. 650-662, 1977.

ZAHOOR, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. **Inhalable alginate nanoparticles as antitubecular drug carriers against experimental tuberculosis**. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 26, p. 298-303, 2005.