

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

MONIZE GABRIELLA CESQUIM

**Desenvolvimento de *scaffolds* de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-
glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecidos**

Lorena

2023

MONIZE GABRIELLA CESQUIM

Desenvolvimento de *scaffolds* de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecidos

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de concentração de Desenvolvimento de produtos e processos

Orientadora: Profa. Dra. Liana Alvares Rodrigues

Versão Corrigida

Lorena

2023

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cesquim, Monize Gabriella

Desenvolvimento de scaffolds de quitosana/gelatina/xerogel de tanino- glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecidos / Monize Gabriella Cesquim; orientadora Liana Alvares Rodrigues - Versão Corrigida. - Lorena, 2023. 183 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2023

1. Engenharia de tecidos. 2. Scaffolds. 3. Quitosana. 4. Xerogel. 5. Tanino. I. Título. II. Rodrigues, Liana Alvares, orient.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus avós, Valdomiro e Noemia, cuja orientação, investimento, cuidado e amor foram essenciais em minha jornada. Sem vocês, minha trajetória não seria a mesma.

Ao meu noivo, José Lucas, expresso minha gratidão pelo encorajamento, ajuda e paciência. Sua presença tornou cada passo mais suave nessa jornada.

À minha mãe, Regiane, agradeço por ter sido a fonte de inspiração que me motivou a perseguir este sonho e acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por permitir que este sonho se concretizasse e por guiar-me em cada passo do caminho.

Aos meus queridos avós Noemia Cesquim e Valdomiro Cesquim, que sempre se esforçaram muito para me proporcionar uma educação acadêmica sólida, princípios e valores que carrego com muito carinho. À minha mãe Regiane Cristina Cesquim, por me ensinar a enxergar o mundo de forma mais empática.

Ao meu noivo José Lucas Galvão de Oliveira, pela cumplicidade, apoio inabalável e amor que me ajudaram a superar os momentos difíceis e me impulsionaram a seguir em frente.

À Prof^a. Dr^a. Liana Alvares Rodrigues, minha orientadora, pela excelente orientação, paciência e confiança em meu potencial, que foram essenciais para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos meus colegas de laboratório, Bruno Baena e Nicolas Perciani de Moraes, pela colaboração ao longo do trabalho.

À minha grande amiga Vanessa Oliva Leite Marques Pereira, por me incentivar a seguir o sonho do mestrado e por estar ao meu lado nesta jornada, compartilhando conhecimentos e experiências.

Ao Prof. Dr. Gilmar Patrocínio Thim e ao Dr. Tiago Moreira Bastos Campos, do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), pela gentileza em cederem os equipamentos necessários para a realização das análises dos materiais, o que foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Lucia Caetano Pinto da Silva, por ceder o liofilizador que permitiu a produção dos *scaffolds* utilizados nesta pesquisa.

Agradeço novamente ao Prof. Dr. Gilmar Patrocínio Thim e à Prof^a. Dr^a. Simone de Fátima Medeiros Sampaio pelas valiosas sugestões e contribuições durante a banca de qualificação, que enriqueceram significativamente o meu trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Meus sinceros agradecimentos pelo apoio financeiro.

E, por fim, a todos os demais envolvidos, sejam familiares, amigos, colegas de instituição ou outros profissionais, que de alguma forma contribuíram para esta conquista, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

CESQUIM, M. G. **Desenvolvimento de *scaffolds* de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecidos.** 2023. 183 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

Os métodos convencionais de transplante possuem limitações, como o risco de infecções e rejeição. A engenharia de tecidos possui o propósito de solucionar estes e outros problemas através da simulação dos microambientes teciduais pelo uso de *scaffolds*. Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais, produzidas a partir de biomateriais, que fornecem suporte para a regeneração dos tecidos. Portanto, precisam dispor de algumas características como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência mecânica e porosidade compatível com o tecido de interesse. O presente trabalho visa o estudo do impacto da adição de partículas de xerogel de tanino-glutaraldeído, assim como a variação da concentração das espécies envolvidas (quitosana, gelatina e glutaraldeído) nas propriedades dos *scaffolds* através das análises da capacidade de adsorção de proteínas, porosidade, dissolução e intumescimento. Nos *scaffolds* de gelatina, não foi possível avaliar o impacto da variação da concentração de glutaraldeído nas propriedades dos *scaffolds*, devido à baixa estabilidade de todos os materiais preparados, uma vez que as amostras degradaram durante a etapa de remoção de resíduos de glutaraldeído não reagido. No entanto, a adição de tanino aos *scaffolds* de gelatina resultou na diminuição da taxa de degradação, dissolução e intumescimento. Foi analisada a influência da concentração de glutaraldeído nas propriedades de *scaffolds* de quitosana pura, sendo seu aumento responsável pelas reduções na taxa de intumescimento, dissolução, adsorção de proteínas e pelo aumento da porosidade dos *scaffolds* preparados. Enquanto o aumento da concentração de quitosana nesses *scaffolds* foi responsável pela elevação da quantidade de proteínas adsorvidas, mas não impactou significativamente nas propriedades de intumescimento, porosidade e dissolução dos materiais. No caso dos *scaffolds* de quitosana/gelatina, o aumento da concentração de glutaraldeído ocasionou a redução da quantidade de proteínas adsorvidas e da taxa de dissolução, bem como o aumento da porosidade e da taxa de intumescimento. Já o aumento da concentração de gelatina foi responsável pela redução da adsorção de proteínas, porosidade e taxa de dissolução, mas não possui efeito significativo na taxa de intumescimento. Os *scaffolds* sintetizados a partir de gelatina/quitosana/xerogel tanino-glutaraldeído apresentaram taxas de porosidade, intumescimento e dissolução adequadas para aplicação em engenharia de tecidos. Seu grande diferencial foi o expressivo aumento da capacidade de adsorção de proteínas, o que demonstra seu elevado potencial de biocompatibilidade, uma vez que a biocompatibilidade se refere à capacidade de um material de interagir de forma harmoniosa com os tecidos biológicos, sem causar reações adversas ou toxicidade. Nesse contexto, um *scaffold* com alta capacidade de adsorção de proteínas é capaz de atrair e interagir favoravelmente com as proteínas presentes no ambiente biológico circundante.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos. *Scaffold*. Quitosana. Xerogel de tanino

ABSTRACT

CESQUIM, M. G. **Development of chitosan/gelatin/tannin-glutaraldehyde scaffolds for application in tissue engineering**. 2023. 183 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

Conventional transplantation methods have limitations, such as the risk of infections and rejection. Tissue engineering has the purpose of solving these and other problems through the simulation of tissue microenvironments through the use of scaffolds. Scaffolds are three-dimensional structures, produced from biomaterials, that provide support for tissue regeneration. Therefore, they need to have some characteristics such as: biocompatibility, biodegradability, mechanical strength and porosity compatible with the tissue of interest. The present work aims to study the impact of the addition of tannin-glutaraldehyde xerogel particles, as well as the variation in the concentration of the species involved (chitosan, gelatin and glutaraldehyde) on the properties of the scaffolds through the analysis of the protein adsorption capacity, porosity, dissolution and swelling. In gelatin scaffolds, it was not possible to evaluate the impact of varying glutaraldehyde concentration on the properties of the scaffolds, due to the low stability of all prepared materials, since the samples degraded during the step of removing unreacted glutaraldehyde residues. However, the addition of tannin to gelatin scaffolds resulted in a decrease in the rate of degradation, dissolution and swelling. The influence of glutaraldehyde concentration on the properties of pure chitosan scaffolds was analyzed, and its increase was responsible for reductions in the rate of swelling, dissolution, protein adsorption and for the increase in porosity of the prepared scaffolds. While the increase in chitosan concentration in these scaffolds was responsible for increasing the amount of adsorbed proteins, it did not significantly impact the swelling, porosity and dissolution properties of the materials. In the case of chitosan/gelatin scaffolds, the increase in glutaraldehyde concentration caused a reduction in the amount of adsorbed proteins and in the dissolution rate, as well as an increase in porosity and swelling rate. The increase in gelatin concentration was responsible for the reduction of protein adsorption, porosity and dissolution rate, but did not have a significant effect on the swelling rate. The scaffolds synthesized from gelatin/chitosan/tannin-glutaraldehyde xerogel showed adequate porosity, swelling and dissolution rates for application in tissue engineering. Its great differential was the significant increase in protein adsorption capacity, which demonstrates its high potential for biocompatibility, since biocompatibility refers to the ability of a material to harmoniously interact with biological tissues, without causing adverse reactions or toxicity. In this context, a scaffold with a high protein adsorption capacity is able to attract and interact favorably with proteins present in the surrounding biological environment.

Keywords: Tissue engineering. Scaffold. Chitosan. Tannin xerogel

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da técnica de eletrofiação utilizada para fabricação de <i>scaffolds</i>	42
Figura 2 - Técnica de liofilização empregada no processo de secagem de <i>scaffolds</i>	43
Figura 3 - Biomateriais	45
Figura 4 - Processo de desacetilação da quitina para obtenção da quitosana	51
Figura 5 - Estrutura básica da gelatina.....	54
Figura 6 - Taninos hidrolisáveis: (A) Estrutura molecular do galotanino (B) Estrutura molecular do elagiotanino (C) Estrutura molecular do ácido gálico (D) Estrutura molecular do ácido elágico	59
Figura 7 - (A) Estrutura química de um flavan-3-ol (B) Estrutura química de um tanino condensado.....	60
Figura 8 - (a) Processo de gelificação (b) Micrografia da gelificação em pH 4 e (c) Micrografia da gelificação em pH 6	62
Figura 9 - Estrutura molecular do glutaraldeído	63
Figura 10 - Representação do mecanismo de reticulação da gelatina através do glutaraldeído	63
Figura 11 - Representação do mecanismo de reticulação da quitosana através do glutaraldeído	64
Figura 12 - Representação do processo de reticulação de polímeros híbridos de quitosana e gelatina, induzido pela adição de glutaraldeído.....	65
Figura 13 - Processos de reticulação do glutaraldeído (A) <i>in-situ</i> , (B) <i>ex-situ</i>	66
Figura 14 - Fluxograma da síntese dos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C1 e C2).....	73
Figura 15 - Fluxograma da síntese dos <i>scaffolds</i> de gelatina pura (G).....	75
Figura 16 - Fluxograma da síntese dos <i>scaffolds</i> híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT)	77
Figura 17 - Fluxograma da síntese dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG1, CG2 e CG3).....	79
Figura 18 - Fluxograma da síntese dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT)	81
Figura 19 - Fluxograma da análise de intumescimento	82
Figura 20 - Fluxograma da análise de porosidade	84

Figura 21 - Fluxograma da fabricação da solução de BSA.....	85
Figura 22 - Fluxograma da análise de adsorção de proteínas	86
Figura 23 - Fluxograma da análise de dissolução	87
Figura 24 - Fluxograma da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	88
Figura 25 - Fluxograma da análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	88
Figura 26 - <i>Scaffolds</i> (A) G 0% (v/v) de Ga, (B) G variando Ga, 1, 2, 3 e 4, correspondem a 0,17% (v/v), 0,33% (v/v), 0,67% (v/v) e 1,67% (v/v), respectivamente, (C) GT, (D) C1, (E) C2, (F) CG1, (G) CG2, (H) CG3 e (I) CGT.....	89
Figura 27 - (A) Aspecto dos <i>scaffolds</i> G durante a lavagem com hidróxido de sódio e (B) Aspectos dos <i>scaffolds</i> G após a lavagem com boro-hidreto de sódio	90
Figura 28 - Espectroscopia de infravermelho dos <i>scaffolds</i> de gelatina pura (G): G-1 (0% (v/v) Ga), G-2 (0,17% (v/v) Ga), G-3 (0,33% (v/v) Ga), G-4 (0,67% (v/v) Ga) e G-5 (1,67% (v/v) Ga).....	93
Figura 29 - Espectroscopia de infravermelho nos <i>scaffolds</i> híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT): GT-1 (0,17% (m/v) Tn), GT-2 (0,33% (m/v) Tn), GT-3 (0,50% (m/v) Tn), GT-4 (0,67% (m/v) Tn) e GT-5 (0,83% (m/v) Tn)	95
Figura 30 - Espectroscopia de infravermelho nos <i>scaffolds</i> de quitosana pura C1: C1-1 (1,67% (v/v) Ga), C1-2 (3,33% (v/v) Ga), C1-3 (5% (v/v) Ga), C1-4 (6,67% (v/v) Ga), C1-5 (10% (v/v) Ga) e C1-6 (13,33% (v/v) Ga); e C2: C2-1 (0,67% (m/v) Ch) e C2-2 (1,33% (m/v).....	97
Figura 31 - Espectroscopia de infravermelho nos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina CG1: CG1-1 (0,17% (v/v) Ga), CG1-2 (0,33% (v/v) Ga), CG1-3 (0,67% (v/v) Ga) e CG1-4 (1,67% (v/v) Ga); e CG2: CG2-1 (0,67% (m/v) Ge), CG2-2 (1,33% (m/v) Ge) e CG2-3 (2% (m/v) Ch).....	98
Figura 32 - Espectroscopia de infravermelho nos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT): CGT-1 (0,67% (m/v) Ch) e CGT-2 (1,33% (m/v) Ch)	100
Figura 33 - Taxa média de intumescimento dos <i>scaffolds</i> híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT): GT-1 (0,17% (m/v) Tn), GT-2 (0,33% (m/v) Tn), GT-3 (0,50% (m/v) Tn), GT-4 (0,67% (m/v) Tn) e GT-5 (0,83% (m/v) Tn)	102
Figura 34 - Taxa média de intumescimento dos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C1): C1-1 (1,67% (v/v) Ga), C1-2 (3,33% (v/v) Ga), C1-3 (5,00% (v/v) Ga), C1-4 (6,67% (v/v) Ga), C1-5 (10,00% (v/v) Ga) e C1-6 (13,33% (v/v) Ga)	103

Figura 35 - Taxa média de intumescimento dos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C2): C2-1 (0,67% (m/v) Ch) e C2-2 (1,33% (m/v) Ch).....	104
Figura 36 - Taxa média de intumescimento dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG1): CG1-1 (0,17% (v/v) Ga), CG1-2 (0,33% (v/v) Ga), CG1-3 (0,67% (v/v) Ga) e CG1-4 (1,67% (v/v) Ga).....	104
Figura 37 - Taxa média de intumescimento dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG2): CG2-1 (0,67% (m/v) Ge), CG2-2 (1,33% (m/v) Ge) e CG2-3 (2,00% (m/v) Ge)	105
Figura 38 - Taxa média de intumescimento dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT): CGT-1 (0,67% (m/v) Ch) e CGT-2 (1,33% (m/v) Ch).....	106
Figura 39 - Comparação da taxa média de intumescimento dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana e gelatina CG2-1 (0,67% (m/v) Ch) e CG3-1 (1,33% (m/v) Ch).....	107
Figura 40 - Comparação da taxa média de intumescimento dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG3-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-2), com concentração de quitosana de 0,67% (m/v)	108
Figura 41 - Comparação da taxa média de intumescimento dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG2-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-1), com concentração de quitosana de 1,33% (m/v)	109
Figura 42 - Taxa média de porosidade dos <i>scaffolds</i> híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT): GT-1 (0,17% (m/v) Tn), GT-2 (0,33% (m/v) Tn), GT-3 (0,50% (m/v) Tn), GT-4 (0,67% (m/v) Tn) e GT-5 (0,83% (m/v) Tn).....	110
Figura 43 - Taxa média de porosidade dos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C1): C1-1 (1,67% (v/v) Ga), C1-2 (3,33% (v/v) Ga), C1-3 (5,00% (v/v) Ga), C1-4 (6,67% (v/v) Ga), C1-5 (10,00% (v/v) Ga) e C1-6 (13,33% (v/v) Ga).....	111
Figura 44 - Taxa média de porosidade dos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C2): C2-1 (0,67% (m/v) Ch) e C2-2 (1,33% (m/v) Ch)	112
Figura 45 - Taxa média de porosidade dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG1): CG1-1 (0,17% (v/v) Ga), CG1-2 (0,33% (v/v) Ga), CG1-3 (0,67% (v/v) Ga) e CG1-4 (1,67% (v/v) Ga).....	113
Figura 46 - Taxa média de porosidade dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG2): CG2-1 (0,67% (m/v) Ge), CG2-2 (1,33% (m/v) Ge) e CG2-3 (2,00% (m/v) Ge)	114
Figura 47 - Taxa média de porosidade dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT): CGT-1 (0,67% (m/v) Ch) e CGT-2 (1,33% (m/v) Ch)...	115

Figura 48 - Comparação da taxa média de porosidade dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana e gelatina CG2-1 (0,67% (m/v) Ch) e CG3-1 (1,33% (m/v) Ch)	116
Figura 49 - Comparação da taxa média de porosidade dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG3-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-2), com concentração de quitosana de 0,67% (m/v).....	116
Figura 50 - Comparação da taxa média de porosidade dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG2-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-1), com concentração de quitosana de 1,33% (m/v).....	117
Figura 51 - Imagens MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> de gelatina pura (G): G-1 (0% (v/v) Ga), G-2 (0,17% (v/v) Ga), G-3 (0,33% (v/v) Ga), G-4 (0,67% (v/v) Ga) e G-5 (1,67% (v/v) Ga), com ampliação de 60x.....	121
Figura 52 - Imagens MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT): GT-1 (0,17% (m/v) Tn), GT-2 (0,33% (m/v) Tn), GT-3 (0,50% (m/v) Tn), GT-4 (0,67% (m/v) Tn) e GT-5 (0,83% (m/v) Tn), com ampliação de 60x	123
Figura 53 - Imagens MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C1): C1-1 (1,67% (v/v) Ga), C1-2 (3,33% (v/v) Ga), C1-3 (5,00% (v/v) Ga), C1-4 (6,67% (v/v) Ga), C1-5 (10,00% (v/v) Ga) e C1-6 (13,33% (v/v) Ga), com ampliação de 60x.....	125
Figura 54 - Imagens MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C2): C2-1 (0,67% (m/v) Ch) e C2-2 (1,33% (m/v) Ch), com ampliação de 60x	126
Figura 55 - Imagens MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG1): CG1-1 (0,17% (v/v) Ga), CG1-2 (0,33% (v/v) Ga), CG1-3 (0,67% (v/v) Ga) e CG1-4 (1,67% (v/v) Ga), com ampliação de 60x.....	128
Figura 56 - Imagens MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG2): CG2-1 (0,67% (m/v) Ge), CG2-2 (1,33% (m/v) Ge) e CG2-3 (2,00% (m/v) Ge), com ampliação de 60x	129
Figura 57 - Imagens MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT): CGT-1 (0,67% (m/v) Ch) e CGT-2 (1,33% (m/v) Ch), com ampliação de 60x	130
Figura 58 - Comparação das imagens MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana e gelatina CG2-1 (0,67% (m/v) Ch) e CG3-1 (1,33% (m/v) Ch), com ampliação de 60x	131
Figura 59 - Comparação das imagens MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG3-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-2), com concentração de quitosana de 0,67% (m/v), ampliado 60x.....	133

Figura 60 - Comparação das imagens MEV da superfície dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG2-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-1), com concentração de quitosana de 1,33% (m/v), ampliado 60x	134
Figura 61 - Quantidade média adsorvida de BSA nos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C1): C1-1 (1,67% (v/v) Ga), C1-2 (3,33% (v/v) Ga), C1-3 (5,00% (v/v) Ga), C1-4 (6,67% (v/v) Ga), C1-5 (10,00% (v/v) Ga) e C1-6 (13,33% (v/v) Ga).....	136
Figura 62 - Quantidade média adsorvida de BSA nos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C2): C2-1 (0,67% (m/v) Ch) e C2-2 (1,33% (m/v) Ch).....	137
Figura 63 - Quantidade média adsorvida de BSA nos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG1): CG1-1 (0,17% (v/v) Ga), CG1-2 (0,33% (v/v) Ga), CG1-3 (0,67% (v/v) Ga) e CG1-4 (1,67% (v/v) Ga).....	138
Figura 64 - Quantidade média adsorvida de BSA nos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG2): CG2-1 (0,67% (m/v) Ge), CG2-2 (1,33% (m/v) Ge) e CG2-3 (2,00% (m/v) Ge)	139
Figura 65 - Quantidade média adsorvida de BSA nos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT): CGT-1 (0,67% (m/v) Ch) e CGT-2 (1,33% (m/v) Ch).....	140
Figura 66 - Comparação da quantidade média adsorvida de BSA nos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana e gelatina CG2-1 (0,67% (m/v) Ch) e CG3-1 (1,33% (m/v) Ch).....	141
Figura 67 - Comparação da quantidade média adsorvida de BSA nos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG3-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-2), com concentração de quitosana de 0,67% (m/v)	142
Figura 68 - Comparação da quantidade média adsorvida de BSA nos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG2-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-1), com concentração de quitosana de 1,33% (m/v)	143
Figura 69 - Aspecto da solução PBS após 21 dias de incubação a 37 °C, com volume de solução de 25 mL, dos <i>scaffolds</i> compostos por gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (a) GT-1 e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (b) CGT-1 e (c) CGT-2.....	144
Figura 70 - Aspecto dos <i>scaffolds</i> de gelatina (G): G-1 (0% (v/v) Ga), G-2 (0,17% (v/v) Ga), G-3 (0,33% (v/v) Ga), G-4 (0,67% (v/v) Ga) e G-5 (1,67% (v/v) Ga), após 0 h, 1 h, 28 h e 68 h de incubação em 25 mL de solução PBS a 37 °C	146
Figura 71 - Aspecto dos <i>scaffolds</i> híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT): (a) GT-1 (0,17% (m/v) Tn), (b) GT-2 (0,33% (m/v) Tn), (c) GT-3 (0,50% (m/v) Tn), (d) GT-4 (0,67% (m/v) Tn) e (e) GT-5 (0,83% (m/v) Tn), após 10 dias de incubação e (f) GT-1 (0,17% (m/v) Tn), (g) GT-2 (0,33% (m/v) Tn), (h) GT-3 (0,50% (m/v) Tn), (i) GT-4 (0,67%	

(m/v) Tn) e (j) GT-5 (0,83% (m/v) Tn), após 21 dias de incubação, imersos em 25 mL de solução PBS a 37 °C.....	148
Figura 72 - Taxa média de dissolução dos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C1): C1-1 (1,67% (v/v) Ga), C1-2 (3,33% (v/v) Ga), C1-3 (5,00% (v/v) Ga), C1-4 (6,67% (v/v) Ga), C1-5 (10,00% (v/v) Ga) e C1-6 (13,33% (v/v) Ga), após 10 e 21 dias de incubação	149
Figura 73 - Taxa média de dissolução dos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C2): C2-1 (0,67% (m/v) Ch) e C2-2 (1,33% (m/v) Ch), após 10 e 21 dias de incubação	150
Figura 74 - Taxa média de dissolução dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG1): CG1-1 (0,17% (v/v) Ga), CG1-2 (0,33% (v/v) Ga), CG1-3 (0,67% (v/v) Ga) e CG1-4 (1,67% (v/v) Ga), após 10 e 21 dias de incubação	151
Figura 75 - Taxa média de dissolução dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG2): CG2-1 (0,67% (m/v) Ge), CG2-2 (1,33% (m/v) Ge) e CG2-3 (2,00% (m/v) Ge), após 10 e 21 dias de incubação	152
Figura 76 - Taxa média de dissolução dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT): CGT-1 (0,67% (m/v) Ch) e CGT-2 (1,33% (m/v) Ch), após 10 e 21 dias de incubação	153
Figura 77 - Comparação da taxa média de dissolução dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana e gelatina CG2-1 (0,67% (m/v) Ch) e CG3-1 (1,33% (m/v) Ch), após 10 e 21 dias de incubação	154
Figura 78 - Comparação da taxa média de dissolução dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG3-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-2), com concentração de quitosana de 0,67% (m/v), após 10 e 21 dias de incubação	155
Figura 79 - Comparação da taxa média de dissolução dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG2-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-1), com concentração de quitosana de 1,33% (m/v), após 10 e 21 dias de incubação	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens dos métodos de fabricação dos <i>scaffolds</i>	44
Tabela 2 – Polímeros naturais suas vantagens, desvantagens e aplicações	46
Tabela 3 – Polímeros híbridos	47
Tabela 4 - Dados das substâncias utilizadas para síntese e análises dos <i>scaffolds</i>	69
Tabela 5 - Equipamentos utilizados para síntese e análise dos <i>scaffolds</i>	70
Tabela 6 - Concentração dos reagentes da solução PBS	70
Tabela 7 - Composição dos <i>scaffolds</i> de quitosana pura C1 (com variação da concentração de glutaraldeído) e C2 (com variação da concentração de quitosana).....	72
Tabela 8 - Composição dos <i>scaffolds</i> de gelatina pura (G), com variação da concentração de glutaraldeído	74
Tabela 9 - Composição dos <i>scaffolds</i> híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT), com variação da concentração de tanino	76
Tabela 10 - Composição dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina CG1 (com variação da concentração de glutaraldeído), CG2 (com variação da concentração de gelatina) e CG3 (com maior teor de quitosana)	78
Tabela 11 - Composição dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT), com variação da concentração de quitosana	80
Tabela 12 - Relação entre os números de onda e os grupos funcionais referentes aos resultados observados na espectroscopia de infravermelho nos <i>scaffolds</i> de gelatina pura (G)	92
Tabela 13 - Relação entre os números de onda e os grupos funcionais referentes aos resultados observados na espectroscopia de infravermelho nos <i>scaffolds</i> híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT)	94
Tabela 14 - Relação entre os números de onda e os grupos funcionais referentes aos resultados observados na espectroscopia de infravermelho nos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C1 e C2).....	96
Tabela 15 - Relação entre os números de onda e os grupos funcionais referentes aos resultados observados na espectroscopia de infravermelho nos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana e gelatina (CG1, CG2 e CG3).....	98

Tabela 16 - Relação entre os números de onda e os grupos funcionais referentes aos resultados observados na espectroscopia de infravermelho nos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT).....	99
Tabela 17 - Análise da variação da taxa média de porosidade (TMP) em função da porcentagem de massa (PM)	118
Tabela 18 - Relação da taxa média de intumescimento (TMI) e taxa média de porosidade (TMP) dos <i>scaffolds</i> híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT)	122
Tabela 19 - Relação da taxa média de intumescimento (TMI) e taxa média de porosidade (TMP) dos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C1)	124
Tabela 20 - Relação da taxa média de intumescimento (TMI) e taxa média de porosidade (TMP) dos <i>scaffolds</i> de quitosana pura (C2)	126
Tabela 21 - Relação da taxa média de intumescimento (TMI) e taxa média de porosidade (TMP) dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG1).....	127
Tabela 22 - Relação da taxa média de intumescimento (TMI) e taxa média de porosidade (TMP) dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina (CG2).....	129
Tabela 23 - Relação da taxa média de intumescimento (TMI) e taxa média de porosidade (TMP) dos <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT) e quitosana/gelatina (CG2-1 e CG3-1)	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina de soro bovino)
C1	<i>Scaffolds</i> de quitosana pura com variação da concentração de glutaraldeído
C1-1	<i>Scaffold</i> de quitosana pura com concentração de glutaraldeído de 1,67% (v/v)
C1-2	<i>Scaffold</i> de quitosana pura com concentração de glutaraldeído de 3,33% (v/v)
C1-3	<i>Scaffold</i> de quitosana pura com concentração de glutaraldeído de 5,00% (v/v)
C1-4	<i>Scaffold</i> de quitosana pura com concentração de glutaraldeído de 6,67% (v/v)
C1-5	<i>Scaffold</i> de quitosana pura com concentração de glutaraldeído de 10,00% (v/v)
C1-6	<i>Scaffold</i> de quitosana pura com concentração de glutaraldeído de 13,33% (v/v)
C2	<i>Scaffolds</i> de quitosana pura com variação da concentração de quitosana
C2-1	<i>Scaffold</i> de quitosana pura com concentração de quitosana de 0,67% (m/v)
C2-2	<i>Scaffold</i> de quitosana pura com concentração de quitosana de 1,33% (m/v)
CAS	Chemical Abstracts Service (Número de registro no serviço de abstratos químicos)
Cb	Carbonato de sódio
CG1	<i>Scaffolds</i> híbridos de quitosana e gelatina com variação da concentração de glutaraldeído
CG1-1	<i>Scaffold</i> híbrido de quitosana e gelatina com concentração de glutaraldeído de 0,17% (v/v)
CG1-2	<i>Scaffold</i> híbrido de quitosana e gelatina com concentração de glutaraldeído de 0,33% (v/v)
CG1-3	<i>Scaffold</i> híbrido de quitosana e gelatina com concentração de glutaraldeído de 0,67% (v/v)
CG1-4	<i>Scaffold</i> híbrido de quitosana e gelatina com concentração de glutaraldeído de 1,67% (v/v)

CG2	<i>Scaffolds</i> híbridos de quitosana e gelatina com variação da concentração de gelatina
CG2-1	<i>Scaffold</i> híbrido de quitosana e gelatina com concentração de gelatina de 0,67% (m/v)
CG2-2	<i>Scaffold</i> híbrido de quitosana e gelatina com concentração de gelatina de 1,33% (m/v)
CG2-3	<i>Scaffold</i> híbrido de quitosana e gelatina com concentração de gelatina de 2,00% (m/v)
CG3	<i>Scaffold</i> híbridos de quitosana e gelatina com aumento da concentração de quitosana
CG3-1	<i>Scaffold</i> híbrido de quitosana e gelatina com concentração de quitosana de 1,33% (m/v)
CGT	<i>Scaffolds</i> híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído com variação da concentração de quitosana
CGT-1	<i>Scaffold</i> híbrido de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído com concentração de quitosana de 0,67% (m/v)
CGT-2	<i>Scaffold</i> híbrido de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído com concentração de quitosana de 1,33% (m/v)
Ch	Quitosana
CTMs	Células-tronco mesenquimais
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
G	<i>Scaffolds</i> de gelatina pura com variação da concentração de glutaraldeído
G-1	<i>Scaffold</i> de gelatina pura com concentração de glutaraldeído de 0% (v/v)
G-2	<i>Scaffold</i> de gelatina pura com concentração de glutaraldeído de 0,17% (v/v)
G-3	<i>Scaffold</i> de gelatina pura com concentração de glutaraldeído de 1,33% (v/v)
G-4	<i>Scaffold</i> de gelatina pura com concentração de glutaraldeído de 0,67% (v/v)
G-5	<i>Scaffold</i> de gelatina pura com concentração de glutaraldeído de 1,67% (v/v)

GT	<i>Scaffolds</i> híbridos de gelatina e xerogel de tanino-glutaraldeído com variação da concentração de tanino
GT-1	<i>Scaffold</i> híbrido de gelatina e xerogel de tanino-glutaraldeído com concentração de tanino de 0,17% (m/v)
GT-2	<i>Scaffold</i> híbrido de gelatina e xerogel de tanino-glutaraldeído com concentração de tanino de 0,33% (m/v)
GT-3	<i>Scaffold</i> híbrido de gelatina e xerogel de tanino-glutaraldeído com concentração de tanino de 0,50% (m/v)
GT-4	<i>Scaffold</i> híbrido de gelatina e xerogel de tanino-glutaraldeído com concentração de tanino de 0,67% (m/v)
GT-5	<i>Scaffold</i> híbrido de gelatina e xerogel de tanino-glutaraldeído com concentração de tanino de 0,83% (m/v)
Ga	Glutaraldeído
GD	Grau de desacetilação
Ge	Gelatina
HA	Hidroxiapatita
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução tampão fosfato-salino)
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietileno glicol
PEO	Polioxietileno
PI	Ponto isoelétrico
PLLA	Poli(ácido l-lático)
PMMA	Polimetil metacrilato
PU	Poliuretano

PVA	Álcool polivinílico
TMI	Taxa média de intumescimento
TMP	Taxa média de porosidade
Tn	Tanino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.1	Engenharia de tecidos	29
2.1.1	<i>Engenharia de tecidos ósseos</i>	<i>30</i>
2.1.2	<i>Engenharia de tecidos cartilagosos.....</i>	<i>32</i>
2.1.3	<i>Engenharia de tecidos cutâneos</i>	<i>34</i>
2.1.4	<i>Engenharia de tecido cardiovascular.....</i>	<i>37</i>
2.2	Scaffolds	38
2.2.1	<i>Propriedades dos scaffolds.....</i>	<i>38</i>
2.2.2	<i>Materiais utilizados na fabricação de scaffolds.....</i>	<i>41</i>
2.2.3	<i>Métodos de fabricação dos scaffolds.....</i>	<i>41</i>
2.3	Biomateriais.....	45
2.4	Quitosana	49
2.4.1	<i>Método de extração da quitosana.....</i>	<i>50</i>
2.4.2	<i>Propriedades da quitosana.....</i>	<i>51</i>
2.4.3	<i>Quitosana na engenharia de tecidos</i>	<i>52</i>
2.5	Gelatina	53
2.5.1	<i>Método de extração da gelatina</i>	<i>54</i>
2.5.2	<i>Propriedades da gelatina.....</i>	<i>55</i>
2.5.3	<i>Gelatina na engenharia de tecidos</i>	<i>56</i>
2.6	Xerogel de tanino-glutaraldeído	57
2.6.1	<i>Géis de carbono</i>	<i>57</i>
2.6.2	<i>Tanino</i>	<i>58</i>
2.6.3	<i>Géis de tanino</i>	<i>60</i>
2.7	Glutaraldeído.....	62

3	OBJETIVO	68
3.1	Objetivos específicos.....	68
4	MATERIAIS E MÉTODOS	69
4.1	Materiais e equipamentos	69
4.1.1	<i>Preparação da solução tampão fosfato-salino (Phosphate Buffered Saline (PBS))</i> 70	
4.1.2	<i>Solução de Bradford</i>	71
4.2	Preparação dos scaffolds	71
4.2.1	<i>Scaffolds de quitosana</i>	71
4.2.2	<i>Scaffolds de gelatina</i>	74
4.2.3	<i>Scaffolds de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído</i>	75
4.2.4	<i>Scaffolds e quitosana/gelatina</i>	78
4.2.5	<i>Scaffolds de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído</i>	80
4.3	Intumescimento	82
4.4	Porosidade	83
4.5	Adsorção de proteínas	84
4.6	Dissolução	86
4.7	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	87
4.8	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	88
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	89
5.1	Scaffolds	89
5.2	Análises	90
5.3	Caracterização dos scaffolds de quitosana, gelatina, quitosana/gelatina, gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído	91
5.3.1	<i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	91
5.3.2	<i>Intumescimento</i>	100
5.3.3	<i>Porosidade</i>	109

5.3.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	119
5.3.5	<i>Adsorção de proteínas</i>	134
5.3.6	<i>Dissolução</i>	144
6	CONCLUSÕES	157
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	159
7.1	Sugestões para trabalhos futuros	159
	REFERÊNCIAS	160

1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento no número de transplantes nos últimos anos tem gerado um desafio significativo para a indústria médica, devido à discrepância entre a demanda de tecidos e órgãos por parte dos pacientes e a disponibilidade limitada de doadores. Diversas estratégias têm sido investigadas com o objetivo de mitigar essa problemática, e um campo promissor para lidar com a escassez de doadores em transplantes é a engenharia de tecidos (MAADANI; DAVOODIAN; SALAHINEJAD, 2023). A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que abrange áreas como medicina regenerativa, ciência, engenharia de materiais e biologia celular. Seu objetivo principal é estimular a regeneração de tecidos danificados, visando restaurar as funções corporais. Um dos componentes essenciais nessa área são os *scaffolds*, que são estruturas tridimensionais porosas utilizadas como suporte para o crescimento celular. Os *scaffolds* promovem a adesão, proliferação e diferenciação de células vivas, facilitando a regeneração tecidual. Além disso, eles oferecem estabilidade e resistência mecânica na região lesionada. O desenvolvimento de *scaffolds* na engenharia de tecidos deve levar em consideração a biologia do microambiente circundante da interface entre o tecido e o *scaffold*. Essa interação determina aspectos como a composição, estrutura, funções e técnicas de fabricação do *scaffold*. Idealmente, os *scaffolds* devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, apresentar porosidade adequada e interconectividade dos poros, além de possuir estabilidade mecânica (ZHANG *et al.*, 2023e). Para a fabricação de *scaffolds*, são empregados biomateriais, que englobam uma variedade de materiais como polímeros (sintéticos e naturais), metais e biocerâmicas (PARIN, 2022).

A escolha do biomaterial na engenharia de tecidos depende do tecido ao qual se destina. Diferentes tipos de biomateriais apresentam características distintas que se adequam às necessidades de regeneração de tecidos específicos (ELDEEB; SALAH; ELKASABGY, 2022). Por exemplo, para tecidos como a pele, que não requerem alta resistência mecânica, os *scaffolds* podem ser confeccionados exclusivamente com polímeros naturais (SUAMTE *et al.*, 2023). No caso do tecido ósseo, que precisa suportar cargas consideráveis, é necessário um suporte mais resistente. Nesse sentido, é comum utilizar polímeros naturais em combinação com materiais mais robustos, como polímeros sintéticos ou biocerâmicas. A hidroxiapatita, encontrada naturalmente no osso, é uma biocerâmica amplamente utilizada na fabricação de *scaffolds* para o tecido ósseo (FU *et al.*, 2013). Além dos tecidos

mencionados, a engenharia de tecidos também abrange uma variedade de outros tecidos, como os cardiovasculares, nervosos, cartilagosos, entre outros (DHANIA *et al.*, 2022).

Dentre os polímeros naturais amplamente utilizados na engenharia de tecidos, destacam-se a quitosana e a gelatina. A quitosana é um polissacarídeo natural, policatiônico, atóxico, derivado do processo de desacetilação alcalina da quitina. Possui propriedades notáveis que a tornam atrativa para diversas aplicações no campo biomédico, como sua biodegradabilidade, capacidade de cicatrização de feridas, funções homeostáticas e biofuncionalidade. Sua versatilidade permite a moldagem em diferentes formas, como géis, filmes, micro ou nanomateriais, *scaffolds*, entre outros. Além de suas aplicações biomédicas, a quitosana também encontra uso em outras áreas, como detecção e remoção de corantes e em embalagens (BISWAL; PUROHIT; SWAIN, 2023). A gelatina é uma proteína desnaturada obtida por meio da hidrólise alcalina ou ácida do colágeno derivado de fontes animais. Sua gama de aplicação é ampla, estando presente em diversos setores, como farmacêutico, cosmético e alimentício (IRFAN *et al.*, 2022). O interesse de aplicação da gelatina no campo biomédico se deve a algumas de suas importantes propriedades como a biodegradabilidade (EL-SEEDI *et al.*, 2023), biocompatibilidade, baixa antigenicidade e alta resistência à tração (MIRANDA *et al.*, 2011). Tanto a quitosana quanto a gelatina são utilizadas na fabricação de *scaffolds* para diversos tecidos, como tecido ósseo, cartilagem, pele e tecido cardiovascular. Suas propriedades e características as tornam adequadas para promover a regeneração tecidual e melhorar as funções biológicas nos tecidos lesionados ou danificados (RASHID; SHOWVA; HOQUE, 2023; ZHANG *et al.*, 2023b; KAZEMI ASL; RAHIMZADEGAN; OSTADRAHIMI, 2023; BHARATHI *et al.*, 2022).

Apesar das vantagens das matérias-primas mencionadas, tanto a quitosana quanto a gelatina possuem limitações comuns aos polímeros naturais. Ambas apresentam resistência mecânica relativamente fraca e uma taxa de degradação mais elevada em comparação a materiais sintéticos. Além dessas limitações, a gelatina também apresenta baixa estabilidade térmica, o que pode restringir sua aplicação em certas condições de processamento e armazenamento. Por outro lado, a quitosana produz *scaffolds* com menor porosidade e absorção de água em comparação a alguns outros biomateriais (ABDIAN *et al.*, 2023; NASIRI *et al.*, 2022; RASHID; SHOWVA; HOQUE, 2023).

Uma estratégia para superar as limitações, especialmente em termos de propriedades mecânicas e taxa de degradação, tanto da gelatina quanto da quitosana, é a inclusão de um agente reticulante. O glutaraldeído (Ga) é amplamente utilizado como agente reticulante para

proteínas e polissacarídeos. Sua capacidade de reticulação tem sido comprovada como uma estratégia eficiente para melhorar as propriedades físicas e químicas de biomateriais. A reticulação ocorre por meio da interação do glutaraldeído com grupos funcionais presentes nas moléculas de diversos biomateriais, como aminas, hidroxilas, imidazóis, tióis, entre outros. Essa reação de reticulação promove a formação de ligações cruzadas entre as macromoléculas, resultando em uma rede tridimensional mais estável e resistente (ALAVARSE *et al.*, 2022). No entanto, é importante ressaltar que o glutaraldeído apresenta alta citotoxicidade, o que restringe sua aplicação em *scaffolds* para engenharia de tecidos (KRISHNAKUMAR *et al.*, 2019).

Outra classe de materiais porosos, além dos *scaffolds*, são os géis de carbono. Porém, sua aplicação não é direcionada para o campo biomédico, mas sim para aplicações como separação de gás (DAI *et al.*, 2022), adsorção de poluentes em fases gasosas e líquidas (CASTRO *et al.*, 2021), isolante térmico, suporte catalítico, armazenamento de hidrogênio, entre outros (REY-RAAP *et al.*, 2016). Esses géis são fabricados por meio da policondensação de um hidroxibenzeno com um aldeído, utilizando o carbonato de sódio como catalisador (FATHY; RIZK; AWAD, 2016). Dependendo do método de secagem empregado, os géis podem ser obtidos na forma de aerogel, criogel ou xerogel, através da secagem supercrítica, criogênica ou subcrítica, respectivamente (CASTRO *et al.*, 2021; DAI *et al.*, 2022). Os reagentes precursores mais comumente utilizados nesse processo são o resorcinol (hidroxibenzeno) e o formaldeído (aldeído) (FATHY; RIZK; AWAD, 2016). No entanto, esses precursores apresentam toxicidade e o resorcinol é relativamente caro. Como alternativa, estão sendo exploradas opções mais sustentáveis e viáveis economicamente, como a utilização de tanino em substituição ao resorcinol (SZCZUREK *et al.*, 2011).

O tanino é um composto polifenólico de baixo custo extraído de diversas partes de plantas, que possui características interessantes para o campo biomédico como as propriedades anticancerígenas, antioxidantes, anti-inflamatórias, bactericidas e curativas (ARISTRI *et al.*, 2022). Embora os géis de carbono contendo tanino sejam amplamente utilizados em diversos tipos de aplicações, (DAI *et al.*, 2022), ainda não foram realizados muitos estudos sobre sua aplicação na engenharia de tecidos, especialmente em associação com *scaffolds*.

A combinação de *scaffolds* e géis de carbono apresenta um potencial interessante devido às suas propriedades porosas (ZHANG *et al.*, 2023e; DAI *et al.*, 2022). Uma vez que a porosidade dos materiais utilizados na regeneração de tecidos é uma característica que

desempenha um papel fundamental na proliferação celular, permeabilidade, transporte de nutrientes e formação de vasos sanguíneos, essenciais para o processo de regeneração tecidual (ZHANG *et al.*, 2022). Além disso, o tanino possui propriedades vantajosas e desejáveis que podem ser aplicadas na engenharia de tecidos, conforme mencionado anteriormente (ARISTRRI *et al.*, 2022). Por fim, estudos indicam que a adição de tanino a biomateriais compostos pode melhorar suas propriedades mecânicas (ARISTRRI *et al.*, 2022) e sabe-se que biomateriais à base de gelatina e quitosana, são conhecidos por suas deficiências nesse aspecto (ASGHARI *et al.*, 2022). Portanto, a incorporação do tanino nos *scaffolds* pode ser uma estratégia interessante para aprimorar as propriedades desses biomateriais (KRISHNAKUMAR *et al.*, 2019).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é a ciência que busca direcionar a regeneração de tecidos danificados por meio do uso de substitutos biológicos. Seu objetivo é promover a recuperação, manutenção ou melhoria desses tecidos, aproveitando o potencial regenerativo natural do próprio organismo para reconstruir suas estruturas complexas (ZHANG *et al.*, 2023a).

Quando órgãos ou tecidos do corpo perdem sua função devido fatores como doença, traumas ou envelhecimento, há uma degeneração tecidual que impacta na qualidade de vida dos pacientes. O método convencional para tratar e substituir órgãos e tecidos danificados envolve o uso de enxertos. No entanto, complicações como infecção, hematoma na área transplantada, rejeição do transplante pelo sistema imunológico do hospedeiro (HABIBZADEH *et al.*, 2022), dependência vitalícia de imunossupressores e dano renal têm contribuído para a limitação na aplicação dessa abordagem. A alta demanda por transplantes de órgãos e tecidos aliada a escassez de doadores tem levado os cientistas a considerarem alternativas aos métodos tradicionais. Uma dessas alternativas é a engenharia de tecidos (VARSHNEY; KUMAR; KAMBLE, 2023).

A engenharia de tecidos teve suas origens na década de 1970, quando os pesquisadores Langer e Folkman realizaram estudos sobre a liberação controlada de drogas utilizando polímeros, com o objetivo de inibir o crescimento de tumores. Este trabalho então foi seguido por estudos na década seguinte, em diversos laboratórios ao redor do mundo, que investigaram os efeitos da inserção de células em substratos para analisar as interações entre células e materiais, assim como o crescimento tecidual. Os resultados promissores obtidos despertaram interesse na comunidade científica e estimularam a colaboração entre diferentes campos de pesquisa, culminando no estabelecimento da engenharia de tecidos como uma área interdisciplinar em pleno desenvolvimento (UQUILLAS; MORONI; DE BOER, 2023).

Através do uso de estruturas de suporte (*scaffolds*), a engenharia de tecidos tem a capacidade de simular as estruturas de tecidos (FICAI *et al.*, 2016) proporcionando um

ambiente adequado para as células e fatores de crescimento, resultando na formação de novos tecidos. Os *scaffolds* são sintetizados a partir de biomateriais, os quais devem ser biocompatíveis e biodegradáveis. A escolha do biomaterial deve estar em consonância com as propriedades do tecido que será aplicado (PRAMANIK *et al.*, 2023).

Embora os materiais disponíveis atualmente possam sobreviver no corpo e estimular a proliferação celular, ainda há uma diferença entre as matrizes poliméricas produzidas e os tecidos humanos. Isso ocorre devido à complexidade e ao dinamismo dos tecidos, o que torna difícil replicá-los. Portanto, é necessário definir claramente os materiais utilizados, suas aplicações e os melhores pontos de desempenho, além de um design mais complexo em nível micro para sintetizar dispositivos mais semelhantes aos tecidos hospedeiros a que se destinam (BAO *et al.*, 2023).

A engenharia de tecidos é um campo abrangente, sua aplicação se estende para variados tipos de tecidos, tais como: tecido ósseo, tecido cartilaginoso, tecido cutâneo e tecido cardiovascular (DHANIA *et al.*, 2022). Os tópicos a seguir exploram algumas das aplicações específicas da engenharia de tecidos com mais detalhes.

2.1.1 Engenharia de tecidos ósseos

A engenharia de tecidos ósseos é um campo interdisciplinar que tem como objetivo corrigir e substituir tecido ósseo danificado (EREZUMA *et al.*, 2023). Depois do sangue o osso é o material mais transplantado do mundo (ARJUNAN *et al.*, 2022). Metade das doenças crônicas em pessoas com mais de 50 anos são atribuídas a problemas ósseos e suas consequências. Defeitos ou lesões ósseas, causados por fatores como idade, acidentes, fraturas não consolidadas, tumores, entre outros, representam desafios enfrentados pela ortopedia e têm um impacto significativo na qualidade de vida do paciente (QU *et al.*, 2019).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), responsável por várias funções no organismo. Ele atua como suporte para os músculos esqueléticos, oferece proteção aos órgãos, desempenha um papel na hematopoese e funciona como reservatório de minerais (THOMPSON, 2012). Além disso, o tecido ósseo abriga e protege a medula óssea, além de ter um papel na absorção de toxinas e metais pesados, prevenindo danos ao organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O tecido ósseo é composto por uma combinação de matéria orgânica e inorgânica. Os componentes inorgânicos são principalmente fosfatos de cálcio, especialmente na forma hidroxiapatita (HA) (PERIĆ KAČAREVIĆ *et al.*, 2019). A HA desempenha um papel crucial em várias atividades metabólicas (YOU *et al.*, 2022), e apresenta alta dureza e excelentes propriedades osteocondutoras (COELHO *et al.*, 2020). Já a matéria orgânica corresponde a cerca de 40% da composição óssea e consiste principalmente em colágeno (98%), proteoglicanos e proteínas não colágenas, enquanto as células, como osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, representam o restante (THOMPSON, 2012). É a componente orgânica que confere ao osso suas propriedades elásticas e flexibilidade (YOU *et al.*, 2022).

Embora o tecido ósseo possua capacidade de autorregeneração, lesões que excedem o dobro do diâmetro do osso comprometido podem resultar na formação de tecido cicatricial, requerendo intervenção médica (MAIA *et al.*, 2022). Em casos de fratura, o tecido ósseo perde sua estabilidade mecânica, assim, é crucial iniciar prontamente e de forma adequada a intervenção para promover a consolidação óssea, visando facilitar uma recuperação eficiente do tecido e restabelecer sua estabilidade mecânica (LI; KACENA; STOCUM, 2019).

A consolidação óssea é um processo complexo que ocorre em estágios sucessivos (CHOW *et al.*, 2022). Ele compreende uma fase inflamatória, uma fase de reparo e uma fase de remodelação (VOLLER *et al.*, 2022). Durante a fase inflamatória, ocorre a formação de um hematoma e a liberação de citocinas por células inflamatórias, estimulando a migração celular e o fluxo sanguíneo na região da fratura. Os osteoclastos desempenham um papel crucial na reabsorção dos fragmentos ósseos. Essa fase se inicia imediatamente após a fratura, intensifica-se após vinte e quatro horas e persiste por até sete dias (CHEN *et al.*, 2020). Na fase de reparo, as células-tronco mesenquimais (CTMs) se diferenciam em osteoblastos e iniciam a formação do novo tecido ósseo. Nesse estágio, ocorre a formação do calo ósseo, que pode ocorrer por ossificação intramembranosa ou endocondral. O calo ósseo é uma estrutura temporária que une as partes fraturadas e proporciona estabilidade durante o processo de cicatrização. Na última fase, ocorre a remodelação do calo ósseo através da atividade dos osteoclastos e osteoblastos. Os osteoclastos reabsorvem a matriz óssea existente, enquanto os osteoblastos sintetizam e depositam nova matriz óssea, resultando na remodelação gradual e no fortalecimento do osso fraturado (VOLLER *et al.*, 2022).

Alguns dos métodos atualmente empregados no tratamento de fraturas ósseas incluem autoenxerto, aloenxerto e substitutos sintéticos (MAIA *et al.*, 2022). O autoenxerto

ósseo é considerado o padrão-ouro atual, porém apresenta desvantagens, como disponibilidade limitada do material, reabsorção variável, risco de danos na área doadora, baixo índice de sucesso em determinadas regiões e a necessidade de múltiplas intervenções cirúrgicas. Em contraste, o aloenxerto ósseo possui disponibilidade substancialmente maior de material, mas apresenta desvantagens, como risco de transmissão de doenças e possibilidade de rejeição. Já os materiais sintéticos, como os implantes metálicos utilizados em próteses articulares, placas e parafusos, são aplicados para fornecer suporte mecânico e estrutural em certos casos. No entanto, eles também apresentam desvantagens, como alta rigidez, risco de fratura e infecção, fadiga, falta de integração com o tecido hospedeiro e possibilidade de extrusão (ARJUNAN *et al.*, 2022).

A regeneração óssea na engenharia de tecidos utiliza *scaffolds* para estimular o crescimento de novos tecidos ósseos (LIU *et al.*, 2017). Esses *scaffolds* são estruturas projetadas para reproduzir a matriz extracelular e a estrutura óssea (QU *et al.*, 2019). Portanto, é essencial que esses *scaffolds* possuam porosidade, composição e propriedades mecânicas semelhantes às do osso natural (SAGADEVAN *et al.*, 2023). Seu principal objetivo é promover adesão, proliferação e diferenciação celular para facilitar a regeneração óssea (QU *et al.*, 2019).

2.1.2 Engenharia de tecidos cartilagosos

A engenharia de tecidos cartilagosos é o ramo da engenharia de tecidos que se dedica à criação de materiais análogos à cartilagem (*scaffolds*) com o objetivo de substituí-la e estimular sua reparação em casos de lesão (XU *et al.*, 2022c). Todos os anos, milhões de pessoas sofrem com disfunções da cartilagem, resultando na diminuição de sua qualidade de vida (GHADIRIAN; KARBASI, 2023). As lesões articulares podem ser resultado de trauma, degeneração ou doenças, ocasionando a perda de sua estrutura e funções (ZHU *et al.*, 2022). Até a degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) da cartilagem, as lesões são assintomáticas, dificultando ainda mais o tratamento (NAJAFI *et al.*, 2023). Cirurgia, autoenxertos, aloenxertos e substituição articular, são algumas das técnicas utilizadas para tratar as lesões na cartilagem, mas esses procedimentos tradicionais se mostram ineficazes (GHADIRIAN; KARBASI, 2023).

O tecido cartilaginoso é responsável por absorver impactos, reduzir o atrito entre os ossos e fornecer suporte aos tecidos moles (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; ZHANG *et al.*, 2023a). É um tipo de tecido conjuntivo envolto pelo pericôndrio, com exceção da região articular (SANCHO-TELLO *et al.*, 2019). É constituído principalmente por condrócitos e matriz extracelular (ŞENOL; ÖZER, 2020). O pericôndrio é um tecido fibroso e denso que reveste a maior parte das superfícies cartilaginosas, composto por colágeno tipo I. Ele possui a capacidade de proteger a cartilagem de lesões, além de contribuir para suas propriedades mecânicas e facilitar a condrogênese (SUN *et al.*, 2021). Devido a essa última característica, o transplante de pericôndrio é uma alternativa para a reconstrução de superfícies articulares (DOU *et al.*, 2021). Os condrócitos, as únicas células presentes na cartilagem, derivados de células-tronco mesenquimais, são responsáveis por secretarem diversos componentes da MEC (SANCHO-TELLO *et al.*, 2019).

O autorreparo do tecido cartilaginoso é limitado devido ao baixo número de células e suas características avasculares, aneurais e alinfáticas, que dificultam o acesso aos nutrientes (WEI *et al.*, 2021). As doenças relacionadas à cartilagem normalmente estão associadas à ocorrência de traumas, acidentes e doenças autoimunes e degenerativas, como artrite reumatoide e osteoartrite (LEITE PEREIRA; LAMGHARI; SARMENTO, 2022). Cartilagens quando lesionadas, apresentam deterioração de suas características de suporte de carga, o que a torna mais suscetível ao desgaste, além de uma possível resposta inflamatória, que elevam os níveis de citocinas sinoviais que agrava a degradação e dano ao tecido (PATEL *et al.*, 2019).

As opções terapêuticas para doenças degenerativas e traumáticas da cartilagem envolvem várias abordagens. A gestão dos sintomas pode ser alcançada por meio da administração de analgésicos e, especialmente em articulações, por meio da aplicação intra-articular de corticosteroides, ácido hialurônico ou plasma rico em plaquetas. Intervenções cirúrgicas, como implantes de próteses, aloenxertos e autoenxertos, também são consideradas. Além disso, a medicina regenerativa desempenha um papel importante, incluindo a implantação de condrócitos autólogos ou produtos de implantação de condrócitos autólogos induzidos por matriz (LEITE PEREIRA; LAMGHARI; SARMENTO, 2022).

A abordagem cirúrgica é largamente utilizada para tratamento de danos cartilaginoso, especialmente em defeitos condrais, porém, apresenta limitações, principalmente a longo prazo (FAZAL; LATIEF, 2018; PATEL *et al.*, 2019). A engenharia de tecidos representa uma alternativa para o tratamento de lesões cartilaginosas. No entanto, sua aplicação é

limitada por questões relacionadas à imunogenicidade, estabilidade, resistência mecânica, entre outras. Um dos principais desafios reside na reprodução precisa do microambiente biomecânico dos condrócitos, o que afeta negativamente sua viabilidade e eficácia clínica (XU *et al.*, 2022c).

2.1.3 Engenharia de tecidos cutâneos

A pele é o maior órgão do corpo humano, com superfície aproximada variando entre 1,5 e 2 m² e correspondendo a 16% de massa corporal total de um adulto (MCKNIGHT; SHAH; HARGEST, 2022; PLOTCHYK; HIGGINS, 2019; XU *et al.*, 2022b). Dentre suas funções, se encontram a proteção contra microorganismos, termorregulação, armazenamento de água, tato, síntese de vitamina D, etc (MCKNIGHT; SHAH; HARGEST, 2022). Ela está suscetível a diversas doenças como câncer, sendo o de pele o que mais incidente em humanos (HUANG; DING; RASHID SHEYKHAHMAD, 2023) e doenças crônicas como dermatite atópica, acne vulgaris, psoríase, vitiligo, alopecia areata, hidradenite, entre outras (CHRISTENSEN; JAFFERANY, 2023). A pele também é suscetível a danos como queimaduras, sendo sua ocorrência o quarto tipo de trauma mais frequente (KHALILIMOFRAD *et al.*, 2023). Em algumas situações, os danos causados na pele são tão extensos que é necessário realizar o transplante desse tecido, mas devido a quantidade limitada de pele disponível, este recurso não é tão explorado (PEIFEN *et al.*, 2023). Além disso, os transplantes convencionais apresentam riscos de rejeição, transmissão de infecções, necessidade de cirurgia adicional para retirada do tecido doador. Nesses casos, a utilização de *scaffolds* pode ser uma alternativa viável para o tratamento de pacientes lesionados, uma vez que promove a regeneração do tecido danificado (PEIFEN *et al.*, 2023; MADNI *et al.*, 2021). O gerenciamento de feridas profundas e extensas representa um dos desafios mais complexos no campo médico. Para alcançar uma cicatrização rápida e eficiente da lesão dérmica, bem como restaurar a função de barreira e a integridade da pele, é necessário realizar uma abordagem inicial adequada. A aplicação de técnicas de engenharia e regeneração de tecido cutâneo se mostra uma solução econômica e de fácil utilização na criação de enxertos de pele sintéticos ou modificados, que podem ser empregados para tratar tanto feridas cutâneas agudas quanto crônicas (ASGHARI *et al.*, 2022).

A pele em sua estrutura é composta pela epiderme, derme e tecidos subcutâneos (ZHANG *et al.*, 2022). A epiderme é a camada mais externa da pele e é constituída por quatro camadas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. A região palmoplantar apresenta, além das camadas citadas, mais uma camada (estrato lúcido) localizada entre o estrato granuloso e córneo. A epiderme é composta por diversos tipos de células, tais como os queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (PLOTCHYK; HIGGINS, 2019). No entanto, a principal célula da epiderme é o queratinócito, responsável pela formação das camadas (ou estratos), através da sua diferenciação progressiva no processo de queratinização (IMAHARA; KLEIN, 2009). Os melanócitos são responsáveis por produzirem melanina, determinando a pigmentação da pele (MOHAMED; HARGEST, 2022). Já as células de Langerhans atuam como células apresentadoras de antígenos, promovendo a resposta imune (MCKNIGHT; SHAH; HARGEST, 2022). Por fim, as células de Merkel são mecanorreceptores responsáveis pela sensibilidade tátil e estão localizadas majoritariamente na camada basal (BOULANGER; LENORMAND, 2018). A membrana basal, situada entre a epiderme e a derme (TZU; LI; MARINKOVICH, 2005), forma uma interface adesiva entre as células destas duas camadas, atuando como barreira de permeabilidade, além de participar da diferenciação celular (KO; MARINKOVICH, 2010).

A derme, localizada entre a epiderme e a hipoderme, é a camada da pele que promove suas características de durabilidade, força e flexibilidade, sendo constituída predominantemente por tecido conjuntivo (MOHAMED; HARGEST, 2022). A principal célula da derme é o fibroblasto, responsável por sintetizar vários tipos de colágeno (principalmente tipos I e III) e outros compostos da matriz extracelular. A derme também conta com folículos pilosos, nervos, vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas e sebáceas (STOJIC *et al.*, 2019). Os fibroblastos estão presentes na pele e na maioria dos tecidos e órgãos do corpo, sendo o principal componente do tecido conjuntivo (WLASCHEK *et al.*, 2021). Além da síntese de colágeno e produção da matriz extracelular, atuam também na cicatrização de feridas e reparação de tecidos (MASCHARAK; DESJARDINS-PARK; LONGAKER, 2020).

A hipoderme é a camada mais profunda da pele, sendo constituída majoritariamente de tecido conjuntivo adiposo e, em algumas partes, de lâminas finas de músculo. Ela é responsável pelo movimento da pele sobre os tecidos adjacentes e o amortecimento contra traumas. A hipoderme é dotada de uma camada de componente gorduroso, que atua no

isolamento e reservatório metabólico, repleto de células-tronco adultas, que podem se converter em outros tipos de células (CARLSON, 2019).

A pele é um órgão que possui capacidade regenerativa. Quando lesionada, diversos eventos fisiológicos iniciam imediatamente para reaver sua integridade e função, combater infecções e remover detritos celulares (PLOTCHYK; HIGGINS, 2019). A regeneração da pele pode ser dividida em três fases: hemostasia e resposta inflamatória, estágio de proliferação e estágio de remodelação (PAN; ZHANG; GAO, 2021). Após a lesão da pele, rapidamente as células imunes começam uma resposta inflamatória na região da ferida (SCHREMENTI; CHEN; DIPIETRO, 2018), este processo se inicia com a homeostasia. Para que não ocorra intensa perda de sangue, durante a homeostasia, os vasos sanguíneos próximos da lesão são submetidos a vasoconstrição e ocorre um acúmulo de plaquetas para formar um tampão, denominado trombo. A fase inflamatória é caracterizada pela infiltração de células imunes, primeiramente os neutrófilos seguidos pelos macrófagos para neutralizar microrganismos e absorver detritos (LOO *et al.*, 2022). A fase de proliferação se inicia 24 a 48 h após a lesão, é marcada pela ação dos fibroblastos, que se proliferam e sintetizam componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo III, ácido hialurônico e fibronectina, convertendo o coágulo em um novo tecido conjuntivo (CASTAÑO *et al.*, 2018). Durante essa fase, ocorrem processos como angiogênese, reepitelização e formação do tecido de granulação (NAZARNEZHAD; KARGOZAR; HAMBLIN, 2022). A etapa de remodelação, pode se estender por meses ou anos, e compreende no amadurecimento do tecido cutâneo subjacente juntamente com a formação de cicatrizes. Nesta etapa o colágeno tipo III é substituído pelo colágeno tipo I, ocorrendo a degradação de componentes desnecessário da MEC (LOO *et al.*, 2022), e os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, ocasionando a contração da ferida, por fim, a vasculatura recente do tecido de granulação regride e o tecido cicatricial é formado (NAZARNEZHAD; KARGOZAR; HAMBLIN, 2022).

Com base no tipo de lesão, diferentes tipos de curativos podem ser utilizados, tais como gaze, bandagens e algodão, que foram recentemente modificados com o objetivo de proteger a área da ferida contra microrganismos contaminantes. No entanto, as propriedades aderentes dos curativos convencionais podem resultar no descolamento da região lesionada, causando uma complicação grave e dolorosa. Além disso, há uma limitação na sua aplicabilidade, restringindo-se apenas a feridas não infectadas com condições moderadas de exsudato. Por outro lado, curativos funcionais para feridas, como *scaffolds*, são capazes de

superar as limitações e desvantagens dos métodos tradicionais. Esses curativos funcionais empregam agentes terapêuticos específicos ou materiais bioativos, como agentes microbianos, fatores de crescimento e enzimas, a fim de proteger a ferida contra infecções, estimular a proliferação celular, promover o aumento da função proteolítica e auxiliar na eliminação de tecidos mortos (ASGHARI *et al.*, 2022).

2.1.4 Engenharia de tecido cardiovascular

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de mortalidade em nível global. Embora abordagens terapêuticas cirúrgicas e celulares tenham sido utilizadas para tratar essas doenças, elas apresentam desafios significativos, como alto risco de rejeição e alterações indesejadas na estrutura corporal. Além disso, o músculo cardíaco tem uma capacidade limitada de autorreparo devido ao baixo potencial de regeneração dos cardiomiócitos (MOMBINI *et al.*, 2019).

O coração é essencial para a manutenção do equilíbrio do organismo. O tecido muscular cardíaco, conhecido como miocárdio, representa a maior parte da massa cardíaca e é responsável pela função de bombeamento. No entanto, o infarto do miocárdio é uma complicação comum das doenças cardíacas, ocorrendo quando as principais artérias coronárias estão obstruídas, reduzindo o suprimento de sangue para o músculo cardíaco. Isso leva à morte das células musculares cardíacas, denominadas cardiomiócitos. O miocárdio sofre lesões irreversíveis em um curto período de tempo devido à falta de oxigênio e nutrientes. Ao longo do tempo, a parede do ventrículo infartado se torna frágil e dilatada, comprometendo a função de bombeamento do coração (CHEN; COHEN, 2023).

Recentemente, novas abordagens têm surgido no campo da reparação de defeitos cardiovasculares, como a implantação de células terapêuticas, o uso de biomateriais e a aplicação de patches cardíacos. A engenharia de tecidos cardiovasculares tem sido explorada nas últimas décadas com a finalidade de desenvolver tecido cardíaco funcional (MOMBINI *et al.*, 2019). Porém, ainda existem desafios significativos devido à complexa arquitetura do coração, apesar dos avanços realizados. Esse processo envolve uma série de variáveis, tais como a seleção de materiais adequados e sua composição, diversos fatores são levados em consideração, como a seleção de materiais apropriados e sua composição, métodos e condições de fabricação, escolha do tipo de célula adequada, além das propriedades físicas,

entre outros (RAFIEYAN *et al.*, 2023). Apesar dos desafios, a engenharia de tecidos cardiovasculares busca superá-los, oferecendo alternativas promissoras para o tratamento de doenças cardíacas e a indução da regeneração do tecido cardíaco (MOMBINI *et al.*, 2019).

2.2 Scaffolds

Scaffolds são uma parte fundamental na engenharia de tecidos (MIRMUSAVI; AHMADIAN; KARBASI, 2022), uma vez que são estruturas tridimensionais de suporte que mimetizam as propriedades e funções de tecidos biológicos, permitindo o desenvolvimento das células (VARSHNEY; KUMAR; KAMBLE, 2023), através da adesão, proliferação e migração celular, levando a formação de novos tecidos (DHANIA *et al.*, 2022). Podem ser classificados de acordo com sua origem em derivados naturais (polímeros naturais), derivados sintéticos (polímeros sintéticos) e acelulares/descelularizados (originados de tecidos humanos ou animais tratados para eliminar células e antígenos, mas preservando sua estrutura) (SOMUNCU *et al.*, 2019).

2.2.1 Propriedades dos scaffolds

Um *scaffold* deve ter características como estrutura tridimensional, biocompatibilidade (DHANIA *et al.*, 2022), bioatividade, porosidade, degradabilidade e resistência mecânica (BHARATHI *et al.*, 2022).

A porosidade é uma propriedade dos materiais que indica a proporção de espaços não preenchidos em relação ao volume total do material (LIU; LU; ZHAI, 2022). O método de fabricação do suporte (*scaffold*) tem um impacto direto nessa propriedade. Diferentes métodos, como lixiviação de sal, *gas foaming*, separação de fases, liofilização e sinterização, são utilizados para fabricar *scaffolds* com porosidade controlada (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005). Além da porosidade, o tamanho e a interconexão destes poros são características importantes. Na regeneração tecidual o tamanho dos poros impacta o crescimento celular. Assim, o tamanho inadequado de poros interfere na permeabilidade celular, limitando o transporte de nutrientes, e de resíduos metabólicos, impedindo a formação de vasos sanguíneos. Em *scaffolds* utilizados para regeneração da pele, a alta e a

baixa porosidade dos *scaffolds* contribuem para adesão, difusão e proliferação dos fibroblastos, mas somente a alta porosidade fornece o ambiente necessário para a migração e infiltração celular, porém, a porosidade excessiva prejudica as propriedades mecânicas do *scaffolds*, sendo necessário um equilíbrio entre os extremos (GHAFARI *et al.*, 2022). Existem vários métodos utilizados para determinar a porosidade e o tamanho dos poros em *scaffolds*. A porosidade total pode ser medida por gravimetria, enquanto a porosidade e o tamanho dos poros podem ser determinados por meio de porosimetria de intrusão de mercúrio. A porosidade aberta pode ser avaliada pelo método de deslocamento líquido. Além disso, imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) são frequentemente utilizadas para medir a porosidade e, mais especificamente, os tamanhos dos poros, com o auxílio de *softwares* de computador para análise de imagem (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005).

A resistência mecânica de um *scaffold* determina se o material suportará a carga que será submetido (KANWAR; VIJAYAVENKATARAMAN, 2021). A propriedade mecânica é uma característica fundamental dos materiais, pois desempenha um papel crucial no auxílio da seleção de cenários de aplicação, definição de parâmetros e no desenvolvimento desses materiais. Essa propriedade é influenciada por diversos fatores, incluindo a composição do material, o método de processamento utilizado e a microestrutura resultante (SONG *et al.*, 2023). Geralmente, as propriedades mecânicas dos materiais são avaliadas por meio de testes de compressão em equipamentos específicos, que são amplamente utilizados como método padrão para medição de dureza. Esses testes permitem determinar importantes propriedades mecânicas, tais como módulo de elasticidade, resistência à flexão, tensão de fratura, entre outras (PATRA; PANDEY, 2022).

Biocompatibilidade é a característica dos *scaffolds* que diz respeito a suas propriedades anti-inflamatórias e a ausência de resposta imune prejudicial (REVATI *et al.*, 2022), portanto, um *scaffold* biocompatível interage com o organismo sem acarretar efeitos tóxicos ou inflamatórios (MIRMUSAVI; AHMADIAN; KARBASI, 2022). Desde a primeira implantação de biomateriais no corpo humano, ficou evidente que ocorrem interações entre esses materiais e o sistema corporal, o que tem um impacto significativo na capacidade do material de desempenhar adequadamente sua função dentro de um período de tempo desejado. As características dessas interações variam de uma situação para outra. No entanto, é amplamente aceito que um biomaterial deve agir ativamente no ambiente em que está inserido, em vez de simplesmente existir. Além disso, deve proporcionar a resposta mais apropriada para a aplicação específica a que se destina, levando sempre em consideração o

contexto dessa aplicação para determinar sua biocompatibilidade. Esse último ponto é de extrema importância, pois a biocompatibilidade de um determinado material varia de acordo com a situação em que é utilizado. A biocompatibilidade é mais uma característica de um sistema material-tecido do que uma propriedade intrínseca de um material específico. No entanto, é válido ressaltar que alguns materiais são naturalmente mais biocompatíveis do que outros (WILLIAMS, 2012).

A bioatividade é a capacidade de um material desencadear uma resposta biológica específica na interface com os tecidos, resultando na formação de uma ligação entre os tecidos e o material. A medida da bioatividade pode ser realizada através da taxa de desenvolvimento da ligação interfacial (CAO; HENCH, 1996). A bioatividade envolve uma série de eventos biológicos que estão intimamente relacionados às características dos biomateriais. Esses processos contribuem para o desempenho dos sistemas biológicos e podem ser identificados como parcialmente responsáveis pelo desempenho de um biomaterial. Quando se busca investigar a atividade clínica benéfica dos materiais bioativos, uma abordagem apropriada é iniciar com os mecanismos fundamentais associados às características biológicas inerentes dos tecidos e/ou células-alvo, e em seguida, identificar possíveis maneiras pelas quais o biomaterial pode influenciar essas características (WILLIAMS, 2022).

A degradação do *scaffold* precisa ocorrer em uma taxa equivalente a formação do novo tecido, para que não cause efeitos adversos no organismo (MIRMUSAVI; AHMADIAN; KARBASI, 2022). Se a taxa de degradação de um *scaffold* for elevada, sua estrutura porosa pode colapsar, resultando na obstrução da transferência de massa e na necrose do tecido. Por outro lado, uma taxa de degradação baixa pode dificultar a regeneração tecidual, levando à formação de cápsulas fibrosas e falta de integração adequada do *scaffold* com o tecido hospedeiro. Portanto, a cinética de degradação do *scaffold* desempenha um papel crucial na regeneração tecidual. A degradação dos *scaffolds* envolve diversos mecanismos complexos que são influenciados por fatores bioquímicos, físicos, geométricos e mecânicos. Essa complexidade decorre do fato de que a degradação/reabsorção segue uma cinética única em cada paciente, devido às características específicas de suas matrizes extracelulares e tipos celulares envolvidos. Fatores como idade, condição nutricional, doenças subjacentes, estilo de vida, sexo e outros fatores relacionados podem influenciar a capacidade regenerativa dos pacientes e, conseqüentemente, a taxa de degradação necessária do *scaffold*. No entanto, é possível manipular a taxa de degradação

do *scaffold* por meio de ajustes na composição do material, modificações ambientais, métodos de fabricação, design da estrutura do *scaffold* e características da superfície (TAJVAR; HADJIZADEH; SAMANDARI, 2023).

2.2.2 Materiais utilizados na fabricação de scaffolds

Os biomateriais implantáveis não degradáveis *in vivo* podem levar a uma resposta inflamatória do organismo, comprometendo o procedimento (SI *et al.*, 2019), devido a isso os *scaffolds* normalmente são fabricados com biomateriais degradáveis que podem ser sintéticos, naturais ou híbridos (SERRANO-AROCA *et al.*, 2022).

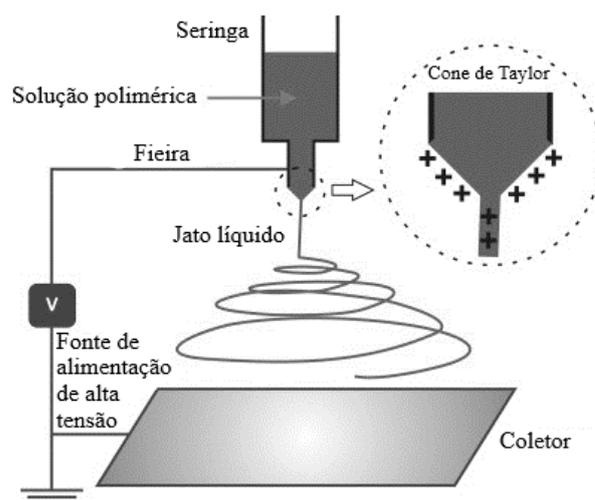
Celulose, quitosana, ácido hialurônico, amido, alginato, elastina, colágeno, gelatina, seda, queratina são alguns dos polímeros naturais utilizados na fabricação de *scaffolds*, dentre suas vantagens estão sua biocompatibilidade, fácil disponibilidade, valores acessíveis e não toxicidade, porém, possuem propriedades mecânicas não adequadas e são de difícil reprodução devido a variação na composição. Os biomateriais sintéticos como polietileno glicol (PEG), policaprolactona (PCL), poliuretano, polimetil metacrilato (PMMA), álcool polivinílico (PVA), poliestireno, polietileno tereftalato possuem propriedades mecânicas superiores aos polímeros naturais e possuem maior reprodutibilidade, mas proporcionam menor adesão celular, são menos biocompatíveis e apresentam custo elevado. Os *scaffolds* híbridos são produzidos através da combinação de polímeros a fim de melhorar suas propriedades (SUAMTE; TIRKEY; BABU, 2023). Como exemplo, podemos citar a adição de elastina aos *scaffolds* de colágeno, que resulta na melhoria das propriedades biológicas e mecânicas (RYAN; O'BRIEN, 2015). Ao adicionar celulose aos *scaffolds* de quitosana, é possível aumentar a resistência mecânica, a capacidade de intumescimento, a adesão e proliferação celular, enquanto se reduz a taxa de degradação (MAHARJAN *et al.*, 2021).

2.2.3 Métodos de fabricação dos scaffolds

Diversos métodos são utilizados na fabricação de *scaffolds* (Tabela 1), tais como eletrofiação, liofilização, *gas foaming*, impressão 3D, bioimpressão (SERRANO-AROCA *et al.*, 2022), fundição com solvente, entre outros (ZHANG *et al.*, 2022).

Eletrofiação (Figura 1) é uma técnica aplicada para produção de micro/nanofibras utilizando soluções poliméricas, que são submetidas a um alto potencial elétrico que ocasiona jateamento, dobramento, alongamento e afinamento de um jato polimérico (QAVI; TAN, 2023; SMÓŁKA; FIRYCH-NOWACKA; WIAK, 2022). Durante o processo, sobre a influência de um alto potencial elétrico, o polímero contido na seringa é expelido através da fieira, o solvente ali presente se evapora e as fibras são depositadas no coletor. Quando uma gota de polímero líquido é submetida a um alto potencial elétrico, ela sofre deformação, sendo atraída para uma região de baixo potencial. Essa deformação da gota é conhecida como “cone de Taylor” (GHORANI; ALEHOSSEINI; TUCKER, 2017). Porém, a uniformidade do material é afetada pelas forças exercidas pelo campo elétrico. O sistema clássico de eletrofiação conta com um único coletor aterrado e um bocal giratório. A fim de amenizar estes problemas, novas técnicas foram empregadas, utilizando mais de um bico giratório, diferentes modelos de coletor, ou inclusive a utilização de mais de um coletor, além de eletrodos adicionais utilizados para moldar as linhas de campo elétrico (SMÓŁKA; FIRYCH-NOWACKA; WIAK, 2022).

Figura 1 - Representação da técnica de eletrofiação utilizada para fabricação de *scaffolds*

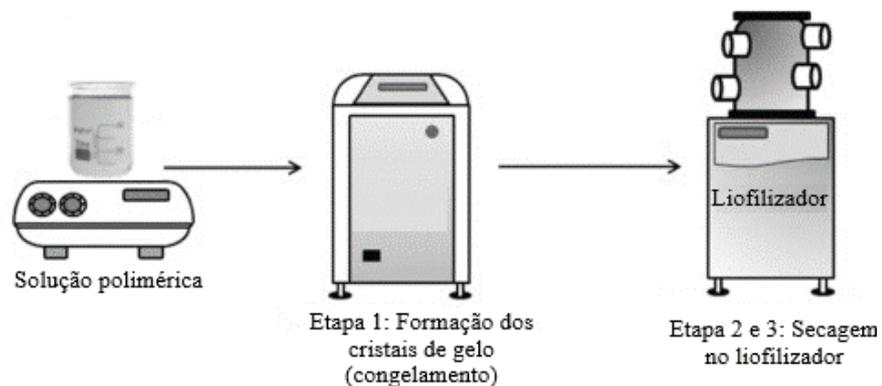


Adaptado de: Ghorani; Alehosseini; Tucker (2017)

A técnica de liofilização (Figura 2) consiste na remoção de solvente de uma solução polimérica através da sublimação (SERRANO-AROCA *et al.*, 2022). O processo de liofilização é um procedimento que se desenvolve em três etapas sequenciais. Inicialmente,

ocorre o congelamento ou a solidificação do solvente presente no material, ocorrendo sob baixas temperaturas e pressão atmosférica. Esse processo resulta na transformação do solvente em cristais de gelo. Na fase subsequente, denominada primeira etapa de secagem, a pressão dentro da câmara é reduzida para criar um vácuo controlado. Isso facilita a remoção da água presente no material por meio da sublimação, onde a água passa diretamente do estado sólido (gelo) para o estado gasoso (vapor). Na fase final, conhecida como a segunda etapa de secagem, a umidade restante na câmara é removida por meio da dessorção. Nessa etapa, as condições de vácuo são acentuadas, e a temperatura é aumentada em relação à primeira etapa de secagem (ELBRINK *et al.*, 2023). Esta técnica é amplamente aplicada nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (SUKEGAWA; KONO; NAKAGAWA, 2022).

Figura 2 - Técnica de liofilização empregada no processo de secagem de *scaffolds*



Adaptado de: Wahid *et al.* (2018)

Gas foaming é uma técnica utilizada para fabricar matrizes altamente porosas, este método consiste na indução da formação de um gás inerte, como o dióxido de carbono (CO_2) ou nitrogênio (N_2), no interior de uma solução. O gás converte a solução líquida em uma espuma, que é congelada para a estabilização de sua fase líquida. Após essa etapa, o material é submetido ao processo de liofilização (POURSAMAR *et al.*, 2015).

A fundição com solvente é uma técnica tradicional para formação de filme através da evaporação do solvente, responsável pelo aumento da concentração de sólidos e o surgimento de interações intermoleculares de longo alcance (WANG *et al.*, 2020). Neste procedimento, primeiramente ocorre a solubilização dos reagentes formadores dos filmes, que são então depositados em substratos planos e secos sob condições brandas (SALEVIC-

JELIĆ *et al.*, 2023). O solvente utilizado durante este processo necessita ser quimicamente estável e de alto ponto de ebulição, pois sua rápida evaporação pode afetar as propriedades da membrana (superfície e microestrutura) (LI *et al.*, 2012).

Impressão 3D é a fabricação de *scaffolds* impressos camada por camada por uma impressora 3D. A bioimpressão 3D é semelhante a impressão 3D, porém, sua matéria prima são biomateriais, como células e fatores de crescimento, sendo possível controlar com exatidão a fabricação do material (BOGALA, 2022). Na bioimpressão 3D, o principal componente é a biotinta, podendo variar suas propriedades de acordo com o tecido em que será aplicado, promovendo adesão, proliferação e diferenciação celular (RAEES *et al.*, 2023).

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens dos métodos de fabricação dos *scaffolds*

Método	Vantagens	Desvantagens
Eletrofição	Boa migração de células, alto fator de crescimento (ZHANG <i>et al.</i> , 2022), baixo custo (KAZEMIANRAD; KOOCHAKI; GHORANI, 2023) e processo controlável (ZHANG <i>et al.</i> , 2023d).	Diâmetro dos poros pequenos, estrutura irregular (ZHANG <i>et al.</i> , 2022) e toxicidade dos solventes utilizados (FRANCIS <i>et al.</i> , 2023).
Liofilização	Melhoria na capacidade de armazenamento e transporte dos materiais, preservação da estrutura do material durante o processo de secagem (SUKEGAWA; KONO; NAKAGAWA, 2022), redução da oxidação dos materiais e uniformidade do tamanho das partículas (DONG <i>et al.</i> , 2021).	Tempo de secagem (SUKEGAWA; KONO; NAKAGAWA, 2022) e custos operacionais elevados (GRACE <i>et al.</i> , 2022).
<i>Gas foaming</i>	Boa permeabilidade celular (LIM <i>et al.</i> , 2008) e ecológico (OKOLIEOCHA <i>et al.</i> , 2015).	Formação de poros aleatória (ZHANG <i>et al.</i> , 2022).
Fundição com solvente	Espessura uniforme do filme, excelente transparência, propriedades mecânicas satisfatórias (WANG <i>et al.</i> , 2020), baixo custo e fabricação relativamente simples (KUMAR; SIDPARA; RACHERLA, 2023).	Poros não interconectados (ZHANG <i>et al.</i> , 2022).
Bioimpressão	Processo estável, alto controle e precisão da distribuição celular, baixo custo (XU <i>et al.</i> , 2022a) e possibilidade de impressão de materiais biológicos (ZHANG <i>et al.</i> , 2022).	Poros extremamente regulares, podendo divergir com o tecido a ser aplicado (ZHANG <i>et al.</i> , 2022).

Fonte: Autor

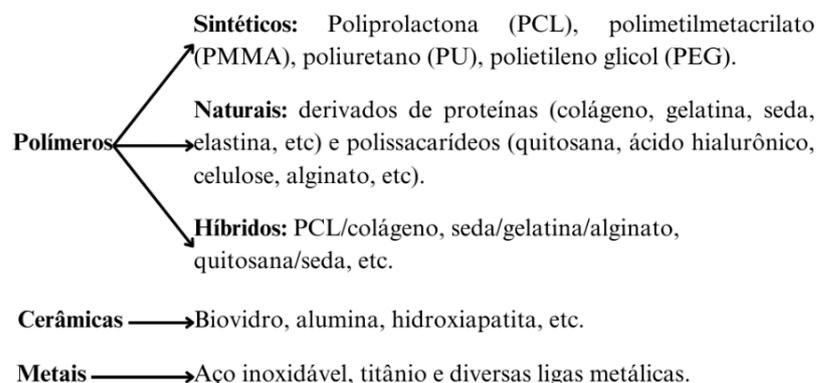
A capacidade de manipular as propriedades físicas químicas dos *scaffolds* permite que estes sejam adaptados de acordo com os requisitos de aplicação (SERRANO-AROCHA *et al.*, 2022).

2.3 Biomateriais

Biomateriais são substâncias sintéticas ou naturais (exceto fármacos) utilizadas para tratar ou substituir tecidos, órgãos e funções corporais (HNEDA; GOMES, 2022). Os biomateriais precisam apresentar propriedades biocompatíveis e biodegradáveis (KATZ; BURDICK, 2018). A biocompatibilidade é a capacidade de um biomaterial atuar no tecido hospedeiro sem causar efeitos adversos (VINODKUMAR; AMRUTHA; NAGESH, 2022). A biodegradação é o processo de degradação do biomaterial decorrente da exposição ao ambiente biológico, podendo ser causada pela presença de água e oxigênio, bem como por processos biológicos desencadeados por resposta inflamatória (PITTENGER; KERR, 2023). Os produtos da biodegradação devem ser atóxicos e facilmente metabolizados e eliminados pelo organismo, uma vez que qualquer substância externa ao corpo é reconhecida e rejeitada pelo mesmo. Quando um biomaterial é implantado, dependendo do tipo e estrutura do material, ocorrem diferentes tipos de resposta do organismo, portanto, nenhum material implantado é completamente compatível (VINODKUMAR; AMRUTHA; NAGESH, 2022).

Diversos biomateriais podem ser utilizados para a produção de *scaffolds*, tais como polímeros, cerâmicas e metais (Figura 3).

Figura 3 - Biomateriais



Fonte: Autor

Os polímeros podem ser sintéticos ou naturais, os naturais possuem propriedades parecidas com os tecidos moles humanos e são extraídos de fontes naturais, já os polímeros sintéticos, podem ser modificados quimicamente e são altamente adaptáveis (PARIN, 2022). Os polímeros naturais podem ser derivados de proteínas (por exemplo, colágeno, gelatina, seda, elastina, fibrinogênio, fibrina e fibronectina) e polissacarídeos (por exemplo, quitosana, quitina, ácido hialurônico, celulose, goma gelana e derivados, alginato e agarose), sendo superiores aos sintéticos no quesito biocompatibilidade, biodegradabilidade e semelhança com o ambiente corpóreo (PINA; REIS; OLIVEIRA, 2022). Contudo, apresentam algumas limitações em determinadas aplicações devido à possibilidade de contaminação, elevada degradação, dificuldade de esterilização e purificação. Já os polímeros sintéticos (policaprolactona-PCL, polioxietileno-PEO e poliuretano-PU) possuem maior resistência mecânica e à degradação (ASGHARI *et al.*, 2022). A Tabela 2, apresenta as vantagens, desvantagens e aplicações de alguns dos principais polímeros naturais.

Tabela 2 – Polímeros naturais suas vantagens, desvantagens e aplicações

Scaffold	Vantagens	Desvantagens
Gelatina	Biocompatibilidade, biodegradabilidade (ELSAYED <i>et al.</i> , 2023), alta adesão, proliferação e diferenciação celular, e boa absorção de água (RASHID; SHOWVA; HOQUE, 2023).	Baixa estabilidade térmica (RASHID; SHOWVA; HOQUE, 2023), alta taxa de degradação e resistência mecânica fraca (NASIRI <i>et al.</i> , 2022).
Quitosana	Biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioatividade, não toxicidade (SANDOMIERSKI <i>et al.</i> , 2022), atividade antimicrobiana, antioxidante e anticancerígena (YANG <i>et al.</i> , 2023).	Resistência mecânica fraca, baixa taxa de intumescimento e porosidade (ABDIAN <i>et al.</i> , 2023)
Celulose	Biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência mecânica (SRIWONG; BOONRUNGSIMAN; SUKYAI, 2023), baixo custo (JANMOHAMMADI <i>et al.</i> , 2023).	Baixa solubilidade (DOUSTDAR; GHORBANI, 2022);
Ácido hialurônico	Propriedades hidratantes, anti-inflamatórias (WANG <i>et al.</i> , 2022c), biocompatibilidade e biodegradabilidade (WANG <i>et al.</i> , 2022c).	Não adequado para impressão 3D (BAVARESCO <i>et al.</i> , 2020) e elevada taxa de degradação (AMIRI <i>et al.</i> , 2022);

Fonte: Autor

Uma estratégia para melhorar as propriedades dos *scaffolds* é a combinação de diferentes tipos de polímeros, resultando em polímeros híbridos. Essa abordagem permite explorar as vantagens de diferentes biomateriais e obter características sinérgicas que podem potencializar a eficiência do *scaffold*. A combinação de biomateriais pode levar a uma ampla gama de efeitos e consequências, como melhorias na resistência mecânica, na estabilidade estrutural, na biocompatibilidade e na capacidade de resposta biológica. A Tabela 3 apresenta exemplos de polímeros híbridos e as consequências da combinação de diferentes biomateriais. Essa estratégia de polímeros híbridos oferece uma abordagem promissora para o desenvolvimento de *scaffolds* mais eficazes e personalizados para aplicações em engenharia de tecidos (SUAMTE; TIRKEY; BABU, 2023).

Tabela 3 – Polímeros híbridos

Biomaterial base	Biomaterial adicionado	Alterações nas propriedades dos <i>scaffolds</i>
Quitosana	Nano Hidroxiapatita	No estudo realizado por Sadeghianmaryan <i>et al.</i> (2022), a adição de nanopartículas de hidroxiapatita em <i>scaffolds</i> de quitosana resultou em uma redução na taxa de dissolução e proliferação de bactérias. Além disso, verificou-se um aumento na resistência mecânica e bioatividade, ao mesmo tempo em que houve uma diminuição no intumescimento. Os autores atribuíram esse efeito de redução do intumescimento à maior rigidez da cadeia polimérica, devido à presença da hidroxiapatita.
Quitosana	Colágeno e Gelatina	Radhika Rajasree <i>et al.</i> (2020), em seus estudos avaliaram <i>scaffolds</i> híbridos de gelatina/quitosana e colágeno/quitosana, e observaram que os <i>scaffolds</i> de gelatina/quitosana apresentaram maior porosidade, taxa de intumescimento e resistência mecânica quando comparados aos de colágeno/quitosana.
Quitosana	Celulose	Na pesquisa conduzida por Mahendiran <i>et al.</i> , 2022, foi constatado que o aumento da concentração de celulose nos <i>scaffolds</i> de quitosana provocou leve redução da taxa de intumescimento, enquanto aumentou a taxa de dissolução, a adsorção de proteínas e a resistência mecânica.

(continua)

(continuação)

Tabela 3 – Polímeros híbridos

Biomaterial base	Biomaterial adicionado	Alterações nas propriedades dos <i>scaffolds</i>
Policaprolactona (PCL)	Quitosana	Os autores (RASTEGAR <i>et al.</i> , 2021), em sua pesquisa, observaram que <i>scaffolds</i> híbridos de PCL/quitosana, apresentaram aumento na taxa de intumescimento, taxa de degradação, porosidade e resistência mecânica, quando comparado com os <i>scaffolds</i> puros de PCL.
Quitosana	Ácido hialurônico	Segundo estudo conduzido por Davachi <i>et al.</i> , 2022, a adição de ácido hialurônico aos <i>scaffolds</i> de quitosana aumentou o módulo de compressão e a resistência mecânica, enquanto diminuiu o tempo de gelificação, ângulo de contato com a água e a degradação enzimática. Se comparar a degradação enzimática dos <i>scaffolds</i> puros de quitosana e ácido hialurônico, os que continham exclusivamente ácido hialurônico apresentaram menores taxas de degradação enzimática, porém, todos os <i>scaffolds</i> híbridos de quitosana/ácido hialurônico independente da variação das concentrações de seus reagentes apresentaram taxas de degradação enzimática inferiores aos <i>scaffolds</i> puros. No que diz respeito aos estudos de viabilidade celular, resultados semelhantes foram obtidos, em que <i>scaffolds</i> híbridos apresentaram melhores resultados em comparação aos <i>scaffolds</i> puros de quitosana e ácido hialurônico.
Gelatina	Fosfato bicálcico anidro (monetite)	De acordo com o estudo desenvolvido por (SINGH <i>et al.</i> , 2023), foi observado que a incorporação de monetite, uma cerâmica bioativa, em <i>scaffolds</i> de gelatina resultou em uma redução na taxa de intumescimento e na taxa de dissolução. Além disso, essa adição melhorou as propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> e demonstrou viabilidade celular, promovendo a adesão e permeabilidade celular.
Gelatina	Poli(ácido l-lático) (PLLA)	Segundo os autores (NIU; STADLER; FU, 2021), os <i>scaffolds</i> híbridos de gelatina/PLLA com concentrações mais elevadas de gelatina mostraram maiores taxas de intumescimento, capacidade de proliferação e migração celular, ao passo que apresentaram menor resistência mecânica.

(continua)

(conclusão)

Tabela 3 – Polímeros híbridos

Biomaterial base	Biomaterial adicionado	Alterações nas propriedades dos <i>scaffolds</i>
Gelatina	Ácido hialurônico	Conforme indicado no estudo conduzido por (ZHANG <i>et al.</i> , 2011), a incorporação de ácido hialurônico aos <i>scaffolds</i> de gelatina resultou em um aumento na taxa de intumescimento e na taxa de degradação, ao mesmo tempo em que reduziu as propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> . Além disso, observou-se que os <i>scaffolds</i> com concentrações mais elevadas de gelatina demonstraram melhor desempenho na adesão e proliferação celular.
Celulose	Gelatina	Nos <i>scaffolds</i> e celulose estudados por (MIRTAGHAVI <i>et al.</i> , 2020), o acréscimo de gelatina nos <i>scaffolds</i> de celulose resultou em uma redução na taxa de intumescimento e na resistência mecânica dos <i>scaffolds</i> híbridos. Ao mesmo tempo, houve um aumento na taxa de degradação enzimática, o que auxiliou no ajuste da lenta degradação da celulose.

Fonte: Autor

Adicionalmente, o comportamento e a composição dos materiais desempenham um papel fundamental na determinação do seu potencial de aplicação. Por exemplo, a quitosana apresenta indicações promissoras para tecidos ósseos, cardíacos, pele, nervos e sistemas de liberação de medicamentos. Por outro lado, a celulose demonstra ser aplicável em tecidos adiposos, ósseos, cartilagosos, cardíacos, neurais, cutâneos e vasculares. A combinação de materiais proporciona a ampliação das aplicações dos biomateriais, permitindo a adaptação de suas propriedades de acordo com as necessidades específicas. Através dessa abordagem, é possível aprimorar e personalizar as características dos materiais, expandindo suas aplicações em diversos contextos biomédicos. (PRAMANIK *et al.*, 2023).

2.4 Quitosana

A quitosana (Ch) é um polissacarídeo de baixo custo derivado da desacetilação da quitina (ZHAO *et al.*, 2022a). A quitina, o biopolímero mais abundante presente na natureza depois da celulose (KOU; PETERS; MUCALO, 2022), é encontrada nas paredes celulares

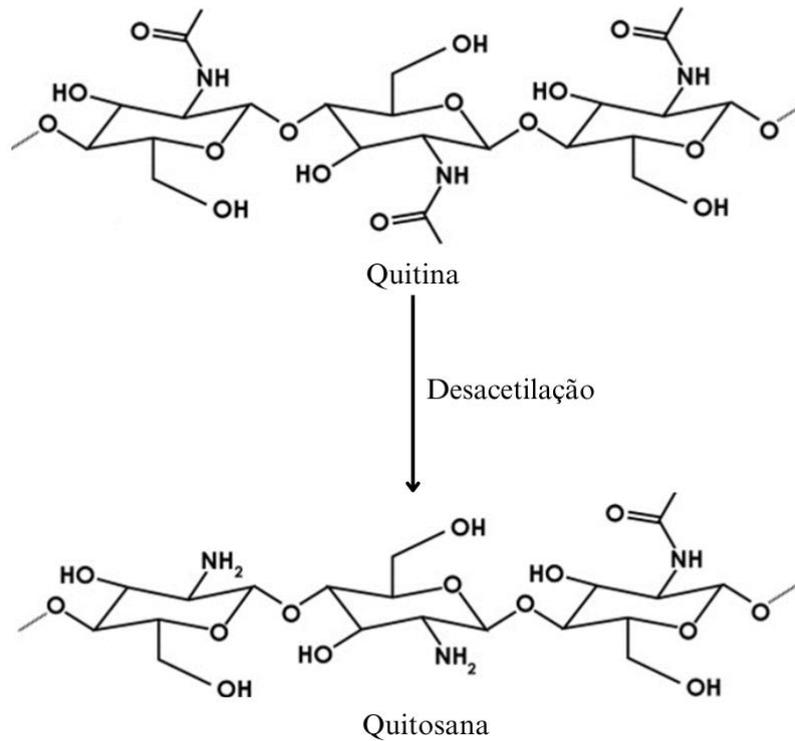
de algumas espécies de fungos e no exoesqueleto de insetos e crustáceos (ZHAO *et al.*, 2022a). Devido à sua baixa solubilidade e reatividade, a quitina é substancialmente menos utilizada em relação a quitosana, que possui grupos funcionais reativos, como amino e hidroxila. Adicionalmente, esses grupos reativos podem ser modificados de acordo com o interesse de cada setor industrial. Assim, a quitosana é amplamente aplicada em indústrias de alimentos, (QIAN *et al.*, 2023), cosméticos, biomédica, farmacêutica, (PRIYANKA; PRASHANTH; THARANATHAN, 2022) veterinária, agrícola, biotecnológica e ambiental (KOU; PETERS; MUCALO, 2022).

A fórmula molecular da quitosana é $(C_6H_{11}NO_4)_n$ e seu nome químico (1,4)-2-amino-2-desoxi- β -D-poliglicose (CHEN *et al.*, 2023). Uma característica importante da quitosana é sua flexibilidade estrutural em razão da presença dos dois grupos hidroxila (-OH na posição C-3 e C-6) e um grupo amina (-NH₂ na posição C-2) em cada uma das unidades de repetição, favorecendo modificações químicas (AHMED *et al.*, 2018). Esses grupos funcionais também desempenham um papel fundamental na formação de ligações covalentes por meio de diferentes tipos de reações químicas, como esterificação, aminação redutiva e reação de eterificação (HARUGADE; SHERJE; PETHE, 2023).

2.4.1 Método de extração da quitosana

Para obtenção da quitosana, primeiro o material bruto é submetido aos processos de desmineralização, desproteinização, desodorização e secagem, gerando como produto a quitina, que é então desacetilada, limpa e seca, dando origem a quitosana (SHOUEIR *et al.*, 2021). O processo de desacetilação da quitina envolve a eliminação do grupo acetil com hidróxido de sódio (NaOH) concentrado, deixando somente o grupo amina (-NH₂), conforme ilustrado na Figura 4 (AHMED *et al.*, 2018).

Figura 4 - Processo de desacetilação da quitina para obtenção da quitosana



Adaptado de: Azmana *et al.* (2021)

2.4.2 Propriedades da quitosana

As principais propriedades da quitosana são seu peso molecular e grau de desacetilação, que impactam em outras de suas propriedades como cristalinidade, área superficial, tamanho de partícula, umidade e teor de cinzas (SHOUEIR *et al.*, 2021). O peso molecular da quitosana varia de 50 a 2000 kDa, dependendo da fonte de quitina e do método de extração utilizado. O grau de desacetilação (GD) da quitosana varia de 54% a 100%. Elevados valores de GD, na faixa de 85% a 95%, estão associados a uma maior solubilidade do polímero devido à maior desacetilação. Por outro lado, valores de GD que variam entre 70% e 85%, considerados baixos valores de desacetilação, resultam desempenho inferior em termos de solubilização. A dissolução da quitosana é geralmente realizada em soluções ácidas diluídas, como ácido acético, ácido fórmico ou ácido clorídrico, comumente em uma concentração de 1%. Portanto, a solubilidade da quitosana é afetada pelo pH. Valores de pH abaixo de 6,3, causam a protonação dos grupos aminos da quitosana, os carregando positivamente e, conseqüentemente, levando a maior solubilidade. No entanto, quando o pH ultrapassa 6,3, ocorre a desprotonação dessas amins, provocando a perda da carga positiva

do polímero e, conseqüentemente, à diminuição de sua solubilidade. Além disso, a solubilidade da quitosana também é influenciada pelo peso molecular do polímero. Observa-se que, à medida que o peso molecular diminui, a solubilidade aumenta. Essa relação se deve ao fato de que um maior peso molecular está associado a um maior número de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares entre as cadeias de quitosana, o que resulta em uma diminuição da solubilidade (YADAV *et al.*, 2023).

A quitosana também apresenta propriedades coagulantes, que são atribuídas à interação do -NH_3^+ presente na quitosana com as plaquetas, que possuem carga superficial negativa. Enquanto o sangue humano geralmente coagula em um intervalo de 450 a 480 segundos, *scaffolds* contendo quitosana são capazes de reduzir esse intervalo para 240 a 270 segundos (ZHANG *et al.*, 2023b).

2.4.3 Quitosana na engenharia de tecidos

Na engenharia de tecidos, a quitosana é amplamente usada devido sua capacidade de promover a adesão, diferenciação, proliferação celular e biodegradabilidade. Podendo ser encontrada em diversos formatos, como esferas, fibras, géis, filmes, *scaffolds*, micropartículas, nanofibras. Os géis de quitosana, podem funcionar como bioadesivos e apoiarem a regeneração de tecidos normais (KOU; PETERS; MUCALO, 2022).

A quitosana, devido à sua semelhança estrutural com a glicina aminoglicana, presente no tecido conjuntivo, é amplamente utilizada na engenharia de tecidos cutâneos devido à sua excelente biocompatibilidade e suas propriedades antibacterianas, hemostáticas, além de promover a proliferação e diferenciação celular. Existem evidências que a interação do NH_3^+ da quitosana com a carga negativa das paredes celulares bacterianas resulta na permeabilização da superfície das células bacterianas, levando à apoptose e inibição do crescimento bacteriano. Na engenharia de tecidos cartilagosos, a quitosana desempenha um papel na regeneração da cartilagem por meio de mecanismos antiangiogênicos que envolvem a modulação de fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos. Esses mecanismos parecem ser benéficos para a proteção do tecido cartilaginoso (ZHANG *et al.*, 2023b). Na engenharia de tecidos cardiovasculares, existem evidências que o uso de *scaffolds* híbridos contendo quitosana, quando aplicados em tecidos cardíacos são capazes de formar tecidos semelhantes ao tecido nativo. Esses *scaffolds*

fornecem estímulos para promover a adesão celular e a regeneração de cardiomiócitos. Essa abordagem tem mostrado potencial para auxiliar no tratamento de doenças cardíacas (KAZEMI ASL; RAHIMZADEGAN; OSTADRAHIMI, 2023). Na engenharia de tecidos ósseos, a quitosana é amplamente utilizada em *scaffolds* para regeneração óssea. Esse polímero desperta interesse devido às suas propriedades biocompatíveis, o que significa que não provoca resposta imune no organismo, e à sua capacidade de produzir materiais com estruturas porosas complexas. Essas características são fundamentais para promover o crescimento de tecido ósseo e facilitar a integração com o osso adjacente (BHARATHI *et al.*, 2022).

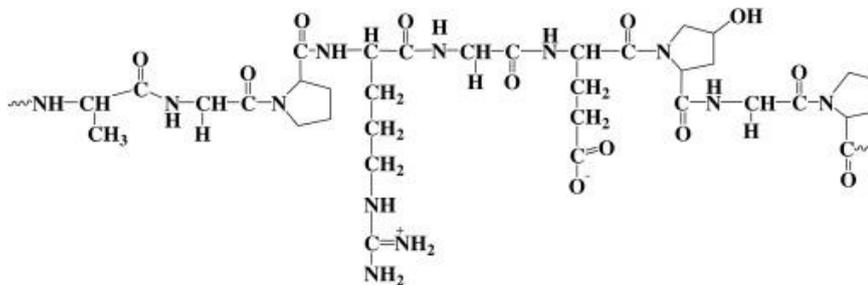
Apesar das vantagens citadas a quitosana apresenta algumas limitações, tais como a baixa solubilidade em água e alguns solventes orgânicos comuns (XIANG *et al.*, 2023), e resistência mecânica baixa, sendo a funcionalização e a reticulação os métodos utilizados para minimizar estes problemas (CAO *et al.*, 2022). Durante o processo de reticulação, as propriedades físicas e químicas da quitosana, tais como a hidrofiliabilidade, termoestabilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade são melhoradas (XIANG *et al.*, 2023).

2.5 Gelatina

A gelatina (Ge) é um biopolímero produzido a partir da hidrólise alcalina ou ácida do colágeno (HARWATE *et al.*, 2021). O colágeno é uma proteína presente nos tecidos humanos e animais que desempenha atividades significativas na preservação da integridade dos tecidos conjuntivos, incluindo ossos, córneas, cartilagens, tendões, vasos sanguíneos, ligamentos e dentina. Porém, apresenta antigenicidade limitada, o que reduz seu potencial de aplicação biológica. Por outro lado, a gelatina apresenta excelente biodegradabilidade e não antigenicidade, além de sua solubilidade em água (EL-SEEDI *et al.*, 2023), o que faz com que ela e seus derivados sejam extensamente empregados em diversos setores, tais como a indústria alimentícia, farmacêutica, médica e cosmética (WANG *et al.*, 2022b). A Ge é um material que possui alta disponibilidade de matéria-prima e baixo custo (IRFAN *et al.*, 2022). Ela é composta por 19 aminoácidos ligados entre si (BARBIERI *et al.*, 2023). Dentre eles estão presentes em sua molécula um grande número de resíduos de glicina, prolina e 4-hidroxiprolina (Figura 5) (DESHMUKH *et al.*, 2017). Sua estrutura é em forma de tripla-hélice em função da representação (Glicina-X-Prolina)_n, onde X retrata normalmente os aminoácidos lisina, arginina, metionina e valina (BARBIERI *et al.*, 2023).

Sua composição química apresenta principalmente carbono (50,5%), seguido por oxigênio (25,2%), nitrogênio (17%) e hidrogênio (6,8%) (MUSHTAQ *et al.*, 2022).

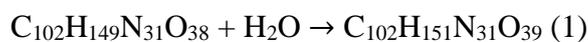
Figura 5 - Estrutura básica da gelatina



Fonte: Deshmukh *et al.* (2017)

2.5.1 Método de extração da gelatina

O colágeno está presente em ossos, cartilagem e pele, sendo utilizados restos animais para a extração da gelatina (BARBIERI *et al.*, 2023). O processo de fabricação da gelatina pode ser dividido em três etapas: pré tratamento, hidrólise e purificação. O pré tratamento, pode ser ácido ou básico, sendo empregado o mais adequado para a demanda industrial, de acordo com o grau de reticulação da matéria-prima do colágeno. A gelatina obtida através de pré tratamento ácido é denominada tipo A, sendo utilizada muitas vezes como matéria-prima a pele de porco e peixe. A gelatina derivada do tratamento alcalino, é chamada de tipo B e normalmente são utilizadas peles bovinas. Durante a etapa de hidrólise, a gelatina é extraída do colágeno insolúvel por meio do tratamento com água quente, gerando danos à sua estrutura por meio da quebra das ligações covalentes e de hidrogênio que é acompanhada pelo desprendimento das moléculas em unidades menores, dando origem a gelatina solúvel. A solução resultante, o “licor de gelatina”, é concentrada em evaporadores a vácuo e seca. A reação da hidrólise da gelatina é demonstrada na equação (1) (MUSHTAQ *et al.*, 2022).



Colágeno

Gelatina

A estrutura primária da gelatina é semelhante à do colágeno nativo encontrado nos tecidos. As variações nesse polímero são atribuídas principalmente às diferentes fontes de matérias-primas utilizadas e aos métodos de extração empregados (MUSHTAQ *et al.*, 2022). As gelatinas de origem suína e bovina são amplamente utilizadas na medicina regenerativa devido à sua estrutura polipeptídica semelhante às gelatinas humanas. Por outro lado, as gelatinas de peixes possuem um teor reduzido de repetições peptídicas ou resíduos de aminoácidos em suas cadeias polipeptídicas, resultando em um ponto de fusão substancialmente menor, baixa estabilidade térmica, temperatura de gelificação relativamente baixa e maior viscosidade em comparação com as gelatinas de mamíferos (EL-SEEDI *et al.*, 2023).

2.5.2 Propriedades da gelatina

A gelatina é um polímero de alto peso molecular (RASHID; SHOWVA; HOQUE, 2023), variando entre 15 e 400 kDa (EL-SEEDI *et al.*, 2023), e exibe um padrão específico de distribuição do peso molecular, consistindo em cadeias α e oligômeros. Essa estrutura é uma combinação de múltiplas cadeias polipeptídicas distintas, sendo predominantes três fragmentos principais: cadeias α livres, cadeias β (dímeros de cadeias α reticuladas covalentemente) e cadeias γ (trímeros de cadeias α reticuladas covalentemente). Em condições de elevada temperatura e maior teor de líquidos, a gelatina se encontra na forma líquida, conhecida como sol ou hidrossol. Por outro lado, em condições de baixa temperatura e menor teor de líquidos, a gelatina adquire uma estrutura concentrada e rugosa, caracterizando a fase gel (MUSHTAQ *et al.*, 2022).

Algumas das propriedades críticas da gelatina incluem a sua viscosidade e a força de Bloom, ambas afetadas pelo peso molecular da gelatina. Enquanto a viscosidade determina a mobilidade das moléculas de gelatina em um líquido (AHMADY; ABU SAMAH, 2021), a força de Bloom refere-se à rigidez do gel formado pela gelatina e é medida sob condições padrão estabelecidas previamente. Essa medida é baseada em um método desenvolvido e patenteado por O.T. Bloom em 1925, que utiliza um êmbolo cilíndrico de fundo plano com diâmetro de 12,7 mm para deprimir a superfície da gelatina em 4 mm, aplicando um peso específico variável. Os valores de Bloom variam de 50 a 400 g, sendo que gelatinas com valores mais altos de Bloom apresentam maior temperatura de gelificação e fusão, bem como

um gel mais forte. As gelatinas são classificadas como alto Bloom quando variam de 200 a 300 g, médio de 100 a 200 g e baixo de 50 a 100 g (HAUG; DRAGET, 2009).

O ponto isoelétrico (PI) da gelatina, varia de acordo com as condições específicas de hidrólise do colágeno. Durante o processo de hidrólise alcalina, os aminoácidos asparagina e glutamina são convertidos em ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente, resultando em um valor de PI mais baixo para a gelatina do tipo B. O ponto isoelétrico representa o pH no qual a gelatina apresenta carga elétrica neutra. Esse valor determina a distribuição de cargas ao longo da estrutura da gelatina em pH fisiológico e pode influenciar sua biocompatibilidade. Em pH acima do seu ponto isoelétrico, a gelatina adquire cargas negativas, enquanto em pH abaixo desse ponto, ela possui cargas positivas. Portanto, a gelatina do tipo A será carregada positivamente em pH fisiológico, enquanto a gelatina do tipo B será carregada negativamente. Essa diferença de carga elétrica afeta a interação da gelatina com outras moléculas e sistemas biológicos, o que pode ter implicações na sua biocompatibilidade. Devido à sua carga negativa em pH fisiológico, a gelatina do tipo B apresenta uma melhor biocompatibilidade em comparação com a gelatina do tipo A. Essa propriedade é relevante em aplicações médicas e regenerativas, uma vez que a interação da gelatina com os tecidos e células do organismo é influenciada pelas cargas elétricas presentes em sua estrutura (AHMADY; ABU SAMAH, 2021).

2.5.3 Gelatina na engenharia de tecidos

Na área de regeneração de tecidos, a gelatina é amplamente utilizada para a produção de diversos materiais, como *scaffolds*, hidrogéis injetáveis e sistemas de liberação de drogas, devido suas características atóxicas, biocompatíveis, biodegradáveis, habilidade de promover proliferação, diferenciação e adesão celular sem provocar reações imunológicas ao organismo, além da capacidade de absorção de água, propriedade desejada na regeneração tecidual, pois melhora o transporte de oxigênio e a nutrição para o desenvolvimento celular saudável. Apesar disso, a gelatina apresenta limitações em relação a sua estabilidade térmica (RASHID; SHOWVA; HOQUE, 2023), resistência mecânica e taxa de degradação (NASIRI *et al.*, 2022), características que podem ser melhoradas através da reticulação da gelatina utilizando métodos físicos, químicos ou enzimáticos (IRFAN *et al.*, 2022). Além disso, a gelatina pode ser empregada na síntese de *scaffolds* para aplicação em diversos tipos de

tecidos, tais como: tecido ósseo, cutâneo, cardiovascular, cartilaginoso, neural, fígado e rim (RASHID; SHOWVA; HOQUE, 2023).

2.6 Xerogel de tanino-glutaraldeído

2.6.1 Géis de carbono

Os géis de carbono, são materiais nanoporosos, obtidos através de uma reação de policondensação entre derivados hidroxilados de benzeno (como fenol, resorcinol, cresol, entre outros) e aldeídos (como formaldeído, furfural, glutaraldeído, entre outros), seguidos por um processo de cura e secagem (FATHY; RIZK; AWAD, 2016). Dentre os géis de carbono existem os aerogéis, xerogéis e criogéis, que são classificados de acordo com o processo de secagem. Os aerogéis são formados através de secagem supercrítica, os criogéis através da secagem criogênica (CASTRO *et al.*, 2021) e os xerogéis são secos a pressão normal (DAI *et al.*, 2022). Os aerogéis, por serem produzidos por meio do processo de secagem supercrítica, são geralmente mais caros em comparação aos criogéis, que podem ser obtidos por liofilização, uma opção mais econômica, e aos xerogéis (SZCZUREK *et al.*, 2011).

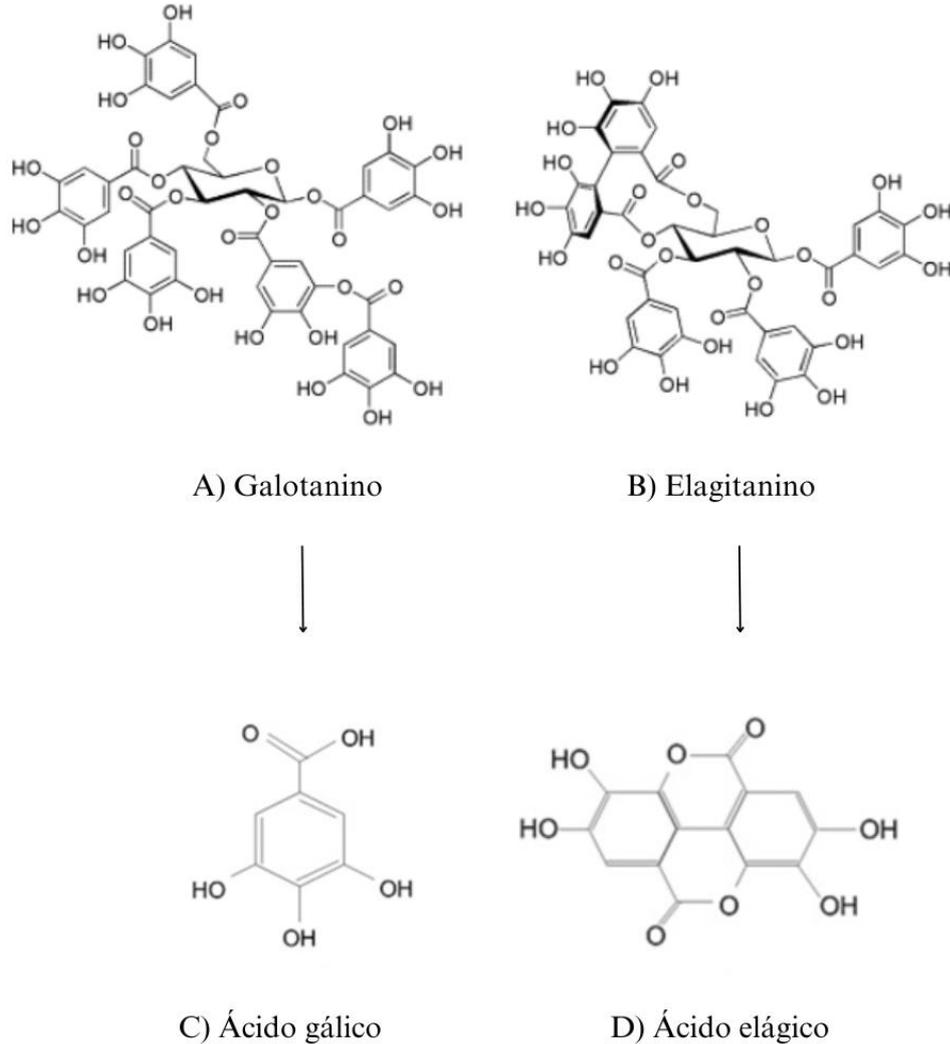
Nos últimos anos, diversos campos de pesquisas têm depositado seus esforços no estudo de géis de carbono devido sua versatilidade, podem ser aplicados em processos de separação de gás (DAI *et al.*, 2022), adsorção de poluentes em fases gasosas e líquidas (CASTRO *et al.*, 2021), como isolante térmico, suporte catalítico, armazenamento de hidrogênio, etc (REY-RAAP *et al.*, 2016). A ampla gama de aplicações desses materiais pode ser atribuída principalmente à sua característica de mesoporosidade, que facilita a rápida transferência de moléculas através de sua estrutura porosa. Esses materiais também se destacam por apresentarem condutividade elétrica e alta resistência química (SZCZUREK *et al.*, 2011).

2.6.2 Tanino

O tanino (Tn) é um composto fenólico solúvel em água, de baixo custo, extraído de diversas partes de plantas (ARISTRRI *et al.*, 2022). Essa classe de compostos está presente no citoplasma das células vegetais e é encontrado em praticamente todas as partes das plantas, incluindo cascas, madeiras, folhas, frutos, raízes e sementes. A quantidade e composição dos taninos podem variar de acordo com a espécie botânica, idade da planta, tipo de tecido vegetal e ambiente em que a planta se desenvolveu (BRAGHIROLI *et al.*, 2019)

Os taninos podem ser classificados em duas categorias principais: hidrolisáveis e condensados (ARISTRRI *et al.*, 2022). Os taninos hidrolisáveis (Figura 6) são compostos por várias moléculas de ácido fenólico e podem ser classificados como galotaninos e elagitaninos, os quais dão origem ao ácido gálico hidrolisado e ao ácido elágico, respectivamente (MELO *et al.*, 2023;SHIRMOHAMMADLI; EFHAMISISI; PIZZI, 2018).

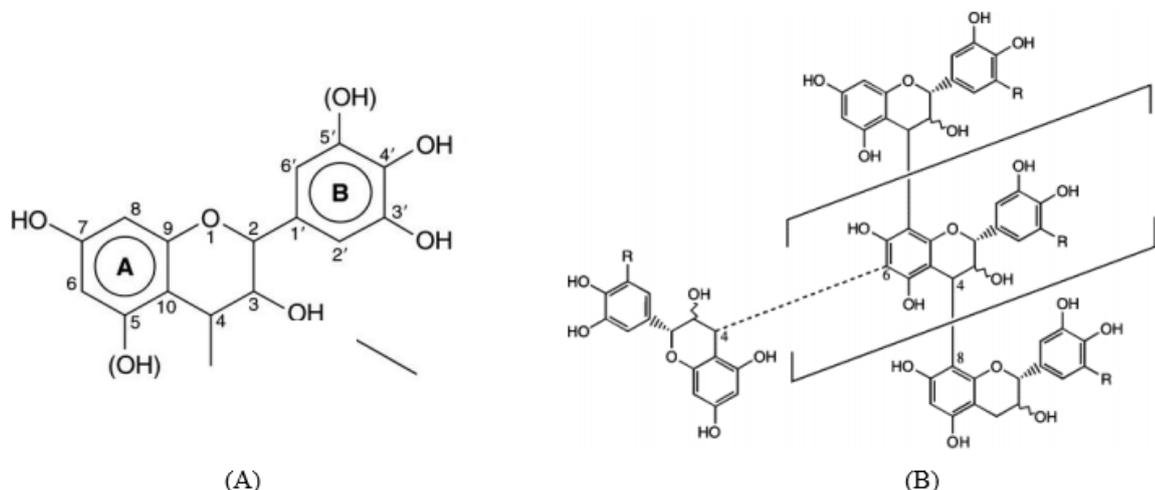
Figura 6 - Taninos hidrolisáveis: (A) Estrutura molecular do galotanino (B) Estrutura molecular do elagiotanino (C) Estrutura molecular do ácido gálico (D) Estrutura molecular do ácido elágico



Adaptado de: Melo *et al.* (2023); Rodrigues (2013)

Os taninos condensados (Figura 7) possuem dois anéis fenólicos conectados por um anel piral central e são polímeros de flavan-3-óis (MELO *et al.*, 2023), e representam 90% da produção mundial de taninos comerciais (SHIRMOHAMMADLI; EFHAMISISI; PIZZI, 2018). O tanino hidrolisado é menos empregado em comparação ao tanino condensado devido à sua baixa reatividade na presença de aldeídos, sua produção limitada em escala mundial e seu preço elevado (RODRIGUES, 2013).

Figura 7 - (A) Estrutura química de um flavan-3-ol (B) Estrutura química de um tanino condensado



Fonte: Rodrigues (2013)

O anel A do flavan-3-ol pode conter um ou dois grupos hidroxila (OH), sendo denominado resorcinol ou florogliconol, respectivamente. O anel B, por sua vez, pode apresentar de dois a três grupos OH, conhecidos como catecol ou pirogalol. Assim, a combinação dos anéis A e B resulta em quatro possíveis combinações de flavonoides (RODRIGUES, 2013). Devido aos seus grupos funcionais, como as hidroxilas, o tanino possui a capacidade de estabelecer reticulações estáveis com diversas moléculas, incluindo proteínas e carboidratos, por meio de ligações químicas. Essa característica única distingue os taninos de outros grupos polifenólicos (MELO *et al.*, 2023).

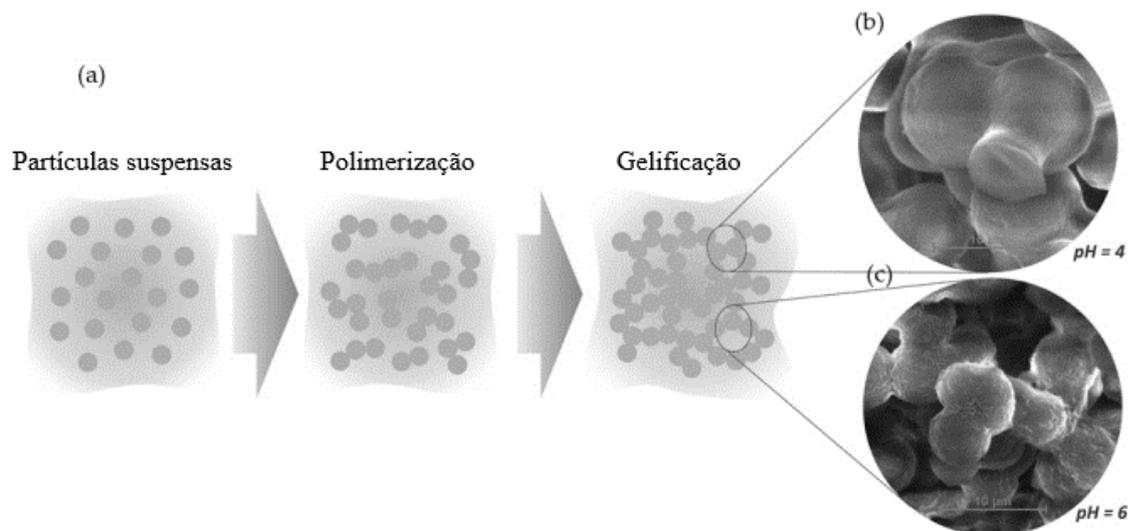
2.6.3 Géis de tanino

Os géis de carbono são frequentemente produzidos a partir da reação entre o resorcinol e o formaldeído, na presença de água como solvente e carbonato de sódio como catalisador. No entanto, devido ao alto custo do resorcinol, tem havido uma busca por alternativas mais econômicas (FATHY; RIZK; AWAD, 2016). A utilização do tanino como precursor é uma alternativa de baixo custo para a obtenção de géis de carbono, em substituição ao resorcinol (SZCZUREK *et al.*, 2011). Além disso, têm sido realizados esforços para substituir o formaldeído por outros reagentes menos tóxicos e prejudiciais,

como o glutaraldeído, glioxal, hexametilenotetramina, entre outros (FATHY; RIZK; AWAD, 2016).

A adição de um reticulante (aldeído) em uma solução aquosa contendo tanino resulta em um aumento na reatividade das espécies químicas presentes. As partículas parcialmente hidrolisadas de tanino sofrem reticulação por meio de reações de policondensação, resultando na liberação de moléculas de água. Durante esse processo, as partículas começam a se aglomerar à medida que as cadeias poliméricas se desenvolvem, levando à formação de um gel (gelificação) e aumentando significativamente a viscosidade da solução. O gel resultante é composto por duas fases distintas em um sistema semi-sólido. A fase sólida consiste em uma rede nanoestruturada de nódulos esféricos interligados, enquanto a fase líquida contém o solvente utilizado na solução de tanino, geralmente água, juntamente com alguns subprodutos formados durante as reações de polimerização. O tamanho dos nódulos formados está relacionado a várias propriedades durante a síntese, sendo o pH e a concentração de sólidos na solução inicial os principais fatores que afetam. Em pH ácido, os géis tendem a ter nódulos maiores, resultando em poros maiores e um maior volume de poros. Por outro lado, géis formados em condições alcalinas tendem a ser menos porosos, com poros menores ou mesmo sem poros. Na Figura 8, está exposta uma representação do processo de gelificação do tanino e como o pH impacta a formação dos poros no gel. Após o processo de gelificação, as reações de polimerização continuam, pois a rede formada possui alta flexibilidade e as cadeias poliméricas têm mobilidade entre si. Devido a isso, é necessário realizar uma etapa de envelhecimento após a gelificação do material antes de prosseguir com o procedimento de secagem do gel, a fim de otimizar a reticulação. Após o envelhecimento, a secagem pode ser realizada para obter o tipo desejado de gel de carbono (xerogel, criogel ou aerogel). (BRAGHIROLI *et al.*, 2019).

Figura 8 - (a) Processo de gelificação (b) Micrografia da gelificação em pH 4 e (c) Micrografia da gelificação em pH 6



Adaptado de: Braghiroli *et al.* (2019)

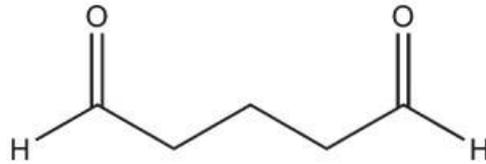
Devido às suas propriedades anticancerígenas, antioxidantes, anti-inflamatórias, bactericidas e curativas do tanino a indústria de polímeros tem demonstrado interesse em explorá-las, visando ampliar os campos de aplicação desse composto (ARISTRÍ *et al.*, 2022; PIZZI, 2021). Estudos também sugerem que quando adicionados a biocompósitos, o tanino é capaz de melhorar as propriedades mecânicas (ARISTRÍ *et al.*, 2022). É válido salientar que não foram encontrados na literatura estudos sobre o uso de xerogéis de tanino em *scaffolds* de quitosana e gelatina. Portanto, este estudo representa a primeira abordagem para investigar esse sistema.

2.7 Glutaraldeído

O glutaraldeído (Ga) é amplamente empregado como agente de reticulação em proteínas e polissacarídeos devido às suas propriedades favoráveis. Apresenta baixo peso molecular, estado líquido, é incolor e possui um odor pungente. Além disso, é solúvel em água, álcool e solventes orgânicos, o que o torna altamente versátil em diferentes aplicações (ALAVARSE *et al.*, 2022). Sua popularidade se deve ao baixo custo, fácil disponibilidade no mercado, reação rápida e capacidade de proporcionar uma estabilização robusta nas estruturas poliméricas (KRISHNAKUMAR *et al.*, 2019). O glutaraldeído é um aldeído

homobifuncional que possui uma cadeia linear de cinco carbonos e grupos aldeído em ambas as extremidades (HERMANSON, 2013a) (Figura 9):

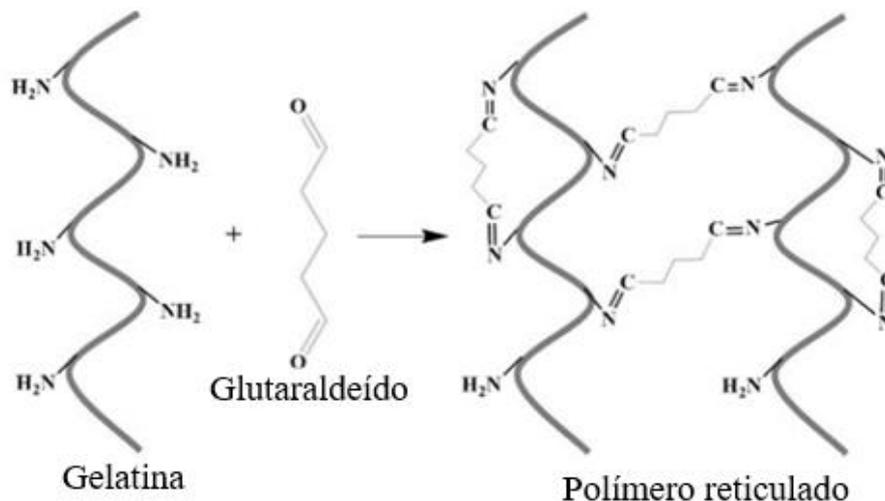
Figura 9 - Estrutura molecular do glutaraldeído



Fonte: Sehmi *et al.* (2016)

A reticulação utilizando glutaraldeído ocorre por meio da sua reação com os grupos funcionais amina (-NH₂) ou hidroxila (-OH) de proteínas ou polímeros, resultando na melhoria das propriedades mecânicas e resistência desses materiais (ORYAN *et al.*, 2018). O glutaraldeído apresenta uma reatividade primária direcionada aos grupos amina, embora a reação possa ocorrer por diferentes mecanismos (HERMANSON, 2013a). Quando o glutaraldeído reage com uma proteína, ocorre a alquilação das aminas disponíveis, formando ligações estáveis de aminas secundárias (HERMANSON, 2013b). Por exemplo, na gelatina, os grupos amina livres (-NH₂) reagem com o glutaraldeído, resultando na formação de uma rede reticulada mais resistente, conforme ilustrado na Figura 10 (ORYAN *et al.*, 2018).

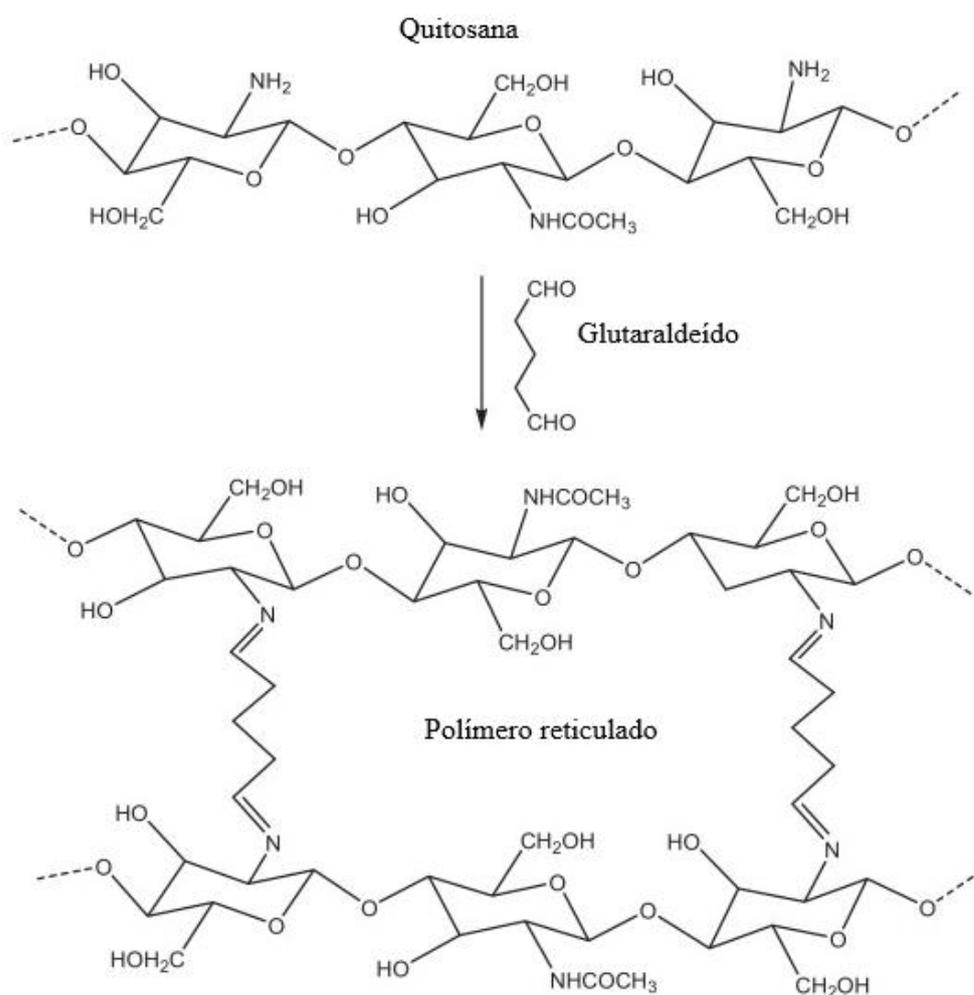
Figura 10 - Representação do mecanismo de reticulação da gelatina através do glutaraldeído



Adaptado de: He *et al.* (2021)

Ao empregar o glutaraldeído na reticulação de polímeros que contêm quitosana, ocorre a interação entre o grupo aldeído do glutaraldeído e os grupos funcionais amina (-NH_2) e hidroxila (-OH) da quitosana, resultando na formação de ligações covalentes. Essas ligações estabelecem uma rede tridimensional mais estável na estrutura polimérica (DOUSTDAR; OLAD; GHORBANI, 2022b). Porém, como citado anteriormente, apesar de interagir com grupos hidroxila, o glutaraldeído interage preferencialmente com o grupo amina, sendo essa sua principal rota de reticulação (HERMANSON, 2013a). Na Figura 11 está ilustrado processo de reticulação da quitosana com o glutaraldeído por meio dos seus grupos funcionais amina.

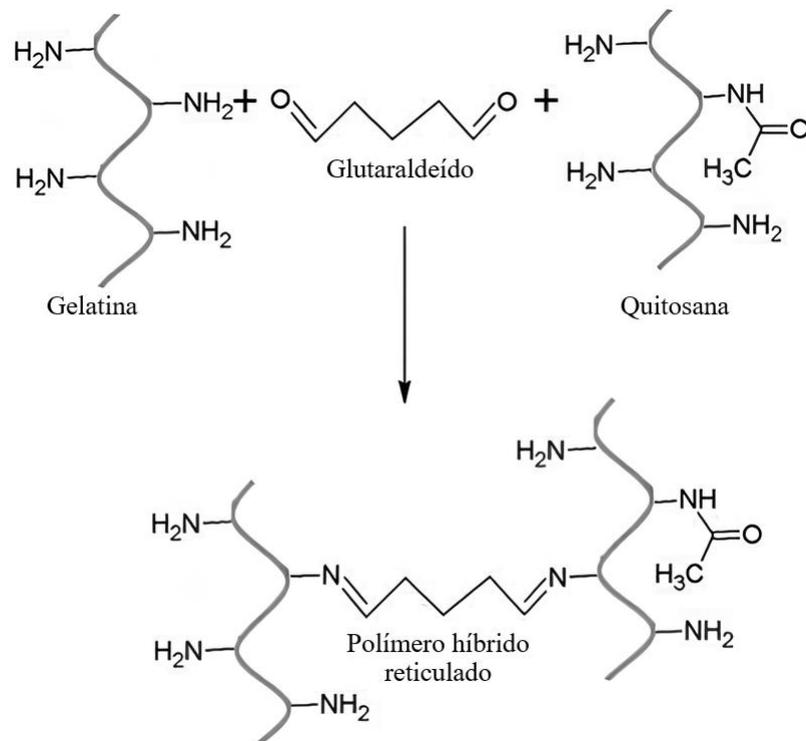
Figura 11 - Representação do mecanismo de reticulação da quitosana através do glutaraldeído



Fonte: Baldino *et al.* (2015)

Em polímeros híbridos compostos por quitosana e gelatina, a reticulação utilizando glutaraldeído (Figura 12) promove uma maior estabilidade da rede polimérica por meio das ligações estabelecidas entre o glutaraldeído e os componentes do polímero (SUBRAMANIAN; VIJAYAKUMAR, 2015). Quando proteínas, como a gelatina, são modificadas com glutaraldeído, elas podem reagir com outras moléculas que possuem grupos funcionais amina, seja por meio da formação de bases de Schiff ou por adição em outros pontos de insaturação (HERMANSON, 2013b).

Figura 12 - Representação do processo de reticulação de polímeros híbridos de quitosana e gelatina, induzido pela adição de glutaraldeído



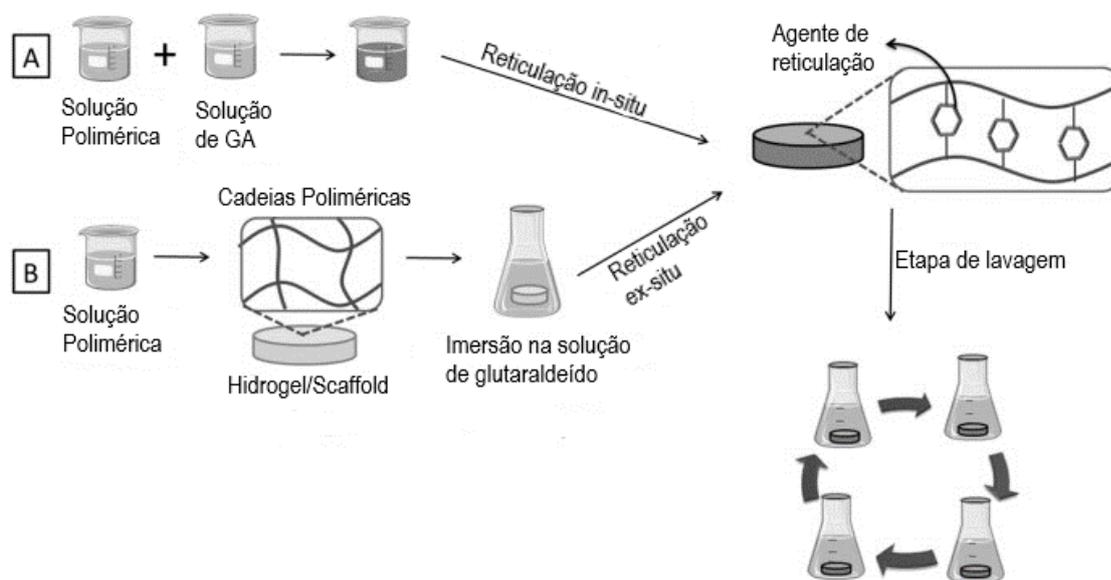
Adaptado de: Subramanian; Vijayakumar (2015)

Além disso, o glutaraldeído também pode ser empregado na reticulação de géis de carbono, incluindo aqueles sintetizados com tanino (FATHY; RIZK; AWAD, 2016). Quando um aldeído é adicionado a uma solução contendo tanino, ele reage com os grupos hidroxilas ($-\text{OH}$) presentes na molécula do tanino. A disponibilidade dos grupos hidroxilas na cadeia do tanino podem ser influenciada por diversos fatores, incluindo modificações químicas realizadas no próprio tanino, bem como a origem da matéria-prima utilizada. Esses

fatores exercem um impacto direto na reatividade entre o tanino e o glutaraldeído (RODRIGUES, 2013).

Existem dois métodos principais de reticulação do glutaraldeído: *in-situ* e *ex-situ*, conforme ilustrado na Figura 13. No método de reticulação *in-situ*, uma solução aquosa de glutaraldeído é adicionada a uma solução polimérica homogênea e a mistura é agitada magneticamente. A solução resultante pode ser moldada, congelada ou mantida em temperatura ambiente para a produção de biomateriais. Já no método de reticulação *ex-situ*, o material já formado é imerso em uma solução aquosa de glutaraldeído. A escolha do método de reticulação varia de acordo com as propriedades dos materiais e aplicação a que se destina (ALAVARSE *et al.*, 2022).

Figura 13 - Processos de reticulação do glutaraldeído (A) *in-situ*, (B) *ex-situ*



Fonte: Alavarse *et al.* (2022)

Embora a adição de glutaraldeído às soluções poliméricas resulte em um aumento na densidade das ligações cruzadas durante a reticulação, conforme evidenciado por diversos estudos (AL-MUHANNA *et al.*, 2023), é importante destacar que esse composto apresenta alta citotoxicidade, com um limite máximo de concentração considerado seguro de 8% (KRISHNAKUMAR *et al.*, 2019). Para contornar esse problema, diversas estratégias têm sido empregadas, tais como a redução da concentração de glutaraldeído, a lavagem com água ou a adição de moléculas capazes de se ligar às moléculas não reagidas de glutaraldeído

(ALAVARSE *et al.*, 2022). No entanto, devido à sua toxicidade, o glutaraldeído apresenta limitações em sua aplicação em produtos comerciais (ORYAN *et al.*, 2018).

Além disso, a reticulação de polímeros utilizando glutaraldeído pode apresentar limitações adicionais, como dificuldades no aumento de escala e na obtenção de resultados reproduzíveis. A falta de reprodutibilidade pode ser atribuída à complexidade em determinar o estado exato do glutaraldeído em solução, incluindo seu potencial tamanho e estrutura de polímero, bem como a natureza precisa dos materiais formados. As variações observadas no comportamento do glutaraldeído podem ser resultado de diferentes variáveis, como a idade da solução. Soluções mais antigas tendem a formar mais polímeros, o que implica que o glutaraldeído fresco pode não produzir os mesmos resultados que soluções envelhecidas (HERMANSON, 2013b).

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de *scaffolds* de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído.

3.1 Objetivos específicos

- Estudar o efeito da adição de partículas de xerogel de tanino-glutaraldeído nas propriedades de *scaffolds* de quitosana/gelatina
- Estudar o efeito das razões quitosana/gelatina (Ch/Ge) nas propriedades dos *scaffolds*
- Avaliar o efeito da quantidade de agente de ligação cruzada nas propriedades dos materiais

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e equipamentos

Os principais dados das substâncias utilizadas neste trabalho, seu peso molecular, fórmula e origem estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados das substâncias utilizadas para síntese e análises dos *scaffolds*

Substância	Fórmula	Massa ^a	Nº CAS ^b	Origem
Corante CBBG-250	C ₄₇ H ₄₈ N ₃ NaO ₇ S ₂	854,04	6104-58-1	Dinâmica Química, Brasil
Água	H ₂ O	18,02	7732-18-5	-
Quitosana, grau de desacetilação 90%	(C ₆ H ₁₁ O ₄ N) _n	Médio	9012-76-4	China
Hidróxido de Sódio 98%	NaOH	40	1310-73-2	Cromoline, Brasil
Ácido fosfórico 85%	H ₃ PO ₄	98	7664-38-2	Dinâmica Química, Brasil
Cloreto de Potássio 99,5%	KCl	74,56	7447-40-7	Dinâmica Química, Brasil
Gelatina em Pó	-	-	9000-70-8	Dinâmica Química, Brasil
Glutaraldeído 50%	C ₅ H ₈ O ₂	100,12	111-3-8	Dinâmica Química, Brasil
Hidrogenofosfato dissódico dihidratado 99,5%	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	177,99	10028-24-7	Merck, Alemanha
Ácido acético 99,8%	CH ₃ COOH	60,05	64-19-7	Merck, Alemanha
Albumina sérica bovina (BSA)	-	-	9048-46-8	Millipore, Alemanha
Álcool etílico 95%	CH ₃ CH ₂ OH	46,07	64-17-5	Synth, Brasil
Carbonato de sódio anidro 99,5%	Na ₂ CO ₃	105,99	497-19-8	Synth, Brasil
Tanino (Phenotan AP)	-	-		Tanac, Brasil
Álcool etílico absoluto	C ₂ H ₅ OH	46,08	64-17-5	Synth, Brasil
Fosfato de Potássio Monobásico 99%	KH ₂ PO ₄	136,09	7778-77-0	Vetec, Brasil
Borohidreto de Sódio 99%	NaBH ₄	37,83	16940-66-2	Vetec, Brasil

Fonte: Autor

a – massa molecular (g/mol)

b – número de registro no Serviço de Abstratos Químicos (Chemical Abstracts Service (CAS))

Os principais equipamentos utilizados neste trabalho, sua marca, modelo e localização estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Equipamentos utilizados para síntese e análise dos *scaffolds*

Equipamento	Marca	Modelo	Localização
pHmetro de bancada	Sppencer	mPA-210	USP, Lorena – SP
Bomba de vácuo	Sppencer/Hipperquímica	SKU 331201/331202	USP, Lorena – SP
Liofilizador	Terroni	Enterprise I	USP, Lorena – SP
Espectrofotômetro UV	Bel Engineering	UV-M51	USP, Lorena – SP
Microscópio eletrônico de varredura	Tescan	Vega 3 XMU	ITA, São José dos Campos – SP
Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier	PerkinElmer Frontier	FTIR-UATR	ITA, São José dos Campos – SP

Fonte: Autor

4.1.1 Preparação da solução tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline (PBS)*)

Para o preparo da solução PBS utilizada nas análises de intumescimento, dissolução e adsorção de proteínas, foram utilizados os reagentes fosfato dissódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de potássio (KCl), hidróxido de sódio (NaOH), fosfato monopotássico (KH_2PO_4), cujas proporções estão expressas na Tabela 6. Após a completa dissolução de todos os reagentes, a solução permaneceu em repouso por 1 h. Em seguida, o pH da solução foi analisado no pHmetro de bancada da marca Sppencer modelo mPA-210, sendo o valor ajustado em aproximadamente pH 7,3 (BRUNIUS; SUNDBOM, 1987; SIDDIQUI *et al.*, 2021).

Tabela 6 - Concentração dos reagentes da solução PBS

Reagente	Concentração (g/L)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,44
KCl	0,2
KH_2PO_4	0,2
NaOH	8

Fonte: Autor

4.1.2 Solução de Bradford

A quantificação da quantidade de proteína adsorvida, é um método desenvolvido por Marion Bradford que se baseia na mudança da absorção máxima de luz do corante Brilliant Blue G-250 de 465 nm para 595 nm quando este se liga a uma proteína. Este método é reconhecido por sua simplicidade, precisão, rapidez e baixo custo. O preparo da solução de *Bradford*, empregada neste estudo, consiste em pesar 100 mg do corante CBBG-250 e adicionar 50 mL de etanol 95%. Em seguida, adiciona-se lentamente 100 mL de ácido fosfórico 85% à solução, agitando magneticamente para dissolver o corante. A mistura é então diluída para 1 L com água deionizada e por fim filtrada até perder a coloração azulada e assumir uma coloração amarronzada. O processo de filtração consiste em despejar a solução em um funil contendo um papel filtro (fornecedor J.PROLAB, modelo JP40, gramatura de 80 g/m²). Esse funil é suportado por um frasco Erlenmeyer, o qual está conectado a uma bomba de vácuo (marca Spencer/Hipperquímica, SKU 331201/331202). Após iniciar a sucção por meio da bomba, as partículas presentes na solução são retidas pelo papel filtro, resultando na obtenção da solução filtrada. Para garantir a preservação da solução, é fundamental que esta seja armazenada em condições de baixas temperaturas.

4.2 Preparação dos *scaffolds*

4.2.1 *Scaffolds* de quitosana

Os *scaffolds* de quitosana foram preparados dissolvendo-se diferentes proporções de quitosana (Tabela 7), sob agitação magnética, em 15 mL de solução de ácido acético 0,67% v/v. Após a completa dissolução, diferentes concentrações de glutaraldeído 50% foram adicionadas à mistura, conforme especificado na Tabela 7. Em seguida, a mistura foi vertida em moldes cilíndricos (diâmetro 1,2 cm e comprimento 4 cm) e mantida em temperatura ambiente até a formação de uma rede tridimensional. Posteriormente, as amostras foram submetidas a temperaturas inferiores a -10 °C por um período de 24 h. Após esse período, as amostras foram desenformadas e liofilizadas por um período de 8 h. Para neutralizar o ácido acético presente, os *scaffolds* secos foram imersos em 100 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 2% (m/v) por 2 h (WANG *et al.*, 2023). A neutralização do glutaraldeído não

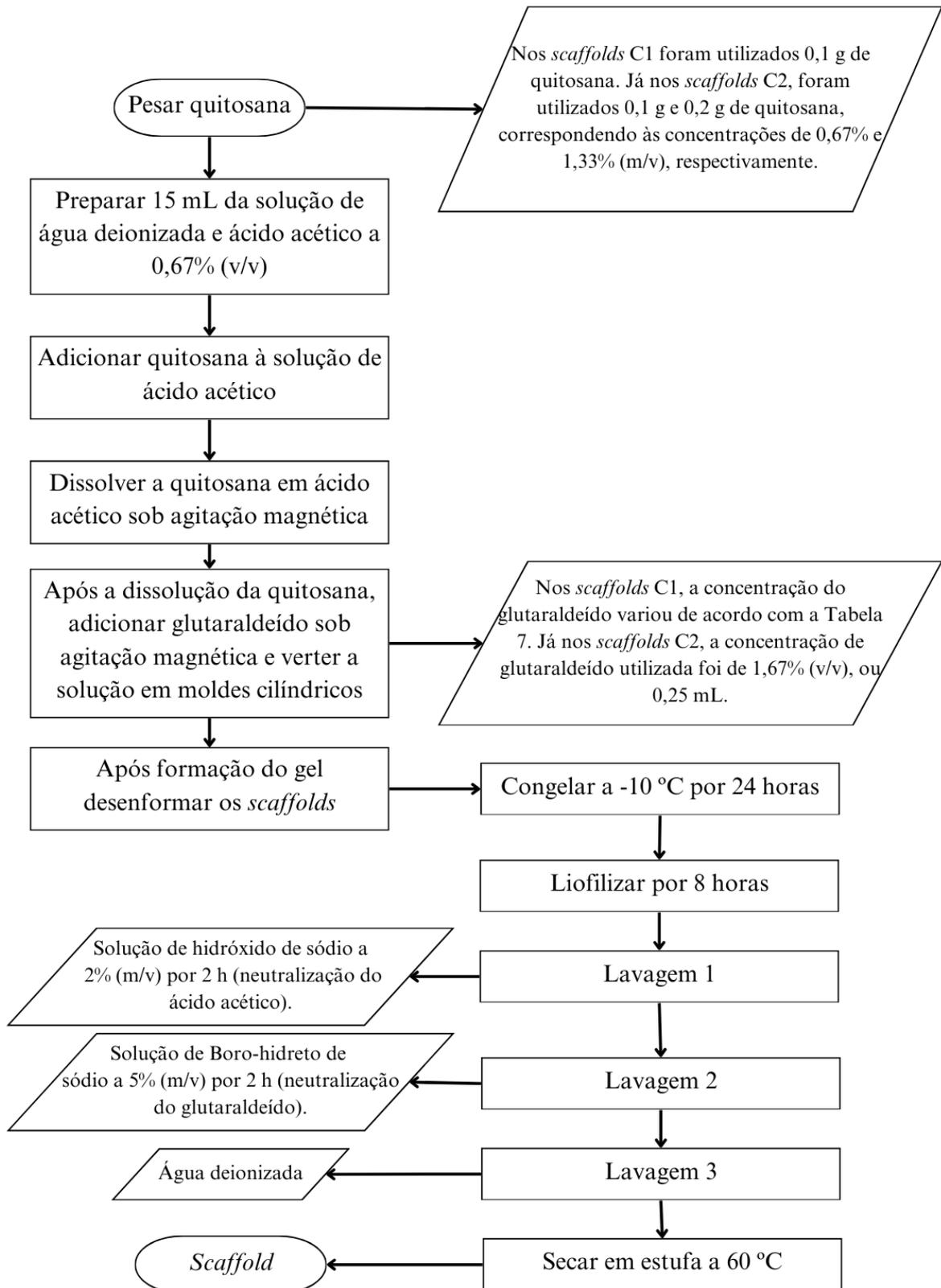
reagido foi realizada pela imersão dos *scaffolds* em 100 mL de uma solução de boro-hidreto de sódio a 5% (m/v) por 2 h (PUTRI *et al.*, 2021). Após as neutralizações, os *scaffolds* foram submetidos a um processo de lavagem em 100 mL de água deionizada, com a água sendo trocada a cada intervalo de 5 min, até a completa remoção dos resíduos de hidróxido de sódio e boro-hidreto de sódio. Em seguida, os *scaffolds* foram secos em uma estufa a uma temperatura de 60 °C por um período de 24 h. O fluxograma do processo descrito acima pode ser observado na Figura 14. Para avaliação do efeito do teor de quitosana e de agente reticulante nas propriedades dos materiais, preparou-se materiais com diferentes massas de quitosana e volumes de glutaraldeído, conforme mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição dos *scaffolds* de quitosana pura C1 (com variação da concentração de glutaraldeído) e C2 (com variação da concentração de quitosana)

<i>Scaffolds</i>	Específicos	Ch% (m/v)	Ge% (m/v)	Ga% (v/v)	Tn% (m/v)	Cb% (m/v)
C1	C1-1	0,67	0	1,67	0	0
	C1-2	0,67	0	3,33	0	0
	C1-3	0,67	0	5,00	0	0
	C1-4	0,67	0	6,67	0	0
	C1-5	0,67	0	10,00	0	0
	C1-6	0,67	0	13,33	0	0
C2	C2-1	0,67	0	1,67	0	0
	C2-2	1,33	0	1,67	0	0

Fonte: Autor

Figura 14 - Fluxograma da síntese dos *scaffolds* de quitosana pura (C1 e C2)



Fonte: Autor

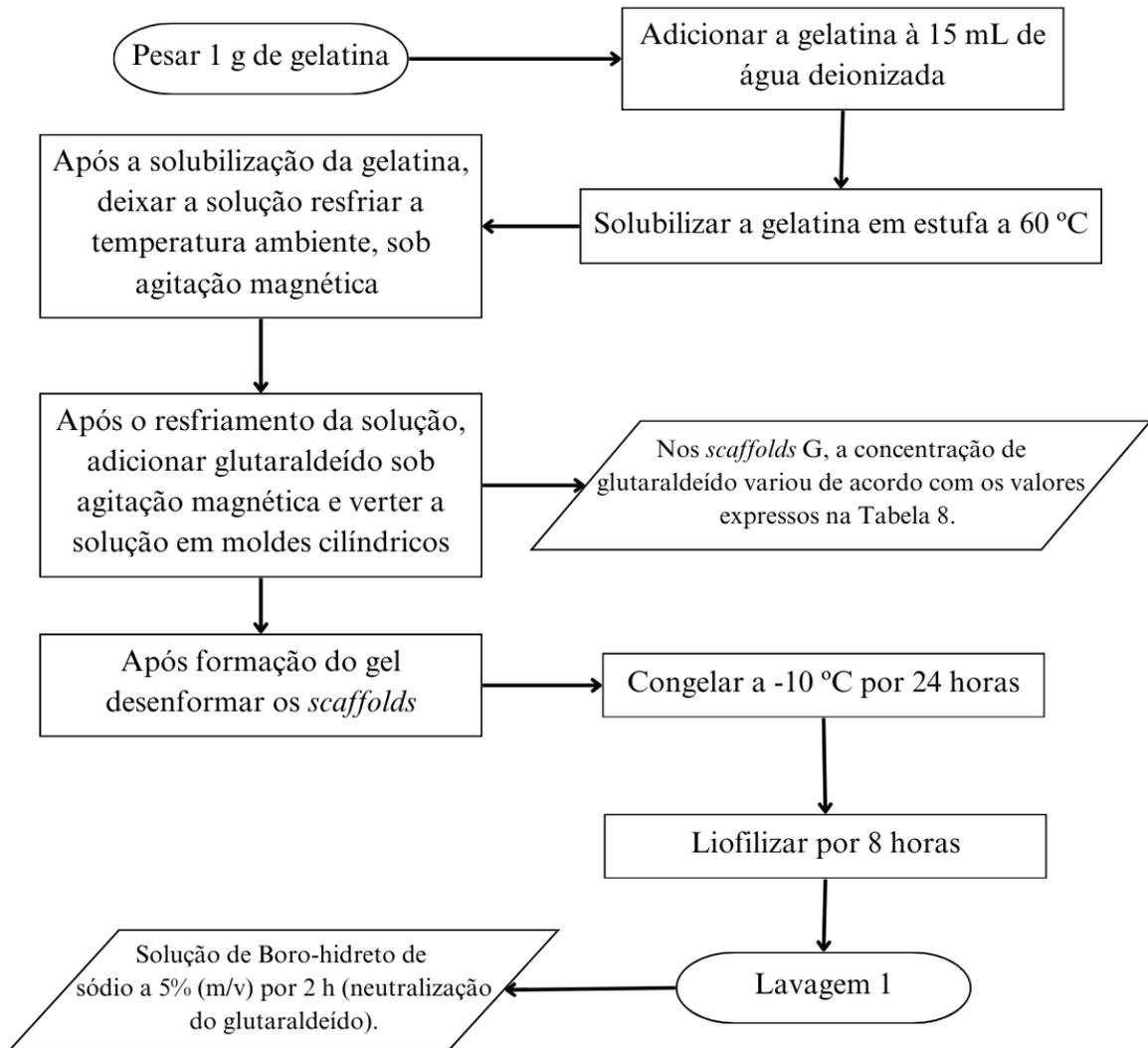
4.2.2 Scaffolds de gelatina

Para preparação dos *scaffolds* de gelatina, foi feita a solubilização de 1 g de gelatina em 15 mL água deionizada (concentração de 6,67% m/v), sendo a mistura mantida em estufa a 60 °C até a completa solubilização da gelatina. A solução resultante foi resfriada sob agitação magnética até 25 °C, momento no qual foi adicionado diferentes volumes de glutaraldeído 50% (Tabela 8). Posteriormente, após a homogeneização do glutaraldeído, a mistura foi despejada em moldes cilíndricos (diâmetro 1,2 cm e comprimento 4 cm) e mantida em temperatura ambiente até a formação da estrutura tridimensional. Os procedimentos realizados com as amostras de gelatina foram semelhantes aos descritos na seção 4.2.1., com exceção das etapas de lavagem com água deionizada e secagem em estufa. Devido ao fato de os *scaffolds* de gelatina não terem suportado os tratamentos utilizados para remover os resíduos não reagidos de glutaraldeído. Adicionalmente, a Figura 15 ilustra o fluxograma da síntese dos *scaffolds* de gelatina.

Tabela 8 - Composição dos *scaffolds* de gelatina pura (G), com variação da concentração de glutaraldeído

<i>Scaffolds</i>	Específicos	Ch% (m/v)	Ge% (m/v)	Ga% (v/v)	Tn% (m/v)	Cb% (m/v)
G	G-1	0	6,67	0	0	0
	G-2	0	6,67	0,17	0	0
	G-3	0	6,67	0,33	0	0
	G-4	0	6,67	0,67	0	0
	G-5	0	6,67	1,67	0	0

Fonte: Autor

Figura 15 - Fluxograma da síntese dos *scaffolds* de gelatina pura (G)

Fonte: Autor

4.2.3 *Scaffolds* de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído

Para a síntese dos *scaffolds* de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído, inicialmente realizou-se a dissolução de variadas proporções de tanino (valores expressos na Tabela 9) em 15 mL de água deionizada, sob agitação magnética. Em seguida, adicionou-se 0,1 g carbonato de sódio (Cb) (concentração de 0,67% m/v) à solução, promovendo a dissolução. Posteriormente, incorporou-se 0,4 g de gelatina (concentração de 2,67% m/v) na mistura, que foi aquecida a 60 °C para solubilização. A solução resultante foi resfriada sob agitação magnética até atingir a temperatura de 25 °C, momento em que se adicionou 0,1 mL de glutaraldeído (concentração de 0,67% v/v) à mistura. Por fim, após a homogeneização do

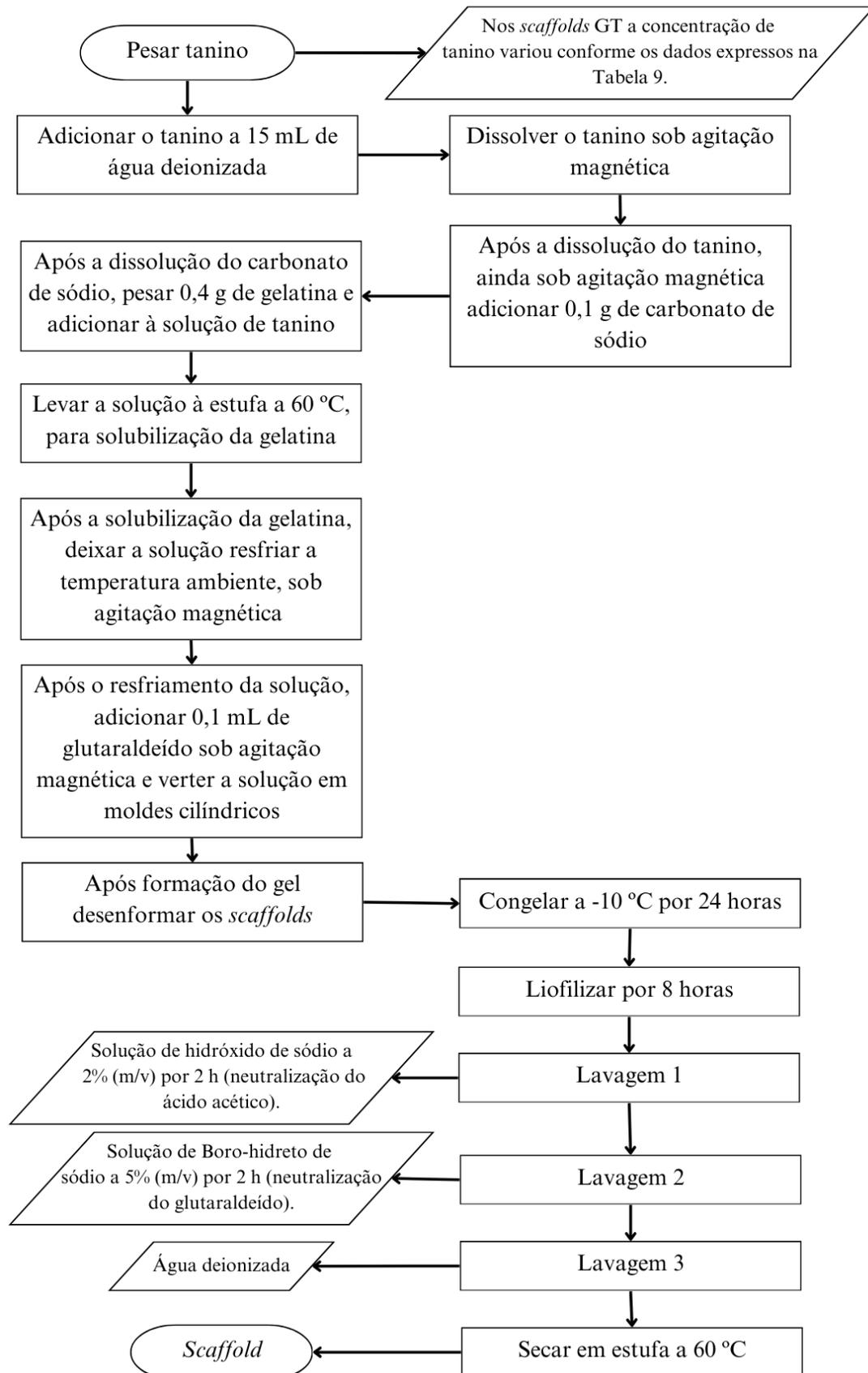
glutaraldeído, a solução foi vertida em moldes cilíndricos (diâmetro 1,2 cm e comprimento 4 cm) e mantida em repouso em temperatura ambiente até a formação da estrutura tridimensional. Os processos subsequentes seguiram os mesmos procedimentos descritos na seção 4.2.1. Para avaliação do efeito do teor de tanino nas propriedades dos materiais, preparou-se materiais com diferentes massas de tanino (Tabela 9). A Figura 16 apresenta o fluxograma dos procedimentos realizados para a síntese dos *scaffolds* de gelatina/xerogel de tanino glutaraldeído.

Tabela 9 - Composição dos *scaffolds* híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT), com variação da concentração de tanino

<i>Scaffolds</i>	Específicos	Ch% (m/v)	Ge% (m/v)	Ga% (v/v)	Tn% (m/v)	Cb% (m/v)
GT	GT-1	0	2,67	0,67	0,17	0,67
	GT-2	0	2,67	0,67	0,33	0,67
	GT-3	0	2,67	0,67	0,50	0,67
	GT-4	0	2,67	0,67	0,67	0,67
	GT-5	0	2,67	0,67	0,83	0,67

Fonte: Autor

Figura 16 - Fluxograma da síntese dos *scaffolds* híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT)



4.2.4 Scaffolds e quitosana/gelatina

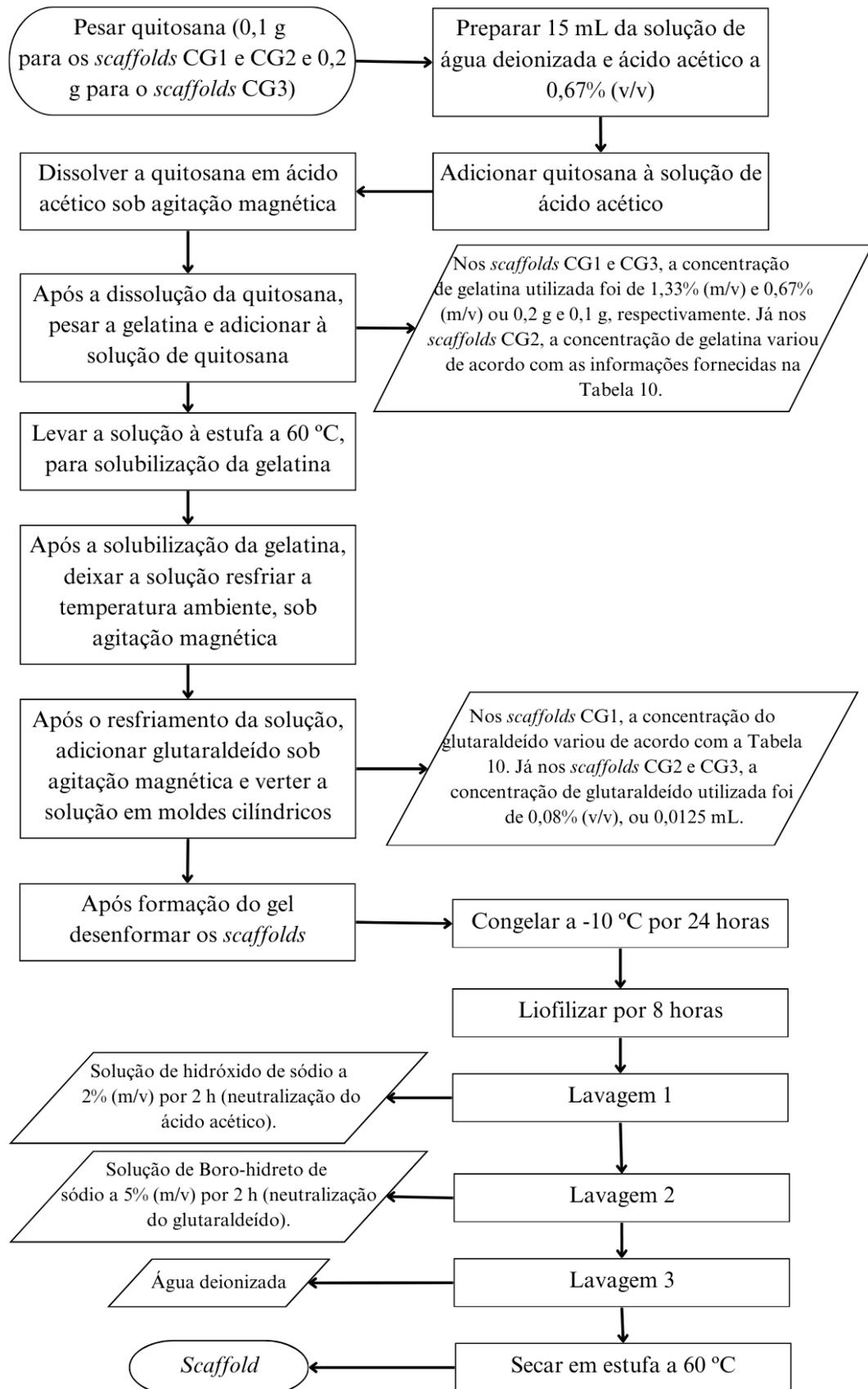
Para a preparação dos *scaffolds* de quitosana/gelatina, inicialmente a quitosana foi dissolvida em diferentes proporções (conforme indicado na Tabela 10) em uma solução contendo 0,1 mL de ácido acético e 15 mL de água (0,67% (v/v)), sob agitação magnética. Após a completa dissolução da quitosana, diferentes massas de gelatina (conforme indicado na Tabela 10) foram adicionadas à solução, que foi mantida em uma estufa a 60 °C até a completa solubilização da gelatina. A solução resultante foi resfriada, sob agitação magnética, até atingir a temperatura de 25 °C. Neste momento, glutaraldeído 50% foi adicionado à mistura e homogeneizado, com o volume variando de acordo com a Tabela 10. Por fim, a solução foi vertida em moldes cilíndricos (diâmetro 1,2 cm e comprimento 4 cm) e deixada em repouso em temperatura ambiente até que a estrutura tridimensional se formasse. Os processos subsequentes seguiram os mesmos procedimentos descritos na seção 4.2.1. Para avaliação do efeito da razão de quitosana/gelatina e de agente reticulante nas propriedades dos materiais, preparou-se materiais com diferentes massas de gelatina e volumes de glutaraldeído, conforme mostrado na Tabela 10. O fluxograma da síntese dos *scaffolds* de quitosana/gelatina está expresso na Figura 17.

Tabela 10 - Composição dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina CG1 (com variação da concentração de glutaraldeído), CG2 (com variação da concentração de gelatina) e CG3 (com maior teor de quitosana)

<i>Scaffolds</i>	Específicos	Ch% (m/v)	Ge% (m/v)	Ga% (v/v)	Tn% (m/v)	Cb% (m/v)
CG1	CG1-1	0,67	1,33	0,17	0	0
	CG1-2	0,67	1,33	0,33	0	0
	CG1-3	0,67	1,33	0,67	0	0
	CG1-4	0,67	1,33	1,67	0	0
CG2	CG2-1	0,67	0,67	0,08	0	0
	CG2-2	0,67	1,33	0,08	0	0
	CG2-3	0,67	2,00	0,08	0	0
CG3	CG3-1	1,33	0,67	0,08	0	0

Fonte: Autor

Figura 17 - Fluxograma da síntese dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG1, CG2 e CG3)



4.2.5 Scaffolds de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído

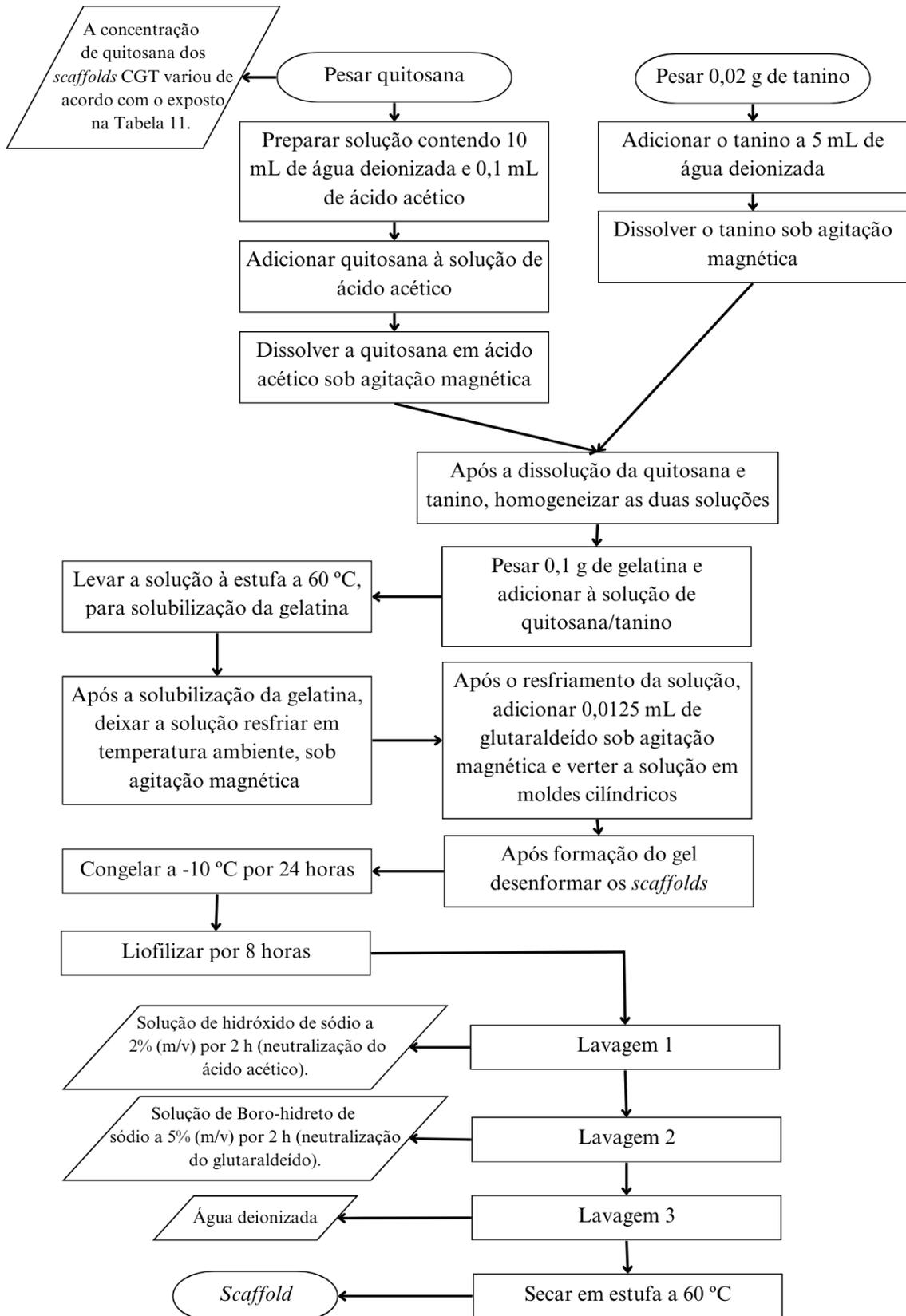
Para a preparação dos *scaffolds* de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído, primeiramente diferentes proporções de quitosana (conforme Tabela 11), foi dissolvida em 10 mL de uma solução contendo 0,1 mL de ácido acético (concentração de 1% v/v), utilizando agitação magnética. Simultaneamente, preparou-se uma solução contendo 0,02 g de tanino e 5 mL de água (concentração de 0,4% m/v), a qual foi submetida a agitação magnética até que o tanino se dissolvesse completamente. Após a dissolução completa das soluções de tanino e quitosana, elas foram combinadas e homogeneizadas. Em seguida, 0,1 g de gelatina foi adicionada à mistura (concentração de 0,67% m/v), que foi mantida em uma estufa a 60 °C até que a gelatina se solubilizasse completamente. A solução resultante foi resfriada, sob agitação magnética, até atingir a temperatura de 25 °C. Neste momento, 0,0125 mL de glutaraldeído 50%, (concentração de 0,08% v/v), foi adicionado à mistura. Após a homogeneização do glutaraldeído, a mistura foi vertida em moldes cilíndricos (diâmetro 1,2 cm e comprimento 4 cm) e mantida em temperatura ambiente até a formação da estrutura tridimensional. Os processos subsequentes seguiram os mesmos procedimentos descritos na seção 4.2.1. O fluxograma correspondente a esse processo pode ser visualizado na Figura 18, e as proporções utilizadas dos reagentes em relação ao volume total da solução (15 mL) estão disponíveis na Tabela 11.

Tabela 11 - Composição dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT), com variação da concentração de quitosana

<i>Scaffolds</i>	Específicos	Ch% (m/v)	Ge% (m/v)	Ga% (v/v)	Tn% (m/v)	Cb% (m/v)
CGT	CGT-1	0,67	0,67	0,08	0,17	0
	CGT-2	1,33	0,67	0,08	0,17	0

Fonte: Autor

Figura 18 - Fluxograma da síntese dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT)



4.3 Intumescimento

Os *scaffolds* secos foram inicialmente pesados e depois imersos em 25 mL de solução tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline (PBS)) presente em recipientes posteriormente vedados e armazenados em estufa a 37 °C por 24 h. Após esse tempo, os *scaffolds* foram retirados dos recipientes e o excesso de água superficial foi removido com papel filtro (fornecedor J.PROLAB, modelo JP40, gramatura de 80 g/m²). Por fim, esses materiais foram pesados novamente (LI *et al.*, 2016). A taxa de intumescimento foi calculada através da equação (2) (JIANG *et al.*, 2021). Na Figura 19 está expresso o fluxograma do processo de análise do intumescimento.

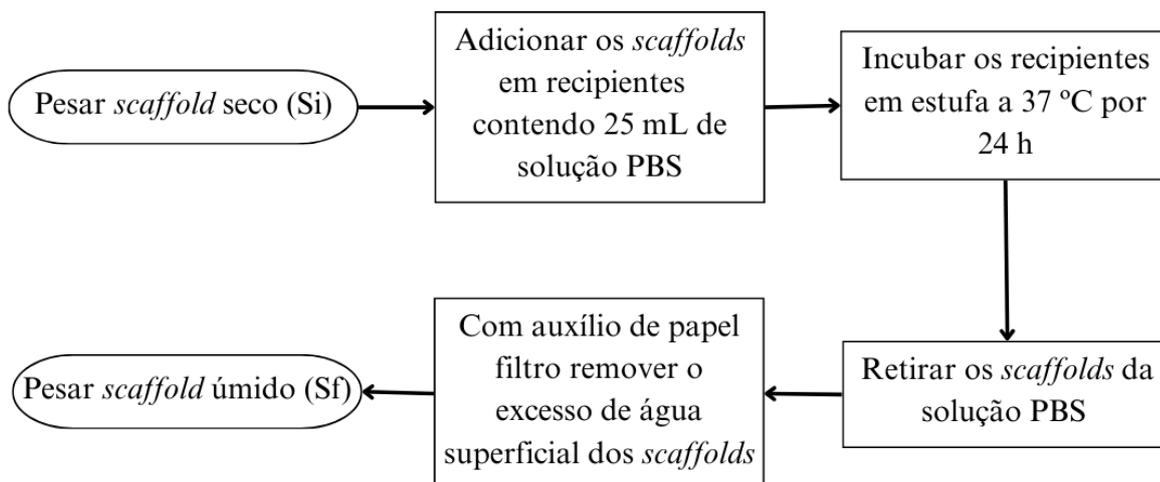
$$\text{A taxa de intumescimento (\%)} = ((S_f - S_i) \div S_i) \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

S_f: massa dos *scaffolds* úmidos (g);

S_i: massa dos *scaffolds* secos (g).

Figura 19 - Fluxograma da análise de intumescimento



Fonte: Autor

4.4 Porosidade

A porosidade dos *scaffolds* foi mensurada através do método de deslocamento de líquido. O líquido utilizado foi o etanol, pois quando em contato com o *scaffold* não interfere em sua morfologia. O cálculo da porosidade se deu pela razão do volume de poros dos *scaffolds* (V1) e seu volume aparente (V2). Para o cálculo de V1, foi determinada a massa dos *scaffolds* secos (M0) e a massa do sistema composto por *scaffolds* imersos em etanol (Ma). Inicialmente, os *scaffolds* secos foram pesados e adicionados a uma proveta graduada, sendo completados com etanol até atingir um volume pré-determinado, neste caso, 5 mL. As provetas foram vedadas com papel filme para evitar a evaporação do etanol e as amostras foram então deixadas em repouso em temperatura ambiente por um período de 1 h. Após esse intervalo, os materiais foram retirados do etanol e a massa do etanol remanescente foi determinado (Mb). Para o cálculo de V2, uma proveta graduada foi preenchida com o volume determinado de etanol (5 mL), e a massa do etanol foi medida (M1). O *scaffold* úmido foi transferido para uma proveta vazia, e o etanol foi adicionado até atingir a marca anterior de 5 mL. Novamente, o sistema *scaffold*-etanol foi pesado (M2). O cálculo foi realizado conforme as equações (3), (4) e (5) (SILVESTRO *et al.*, 2021). Na Figura 20, é apresentado o fluxograma do processo descrito anteriormente.

$$V1 = \text{Volume de poros do } scaffold = Ma - Mb - M0 \quad (3)$$

$$V2 = \text{Volume aparente do } scaffold = (Ma - Mb) - (M2 - M1) \quad (4)$$

$$\text{Porosidade (\%)} = (V1 \div V2) \times 100 \quad (5)$$

Sendo:

Ma: massa do sistema composto por *scaffolds* imersos em etanol (g);

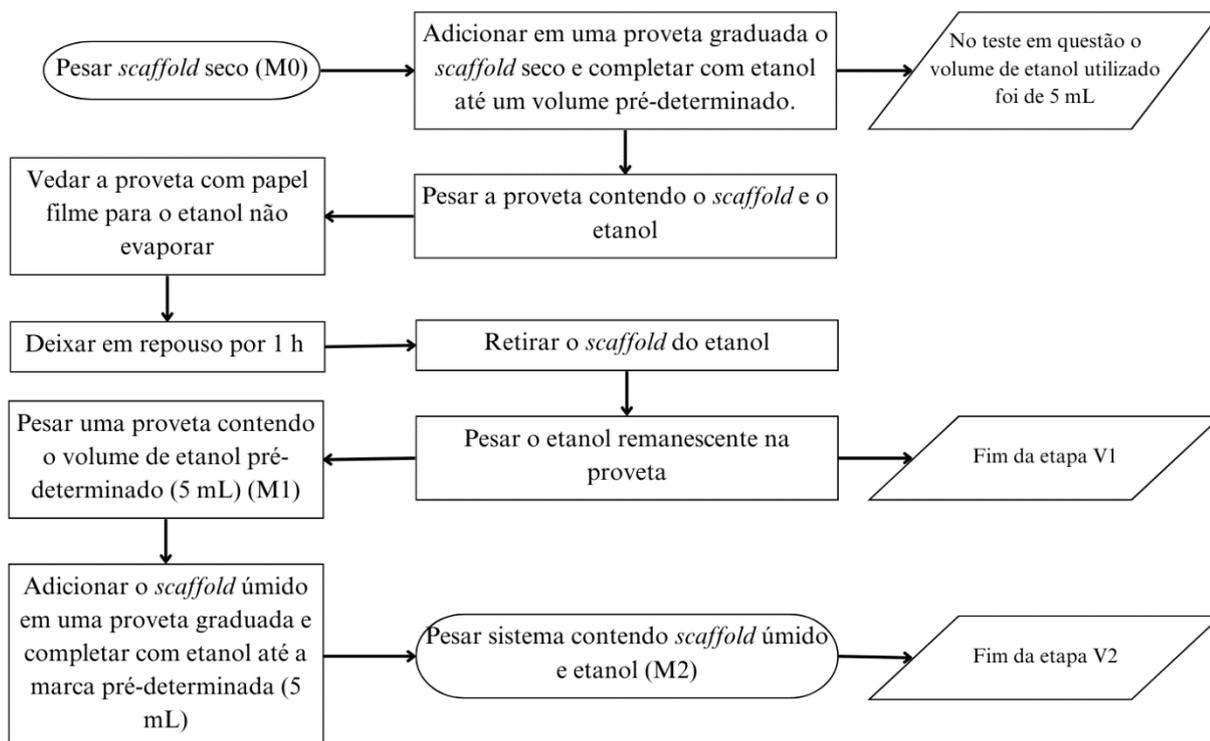
Mb: massa do etanol remanescente (g);

M0: massa *scaffolds* secos (g);

M1: massa do etanol na marca pré-determinada (g);

M2: sistema *scaffold* úmido-etanol até marca pré-determinada (g).

Figura 20 - Fluxograma da análise de porosidade

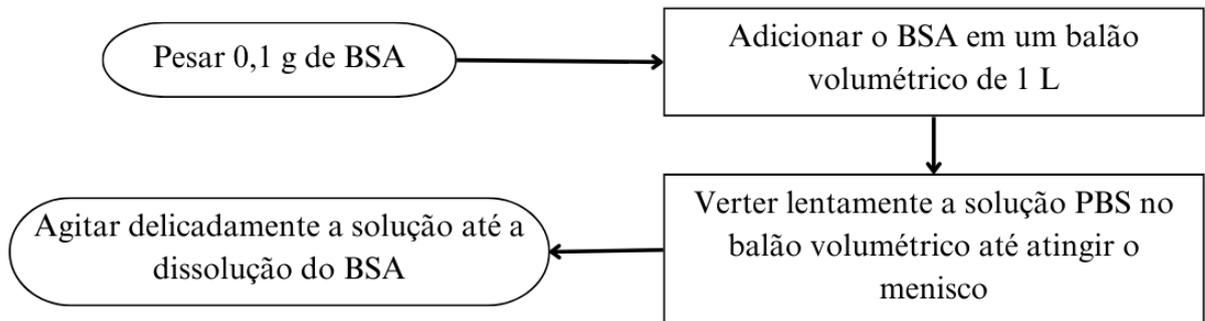


Fonte: Autor

4.5 Adsorção de proteínas

Para o teste de adsorção de proteínas, primeiramente, preparou-se uma solução diluída de albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin* (BSA)) em PBS, com uma concentração de 0,1 g/L. Para isso, pesou-se 0,1 g de BSA e adicionou-se a um balão volumétrico de 1 L. Em seguida, verteu-se lentamente a solução PBS no balão volumétrico até atingir o menisco, agitando delicadamente o conteúdo até a completa dissolução do BSA. O fluxograma do processo pode ser observado na Figura 21.

Figura 21 - Fluxograma da fabricação da solução de BSA



Fonte: Autor

A seguir, os *scaffolds* foram pesados e adicionados a recipientes contendo 15 mL dessa solução. Os recipientes foram vedados e armazenados em uma estufa por 24 h a uma temperatura de 37 °C. Após esse período, os *scaffolds* foram removidos da solução e o sobrenadante foi analisado. Para isso, utilizou-se a solução de *Bradford* para quantificar a quantidade de proteína adsorvida. Em um recipiente, adicionou-se 0,25 mL da solução de proteína não adsorvida e 2 mL da solução de *Bradford*. A mistura foi homogeneizada e mantida em repouso por 5 min. Em seguida, o material foi analisado em um espectrofotômetro UV da marca Bel Engineering, modelo UV-M51, a 595 nm (DEPAN; MISRA, 2013). Na Figura 22 é possível verificar o fluxograma do processo descrito. Para o cálculo da quantidade de proteínas adsorvidas foi utilizada a equação (6).

$$\text{Adsorção de proteínas (mg/g)} = ((C_i - C_f) \times V) \div m_0 \quad (6)$$

Sendo:

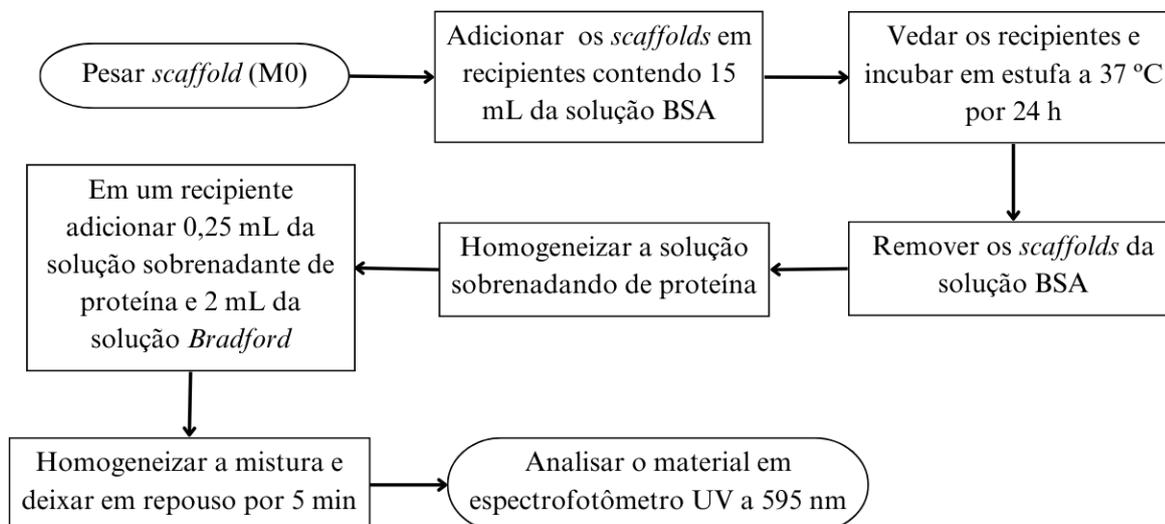
C_i : concentração inicial da solução de BSA (mg/L);

C_f : concentração final da solução de BSA (mg/L);

V : volume de BSA utilizado para análise (L);

m_0 : massa do *scaffold* (g) (Xu *et al.*, 2022b).

Figura 22 - Fluxograma da análise de adsorção de proteínas



Fonte: Autor

4.6 Dissolução

Para o teste de dissolução, iniciou-se pesando os *scaffolds* secos, que foram posteriormente adicionados a recipientes de vidro identificados contendo 25 mL de solução PBS. Os recipientes foram vedados e incubados a 37 °C por um tempo específico, sendo 10 e 21 dias. Após o período de incubação, os materiais foram retirados de seus respectivos recipientes e submetidos a um processo de lavagem com água deionizada, realizando-se 10 lavagens a cada intervalo de 5 min. Esse procedimento visou a remoção dos sais presentes na solução PBS. Por fim, os *scaffolds* foram submetidos à secagem em uma estufa a uma temperatura de 60 °C por um período de 24 h. Após a conclusão desse processo, os *scaffolds* foram removidos da estufa para resfriarem até atingirem a temperatura ambiente e, em seguida, foram pesados novamente (DOUSTDAR; OLAD; GHORBANI, 2022b). O fluxograma do processo descrito está contido na Figura 23. A taxa de dissolução é calculada conforme mostrado na equação (7) (ALTUNORDU *et al.*, 2023):

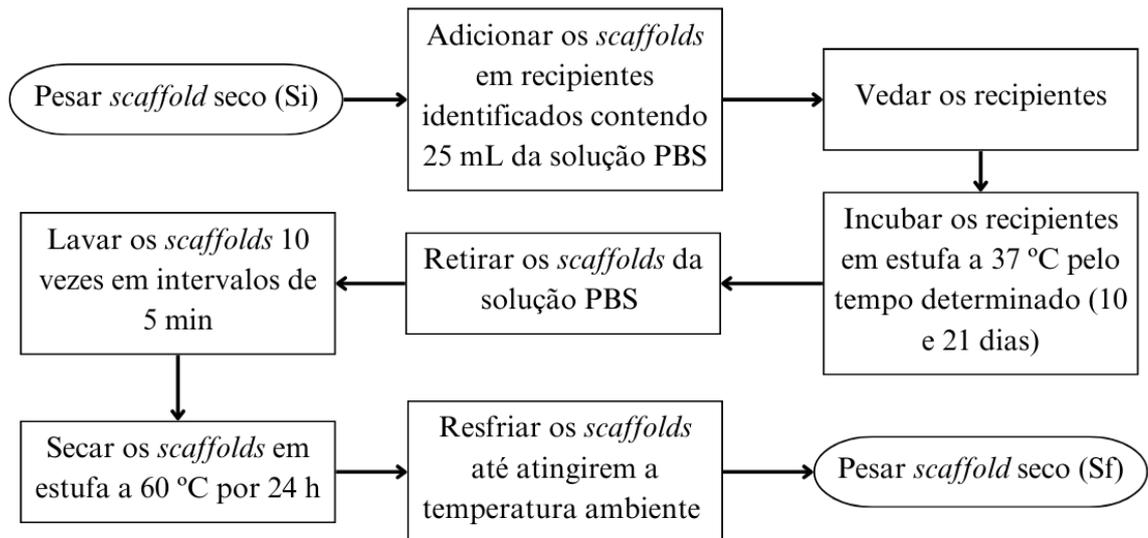
$$\text{Taxa dissolução (\%)} = ((S_i - S_f) \div S_i) \times 100 \quad (7)$$

Sendo:

Si: massa dos *scaffolds* antes de serem incubados (g);

Sf: massa dos *scaffolds* secos após o período de incubação (g).

Figura 23 - Fluxograma da análise de dissolução

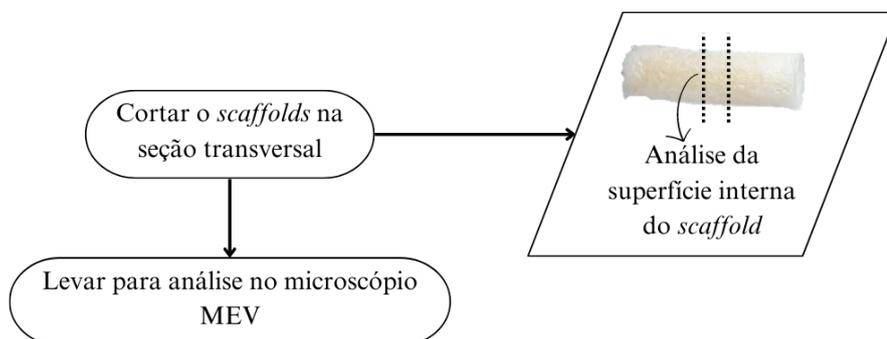


Fonte: Autor

4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca TESCAN, modelo Vega 3 XMU. As amostras dos *scaffolds* foram preparadas cortando-as na seção transversal do centro das amostras. Em seguida, as amostras foram fixadas no suporte adequado e analisadas no equipamento MEV. As micrografias dos materiais foram adquiridas com um aumento de 60×, permitindo uma visualização detalhada da estrutura e morfologia dos *scaffolds*. O fluxograma do processo descrito está expresso na Figura 24.

Figura 24 - Fluxograma da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

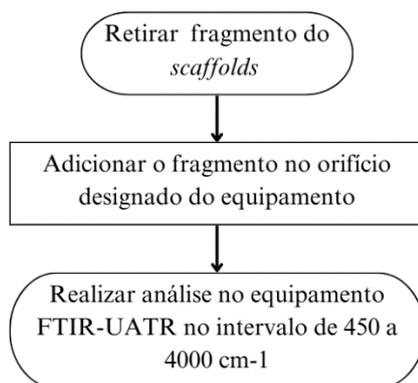


Fonte: Autor

4.8 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise dos materiais preparados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi conduzida utilizando o espectrômetro PerkinElmer Frontier (FTIR-UATR). A faixa de análise abrangeu o intervalo de 450 a 4000 cm^{-1} , sendo realizadas 16 varreduras. O fluxograma deste processo está ilustrado na Figura 25.

Figura 25 - Fluxograma da análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)



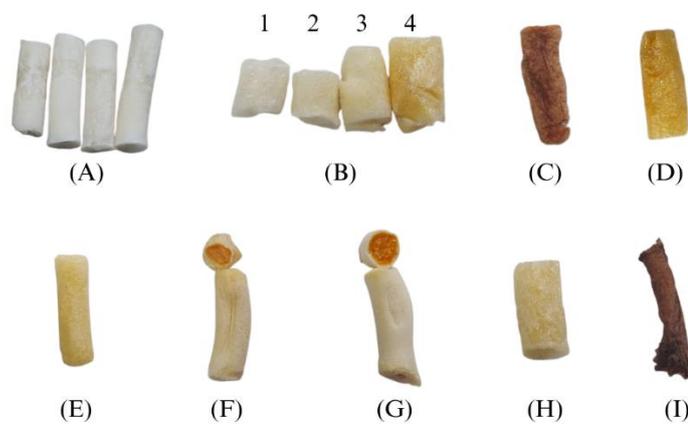
Fonte: Autor

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Scaffolds

As diferentes composições dos *scaffolds* impactaram em sua aparência, conforme apresentado na Figura 26. Observou-se uma distinção na coloração dos *scaffolds* GT e CGT (Figura 26 (C) e (I)), que contêm tanino, apresentando uma tonalidade amarronzada, condizente com a presença desse composto. Por sua vez, os *scaffolds* de quitosana pura C1 e C2, Figura 26 (D) e (E) respectivamente, exibiram coloração amarelada. Os *scaffolds* de G com concentração de 0% (v/v) de Ga (Figura 26 (A)) são brancos, porém, à medida que se adiciona glutaraldeído, conforme exibido na Figura 26 (B), nos *scaffolds* 1, 2, 3 e 4, com concentrações crescentes de 0,17% (v/v), 0,33% (v/v), 0,67% (v/v) e 1,67% (v/v), respectivamente, os *scaffolds* assumem coloração amarelada. Os *scaffolds* de quitosana e gelatina CG1, CG2 e CG3 também apresentaram variação de coloração (Figura 26 (F), (G) e (H), respectivamente). Nota-se, entretanto, que os *scaffolds* CG1 e CG2 (Figura 26 (F) e (G), respectivamente) exibiram uma diferença na aparência entre o interior e o exterior. O interior apresentou coloração amarelada, enquanto o exterior mostrou uma tonalidade mais clara, próxima ao branco.

Figura 26 - *Scaffolds* (A) G 0% (v/v) de Ga, (B) G variando Ga, 1, 2, 3 e 4, correspondem a 0,17% (v/v), 0,33% (v/v), 0,67% (v/v) e 1,67% (v/v), respectivamente, (C) GT, (D) C1, (E) C2, (F) CG1, (G) CG2, (H) CG3 e (I) CGT



Fonte: Autor

Os *scaffolds* exibidos na Figura 26, com exceção dos *scaffolds* de gelatina apresentados nas Figura 26 (A) e (B), haviam sido submetidos aos processos de lavagem e secagem em estufa a 60 °C por 24 h. É válido salientar que os *scaffolds* de gelatina não foram submetidos ao processo de lavagem devido à elevada degradação apresentada, Figura 27, quando submetidos aos processos de lavagem.

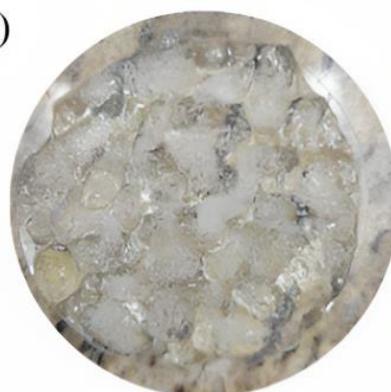
Figura 27 - (A) Aspecto dos *scaffolds* G durante a lavagem com hidróxido de sódio e (B) Aspectos dos *scaffolds* G após a lavagem com boro-hidreto de sódio

(A)



Aspecto dos *scaffolds* de gelatina durante a **primeira etapa de lavagem** em solução de hidróxido de sódio a 2% (m/v) para a neutralização do ácido acético.

(B)



Aspecto dos *scaffolds* de gelatina após a **segunda etapa de lavagem** em solução de boro-hidreto de sódio a 5% (m/v) para neutralização do glutaraldeído.

Fonte: Autor

5.2 Análises

No âmbito deste estudo, foram conduzidas análises de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), intumescimento, porosidade, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), adsorção de proteínas e dissolução, em uma variedade de *scaffolds*, com o objetivo de investigar os efeitos das variações nos componentes e concentrações sobre as propriedades desses materiais. Abaixo está apresentada a relação entre os tipos de *scaffolds* e os aspectos específicos examinados nos testes:

- a) *scaffolds* de gelatina (G): foram analisados, quando aplicável, os efeitos das variações na concentração de glutaraldeído sobre as propriedades dos *scaffolds*;
- b) *scaffolds* de gelatina e tanino (GT): foi investigado o impacto do teor de tanino nos *scaffolds* de gelatina;
- c) *scaffolds* de quitosana (C1): as análises abordaram as consequências das variações na concentração de glutaraldeído sobre as propriedades dos *scaffolds*;
- d) *scaffolds* de quitosana (C2): foram examinados os efeitos das variações na concentração de quitosana nas propriedades dos *scaffolds*;
- e) *scaffolds* de quitosana e gelatina (CG1): as análises focalizaram os efeitos das variações na concentração de glutaraldeído nas propriedades dos *scaffolds*;
- f) *scaffolds* de quitosana e gelatina (CG2): foram investigados os efeitos das variações na concentração de gelatina nas propriedades dos *scaffolds*;
- g) *scaffolds* de quitosana, gelatina e tanino (CGT): foi examinado o impacto das variações na concentração de quitosana nas propriedades dos *scaffolds*;
- h) comparativo entre os *scaffolds* CG2-1 e CG3-1: foi analisado o efeito do aumento da concentração de quitosana em *scaffolds* compostos por quitosana e gelatina;
- i) comparativo entre os *scaffolds* CG3-1 e CGT-2: as análises exploraram os efeitos da adição de tanino aos *scaffolds*, considerando uma concentração de quitosana de 0,67% (m/v);
- j) comparativo entre os *scaffolds* CG2-1 e CGT-1: foram examinados os efeitos da adição de tanino aos *scaffolds*, considerando uma concentração de quitosana de 1,33% (m/v).

5.3 Caracterização dos *scaffolds* de quitosana, gelatina, quitosana/gelatina, gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído

5.3.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica de grande relevância na caracterização e análise de materiais, pois

possibilita a identificação da composição de uma variedade de compostos, além de fornecer informações sobre suas interações químicas (DEPCIUCH *et al.*, 2023).

A técnica de espectroscopia infravermelha (FTIR) foi empregada para a caracterização das propriedades estruturais das matérias-primas e das interações presentes nos *scaffolds* G, GT, C1, C2, CG1, CG2, CG3 e CGT. Para tanto, utilizou-se um espectrofotômetro PerkinElmer Frontier (FTIR-UATR) para a realização das análises.

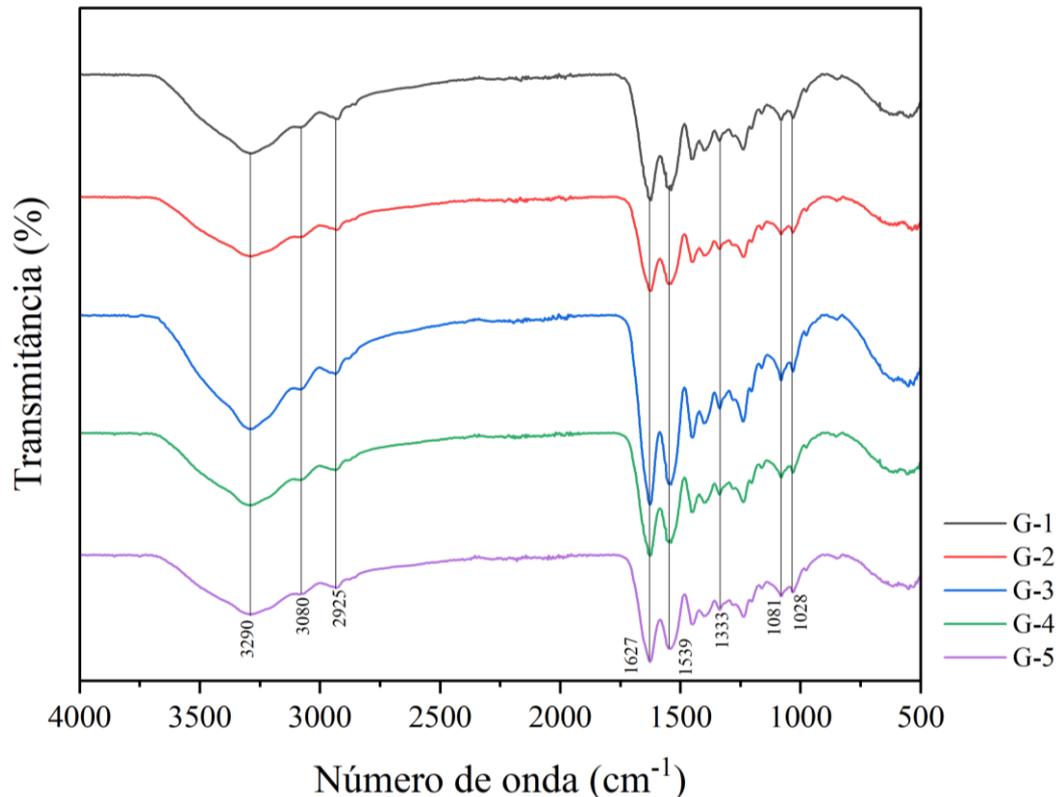
Ao analisar o espectro de infravermelho dos *scaffolds* de gelatina G (Figura 28), é possível identificar a presença da gelatina por meio de seus números de onda característicos (Tabela 12). O gráfico exibe uma banda larga na faixa dos 3700 a 3000 cm^{-1} , correspondente às vibrações da amida A (3290 cm^{-1}) e amida B (3080 cm^{-1}). Essas bandas indicam a presença das ligações mais alongadas do grupo N – H, somadas às ligações de hidrogênio (VENKATESAN *et al.*, 2023). Além disso, observa-se a presença dos seguintes picos: o pico em 1627 cm^{-1} , relacionado à ligação C = O (amida I); o pico em 1539 cm^{-1} , associado à ligação H – N (amida II); o pico em 1333 cm^{-1} , correspondente à ligação H – N (amida III); e o pico em 1028 cm^{-1} , relacionado ao alongamento da ligação C – O – C (ECHAVE *et al.*, 2022; LUKIN *et al.*, 2023; MOGHANIAN *et al.*, 2023; NACU *et al.*, 2023). Adicionalmente, os picos em 2925 cm^{-1} e 1081 cm^{-1} caracterizam as ligações C – H e C – O, respectivamente (VENKATESAN *et al.*, 2023).

Tabela 12 - Relação entre os números de onda e os grupos funcionais referentes aos resultados observados na espectroscopia de infravermelho nos *scaffolds* de gelatina pura (G)

Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional
3290	Amida A
3080	Amida B
2925	C – H
1627	Amida I
1539	Amida II
1333	Amida III
1081	C – O
1028	C – O – C

Fonte: Autor

Figura 28 - Espectroscopia de infravermelho dos *scaffolds* de gelatina pura (G): G-1 (0% (v/v) Ga), G-2 (0,17% (v/v) Ga), G-3 (0,33% (v/v) Ga), G-4 (0,67% (v/v) Ga) e G-5 (1,67% (v/v) Ga)



Fonte: Autor

Os espectros dos *scaffolds* de gelatina e tanino (GT), expresso na Figura 29, revela a presença de picos característicos tanto da gelatina quanto do tanino. A banda larga na faixa dos 3700 a 3000 cm^{-1} é relacionada às vibrações da amida A (3280 cm^{-1}) e amida B (3075 cm^{-1}), indicando as ligações mais alongadas do grupo N – H, associadas à formação de ligações de hidrogênio (VENKATESAN *et al.*, 2023). No entanto, o pico em 3280 cm^{-1} também pode estar associado ao alongamento – OH das estruturas fenólicas presentes no tanino (BLYWEERT *et al.*, 2023). Além disso, o pico em 2934 cm^{-1} caracteriza as vibrações do alongamento do C – H, presentes tanto na gelatina quanto no tanino (HAN *et al.*, 2022; IRMAN *et al.*, 2022; VENKATESAN *et al.*, 2023). Os picos em 1635 cm^{-1} e 1534 cm^{-1} estão relacionados à ligação C = O (amida I) e à ligação H – N (amida II), respectivamente, presentes na gelatina (ECHAVE *et al.*, 2022; LUKIN *et al.*, 2023; MOGHANIAN *et al.*, 2023; NACU *et al.*, 2023). Entretanto, a presença conjunta dos três picos em 1635 cm^{-1} , 1534 cm^{-1} e 1448 cm^{-1} são características da vibração de alongamento do anel aromático presente no tanino. O pico em 1387 cm^{-1} é atribuído à vibração de alongamento fenólico de – OH do tanino (HAN *et al.*, 2022). O pico em 1334 cm^{-1} corresponde à ligação H – N (amida

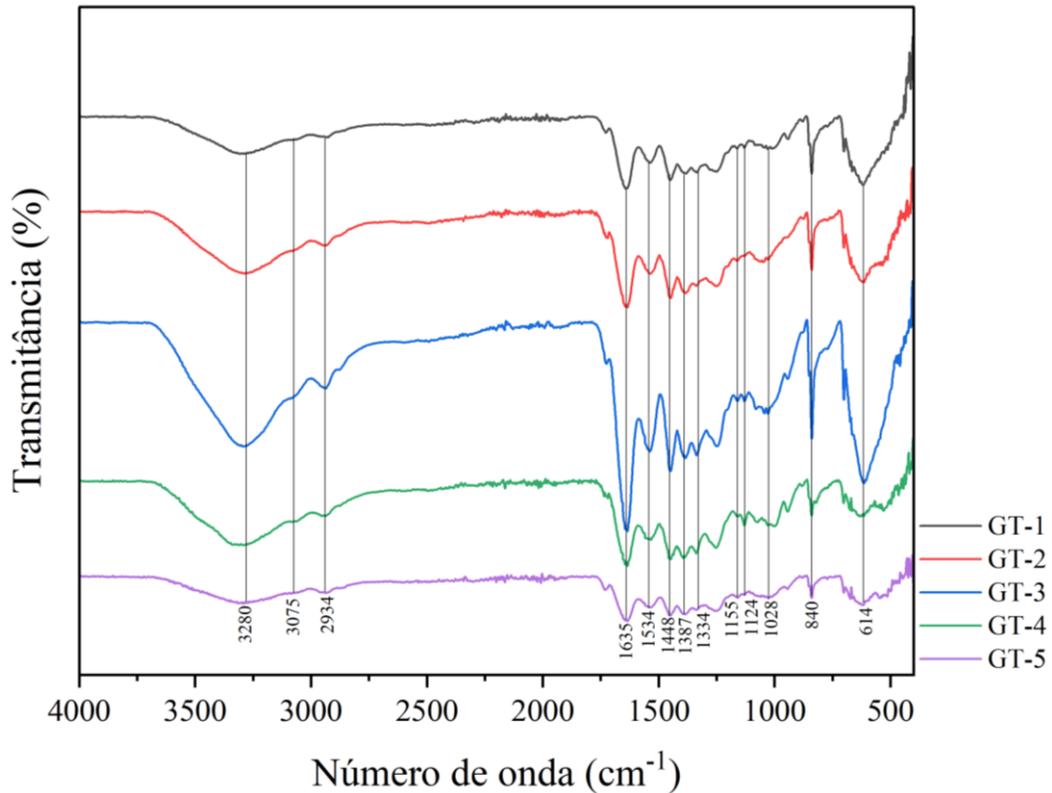
III), presente na gelatina (ECHAVE *et al.*, 2022; LUKIN *et al.*, 2023; MOGHANIAN *et al.*, 2023; NACU *et al.*, 2023). Os picos em 1155 cm^{-1} e 1124 cm^{-1} foram produzidos pelo alongamento da ligação C – O aromático e da vibração de alongamento da ligação C – O do éter alifático, respectivamente, ambos associados ao tanino (HAN *et al.*, 2022). O pico em 1028 cm^{-1} pode ser associado tanto ao alongamento da ligação C – O – C da gelatina quanto do tanino (ECHAVE *et al.*, 2022; LUKIN *et al.*, 2023; MOGHANIAN *et al.*, 2023; NACU *et al.*, 2023; HAN *et al.*, 2022). A banda situada entre 840 cm^{-1} a 614 cm^{-1} foi causada por vibrações de deformação fora do plano de ligações C – H do anel aromático (HAN *et al.*, 2022). A Tabela 13 apresenta um resumo dos dados de espectroscopia.

Tabela 13 - Relação entre os números de onda e os grupos funcionais referentes aos resultados observados na espectroscopia de infravermelho nos *scaffolds* híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT)

Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional
3280	Amida A (gelatina); – OH (tanino)
3075	Amida B (gelatina)
2934	C – H (gelatina e tanino)
1635	C = O (amida I) (gelatina)
1534	H – N (amida II) (gelatina)
1625, 1534 e 1448	Alongamento do anel aromático (tanino)
1387	Alongamento fenólico de – OH (tanino)
1334	H – N (amida III) (gelatina)
1155	Alongamento C – O aromático (tanino)
1124	Alongamento C – O éter alifático (tanino)
1028	C – O – C (gelatina e tanino)
614-840	Deformação fora do plano de ligações C – H insaturadas do anel aromático (tanino)

Fonte: Autor

Figura 29 - Espectroscopia de infravermelho nos *scaffolds* híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT): GT-1 (0,17% (m/v) Tn), GT-2 (0,33% (m/v) Tn), GT-3 (0,50% (m/v) Tn), GT-4 (0,67% (m/v) Tn) e GT-5 (0,83% (m/v) Tn)



Fonte: Autor

Ao analisar o espectro de espectroscopia infravermelha (FTIR) dos *scaffolds* de quitosana pura C1 e C2, representados na Figura 30, é possível identificar características espectrais típicas da quitosana. O espectro apresenta diversas bandas e picos que são indicativos de grupos funcionais específicos presentes na estrutura da quitosana. Entre os principais, destacam-se a banda ampla de absorção entre 3500 e 3000 cm^{-1} , com um pico proeminente em 3328 cm^{-1} , correspondente às frequências de estiramento das ligações -OH e -NH . Essas vibrações são características dos grupos hidroxila e amina presentes na quitosana. As bandas em 2926 cm^{-1} e 2865 cm^{-1} , que são atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico das ligações C-H na quitosana. O pico em 1642 cm^{-1} , correspondente à vibração de estiramento da carbonila (C=O) da amida I presente na quitosana. O pico em 1567 cm^{-1} , relacionado à curvatura do grupo amina (-NH) da amida II na estrutura da quitosana. Os picos situados entre 1313 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} , associados às vibrações de grupos hidroxila (-OH) e grupos metila (-CH) presentes no anel da quitosana. A vibração de estiramento C-O da estrutura do sacarídeo, está refletida nas bandas de

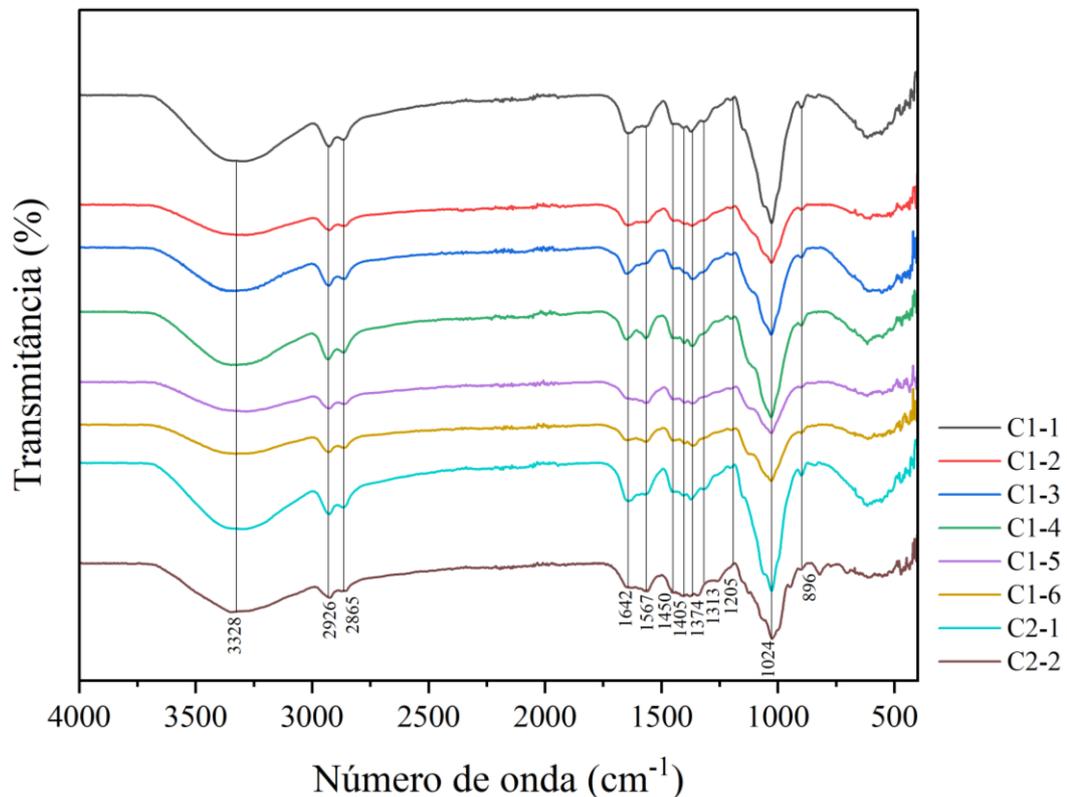
absorção em 896 cm^{-1} e uma curva mais ampla em torno de 1024 cm^{-1} . Essas bandas e picos característicos da quitosana no espectro FTIR confirmam a presença desse polissacarídeo nos *scaffolds* C1 e C2 (RESSLER *et al.*, 2023; SANDOMIERSKI *et al.*, 2022). Na Tabela 14, estão expostos resumidamente os dados das bandas e picos dos *scaffolds* C1 e C2.

Tabela 14 - Relação entre os números de onda e os grupos funcionais referentes aos resultados observados na espectroscopia de infravermelho nos *scaffolds* de quitosana pura (C1 e C2)

Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional
3328	–OH e –NH
2926	C – H (estiramento simétrico)
2865	C – H (estiramento assimétrico)
1642	C = O (amida I)
1567	H – N (amida II)
1313 a 1450	Hidroxila (–OH) e grupos metila (–CH) presentes no anel da quitosana
896 e 1024	C – O (estiramento)

Fonte: Autor

Figura 30 - Espectroscopia de infravermelho nos *scaffolds* de quitosana pura C1: C1-1 (1,67% (v/v) Ga), C1-2 (3,33% (v/v) Ga), C1-3 (5% (v/v) Ga), C1-4 (6,67% (v/v) Ga), C1-5 (10% (v/v) Ga) e C1-6 (13,33% (v/v) Ga); e C2: C2-1 (0,67% (m/v) Ch) e C2-2 (1,33% (m/v))



Fonte: Autor

Ao analisar o espectro de infravermelho dos *scaffolds* de gelatina e quitosana CG1, CG2 e CG3 (Figura 31) e compará-lo com os gráficos gerados pelos *scaffolds* de gelatina pura (G) e quitosana pura (C1 e C2) (Figuras 28 e 30, respectivamente), é possível constatar que os picos e bandas observados nos espectros FTIR dos *scaffolds* CG1, CG2 e CG3 são consistentes com as vibrações características das ligações e grupos funcionais presentes na gelatina e na quitosana, conforme demonstrado nas referências espectrais dos *scaffolds* de gelatina pura (G) e quitosana pura (C1 e C2).

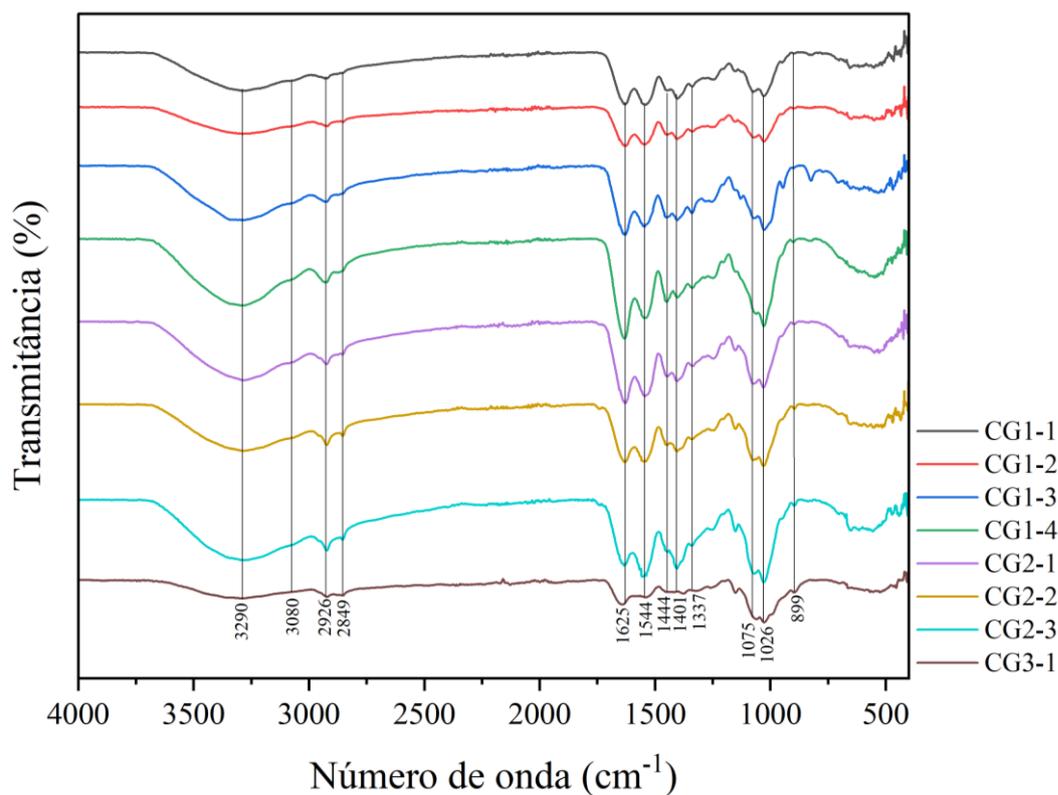
A Tabela 15 apresenta os picos observados nos espectros dos *scaffolds* CG1, CG2 e CG3, assim como seus correspondentes compostos identificados. Essa tabela resume as principais informações espectrais dos *scaffolds* híbridos, evidenciando a coexistência de gelatina e quitosana em sua composição.

Tabela 15 - Relação entre os números de onda e os grupos funcionais referentes aos resultados observados na espectroscopia de infravermelho nos *scaffolds* híbridos de quitosana e gelatina (CG1, CG2 e CG3)

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3290	-OH e -NH (quitosana) e Amida A (gelatina)
3080	Amida B (gelatina)
2926	C - H (estiramento simétrico) (quitosana e gelatina)
2849	C - H (estiramento assimétrico) (quitosana)
1625	C = O (amida I) (quitosana e gelatina)
1544	H - N (amida II) (quitosana e gelatina)
1337	Amida III (gelatina)
1337 a 1444	Hidroxila (-OH) e grupos metila (-CH) presentes no anel da quitosana
899 a 1075	C - O (estiramento) (quitosana e gelatina)

Fonte: Autor

Figura 31 - Espectroscopia de infravermelho nos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina CG1: CG1-1 (0,17% (v/v) Ga), CG1-2 (0,33% (v/v) Ga), CG1-3 (0,67% (v/v) Ga) e CG1-4 (1,67% (v/v) Ga); e CG2: CG2-1 (0,67% (m/v) Ge), CG2-2 (1,33% (m/v) Ge) e CG2-3 (2% (m/v) Ch)



Fonte: Autor

Ao analisar o espectro de infravermelho dos *scaffolds* de quitosana, gelatina e tanino (CGT) na Figura 32, é possível identificar os picos e bandas que evidenciam a presença dos três compostos, os quais já foram previamente identificados nos gráficos das Figuras 28, 29, 30 e 31, bem como nas tabelas 11, 12, 13 e 14. Adicionalmente, é evidente que tanto a gelatina quanto a quitosana apresentam um grande número de picos e bandas similares, uma vez que compartilham ligações químicas e estruturas semelhantes. O tanino mostra certa convergência com a quitosana e a gelatina em alguns pontos, devido a características compartilhadas entre esses compostos. No entanto, o tanino também apresenta um elevado número de bandas e picos exclusivos de sua própria estrutura química, que diverge significativamente dos outros componentes presentes nos *scaffolds* CGT.

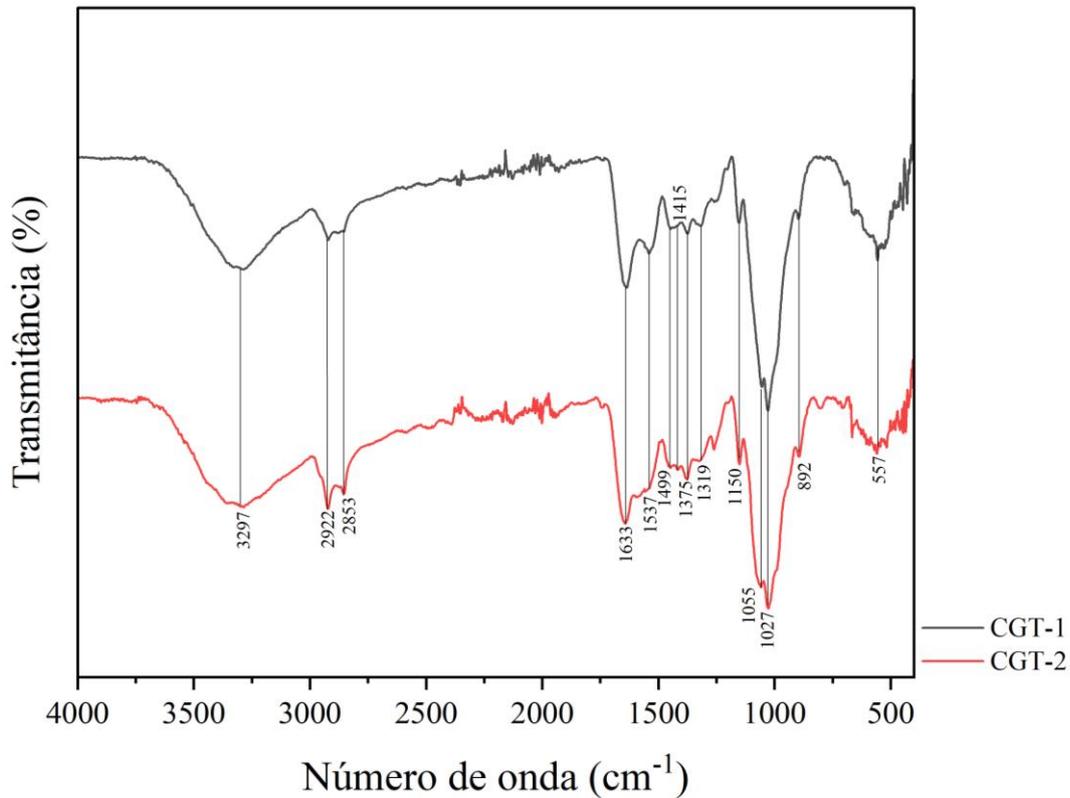
A Tabela 16 apresenta de forma conjunta os picos e suas respectivas atribuições aos compostos presentes no *scaffold* CGT.

Tabela 16 - Relação entre os números de onda e os grupos funcionais referentes aos resultados observados na espectroscopia de infravermelho nos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT)

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3297	-OH e -NH (quitosana), Amida A (gelatina) e -OH (tanino)
2922	C - H (estiramento simétrico) (quitosana, gelatina e tanino)
2853	C - H (estiramento assimétrico) (quitosana)
1633	C = O (amida I) (quitosana e gelatina)
1537	H - N (amida II) (quitosana e gelatina)
1499, 1537 e 1625	Alongamento do anel aromático (tanino)
1375	Alongamento fenólico de -OH (tanino)
1319	H - N Amida III (gelatina)
1319 a 1415	Hidroxila (-OH) e grupos metila (-CH) presentes no anel da quitosana
1150	Alongamento C - O aromático (tanino)
892 a 1055	C - O (estiramento) (quitosana, gelatina e tanino)
557 a 892	Deformação fora do plano de ligações C - H insaturadas no esqueleto do anel aromático (tanino)

Fonte: Autor

Figura 32 - Espectroscopia de infravermelho nos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT): CGT-1 (0,67% (m/v) Ch) e CGT-2 (1,33% (m/v) Ch)



Fonte: Autor

5.3.2 Intumescimento

O intumescimento é uma propriedade fundamental dos *scaffolds*, determinando sua capacidade em absorver fluidos. Essa capacidade é influenciada por diversos fatores, incluindo a porosidade do material, a interconexão entre os poros, as características físico-químicas da matéria-prima utilizada em sua síntese e as propriedades de superfície, como a hidrofiliabilidade. Além disso, é comum expressar a capacidade de intumescimento em forma de taxa. A taxa de intumescimento representa a velocidade ou proporção com que um material absorve/absorveu fluidos ao longo do tempo (ABDIAN *et al.*, 2023).

Os *scaffolds* fabricados a partir de polímeros naturais demonstram maior tendência a intumescer quando expostos a fluidos biológicos. Esse intumescimento inicial é benéfico para a adesão e crescimento celular devido ao aumento do tamanho dos poros. No entanto, um intumescimento contínuo pode comprometer a estabilidade mecânica dos *scaffolds* (ZHANG *et al.*, 2023c). O intumescimento dos *scaffolds* se faz essencial para a manutenção

das células ali presentes, proporcionando fluxo de nutrientes, oxigênio e resíduos (OLAD; BAKHT KHOSH HAGH, 2019).

Em *scaffolds* destinados à cicatrização de feridas por exemplo, a análise da capacidade de intumescimento é essencial pois permite avaliar a estabilidade estrutural desses materiais quando em contato com o exsudato presente na ferida e seu devido gerenciamento. O acúmulo excessivo desse líquido pode facilitar o crescimento de bactérias, levando ao desenvolvimento de infecções e contribuindo para a cronicidade da ferida (LINJU; REKHA, 2023). Portanto, um curativo com boa capacidade de absorção de água desempenha um papel importante na inibição do crescimento bacteriano e cria um ambiente úmido para a cicatrização (NASIRI; AHMADI; AFSHAR-TAROMI, 2023).

O teste de intumescimento foi conduzido em duplicata utilizando amostras de *scaffolds* imersas em 25 mL de solução PBS a 37 °C por um período de 24 h. As Figuras 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 e 41 apresentam os resultados da taxa média de intumescimento para os seguintes grupos de amostras: *scaffolds* de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT), quitosana (C1 e C2), quitosana/gelatina (CG1 e CG2), e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT). Além disso, as figuras também exibem as comparações entre os *scaffolds* CG2-1 e CG3-1, CG3-1 e CGT-2, CG2-1 e CGT-1, respectivamente, bem como o impacto das variações nos reagentes utilizados (glutaraldeído, quitosana, gelatina e tanino) nos resultados obtidos.

Não foi possível avaliar o efeito da concentração de glutaraldeído na taxa de intumescimento de *scaffolds* de gelatina (G), uma vez que as amostras não suportaram a etapa de remoção de resíduos do glutaraldeído não reagido.

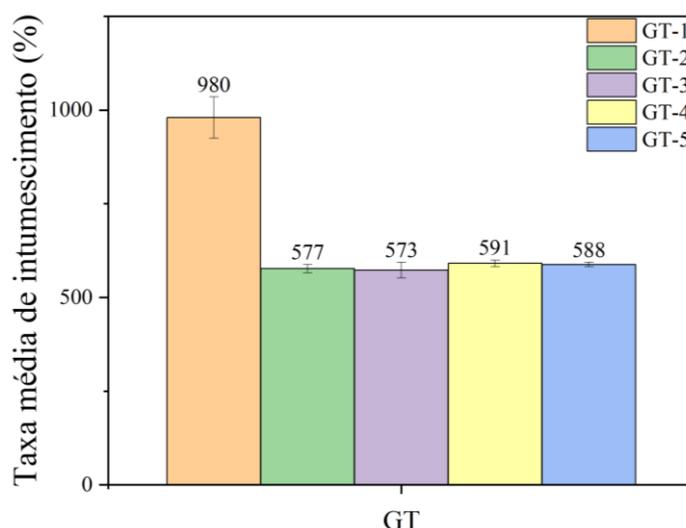
Assim, com o intuito de aumentar a estabilidade da matriz, adicionou-se tanino durante a etapa de reticulação do gel. O aumento do teor de tanino (*scaffolds* GT – Figura 33) de 0,17% a 0,33% acarretou a redução da taxa de intumescimento de $980\% \pm 55\%$ para $577\% \pm 11\%$. Um aumento adicional no teor de tanino não afetou significativamente a taxa de intumescimento da matriz.

A redução da taxa de intumescimento dos *scaffolds* GT com o aumento da concentração de tanino pode ser atribuída às interações entre os compostos fenólicos presentes no tanino e os grupos funcionais disponíveis na gelatina, o que resulta na reticulação das cadeias de gelatina. Essas interações promovem a formação de ligações

cruzadas entre as cadeias de gelatina, resultando em uma estrutura mais estável e menos suscetível à absorção de água (ETXABIDE *et al.*, 2022).

Além disso, verificou-se que o aumento adicional da concentração de tanino não teve efeito significativo na taxa média de intumescimento. Isso sugere que os grupos funcionais disponíveis na gelatina já tenham interagido com os grupos fenólicos do tanino, alcançando uma saturação na solução (RUSSEL, 1994). Nesse ponto, a adição de mais tanino não resulta em novas interações ou reticulações, levando a uma estabilização da taxa de intumescimento.

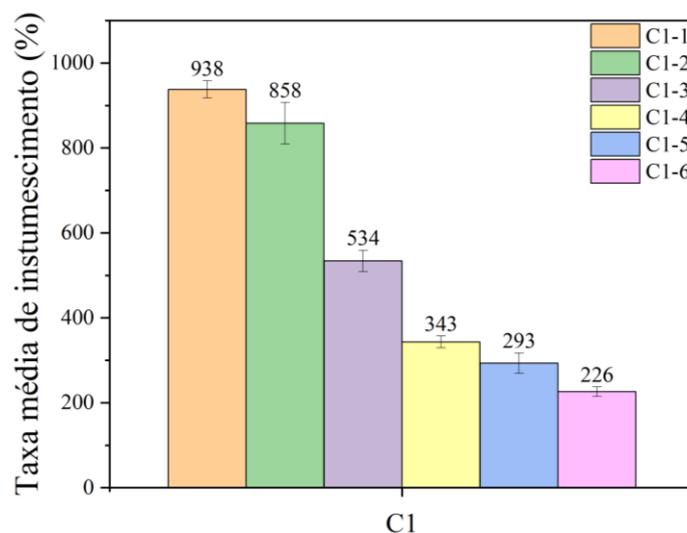
Figura 33 - Taxa média de intumescimento dos *scaffolds* híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT): GT-1 (0,17% (m/v) Tn), GT-2 (0,33% (m/v) Tn), GT-3 (0,50% (m/v) Tn), GT-4 (0,67% (m/v) Tn) e GT-5 (0,83% (m/v) Tn)



Fonte: Autor

Os resultados dos testes de intumescimento demonstraram que nos *scaffolds* C1 (Figura 34), o aumento da concentração de glutaraldeído de 1,67% a 13,33% levou à redução progressiva da taxa de intumescimento de $938\% \pm 20\%$ para $226\% \pm 11\%$, respectivamente. A redução da capacidade de intumescimento da matriz polimérica pode ser atribuída ao bloqueio de parte dos grupos funcionais na etapa de reticulação com glutaraldeído, uma vez que a quitosana possui grupos funcionais hidrofílicos com alta capacidade de absorção de água (OLAD; BAKHT KHOSH HAGH, 2019).

Figura 34 - Taxa média de intumescimento dos *scaffolds* de quitosana pura (C1): C1-1 (1,67% (v/v) Ga), C1-2 (3,33% (v/v) Ga), C1-3 (5,00% (v/v) Ga), C1-4 (6,67% (v/v) Ga), C1-5 (10,00% (v/v) Ga) e C1-6 (13,33% (v/v) Ga)

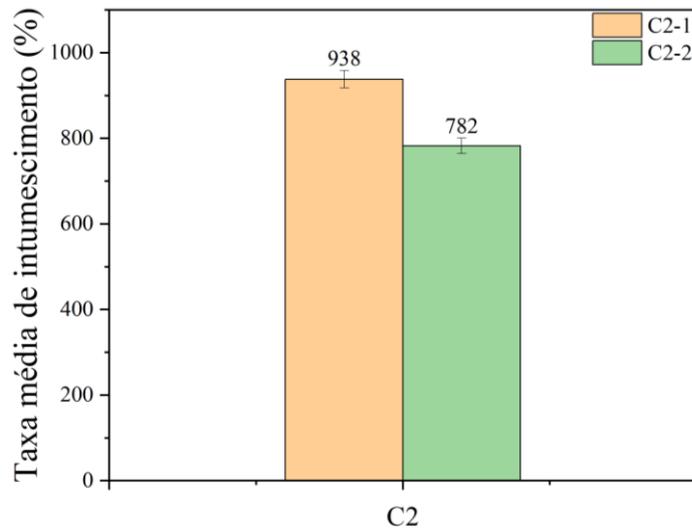


Fonte: Autor

O aumento da concentração de quitosana nos *scaffolds* de quitosana (notação C2 – Figura 35), de 0,67% a 1,33%, resultou na redução da taxa de intumescimento, de 938% \pm 20% para 782% \pm 18%, respectivamente. Na pesquisa realizada por Si *et al.* (2019), foi observado um comportamento semelhante em *scaffolds* híbridos de quitosana/colágeno, no qual o aumento da concentração de quitosana resultou na redução do intumescimento. Foi constatado que o *scaffold* contendo 10% de quitosana apresentou uma taxa de intumescimento de 182,7%, enquanto os *scaffolds* com concentrações de quitosana de 50%, 70% e 90% apresentaram taxas de intumescimento inferiores a 50%, após 2 h de incubação a 37 °C.

O aumento na concentração de quitosana, embora aumente a presença de grupos funcionais hidrofílicos com afinidade pela água, culmina na formação de uma estrutura polimérica mais densa. Com isso essa estrutura pode torna-se menos suscetível à absorção de água, provocando possivelmente a redução na capacidade de intumescimento dos *scaffolds* (HSIEH; LIAU; LI, 2015).

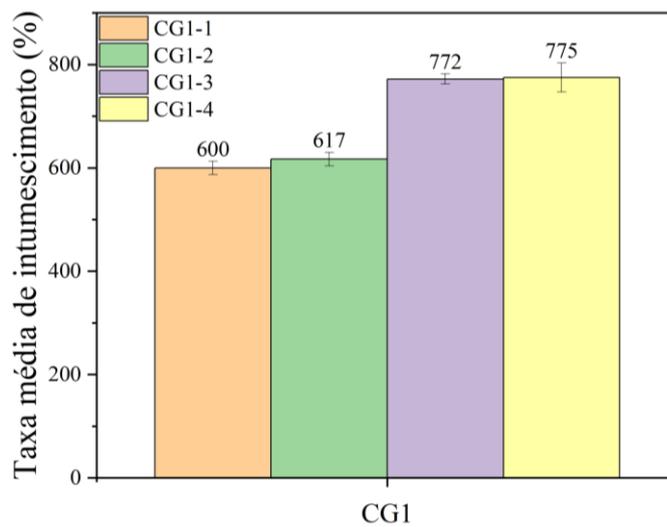
Figura 35 - Taxa média de intumescimento dos *scaffolds* de quitosana pura (C2): C2-1 (0,67% (m/v) Ch) e C2-2 (1,33% (m/v) Ch)



Fonte: Autor

No caso dos *scaffolds* CG1 (Figura 36) o aumento da concentração de glutaraldeído de 0,17% a 1,67% ocasionou um ligeiro aumento na taxa de intumescimento, sendo a variação dessa taxa de $600\% \pm 13\%$ a $775\% \pm 28\%$, respectivamente.

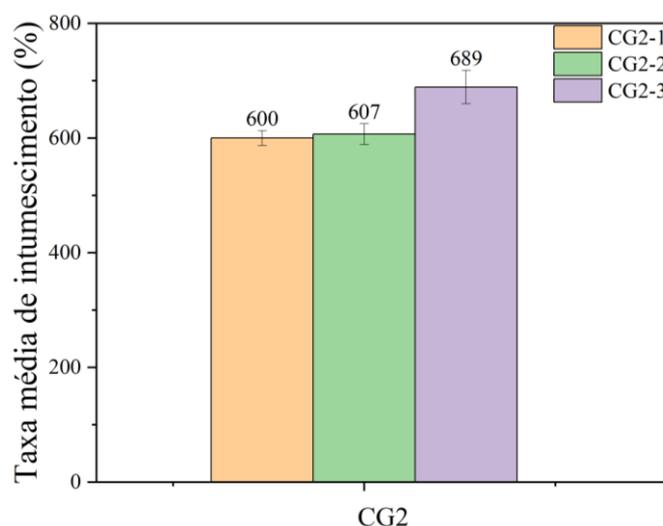
Figura 36 - Taxa média de intumescimento dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG1): CG1-1 (0,17% (v/v) Ga), CG1-2 (0,33% (v/v) Ga), CG1-3 (0,67% (v/v) Ga) e CG1-4 (1,67% (v/v) Ga)



Fonte: Autor

Enquanto o aumento da concentração de gelatina nesses *scaffolds* (notação CG2 – Figura 37) não afeta significativamente a taxa de intumescimento, variando entre $600\% \pm 13\%$ a $689\% \pm 29\%$ nas concentrações 0,67% a 2%, respectivamente. Ambos os resultados são contraintuitivos, uma vez que o aumento da quantidade de glutaraldeído deveria resultar em uma menor disponibilidade de grupos funcionais hidrofílicos presentes na quitosana e na gelatina, enquanto a maior quantidade de gelatina deveria resultar em maior disponibilidade de pontes de hidrogênio (responsáveis pela absorção de água) formadas entre moléculas de água, ácido carboxílico e grupos amino (OLAD; BAKHT KHOSH HAGH, 2019).

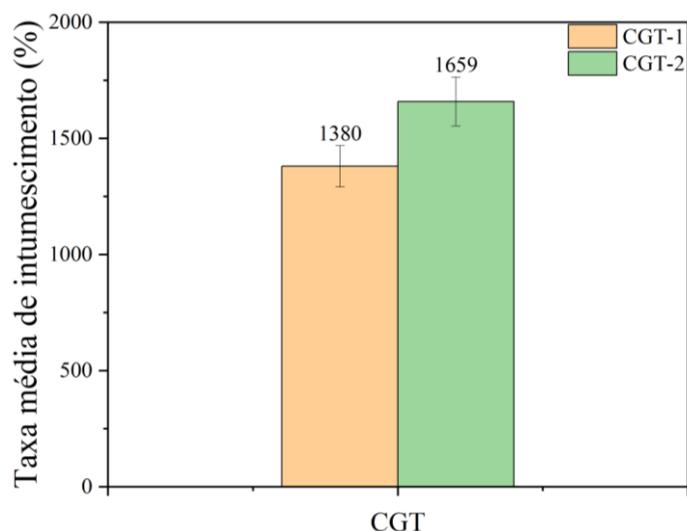
Figura 37 - Taxa média de intumescimento dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG2): CG2-1 (0,67% (m/v) Ge), CG2-2 (1,33% (m/v) Ge) e CG2-3 (2,00% (m/v) Ge)



Fonte: Autor

Nos *scaffolds* CGT, a variação da concentração de quitosana entre 0,67% e 1,33% resultou em um aumento na taxa média de intumescimento, passando de $1380\% \pm 89\%$ para $1659\% \pm 105\%$, como mostrado na Figura 38.

Figura 38 - Taxa média de intumescimento dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT): CGT-1 (0,67% (m/v) Ch) e CGT-2 (1,33% (m/v) Ch)



Fonte: Autor

Essa mesma tendência foi observada na comparação dos *scaffolds* CG2-1 e CG3-1 (Figura 39), nos quais a taxa média de intumescimento aumentou de $600\% \pm 13\%$ para $1873\% \pm 60\%$, quando a concentração de quitosana também variou de 0,67% a 1,33%. No estudo conduzido por Xu *et al.* (2021), foram obtidos resultados semelhantes. Ao aumentar a quantidade de quitosana nos *scaffolds* de 1 g para 2 g, a taxa de intumescimento aumentou de 617% para 944% após 4 horas de imersão em solução PBS a 37 °C.

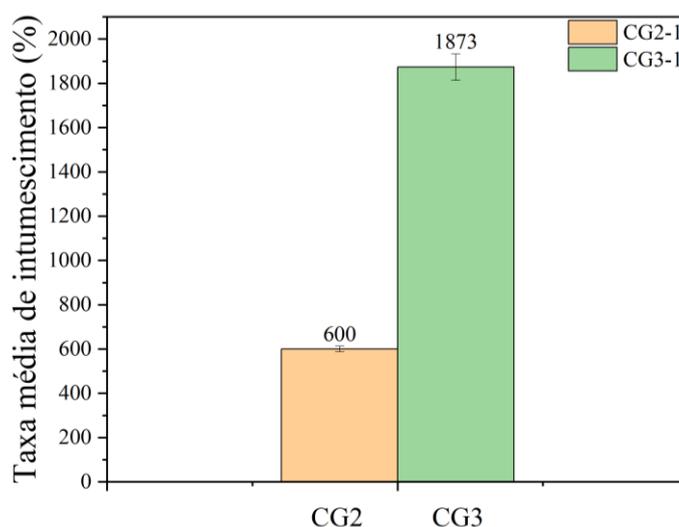
Nesse contexto, os resultados obtidos podem ser associados aos grupos hidrofílicos existentes na quitosana. A medida em que sua concentração é aumentada, há uma ampliação correspondente na disponibilidade desses grupos com afinidade pela água. Isso, por sua vez, promove uma melhoria na capacidade de intumescimento do *scaffold*.

Adicionalmente, os resultados obtidos com a variação da concentração de quitosana nos *scaffolds* CGT, CG2-1 e CG3-1 diferem dos observados nos *scaffolds* C2, onde o aumento da concentração dessa substância levou a uma leve redução na taxa média de intumescimento. Essa variação se deve possivelmente às diferentes formulações dos *scaffolds*. Apesar dos *scaffolds* apresentarem proporções parecidas de quitosana, os *scaffolds* C2 foram sintetizados com uma concentração de 1,67% de glutaraldeído, enquanto os CGT-1, CGT-2, CG2-1 e CG3-1 foram preparados com 0,08% (v/v).

Nesse cenário, é possível deduzir que, em uma situação caracterizada por menor concentração de glutaraldeído, a incorporação de quitosana aos *scaffolds* promove um

aumento na capacidade de intumescimento. Esse incremento é resultado da disponibilidade mais ampla de grupos funcionais hidrofílicos que ainda não reagiram com o glutaraldeído. Entretanto, em *scaffolds* fabricados com concentrações mais elevadas de glutaraldeído, que pode estar em excesso, o aumento na concentração de quitosana provavelmente induz à reação entre seus grupos hidrofílicos e as moléculas remanescentes de glutaraldeído. Essa interação propicia uma reticulação mais significativa do *scaffold*, juntamente com o aumento na densidade do polímero, o que reduz a capacidade de intumescimento.

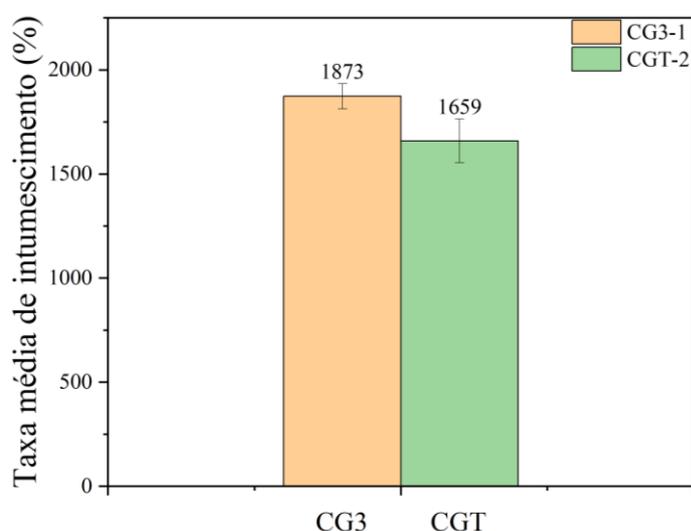
Figura 39 - Comparação da taxa média de intumescimento dos *scaffolds* híbridos de quitosana e gelatina CG2-1 (0,67% (m/v) Ch) e CG3-1 (1,33% (m/v) Ch)



Fonte: Autor

Ao comparar os *scaffolds* CG3-1 e CGT-2 (Figura 40), nos quais a única diferença na composição é a adição de 0,17% de tanino aos *scaffolds* CGT-2, foi observada uma leve redução na taxa de intumescimento de $1873\% \pm 60\%$ para $1659\% \pm 105\%$. Esses resultados estão em consonância com os observados nos *scaffolds* GT, em que a inclusão de tanino também resultou em uma redução na taxa média de intumescimento, passando de $980\% \pm 55\%$ para $577\% \pm 11\%$ quando a concentração de tanino variou de 0,17% para 0,33%.

Figura 40 - Comparação da taxa média de intumescimento dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG3-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-2), com concentração de quitosana de 0,67% (m/v)

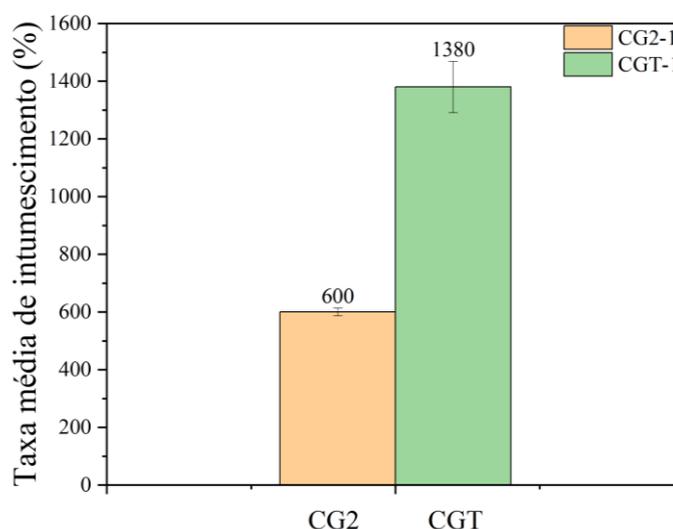


Fonte: Autor

Por outro lado, ao comparar os *scaffolds* CG2-1 e CGT-1 (Figura 41), nos quais a principal diferença também foi a adição de tanino, observou-se um significativo aumento na taxa média de intumescimento. Nos *scaffolds* CG2-1, sem adição de tanino, a taxa média de intumescimento foi de $600\% \pm 13\%$, enquanto nos *scaffolds* CGT-1, com a adição de 0,17% de tanino, a taxa de intumescimento elevou-se para $1380\% \pm 89\%$.

Este resultado é contraintuitivo, uma vez que ao adicionar o tanino, ocorre a reticulação da cadeia, através da interação dos grupos fenólicos do tanino com os grupos funcionais dos demais compostos, o que estabiliza a rede polimérica e dificulta a permeabilidade de fluídos e conseqüentemente sua absorção, impactando na taxa de intumescimento (ETXABIDE *et al.*, 2022).

Figura 41 - Comparação da taxa média de intumescimento dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG2-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-1), com concentração de quitosana de 1,33% (m/v)



Fonte: Autor

Xu *et al.* (2021), reportaram uma variação da taxa de intumescimento de 299% a 1300% para *scaffolds* de quitosana/gelatina. Assim, as taxas de intumescimento observadas no presente estudo estão compatíveis com as observadas para *scaffolds* contendo quitosana e gelatina na literatura.

Além disso, verificou-se que *scaffolds* feitos exclusivamente de quitosana não apresentaram formação de gel com uma concentração de glutaraldeído inferior a 1,67%. No entanto, ao adicionar gelatina aos *scaffolds* de quitosana, foi possível reduzir a concentração de glutaraldeído para 0,08%. Esse resultado é benéfico, considerando que o glutaraldeído tem propriedades citotóxicas, sendo desejável minimizar sua presença em aplicações biomédicas.

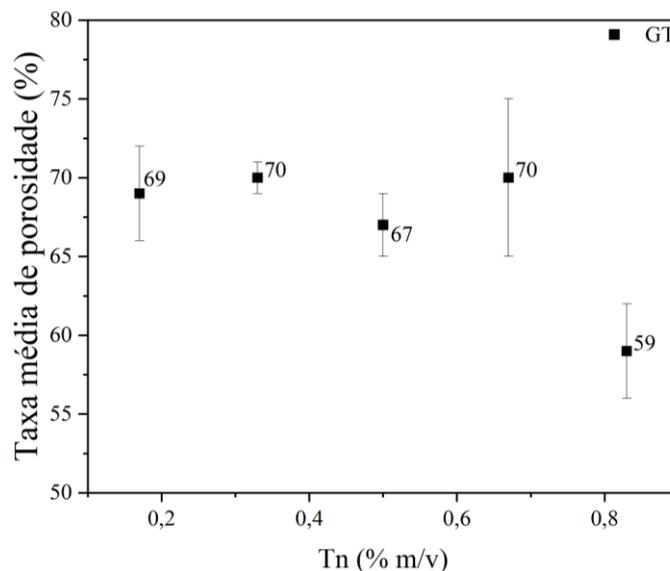
5.3.3 Porosidade

A porosidade é um elemento crucial na engenharia de tecidos, desempenhando um papel indispensável ao permitir a migração celular através da estrutura do *scaffold*, bem como facilitar a oxigenação celular, a difusão de nutrientes e a remoção de produtos residuais. Adicionalmente, é relevante enfatizar que a porosidade exerce uma influência

direta na área superficial do material, que, por sua vez, tem um impacto direto na adesão celular e na resistência mecânica do *scaffold* (BAPTISTA; GUEDES, 2021). Contudo, é necessário encontrar um equilíbrio adequado na taxa de porosidade, uma vez que níveis excessivamente altos podem comprometer a estabilidade mecânica dos *scaffolds*, enquanto taxas muito baixas podem prejudicar a proliferação celular e a permeabilidade, dificultando a disponibilidade de nutrientes e a formação de vasos sanguíneos (ZHANG *et al.*, 2022). Para *scaffolds* destinados à regeneração tecidual, a faixa de porosidade deve estar entre 60% e 90% (INDRA *et al.*, 2023). O método utilizado para analisar a porosidade no presente trabalho foi o de deslocamento líquido, usado para avaliar a porosidade aberta dos materiais (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005).

Não foi possível determinar a porosidade de *scaffolds* de gelatina devido à sua elevada taxa de dissolução. No entanto, a adição de tanino aos *scaffolds* GT (Figura 42), provocou redução na taxa de porosidade, sendo a variação observada de $69\% \pm 3\%$ para $59\% \pm 3\%$, para um aumento na quantidade de tanino de 0,17% a 0,83%, respectivamente.

Figura 42 - Taxa média de porosidade dos *scaffolds* híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT): GT-1 (0,17% (m/v) Tn), GT-2 (0,33% (m/v) Tn), GT-3 (0,50% (m/v) Tn), GT-4 (0,67% (m/v) Tn) e GT-5 (0,83% (m/v) Tn)

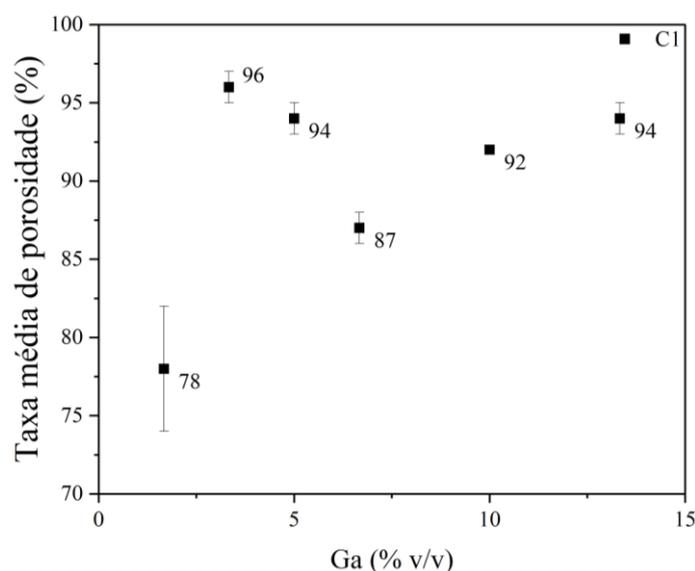


Fonte: Autor

Conforme apresentado na Figura 43, a introdução de glutaraldeído nos *scaffolds* C1 tem efeito significativo na porosidade do material. Um aumento de 1,67% para 3,33% na

quantidade de glutaraldeído em solução, resulta num aumento de $78\% \pm 4\%$ para $96\% \pm 1\%$ na porosidade da matriz. Um aumento adicional no teor de glutaraldeído não gera variação significativa na porosidade do material. Doustdar *et al.* (2022b), encontraram resultados semelhantes para *scaffolds* de quitosana/nanocristal de celulose. Em seu estudo os autores observaram que os *scaffolds* sintetizados sem glutaraldeído apresentaram uma porosidade de 88,64%, enquanto os *scaffolds* com uma concentração de 1% (p/p) de glutaraldeído exibiram porosidade de 93,34%. Portanto, a adição de glutaraldeído aumentou a porosidade.

Figura 43 - Taxa média de porosidade dos *scaffolds* de quitosana pura (C1): C1-1 (1,67% (v/v) Ga), C1-2 (3,33% (v/v) Ga), C1-3 (5,00% (v/v) Ga), C1-4 (6,67% (v/v) Ga), C1-5 (10,00% (v/v) Ga) e C1-6 (13,33% (v/v) Ga)

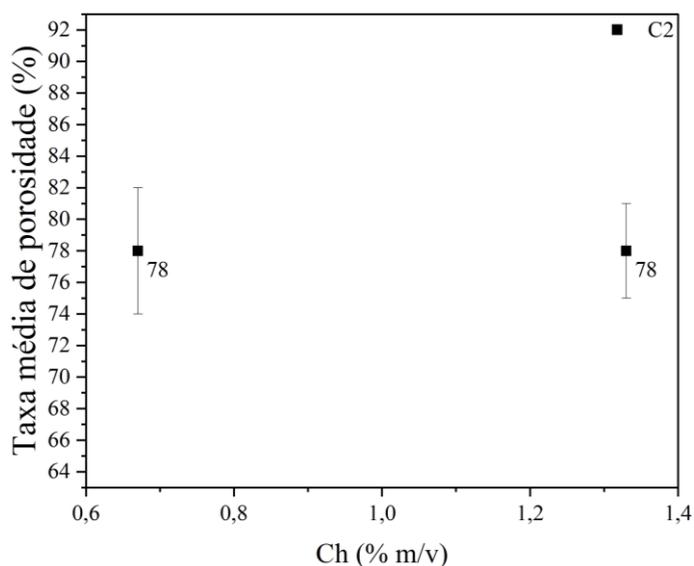


Fonte: Autor

O aumento da concentração de quitosana nos *scaffolds* C2 (Figura 44) não resultou em alterações significativas na porosidade do material. Os *scaffolds* fabricados com 0,67% (m/v) de quitosana demonstraram uma taxa de porosidade de cerca de $78\% \pm 4\%$, enquanto os *scaffolds* com 1,33% (m/v) de quitosana apresentaram um resultado praticamente idêntico, com $78\% \pm 3\%$, exibindo uma variação mínima no erro. Na pesquisa conduzida por SI *et al.* (2019), foram observados resultados semelhantes em relação à porosidade dos *scaffolds*. Os autores constataram que o aumento da concentração de quitosana em *scaffolds* híbridos de quitosana/colágeno, resultou em uma variação mínima na porosidade. No estudo, *scaffolds* contendo 10% e 50% de quitosana exibiram uma porosidade próxima a 85%,

enquanto aqueles com 70% e 90% de quitosana apresentaram uma porosidade aproximada de 90%.

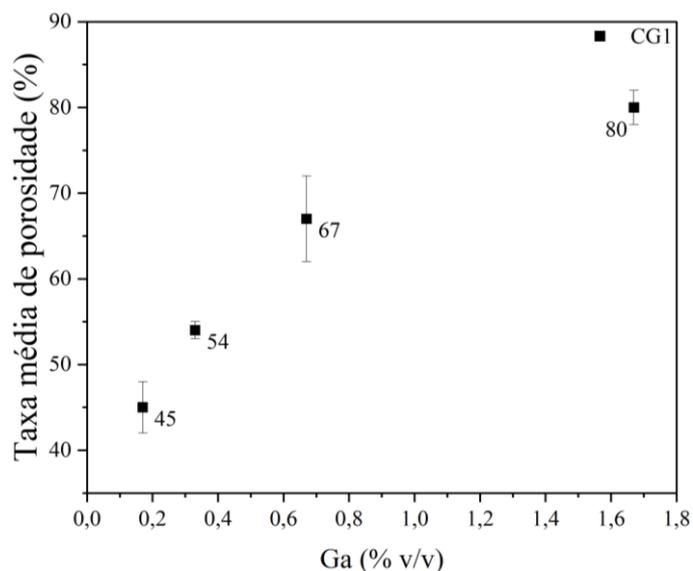
Figura 44 - Taxa média de porosidade dos *scaffolds* de quitosana pura (C2): C2-1 (0,67% (m/v) Ch) e C2-2 (1,33% (m/v) Ch)



Fonte: Autor

Para *scaffolds* CG1 (Figura 45), a elevação do teor de glutaraldeído de 0,17% a 1,67% resulta no aumento da porosidade, de $45\% \pm 3\%$ para $80\% \pm 2\%$, respectivamente. Conforme citado anteriormente, Doustdar *et al.* (2022b), encontrou resultados similares em seus estudos de *scaffolds* de quitosana e nanocristais de celulose, onde a adição de 1% (p/p) de glutaraldeído aumentou a porosidade de 88,64% para 93,34%, em comparação com o *scaffold* sem glutaraldeído.

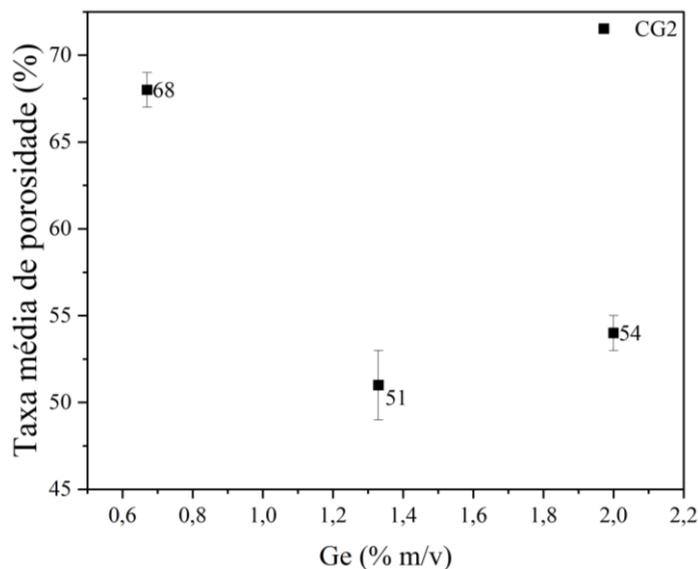
Figura 45 - Taxa média de porosidade dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG1): CG1-1 (0,17% (v/v) Ga), CG1-2 (0,33% (v/v) Ga), CG1-3 (0,67% (v/v) Ga) e CG1-4 (1,67% (v/v) Ga)



Fonte: Autor

Os *scaffolds* de CG2 (Figura 46) apresentaram redução da porosidade ($68\% \pm 1\%$ para $54\% \pm 1\%$) com o aumento da concentração de gelatina (0,67% a 2%). No estudo de Wang *et al.* (2021), foi observado um comportamento parecido, em *scaffolds* híbridos de carboneto de boro/gelatina, onde a adição de gelatina em concentrações de 0% (p/p), 1% (p/p), 2% (p/p), 3% (p/p) e 5% (p/p) resultou em uma redução na porosidade de $74,53\% \pm 1,53\%$ para $74,17\% \pm 2,15\%$, $73,99\% \pm 1,72\%$, $73,72\% \pm 2,37\%$ e $73,27\% \pm 1,94\%$, respectivamente.

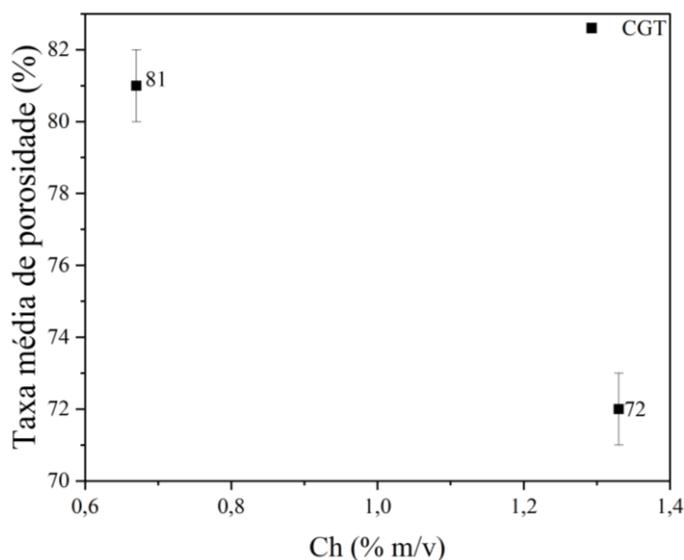
Figura 46 - Taxa média de porosidade dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG2): CG2-1 (0,67% (m/v) Ge), CG2-2 (1,33% (m/v) Ge) e CG2-3 (2,00% (m/v) Ge)



Fonte: Autor

Nos *scaffolds* CGT (conforme Figura 47), o aumento da concentração de quitosana de 0,67% (m/v) para 1,33% (m/v) resultou em uma redução da taxa média de porosidade, diminuindo de $81\% \pm 1\%$ para $72\% \pm 1\%$. Esses resultados são consistentes com os resultados obtidos no estudo por Tien *et al.* (2022), que investigaram nanofibras híbridas de quitosana/poli(óxido de etileno). Nesse estudo, concentrações de quitosana de 95%, 90%, 80%, 70% e 30% exibiram porosidade de aproximadamente 33%, 44%, 52%, 57% e 75%, respectivamente. A porcentagem de porosidade nesses estudos foi calculada utilizando o método de densidade aparente.

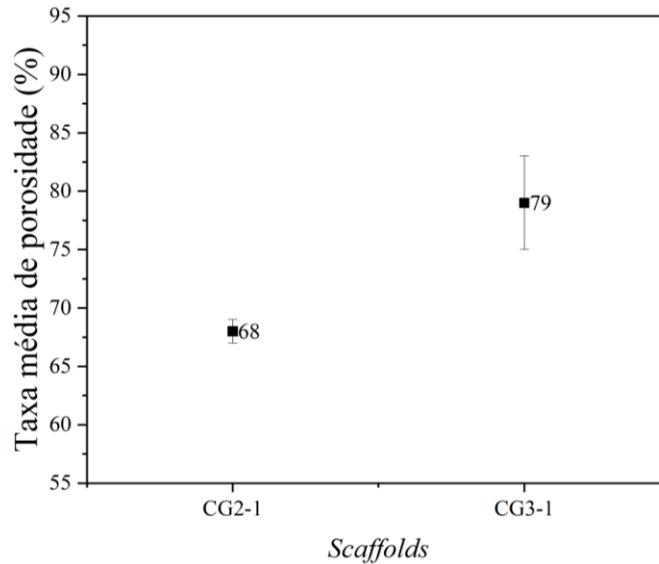
Figura 47 - Taxa média de porosidade dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT): CGT-1 (0,67% (m/v) Ch) e CGT-2 (1,33% (m/v) Ch)



Fonte: Autor

Ao comparar os *scaffolds* CG2-1 e CG3-1 (Figura 48), fica evidente que o aumento da concentração de quitosana de 0,67% (m/v) para 1,33% (m/v) resultou em um aumento na taxa média de porosidade, passando de $68\% \pm 1\%$ para $79\% \pm 4\%$. Apesar dessa divergência em relação aos resultados encontrados para outros *scaffolds* que também tiveram variação na concentração de quitosana (como C2 e CGT), essa tendência de aumento na porosidade com o aumento da concentração de quitosana também está em consonância com pesquisas existentes na literatura. De fato, um estudo conduzido por Liu e Wang (2023), demonstrou resultados similares para *scaffolds* híbridos de quitosana/carbonato de cálcio, onde o maior teor de quitosana resultou em maiores taxas de porosidade. Nesse estudo, *scaffolds* contendo teores de quitosana de 100%, 80%, 60% e 40% exibiram taxas de porosidade de 95,59%, 93,13%, 91,01% e 89,76%, respectivamente.

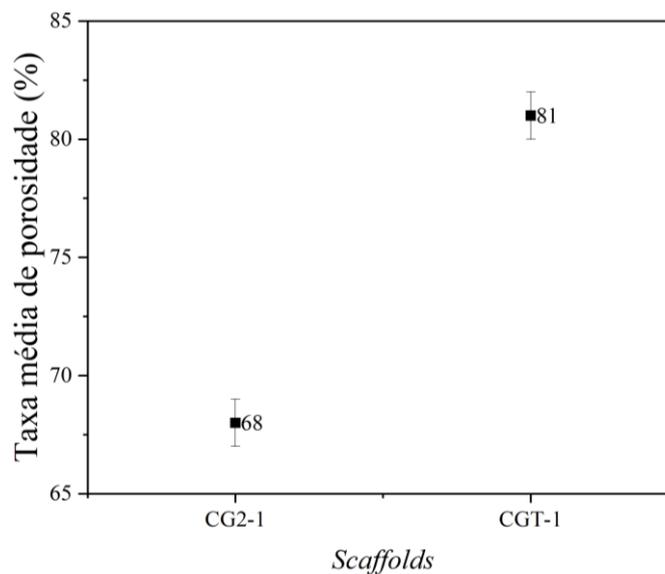
Figura 48 - Comparação da taxa média de porosidade dos *scaffolds* híbridos de quitosana e gelatina CG2-1 (0,67% (m/v) Ch) e CG3-1 (1,33% (m/v) Ch)



Fonte: Autor

Ao comparar os *scaffolds* CG2-1 e CGT-1 (Figura 49), ambos contendo gelatina e quitosana a uma concentração de 0,67% (m/v), notou-se que a adição de 0,17% de tanino (nos *scaffolds* CGT-1) resultou em um aumento da taxa média de porosidade, elevando-a de $68\% \pm 1\%$ para $81\% \pm 1\%$.

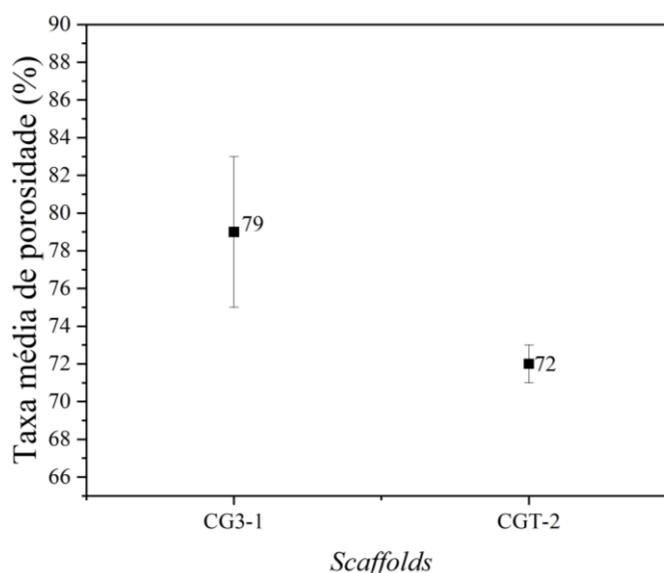
Figura 49 - Comparação da taxa média de porosidade dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG3-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-2), com concentração de quitosana de 0,67% (m/v)



Fonte: Autor

No entanto, ao analisar os *scaffolds* CG3-1 e CGT-2 (conforme Figura 50), cujas formulações incluem gelatina e quitosana em concentrações de 0,67% (m/v) e 1,33% (m/v), respectivamente, observou-se que ao adicionar 0,17% (m/v) de tanino ao *scaffold* CGT-2, ocorreu uma redução na taxa de porosidade, diminuindo-a de $79\% \pm 4\%$ para $72\% \pm 1\%$.

Figura 50 - Comparação da taxa média de porosidade dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG2-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-1), com concentração de quitosana de 1,33% (m/v)



Fonte: Autor

É importante ressaltar que a porosidade do *scaffold* é influenciada por diversos fatores, tais como o método de preparo empregado para a síntese e a composição do *scaffold* (ZHU *et al.*, 2021). Conforme mencionado anteriormente, na técnica de liofilização, primeiramente o material é congelado para a conversão do solvente (água) em cristais de gelo e, após a solidificação, o solvente é retirado do material por sublimação, resultando na formação dos poros onde os cristais de gelo antes se encontravam (ELBRINK *et al.*, 2023; SERRANO-AROCA *et al.*, 2022). Portanto é essencial considerar a razão entre soluto e solvente durante a síntese do material, pois ela impacta diretamente na porosidade, uma vez que uma maior proporção de soluto resultaria em menor disponibilidade de solvente para formação de cristais de gelo.

O estudo de Liu e Wang (2023), corroborou com essa relação, demonstrando que o aumento da concentração de carbonato de sódio (soluto) em *scaffolds* híbridos de quitosana/carbonato de sódio provocou uma redução na porosidade. Portanto, quanto maior

a quantidade de soluto (sólido) presente na solução, maior a tendência de redução da porosidade.

No presente estudo, foi realizada a correlação entre taxa média de porosidade (TMP) e a razão de soluto/solvente durante a síntese do *scaffold*, conforme apresentado na Tabela 17. O cálculo da razão de soluto/solvente foi realizado através da porcentagem de massa (PM), de acordo com a equação (8) (MOELLER *et al.*, 1980). Nos resultados obtidos, é possível observar a tendência de redução da porosidade com o aumento da porcentagem de massa de soluto da solução para a maioria dos *scaffolds*, com exceção dos CG1.

$$PM (\%) = (\text{Massa do soluto (g)} \div \text{Massa da solução (g)}) \times 100 \quad (8)$$

Tabela 17 - Análise da variação da taxa média de porosidade (TMP) em função da porcentagem de massa (PM)

<i>Scaffold</i>	TMP (%)	PM (%)	<i>Scaffold</i>	TMP (%)	PM (%)
GT-1	69 ± 3	21	CG1-1	45 ± 3	12
GT-2	70 ± 1	22	CG1-2	54 ± 1	11
GT-3	67 ± 2	22	CG1-3	67 ± 5	11
GT-4	70 ± 5	23	CG1-4	80 ± 2	11
GT-5	59 ± 3	24	CG2-1	68 ± 1	8
C1-1	78 ± 4	4	CG2-2	51 ± 2	12
C1-2	96 ± 1	4	CG2-3	54 ± 1	15
C1-3	94 ± 1	3	CG3-1	79 ± 4	12
C1-4	87 ± 1	3	CGT-1	81 ± 1	9
C1-5	92 ± 0	3	CGT-2	72 ± 1	13
C1-6	94 ± 1	2			
C2-1	78 ± 4	4			
C2-2	78 ± 3	4			

Fonte: Autor

É importante destacar que as ligações químicas formadas entre os compostos presentes nos *scaffolds* também desempenham um papel significativo na determinação da taxa média de porosidade. A porcentagem de massa somente é válida quando analisamos um mesmo grupo de *scaffolds* de composição similar.

Adicionalmente, a porosidade média dos *scaffolds* GT, C1, C2, CG1, CG2, CG3 e CGT foram 67%, 90%, 78%, 62%, 58%, 79% e 76%, respectivamente. No geral, os *scaffolds*

que continham gelatina foram os que apresentaram as menores porosidades. Essa observação pode ser atribuída à contribuição da gelatina para inibir o crescimento anormal dos cristais de gelo, o que resulta na formação de uma microestrutura uniforme e conseqüentemente de menor porosidade (WANG *et al.*, 2021). As amostras com maiores concentrações de gelatina nos *scaffolds* CG2 (1,33%-m/v e 2%-m/v) exibiram porosidades abaixo de 60%, portanto, são inadequados para aplicação em engenharia de tecidos. O mesmo comportamento foi observado para o *scaffold* GT-5, com maior teor de tanino de 0,83% (m/v) e para os *scaffolds* CG1 com menores concentrações de glutaraldeído 0,17% (v/v) e 0,33% (v/v). A porosidade observada para os *scaffolds* C1 preparados com 3,33%, 5%, 10% e 13,33% (v/v) de glutaraldeído foi acima de 90%, como a estabilidade mecânica desses materiais é afetada pela elevada porosidade, esses *scaffolds* também não estão aptos para serem aplicados na engenharia de tecidos. O restante dos *scaffolds* possuem porosidade dentro da faixa de 60 a 90%, o que indica que eles podem ser aplicados para regeneração tecidual.

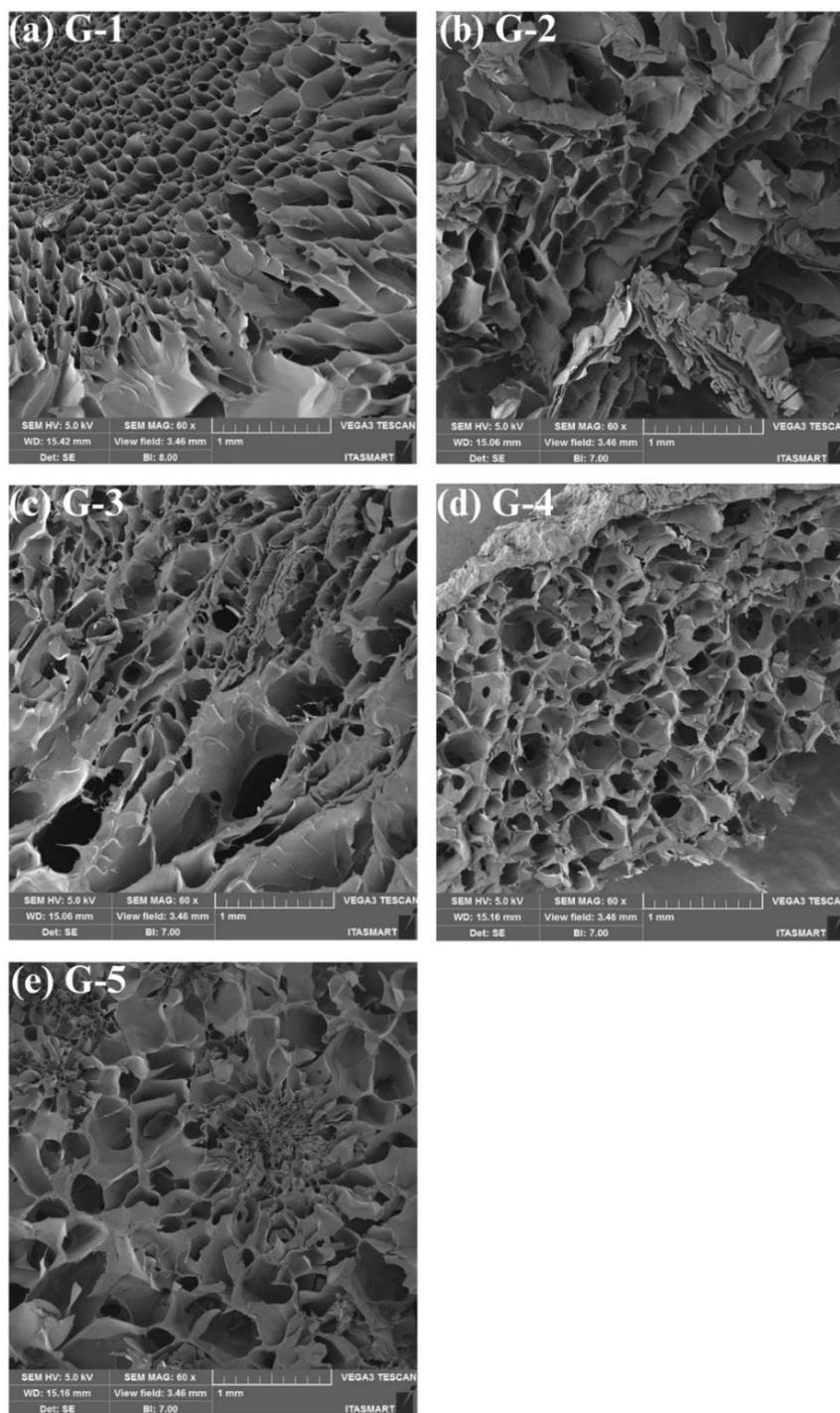
5.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a engenharia de tecidos, características estruturais dos *scaffolds*, como a geometria, volume e forma dos poros, assim como sua interconectividade podem impactar na adesão celular, proliferação e regeneração tecidual (LIU; WANG, 2023). Além disso, tais características também afetam o transporte de nutrientes essenciais para o crescimento celular (ABDIAN *et al.*, 2023). Poros de dimensões reduzidas podem restringir a migração celular, ocasionando a formação de cápsulas celulares nas bordas, o que limita o acesso das células aos nutrientes. Por outro lado, poros de dimensões muito amplas podem diminuir a área superficial disponível para a adesão celular (OLAD; BAKHT KHOSH HAGH, 2019). O tamanho dos poros em *scaffolds* deve situar-se dentro da faixa de 100 a 400 μm (INDRA *et al.*, 2023).

Através das micrografias dos *scaffolds* de gelatina sem tratamento para remoção de resíduos provenientes da síntese, pode-se observar que o processo de liofilização permitiu a formação de estruturas com poros interligados em uma ampla faixa de diâmetros, conforme ilustrado na Figura 51. As cavidades resultantes apresentam formato irregular e diâmetros de poros que variam entre 100 e 200 μm , como evidenciado pelas imagens. Além disso, é

possível observar que conforme se adicionou glutaraldeído aos *scaffolds* G-1, G-2, G-3, G-4 e G-5, houve um leve aumento no diâmetro de seus poros. Nos *scaffolds* G-1 (concentração de 0% (v/v) de Ga) estes poros são uniformes e menores, enquanto que nos *scaffolds* G-5 com concentração de 1,67% (v/v) de glutaraldeído, os poros se apresentam maiores e mais disformes.

Figura 51 - Imagens MEV da superfície dos *scaffolds* de gelatina pura (G): G-1 (0% (v/v) Ga), G-2 (0,17% (v/v) Ga), G-3 (0,33% (v/v) Ga), G-4 (0,67% (v/v) Ga) e G-5 (1,67% (v/v) Ga), com ampliação de 60x



Fonte: Autor

As micrografias dos *scaffolds* GT-1, GT-2, GT-3, GT-3 e GT-5, expostas na Figura 52, mostram que a adição de tanino prejudicou a uniformidade dos poros dos *scaffolds*. A princípio, o *scaffold* GT-1 com 0,17% (m/v) de tanino apresenta estrutura porosa com poros regulares e menor tamanho de poros. À medida que se adiciona tanino, observa-se um aumento no diâmetro dos poros e, simultaneamente, uma significativa diminuição na quantidade de poros presentes no material. No caso específico do *scaffold* GT-5, os poros praticamente tornam-se indetectáveis devido à redução drástica de sua quantidade.

As micrografias estão em consonância com os resultados dos testes de intumescimento e porosidade. Considerando que o tamanho e a quantidade de poros têm influência direta na porosidade dos materiais, afetando, conseqüentemente, o processo de intumescimento. Geralmente, materiais mais porosos facilitam a permeabilidade e a difusão de fluidos em seu interior, levando a um aumento na taxa de intumescimento do material (SHI; WANG; WANG, 2011). No entanto, além da porosidade, é importante destacar que o grau de hidrofiliçidade dos materiais utilizados na composição dos *scaffolds* também desempenha um papel significativo no processo de intumescimento (HASSOUNA; ELGHARBAWY; MORSY, 2023).

No teste de porosidade, o aumento da concentração de tanino de 0,17% (m/v) para 0,83% (m/v) resultou na redução da taxa média de porosidade, de $69\% \pm 3\%$ para $59\% \pm 3\%$. No teste de intumescimento, é possível observar a mesma tendência, em que o aumento da concentração de tanino de 0,17% (m/v) para 0,33% (m/v) reduziu a taxa de intumescimento de $980\% \pm 55\%$ para $577\% \pm 11\%$, porém, a partir deste ponto, a adição de tanino não provocou variação significativa. Estes dados podem ser observados na Tabela 18.

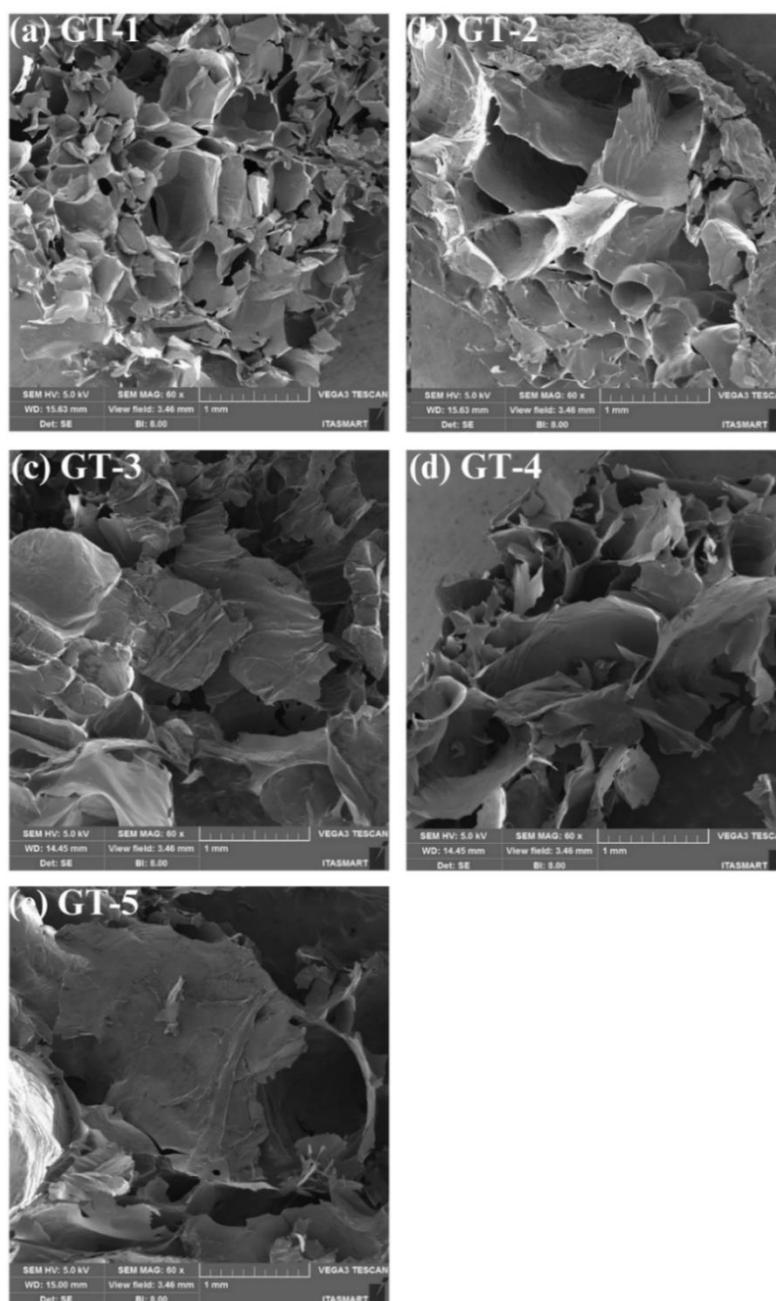
Tabela 18 - Relação da taxa média de intumescimento (TMI) e taxa média de porosidade (TMP) dos *scaffolds* híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT)

<i>Scaffold</i>	% Tn (m/v)	TMI (%)	TMP (%)
GT-1	0,17	980 ± 55	69 ± 3
GT-2	0,33	577 ± 11	70 ± 1
GT-3	0,5	573 ± 21	67 ± 2
GT-4	0,67	591 ± 9	70 ± 5
GT-5	0,83	588 ± 6	59 ± 3

Fonte: Autor

Assim, é possível constatar uma correlação clara e evidente entre as micrografias obtidas, a porosidade e o intumescimento dos *scaffolds*. Observa-se que a diminuição excessiva na quantidade de poros, associada a um aumento significativo no tamanho desses poros, afeta as taxas de intumescimento e porosidade dos *scaffolds* CGT, resultando em sua redução.

Figura 52 - Imagens MEV da superfície dos *scaffolds* híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT): GT-1 (0,17% (m/v) Tn), GT-2 (0,33% (m/v) Tn), GT-3 (0,50% (m/v) Tn), GT-4 (0,67% (m/v) Tn) e GT-5 (0,83% (m/v) Tn), com ampliação de 60x



A Figura 53 exibe as micrografias dos *scaffolds* C1-1, C1-2, C1-3, C1-4, C1-5 e C1-6, nelas é possível observar a morfologia desses *scaffolds*. A amostra C1-1, que continha 1,67% (v/v) de glutaraldeído, apresentou o menor diâmetro de poros. Conforme o teor de glutaraldeído aumentou para 3,33 % (v/v), 5% (v/v) 6,67% (v/v), 10% (v/v) e 13,33% (v/v) nos *scaffolds* C1-2, C1-3, C1-4, C1-5 e C1-6, respectivamente, os poros se dilataram e se tornaram mais irregulares.

Assim, não é possível correlacionar a morfologia desses materiais com o aumento da taxa média de porosidade de $78\% \pm 4\%$ para $98\% \pm 1\%$. No entanto, fatores como a redução da proporção de sólidos e a adição do agente reticulante (glutaraldeído) na solução polimérica podem ser responsáveis por esse aumento (CAMANI *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2022a).

Apesar do aumento da porosidade e do tamanho dos poros, geralmente resultarem em um aumento na capacidade de intumescimento, pois estimulam o fluxo de fluidos para o interior do material, foi observada uma redução significativa na taxa média de intumescimento. A taxa média de intumescimento diminuiu de $938\% \pm 20\%$ para $226\% \pm 11\%$ com o aumento da concentração de glutaraldeído de 1,67% (v/v) para 13,33% (v/v). Essa redução pode ser atribuída à maior rigidez da matriz polimérica, resultado do aumento da concentração do reticulante (glutaraldeído) (DOUSTDAR; OLAD; GHORBANI, 2022b), uma vez que uma estrutura mais rígida dificulta a permeabilidade da solução PBS, reduzindo desta forma a capacidade de intumescer do material.

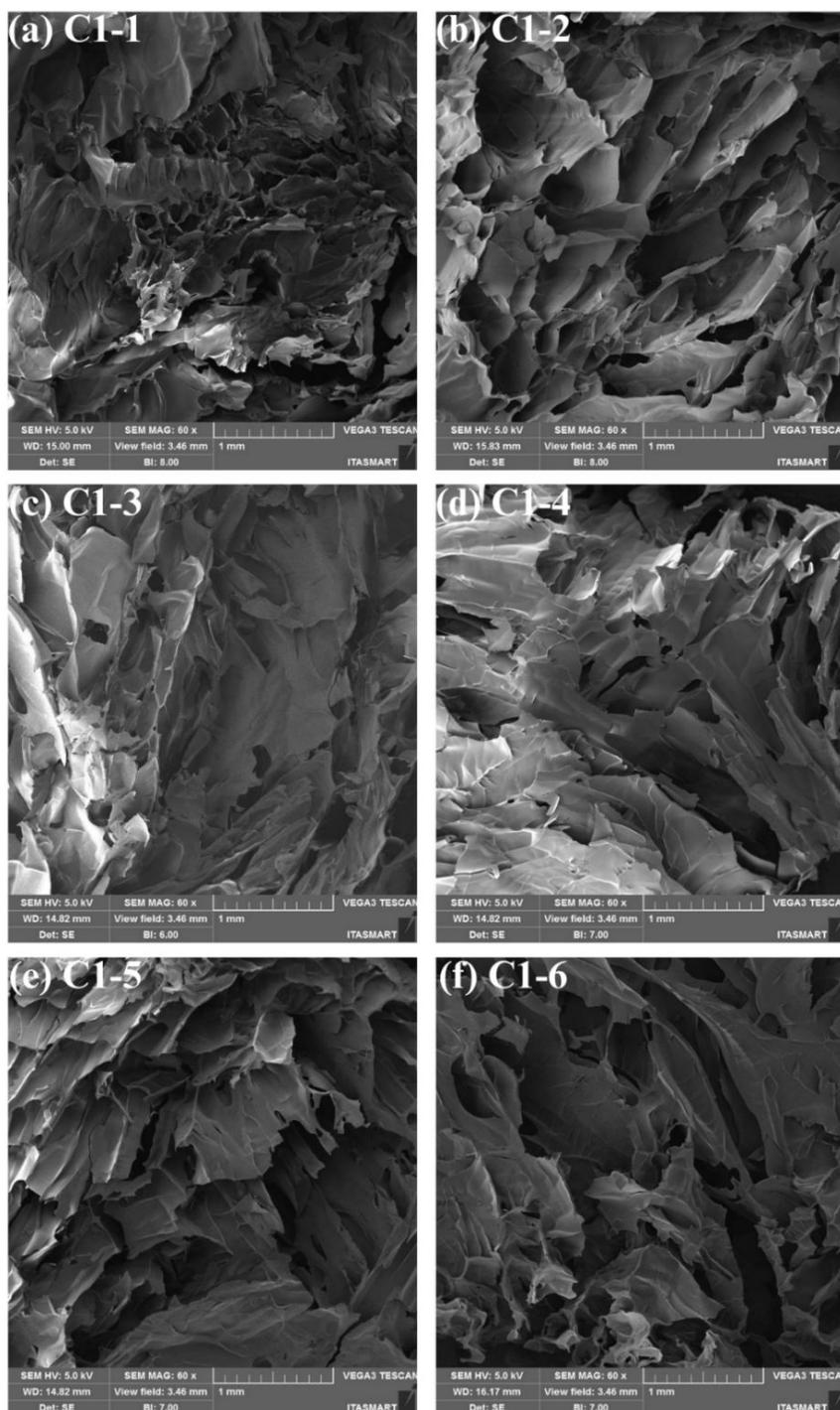
Na Tabela 19 estão expostas a relação entre a taxa de intumescimento (TMI) e a taxa média de porosidade (TMP) dos *scaffolds*, conforme se adiciona glutaraldeído.

Tabela 19 - Relação da taxa média de intumescimento (TMI) e taxa média de porosidade (TMP) dos *scaffolds* de quitosana pura (C1)

<i>Scaffold</i>	% Ga (v/v)	TMI (%)	TMP (%)
C1-1	1,67	938 ± 20	78 ± 4
C1-2	3,33	858 ± 49	96 ± 1
C1-3	5	534 ± 25	94 ± 1
C1-4	6,67	343 ± 14	87 ± 1
C1-5	10	293 ± 24	92 ± 0
C1-6	13,33	226 ± 11	94 ± 1

Fonte: Autor

Figura 53 - Imagens MEV da superfície dos *scaffolds* de quitosana pura (C1): C1-1 (1,67% (v/v) Ga), C1-2 (3,33% (v/v) Ga), C1-3 (5,00% (v/v) Ga), C1-4 (6,67% (v/v) Ga), C1-5 (10,00% (v/v) Ga) e C1-6 (13,33% (v/v) Ga), com ampliação de 60x



Fonte: Autor

Os *scaffolds* C2-1 e C2-2 (Figura 54) exibem estrutura porosa interconectada, de poros irregulares. É possível notar que o acréscimo de quitosana de 0,67% (m/v) para 1,33% (m/v) resultou no aumento do diâmetro dos poros do material.

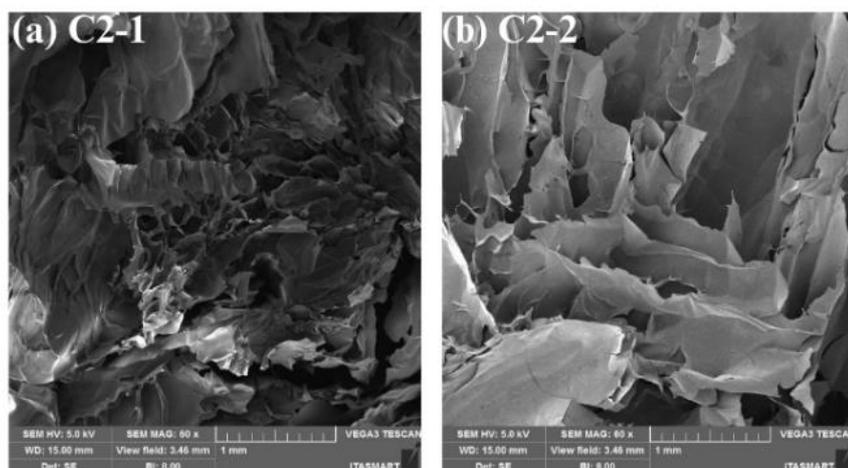
No entanto o aumento do diâmetro dos poros, resultante da elevação da concentração de quitosana, não houve impacto na porosidade dos *scaffolds* C2, conforme os dados apresentados na Tabela 20, que revelam uma porosidade constante de 78%. Entretanto, a taxa média de intumescimento demonstrou uma leve redução de $938\% \pm 20\%$ para $782\% \pm 18\%$, apesar do aumento no tamanho dos poros.

Tabela 20 - Relação da taxa média de intumescimento (TMI) e taxa média de porosidade (TMP) dos *scaffolds* de quitosana pura (C2)

<i>Scaffold</i>	% Ch (m/v)	TMI (%)	TMP (%)
C2-1	0,67	938 ± 20	78 ± 4
C2-2	1,33	782 ± 18	78 ± 3

Fonte: Autor

Figura 54 - Imagens MEV da superfície dos *scaffolds* de quitosana pura (C2): C2-1 (0,67% (m/v) Ch) e C2-2 (1,33% (m/v) Ch), com ampliação de 60x



Fonte: Autor

As imagens da Figura 55 mostram as micrografias das amostras CG1-1, CG1-2, CG1-3 e CG1-4. Observa-se que a amostra CG1-1, produzida com 0,17% (v/v) de glutaraldeído, possui menor diâmetro de poros dentre os materiais CG1. Os *scaffolds* CG1-2, CG1-3 e CG1-4 possuem poros mais dilatados e irregulares, sendo essa tendência acentuada com o aumento da concentração de glutaraldeído na preparação dos materiais.

Assim, embora o aumento da concentração de glutaraldeído resulte em uma menor disponibilidade de grupos funcionais hidrofílicos, ele também resulta em tamanho de poros

maiores que facilitam a difusão da solução PBS, resultando no aumento da taxa média de intumescimento, conforme observado nos *scaffolds* CG1.

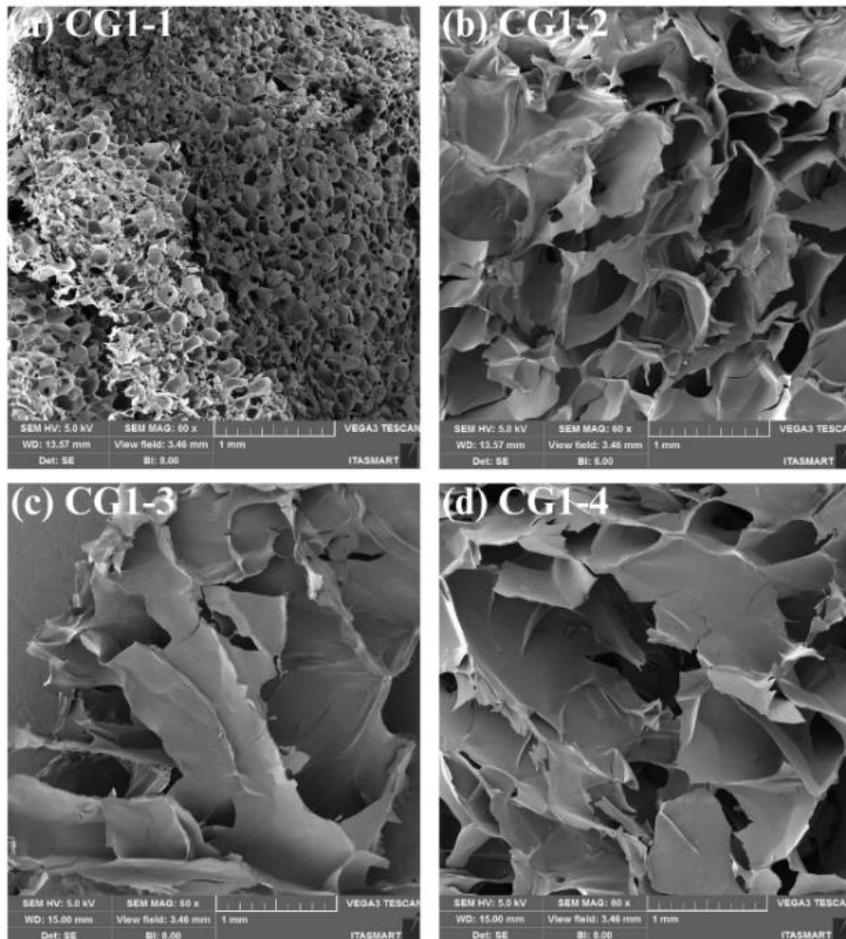
Adicionalmente, foi constatado um aumento na taxa média de porosidade dos *scaffolds* CG1, correlacionado com o aumento do diâmetro dos poros. Essa variação na porosidade é notável, considerando que a proporção de sólidos na solução foi mantida similar entre os *scaffolds* CG1. Teoricamente, isso deveria resultar em uma manutenção constante da porosidade, uma vez que ela é influenciada pela relação soluto/solvente. Desse modo, é possível concluir que o incremento da porosidade pode ser atribuído principalmente ao aumento do diâmetro dos poros nos *scaffolds* CG1. Os valores de taxa média de porosidade e intumescimento foram comparados na Tabela 21.

Tabela 21 - Relação da taxa média de intumescimento (TMI) e taxa média de porosidade (TMP) dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG1)

<i>Scaffold</i>	% Ga (v/v)	TMI (%)	TMP (%)
CG1-1	0,17	600 ± 13	45 ± 3
CG1-2	0,33	617 ± 13	54 ± 1
CG1-3	0,67	772 ± 10	67 ± 5
CG1-4	0,67	775 ± 28	80 ± 2

Fonte: Autor

Figura 55 - Imagens MEV da superfície dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG1): CG1-1 (0,17% (v/v) Ga), CG1-2 (0,33% (v/v) Ga), CG1-3 (0,67% (v/v) Ga) e CG1-4 (1,67% (v/v) Ga), com ampliação de 60x



Fonte: Autor

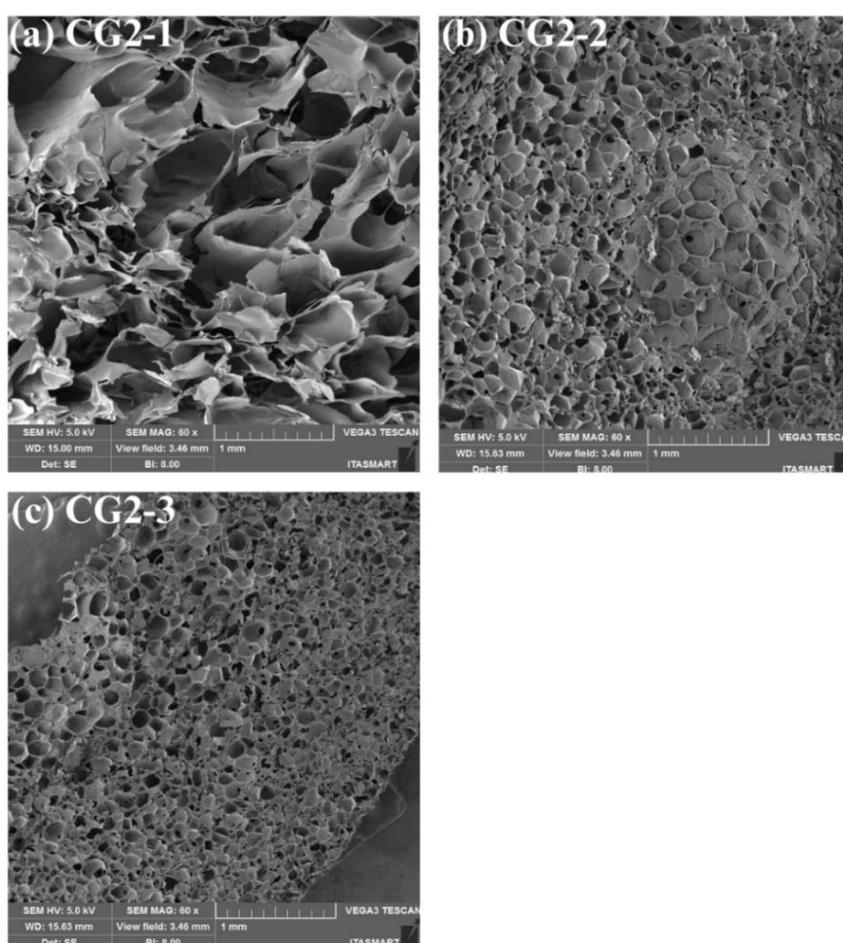
Na Figura 56, podemos observar que os *scaffolds* CG2-1, CG2-2 e CG2-3 apresentam uma notável diminuição do tamanho dos poros com o acréscimo de gelatina. Apesar dessa alteração na estrutura dos poros, a taxa média de intumescimento não foi significativamente afetada, variando entre $600\% \pm 13\%$ a $689\% \pm 29\%$ nos *scaffolds* CG2-1 e CG2-3, respectivamente. No entanto, a taxa média de porosidade mostrou uma correlação com a diminuição do tamanho dos poros nos *scaffolds*, reduzindo de $68\% \pm 1\%$ para $54\% \pm 1\%$ com o aumento da concentração de gelatina, conforme indicado na Tabela 22.

Tabela 22 - Relação da taxa média de intumescimento (TMI) e taxa média de porosidade (TMP) dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG2)

<i>Scaffold</i>	% Ge (m/v)	TMI (%)	TMP (%)
CG2-1	0,67	600 ± 13	68 ± 1
CG2-2	1,33	607 ± 18	51 ± 2
CG2-3	2,00	689 ± 29	54 ± 1

Fonte: Autor

Figura 56 - Imagens MEV da superfície dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG2): CG2-1 (0,67% (m/v) Ge), CG2-2 (1,33% (m/v) Ge) e CG2-3 (2,00% (m/v) Ge), com ampliação de 60x



Fonte: Autor

Por meio das micrografias dos *scaffolds* CGT-1 e CGT-2 (Figura 57), é possível constatar a presença de uma estrutura porosa interconectada, composta por poros irregulares.

Nos *scaffolds* CGT, foi observado um aumento na taxa de intumescimento de 1380% ± 89% para 1659% ± 105% após a adição de quitosana, conforme apresentado na Tabela 23.

O aumento observado na taxa de intumescimento nos *scaffolds* CGT pode ser devido principalmente ao caráter hidrofílico da quitosana.

Por outro lado, apesar do aumento dos poros, a taxa média de porosidade apresentou uma redução de $81\% \pm 1\%$ para $72\% \pm 1\%$. Essa redução na porosidade pode ser atribuída ao aumento da concentração de sólidos na solução, que passou de 9% para 13%. A maior concentração de sólidos resultou em uma menor proporção de espaço vazio na estrutura porosa, o que pode ter contribuído para a redução da porosidade do material.

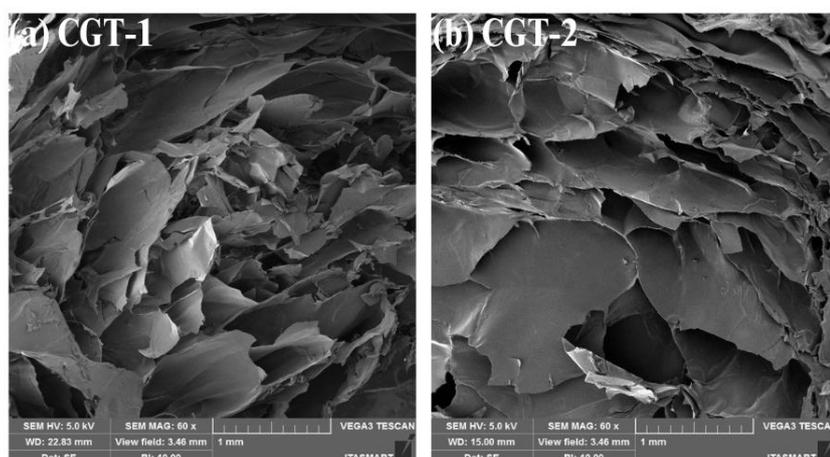
A Tabela 23 disponibiliza as informações referentes às concentrações de tanino e quitosana dos *scaffolds* CGT-1 e CGT-2, juntamente com suas taxas médias de intumescimento e porosidade. Adicionalmente, os dados dos *scaffolds* CG2-1 e CG3-1 também são apresentados nesta tabela, os quais serão objeto de análises nas seções subsequentes do texto.

Tabela 23 - Relação da taxa média de intumescimento (TMI) e taxa média de porosidade (TMP) dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT) e quitosana/gelatina (CG2-1 e CG3-1)

<i>Scaffold</i>	% Tn (m/v)	% Ch (m/v)	TMI (%)	TMP (%)
CGT-1	0,17	0,67	1380 ± 89	81 ± 1
CGT-2	0,17	1,33	1659 ± 105	72 ± 1
CG2-1	0	0,67	600 ± 13	68 ± 1
CG3-1	0	1,33	1873 ± 60	70 ± 4

Fonte: Autor

Figura 57 - Imagens MEV da superfície dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT): CGT-1 (0,67% (m/v) Ch) e CGT-2 (1,33% (m/v) Ch), com ampliação de 60x



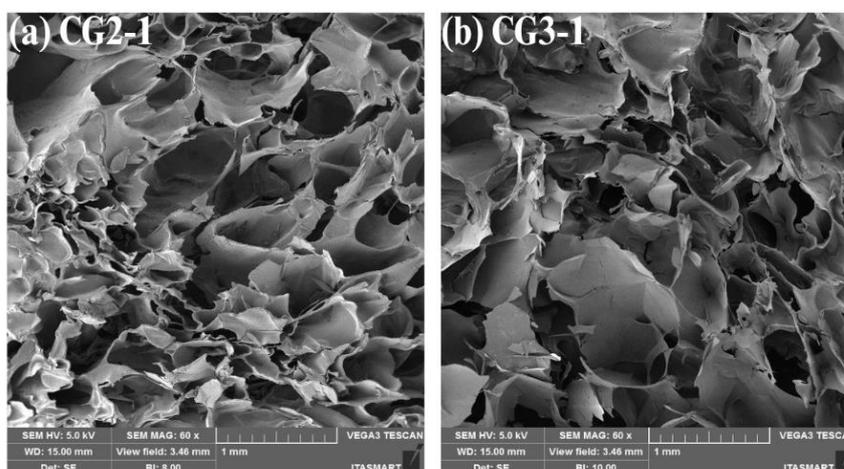
Fonte: Autor

Conforme evidenciado pelas micrografias dos *scaffolds* CG2-1 e CG3-1 (Figura 58), é possível observar em ambos a presença de considerável quantidade de poros interconectados com diâmetros variados. Ao analisar o efeito do aumento da concentração de quitosana de 0,67% (m/v) para 1,33% (m/v) (Tabela 23), pode-se observar que esse acréscimo resultou em um aumento no diâmetro dos poros.

Esse aumento no diâmetro dos poros teve impacto na taxa média de porosidade, elevando-a de $68\% \pm 1\%$ para $79\% \pm 4\%$, apesar do aumento da razão soluto/solvente na solução polimérica do *scaffold*. Esse fenômeno sugere que, nesse contexto, o aumento do diâmetro dos poros pode ter tido uma influência mais significativa na variação da porosidade do que a própria razão soluto/solvente.

No que se refere à taxa média de intumescimento, a adição de quitosana resultou em um expressivo aumento de $600\% \pm 13\%$ para $1873\% \pm 60\%$, representando o triplo de intumescimento. Esse acréscimo pode ser atribuído a diversos fatores. Além do aumento do diâmetro dos poros e da porosidade, que facilitam a difusão da solução PBS no interior do *scaffold*, favorecendo o intumescimento, outro fator relevante pode ser o aumento do número de grupos funcionais hidrofílicos disponíveis com o aumento da concentração de quitosana. Esses grupos funcionais hidrofílicos são responsáveis por melhorar a capacidade de absorção de água do material, o que contribui para o aumento da absorção da solução PBS e, conseqüentemente, afeta a taxa média de intumescimento.

Figura 58 - Comparação das imagens MEV da superfície dos *scaffolds* híbridos de quitosana e gelatina CG2-1 (0,67% (m/v) Ch) e CG3-1 (1,33% (m/v) Ch), com ampliação de 60x



Fonte: Autor

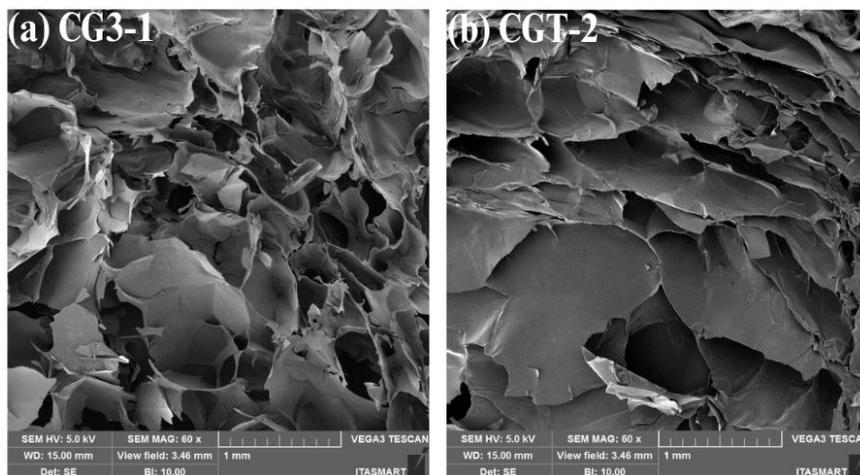
Ao analisar as micrografias dos *scaffolds* CG3-1 e CGT-2 (Figura 59), é possível observar a formação de poros interconectados com diâmetros variados em ambos os casos. Entretanto, ao comparar as duas micrografias, nota-se que nos *scaffolds* CG3-1, sem a presença de tanino, os poros são mais regulares e há uma quantidade maior deles, enquanto nos *scaffolds* CGT-1, com a concentração de 0,17% (m/v) de tanino, há uma redução na quantidade de poros, além deles se tornarem mais irregulares.

Ao correlacionar essas mudanças morfológicas nas micrografias com a taxa média de porosidade, é possível observar que os *scaffolds* apresentam uma redução dessa taxa de $79\% \pm 4\%$ para $72\% \pm 1\%$ (Tabela 23), conforme ocorre a diminuição da quantidade de poros. Além disso, a redução na taxa média de porosidade também pode estar associada à maior concentração de soluto presente nos *scaffolds* CGT-1. Portanto, ambos os fatores, redução do diâmetro dos poros e maior concentração de soluto, contribuem para a diminuição da porosidade.

No caso da taxa média de intumescimento, também é possível observar uma redução de $1873\% \pm 60\%$ para $1659\% \pm 105\%$ com a adição de tanino (Tabela 23). Diversos fenômenos podem ter contribuído para essa redução. O tanino atua de forma semelhante aos reticulantes, favorecendo a rigidez da estrutura polimérica, o que, por sua vez, reduz a capacidade de intumescimento do *scaffold*. Além disso, as alterações na estrutura, como a redução do número de poros e da porosidade, também diminuem a permeabilidade da solução PBS através do *scaffold*, o que afeta negativamente a capacidade de intumescimento. Portanto, esses eventos em conjunto podem ter culminado na redução da taxa de intumescimento.

Adicionalmente, é válido salientar que, apesar da redução da taxa média de intumescimento dos *scaffolds* CG3-1 em relação aos CGT-2, ambos ainda apresentam valores elevados de taxa média de intumescimento. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de possuírem maiores concentrações de quitosana, o que aumenta a disponibilidade de seus grupos hidrofílicos que possuem afinidade pela água e, conseqüentemente, impulsionam a taxa de intumescimento.

Figura 59 - Comparação das imagens MEV da superfície dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG3-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-2), com concentração de quitosana de 0,67% (m/v), ampliado 60x

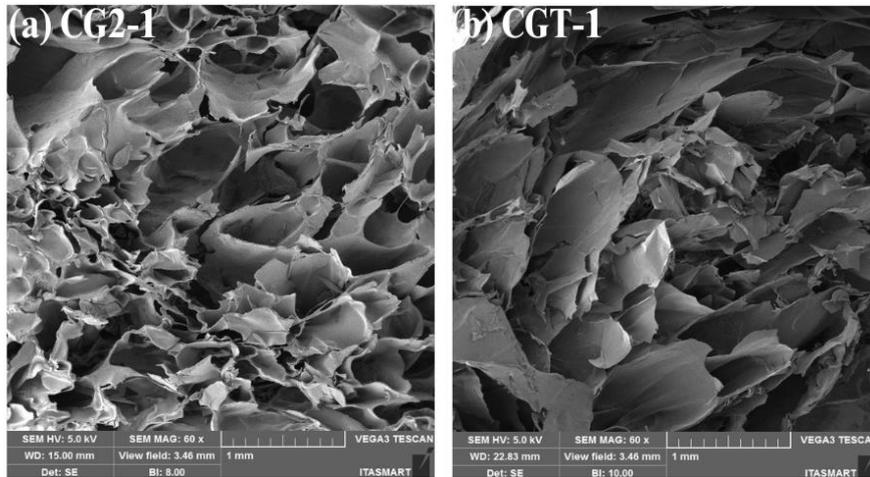


Fonte: Autor

Na Figura 60, pode-se observar as micrografias dos *scaffolds* CG2-1 e CGT-1, que evidenciam a formação de uma estrutura porosa interconectada com variação do diâmetro dos poros em ambos os casos. Nos *scaffolds* CG2-1, sem adição de tanino, os poros são mais regulares e apresentam diâmetros menores. No entanto, nos *scaffolds* CGT-1, em que foi adicionado 0,17% (m/v) de tanino, é possível observar a diminuição do número de poros, ao mesmo tempo que seus diâmetros se tornam maiores.

O aumento do diâmetro dos poros influenciou positivamente a taxa média de porosidade, que apresentou um substancial aumento de $68\% \pm 1\%$ para $81\% \pm 1\%$ nos *scaffolds* CG2-1 e CGT-1, respectivamente (conforme Tabela 23). Esse aumento ocorreu apesar do aumento da quantidade de soluto presente na composição do *scaffold* CGT-1, o que normalmente reduziria a porosidade dos *scaffolds*. Contudo, esse mesmo aumento também foi observado na taxa média de intumescimento, que subiu de $600\% \pm 13\%$ para $1380\% \pm 89\%$. Esse incremento pode ser atribuído ao aumento do diâmetro dos poros e da porosidade, que favorecem a difusão da solução PBS no interior do *scaffold*, permitindo assim uma maior retenção de líquido e, conseqüentemente, aumentando a taxa média de intumescimento.

Figura 60 - Comparação das imagens MEV da superfície dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG2-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-1), com concentração de quitosana de 1,33% (m/v), ampliado 60x



Fonte: Autor

5.3.5 Adsorção de proteínas

Adsorção de proteínas é o processo precursor da adesão celular, sua ausência é o indicativo inicial da ineficiência do *scaffold* de promover o crescimento celular e a sobrevivência dos tecidos (ABDAL-HAY *et al.*, 2022). Esse é o primeiro evento que ocorre quando o material entra em contato com o sangue, formando uma camada de proteína ao redor do implante (PARAU *et al.*, 2023). Após a implantação, as proteínas do plasma sanguíneo, como a albumina, interagem com a superfície do material implantado, resultando em adsorção e modificação da superfície do material. O fluido corporal tende a se localizar na superfície onde as proteínas foram adsorvidas, ao invés da superfície original. A adsorção de proteínas pode ocorrer por diferentes mecanismos, como interação eletrostática, ligação de hidrogênio e de Van der Waals. Fatores como força iônica, concentração da proteína, temperatura da solução (SARKAR; KUNDU, 2023), intumescimento, propriedades químicas e topográficas da superfície do material interferem na adsorção de proteínas (DEPAN; MISRA, 2013). Além disso, a hidrofobicidade e hidroflicidade dos materiais também afetam a adsorção de proteínas (MOULOD; MOGHADDAM, 2022). Em materiais hidrofílicos, o custo energético para desidratar a superfície e permitir que as moléculas de proteína se liguem é maior em comparação aos materiais hidrofóbicos (VOGLER, 2012).

A albumina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, representando cerca de 50% das proteínas séricas (SAINZ *et al.*, 2020). Sua estrutura é esférica, com dimensões aproximadas de 4 nm x 4 nm x 14 nm. Essa proteína desempenha uma função fisiológica essencial ao manter a pressão osmótica e o pH sanguíneo, além de atuar no transporte de diversos compostos endógenos e exógenos, incluindo ácidos graxos, metais, aminoácidos, esteróides e drogas (KOPAC; BOZGEYIK; YENER, 2008). A BSA possui um ponto isoelétrico em torno de pH 4,7. Em pH acima desse valor, a BSA apresenta uma carga negativa, enquanto em pH abaixo do ponto isoelétrico, ela adquire uma carga positiva (SARKAR; KUNDU, 2023). Para o teste de adsorção de proteína foi utilizada a BSA como molécula modelo.

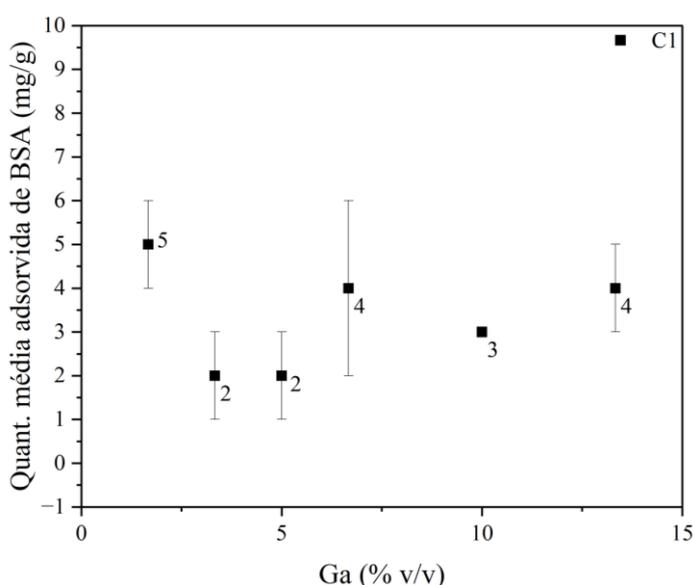
Não foi possível determinar a capacidade de adsorção de proteínas dos *scaffolds* de gelatina (G) e dos de gelatina/tanino (GT) devido à baixa estabilidade do primeiro, enquanto para a segunda classe o impeditivo foi a liberação de moléculas de tanino na solução de BSA. É válido salientar que a molécula do tanino absorve radiação no mesmo comprimento de onda do BSA, interferindo assim na análise por espectrofotometria UV-vis.

Para os *scaffolds* C1 (Figura 61), foi observada a maior capacidade de adsorção de proteínas no material preparado com a menor quantidade de glutaraldeído de 1,67% (v/v). Resultados semelhantes foram relatados por Mondal, Li e Wang (2015), em seus estudos com grânulos de hidrogel de quitosana. Eles observaram que o aumento da concentração de glutaraldeído de 0,2% para 0,5%, 0,7% e 1% resultou em uma redução na capacidade de adsorção da proteína BSA, diminuindo de 96,4 mg/g para aproximadamente 60 mg/g, 50 mg/g e 40 mg/g, respectivamente, após 24 h de incubação.

A redução da capacidade de adsorção de BSA com o aumento da concentração de glutaraldeído pode ser explicada considerando a lei eletrostática de Coulomb, que descreve a energia de atração entre moléculas com cargas distintas, e repulsão entre moléculas carregadas similarmente (VARADWAJ; VARADWAJ; YAMASHITA, 2018). Nesse contexto, a solução BSA foi preparada utilizando a solução PBS com pH 7,3, e em pH acima de 4,7 o BSA apresenta carga negativa, conferindo-lhe, portanto, um caráter aniônico (SARKAR; KUNDU, 2023). Os grupos amino ($-NH_2^+$) presentes na estrutura da quitosana são caracterizados por serem grupos funcionais com carga positiva (YAN *et al.*, 2021). Contudo, quando glutaraldeído é introduzido, estabelece-se uma interação entre o grupo funcional aldeído do glutaraldeído e o grupo amino da quitosana (DOUSTDAR; OLAD; GHORBANI, 2022b). Essa interação resulta na diminuição da disponibilidade dos grupos

amino carregados positivamente. Com base nessas observações, é possível concluir que a adição de glutaraldeído promove um aumento do caráter aniônico dessa molécula. Dessa forma, a modificação da carga superficial reduz a atração entre as moléculas de quitosana e as moléculas de BSA, resultando na diminuição da capacidade de adsorção de BSA nos *scaffolds*.

Figura 61 - Quantidade média adsorvida de BSA nos *scaffolds* de quitosana pura (C1): C1-1 (1,67% (v/v) Ga), C1-2 (3,33% (v/v) Ga), C1-3 (5,00% (v/v) Ga), C1-4 (6,67% (v/v) Ga), C1-5 (10,00% (v/v) Ga) e C1-6 (13,33% (v/v) Ga)



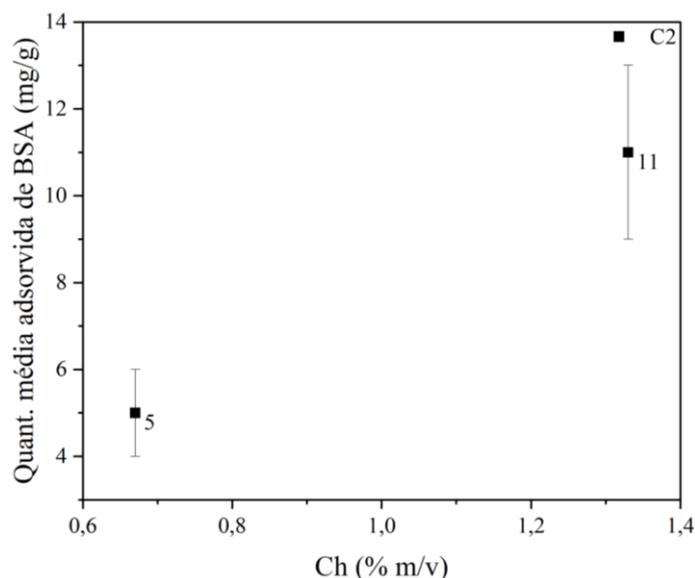
Fonte: Autor

Os *scaffolds* C2 (Figura 62) exibiram aumento da adsorção de proteínas de 5 ± 1 mg/g para 11 ± 2 mg/g, com o aumento da concentração de quitosana de 0,67% (m/v) a 1,33% (m/v). No estudo de Liu *et al.* (2021), foram obtidos resultados semelhantes, em que a inclusão de quitosana em diferentes proporções (10%, 20%, 30%, 40% e 50%, em massa) em *scaffolds* híbridos de quitosana e celulose resultou em um aumento na quantidade de BSA adsorvida. Após 10 h de teste, a quantidade adsorvida aumentou de cerca de 40 mg/g para 200 mg/g com o aumento do teor de quitosana.

O aumento da quantidade adsorvida de BSA nos *scaffolds* C2 com o aumento da concentração de quitosana, pode ser atribuído ao caráter catiônico da quitosana, que promove uma maior atração entre a quitosana carregada positivamente e a molécula de BSA carregada negativamente, resultando em uma maior capacidade de adsorção de BSA nos

materiais. Essa interação eletrostática entre as cargas opostas favorece a adsorção de BSA na superfície dos *scaffolds*, levando a um aumento na quantidade adsorvida à medida que a concentração de quitosana é incrementada (MONDAL; LI; WANG, 2015).

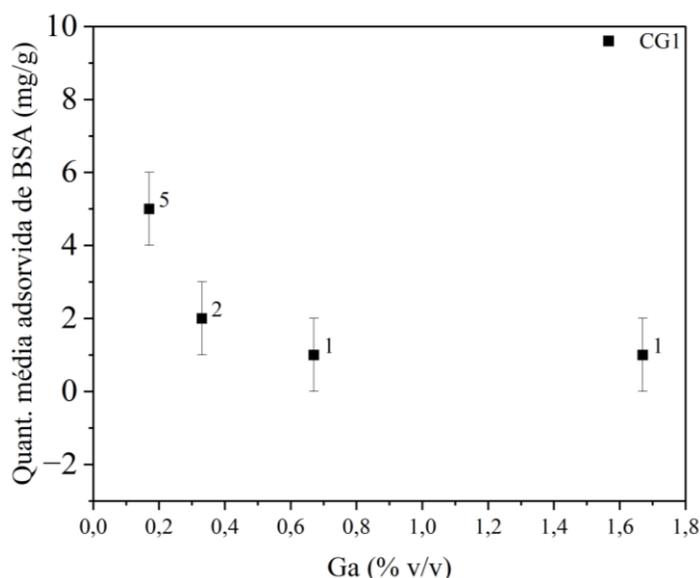
Figura 62 - Quantidade média adsorvida de BSA nos *scaffolds* de quitosana pura (C2): C2-1 (0,67% (m/v) Ch) e C2-2 (1,33% (m/v) Ch)



Fonte: Autor

A adição de glutaraldeído nos *scaffolds* CG1 (Figura 63) provocou a diminuição da adsorção de proteínas de 5 ± 1 mg/g para 1 ± 1 mg/g nas respectivas concentrações de 0,17% (v/v) e 1,67% (v/v). Essa redução na quantidade adsorvida de BSA com o aumento da concentração de glutaraldeído, como observado anteriormente nos *scaffolds* C1, novamente pode ser atribuída a redução das cargas positivas nas moléculas de quitosana e gelatina durante a etapa de reticulação com glutaraldeído. Portanto, a reticulação com glutaraldeído impacta negativamente na adsorção de BSA nos *scaffolds* CG1, devido à modificação das propriedades de carga da superfície do material.

Figura 63 - Quantidade média adsorvida de BSA nos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG1): CG1-1 (0,17% (v/v) Ga), CG1-2 (0,33% (v/v) Ga), CG1-3 (0,67% (v/v) Ga) e CG1-4 (1,67% (v/v) Ga)



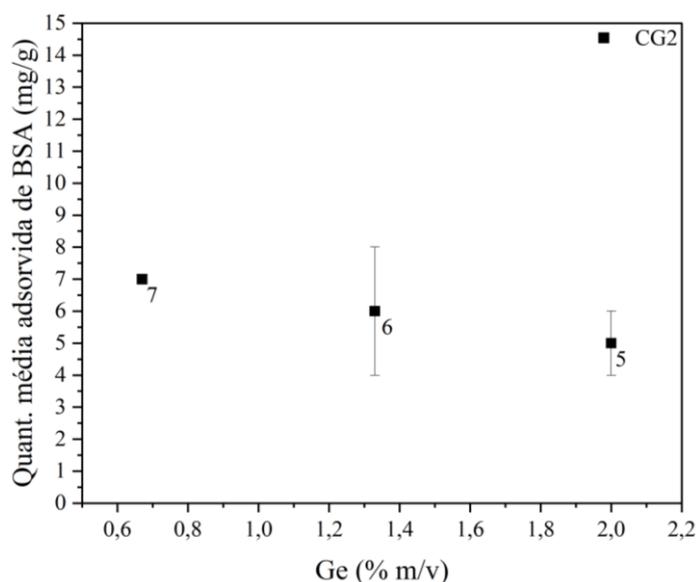
Fonte: Autor

Conforme demonstrado na Figura 64, nos *scaffolds* CG2, a adição de gelatina impactou na adsorção de proteínas, resultando em uma redução da quantidade de proteína adsorvida de 7 ± 0 mg/g para 5 ± 1 mg/g.

A redução da adsorção de proteínas possivelmente decorreu da repulsão de cargas entre as moléculas de gelatina e proteína. A gelatina empregada neste estudo é do tipo B, com ponto isoelétrico na faixa de pH 4,8 a pH 5,1 (VAN VLIERBERGHE *et al.*, 2014). Provavelmente, como o teste de adsorção de proteínas é realizado em solução contendo BSA com pH aproximado de 7,3, ou seja, acima do ponto isoelétrico da gelatina, esta, ao entrar em contato com essa solução, adquire uma carga negativa. Dado que a molécula de proteína (BSA) também possui carga negativa, surge uma repulsão entre essas moléculas.

Além disso, conforme observado nas micrografias dos *scaffolds* CG2, é possível identificar as alterações morfológicas resultantes da adição de gelatina. Embora tenha ocorrido um aumento na quantidade de poros, houve uma significativa redução em seus diâmetros. Essa redução pode ter contribuído para a dificuldade da molécula de BSA em adsorver na superfície do *scaffold*, uma vez que pode interferir na etapa de difusão do BSA.

Figura 64 - Quantidade média adsorvida de BSA nos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG2): CG2-1 (0,67% (m/v) Ge), CG2-2 (1,33% (m/v) Ge) e CG2-3 (2,00% (m/v) Ge)

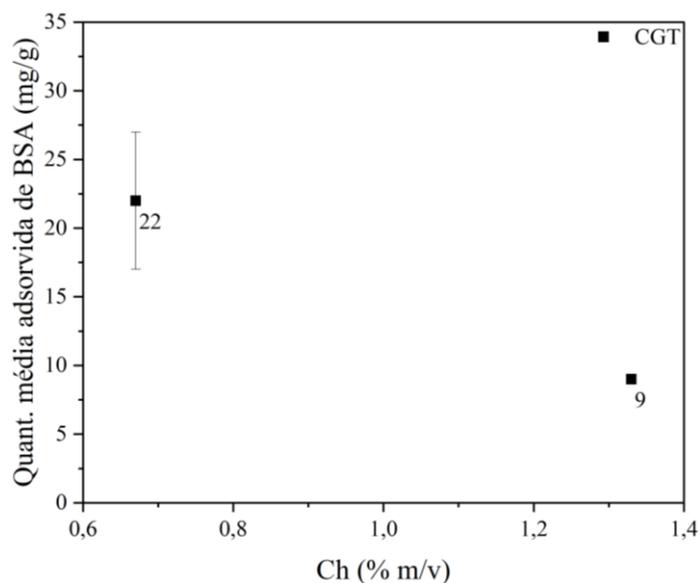


Fonte: Autor

Na Figura 65, é possível observar o efeito da adição de quitosana nos *scaffolds* CGT. Quando a concentração de quitosana aumentou de 0,67% (m/v) para 1,33% (m/v), a quantidade média de BSA adsorvida reduziu de 22 ± 5 mg/g para 9 ± 0 mg/g. Nesse contexto, a diminuição na adsorção de proteínas pode ser atribuída à hidrofiliicidade da quitosana, que, em muitos trabalhos é apontada como fator negativo para a adsorção de proteínas (MESQUIDA *et al.*, 2018).

Ao comparar os *scaffolds* CGT com os C2 contendo quitosana pura, observa-se uma diferença significativa na adsorção de proteínas. Nos *scaffolds* C2, o aumento da concentração de quitosana resultou em uma maior adsorção de proteínas, o que difere do comportamento observado nos *scaffolds* CGT. Essa disparidade pode ser atribuída à composição química e às interações entre os materiais presentes em cada tipo de *scaffold*.

Figura 65 - Quantidade média adsorvida de BSA nos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT): CGT-1 (0,67% (m/v) Ch) e CGT-2 (1,33% (m/v) Ch)

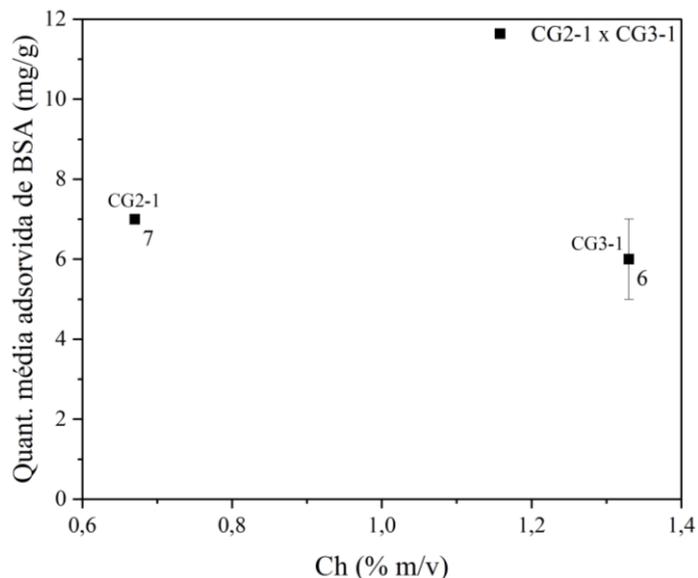


Fonte: Autor

Ao comparar a quantidade média de BSA adsorvida nos *scaffolds* CG2-1 e CG3-1 (Figura 66), com concentrações de quitosana de 0,67% (m/v) e 1,33% (m/v), respectivamente, nota-se que houve redução da adsorção de proteínas de 7 ± 0 mg/g para 6 ± 1 mg/g.

De forma semelhante à análise anterior, observou-se uma diminuição na adsorção de proteínas à medida que a concentração de quitosana aumentou. É possível inferir que a hidrofiliçidade da quitosana novamente teve um papel significativo nessa redução.

Figura 66 - Comparação da quantidade média adsorvida de BSA nos *scaffolds* híbridos de quitosana e gelatina CG2-1 (0,67% (m/v) Ch) e CG3-1 (1,33% (m/v) Ch)

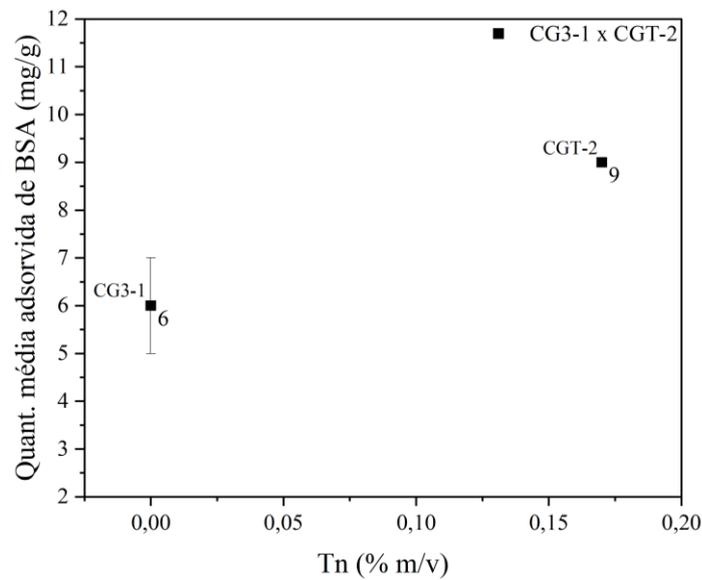


Fonte: Autor

Ao comparar os *scaffolds* CG3-1 e CGT-2 (Figura 67), com concentração de 0% (m/v) e 0,17% (m/v) de tanino, respectivamente, observa-se que a adição de tanino resultou em um aumento na adsorção de proteínas, de 6 ± 1 mg/g para 9 ± 0 mg/g.

Geralmente a interação entre tanino e BSA pode envolver efeitos hidrofóbicos e pontes de hidrogênio. Tal interação é influenciada pela concentração relativa de tanino e proteína, composição do solvente, força iônica, pH e presença de outros co-substratos como polissacarídeos (CARVALHO; MATEUS; DE FREITAS, 2004). Dessa forma, é possível inferir que a presença de tanino contribui positivamente para o aumento na adsorção de BSA nos *scaffolds*.

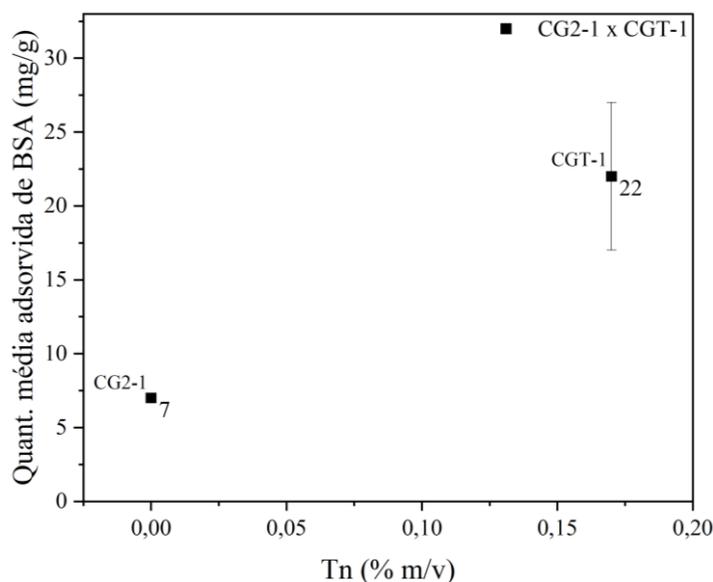
Figura 67 - Comparação da quantidade média adsorvida de BSA nos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG3-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-2), com concentração de quitosana de 0,67% (m/v)



Fonte: Autor

Ao comparar os *scaffolds* CG2-1 e CGT-1 (Figura 68), é possível notar que a adição de tanino resultou em um significativo aumento na adsorção de BSA. Os *scaffolds* CG2-1, sem a presença de tanino, apresentaram valores de adsorção de 7 ± 0 mg/g, enquanto os *scaffolds* CGT-1, contendo 0,17% (m/v) de tanino, mostraram uma adsorção de proteínas de 22 ± 5 mg/g. Esse aumento significativo na adsorção pode ser atribuído à alta capacidade de adsorção já reconhecida do xerogel de tanino.

Figura 68 - Comparação da quantidade média adsorvida de BSA nos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG2-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-1), com concentração de quitosana de 1,33% (m/v)



Fonte: Autor

Complementarmente, no geral os *scaffolds* de quitosana (C1 e C2) exibiram melhores resultados de adsorção de proteínas se comparados aos *scaffolds* de gelatina (CG1 e CG2). Esse resultado já era esperado, uma vez que a gelatina é mais hidrofílica que a quitosana (CHENG *et al.*, 2012). No entanto, os melhores resultados de adsorção de proteínas foram exibidos pelos *scaffolds* CGT, evidenciando a elevada capacidade de adsorção de proteínas do xerogel de tanino.

Adicionalmente, os *scaffolds* CG1, com concentração de glutaraldeído variando entre 0,17% (v/v) e 1,67% (v/v), apresentaram média de adsorção de proteínas de 2 mg/g, enquanto os *scaffolds* CG2 e CG3, com teores de glutaraldeído de 0,08% (v/v), apresentaram valores médios de adsorção de proteínas de 6 mg/g. Isso demonstra o impacto negativo da adição de glutaraldeído na adsorção de proteínas dos *scaffolds*.

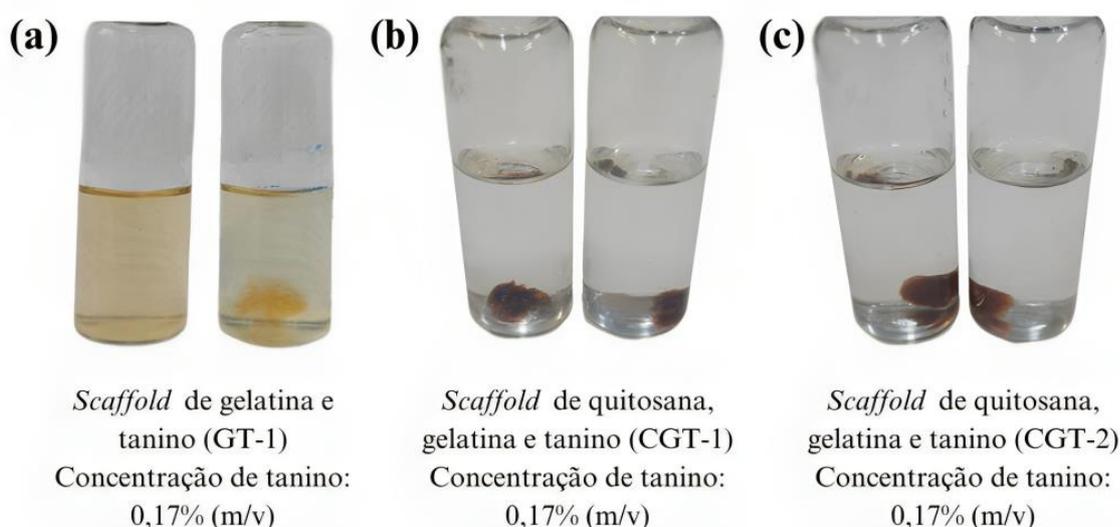
Por fim, é importante ressaltar que nos *scaffolds* GT, compostos apenas por gelatina e tanino, não foi possível avaliar a quantidade média adsorvida de proteína, devido à dispersão das moléculas de tanino não imobilizadas na rede tridimensional na solução, o que dificultou a leitura da absorbância das amostras.

No entanto, nos *scaffolds* CGT, que contêm quitosana, gelatina e tanino, observou-se que não houve liberação significativa de tanino na solução, possibilitando a medição da

quantidade média adsorvida de proteína. Esses resultados sugerem que a adição de quitosana aos *scaffolds* facilitou a imobilização das moléculas de tanino na estrutura do *scaffold*.

A Figura 69 apresenta a diferença na coloração da solução entre o *scaffold* GT-1 (composto por gelatina e tanino) e os *scaffolds* CGT-1 e CGT-2 (compostos por gelatina, quitosana e tanino), todos com concentração de 0,17% (m/v) de tanino, após 21 dias de incubação em solução PBS a 37 °C. Essa diferença de coloração evidencia a retenção do tanino nos *scaffolds* CGT em comparação ao *scaffold* GT-1, corroborando a maior interação e imobilização do tanino na presença da quitosana.

Figura 69 - Aspecto da solução PBS após 21 dias de incubação a 37 °C, com volume de solução de 25 mL, dos *scaffolds* compostos por gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (a) GT-1 e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (b) CGT-1 e (c) CGT-2



Fonte: Autor

5.3.6 Dissolução

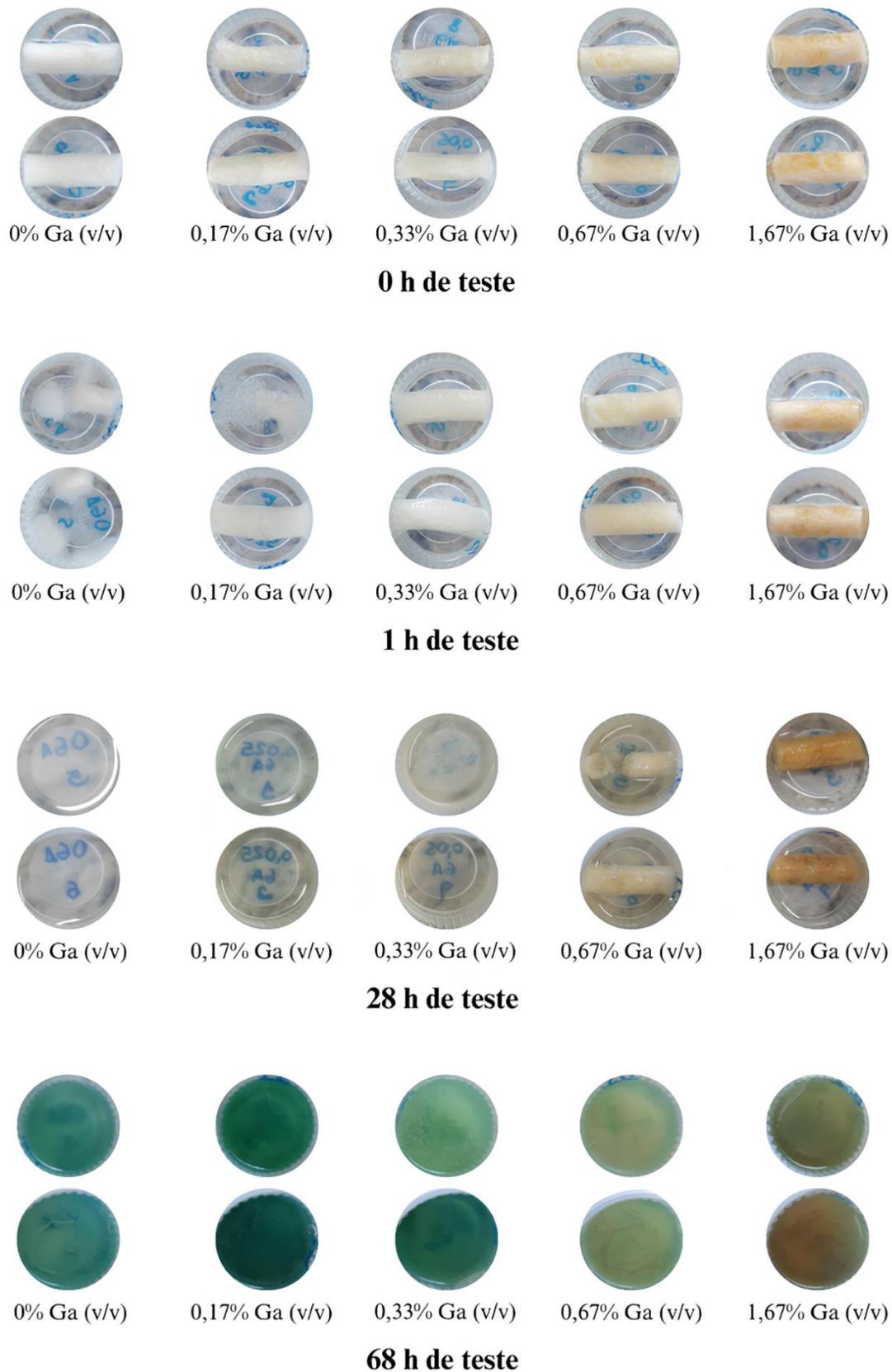
Na engenharia de tecidos a dissolução é uma importante característica dos *scaffolds*, sendo influenciada pelas propriedades físico-químicas, morfológicas e mecânicas (ESMAEILI *et al.*, 2022). A taxa de dissolução dos *scaffolds* deve ser diretamente proporcional a de regeneração tecidual (DOUSTDAR; OLAD; GHORBANI, 2022a). A rápida dissolução ocasiona o colapso da estrutura porosa prejudicando o crescimento celular

e a estabilidade do implante (ZHAO *et al.*, 2022b), enquanto a lenta pode desencadear um processo inflamatório (DOUSTDAR; OLAD; GHORBANI, 2022b).

Scaffolds à base de gelatina possuem taxa de dissolução elevada e propriedades mecânicas reduzidas (ZHANG *et al.*, 2022), o mesmo se aplica aos de quitosana (ZHANG *et al.*, 2023c). Por isso, reticulantes são frequentemente utilizados para melhorar as propriedades mecânicas e biológicas dos polímeros, e o glutaraldeído é um exemplo de reticulante químico que pode interagir com grupos amina ou hidroxila dos polímeros, aprimorando suas propriedades mecânicas e de dissolução (DOUSTDAR; OLAD; GHORBANI, 2022b).

Os *scaffolds* de gelatina (G) não resistiram ao tratamento para remoção dos resíduos de espécies não reagidas devido à baixa estabilidade dos materiais utilizados para a síntese. No entanto, foi realizado um teste de dissolução dos *scaffolds* G sem tratamento. Devido à baixa estabilidade dos materiais, o teste de dissolução foi conduzido de forma observacional, no qual os *scaffolds* foram incubados em 25 mL de solução PBS a 37 °C e retirados para verificação nos tempos de 8 h, 28 h e 68 h, conforme apresentado na Figura 70. Nota-se que os *scaffolds* com maiores concentrações de glutaraldeído resistiram por um período mais prolongado durante o teste, além de exibirem coloração amarelada. Ao final das 68 h de teste, todos os *scaffolds* haviam sofrido dissolução e a solução PBS assumiu uma coloração verde azulada.

Figura 70 - Aspecto dos *scaffolds* de gelatina (G): G-1 (0% (v/v) Ga), G-2 (0,17% (v/v) Ga), G-3 (0,33% (v/v) Ga), G-4 (0,67% (v/v) Ga) e G-5 (1,67% (v/v) Ga), após 0 h, 1 h, 28 h e 68 h de incubação em 25 mL de solução PBS a 37 °C

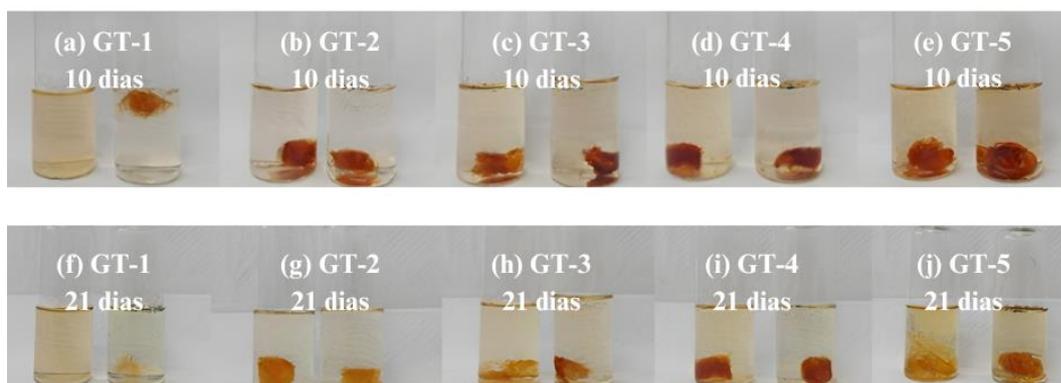


Os *scaffolds* de gelatina/tanino (GT) foram submetidos a incubação por 10 e 21 dias (conforme Figura 71). Observa-se nas imagens que os *scaffolds* com concentrações mais elevadas de tanino apresentaram uma perda de massa menor. Apenas um dos *scaffolds* GT-1, que continha 0,17% (m/v) de tanino, não resistiu ao teste de dissolução de 10 dias, enquanto os demais resistiram até o 21º dia. Resultados semelhantes foram observados ao adicionar tanino em filmes compostos por alginato de sódio/gelatina/poli(álcool vinílico). As concentrações de 0%, 0,5%, 2% e 5% de tanino nos filmes resultou em taxas de dissolução de aproximadamente 64%, 60% 55% e 45%, respectivamente, após 24 h de incubação em água deionizada a 25 °C (LIU *et al.*, 2023).

O tanino, devido aos seus compostos fenólicos, possui a capacidade de interagir com grupos funcionais como amina e hidroxila presentes tanto na gelatina quanto na quitosana, formando ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. Essas interações resultam em uma estrutura mais estável, tornando o material menos suscetível a absorver água e, conseqüentemente, menos propenso à dissolução (ETXABIDE *et al.*, 2022). O aumento da concentração de tanino promove um maior grau de reticulação da cadeia polimérica, o que resulta na redução da taxa de dissolução do material.

Adicionalmente, é importante destacar que a redução do intumescimento observado nos *scaffolds* GT, à medida que aumentou a concentração do tanino, pode ter influenciado na redução da taxa média de dissolução desses mesmos *scaffolds*. Isso ocorre porque a diminuição na capacidade de absorção de água resulta em um menor grau de solubilidade do material. Dessa forma, as propriedades de intumescimento e dissolução estão interligadas, e a modificação de uma propriedade pode afetar diretamente a outra (LINJU; REKHA, 2023).

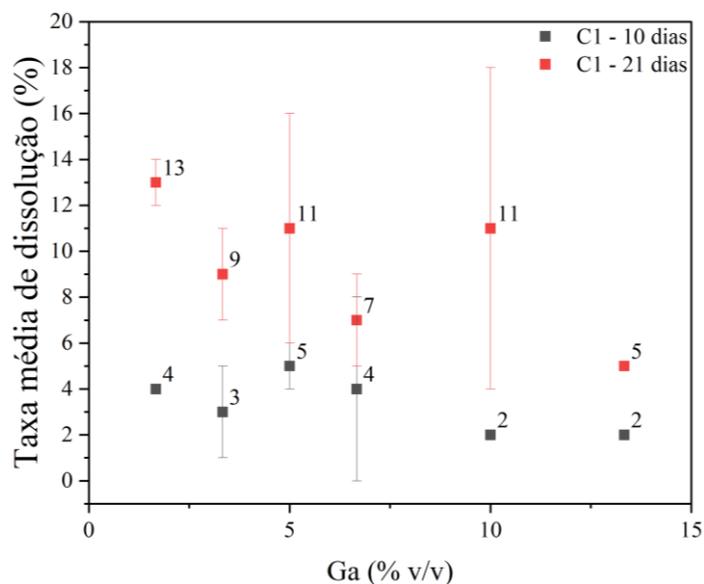
Figura 71 - Aspecto dos *scaffolds* híbridos de gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (GT): (a) GT-1 (0,17% (m/v) Tn), (b) GT-2 (0,33% (m/v) Tn), (c) GT-3 (0,50% (m/v) Tn), (d) GT-4 (0,67% (m/v) Tn) e (e) GT-5 (0,83% (m/v) Tn), após 10 dias de incubação e (f) GT-1 (0,17% (m/v) Tn), (g) GT-2 (0,33% (m/v) Tn), (h) GT-3 (0,50% (m/v) Tn), (i) GT-4 (0,67% (m/v) Tn) e (j) GT-5 (0,83% (m/v) Tn), após 21 dias de incubação, imersos em 25 mL de solução PBS a 37 °C



Fonte: Autor

A taxa de dissolução dos *scaffolds* C1 foi reduzida com o aumento do teor de agente reticulante na etapa de síntese, variando de $4\% \pm 0\%$ para $2\% \pm 0\%$ com 10 dias de incubação e de $13\% \pm 1\%$ para $5\% \pm 0\%$ com 21 dias de incubação (Figura 72). Essa melhoria pode ser atribuída à adição de agentes de reticulação na matriz polimérica, que estabelecem ligações físicas ou químicas entre as cadeias, contribuindo para o aprimoramento das características mecânicas, biológicas e de dissolução dos *scaffolds* (DOUSTDAR; OLAD; GHORBANI, 2022b). Além disso, a taxa média de intumescimento dos *scaffolds* C1 também foi afetada pela adição de glutaraldeído, apresentando redução conforme a concentração desse reagente aumentou. Essa redução na taxa de intumescimento também pode ter influenciado na diminuição da taxa média de dissolução dos *scaffolds* C1.

Figura 72 - Taxa média de dissolução dos *scaffolds* de quitosana pura (C1): C1-1 (1,67% (v/v) Ga), C1-2 (3,33% (v/v) Ga), C1-3 (5,00% (v/v) Ga), C1-4 (6,67% (v/v) Ga), C1-5 (10,00% (v/v) Ga) e C1-6 (13,33% (v/v) Ga), após 10 e 21 dias de incubação

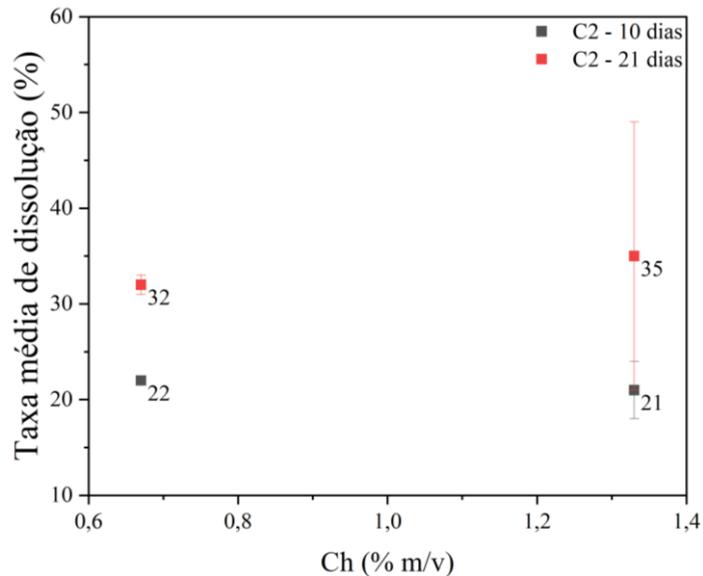


Fonte: Autor

A adição de quitosana não afetou significativamente a taxa de dissolução dos *scaffolds* C2 (Figura 73), o aumento da concentração de 0,67% (m/v) para 1,33% (m/v) resultou em taxas médias de dissolução de $22\% \pm 0\%$ para $21\% \pm 3\%$, após 10 dias de teste e de $32\% \pm 1\%$ para $35\% \pm 14\%$, após 21 dias de incubação. Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Hsieh *et al.* (2007), nos quais três *scaffolds* de quitosana pura com concentrações de 1%, 2% e 3% foram comparados. Observou-se que a taxa de dissolução desses *scaffolds* variou muito pouco em relação à variação da concentração de quitosana.

Além disso, é importante ressaltar que novamente foi observada uma correlação entre a taxa média de intumescimento e a taxa média de dissolução. Nos *scaffolds* C2, a incorporação da quitosana resultou em uma leve redução na taxa média de intumescimento, sem provocar variações significativas.

Figura 73 - Taxa média de dissolução dos *scaffolds* de quitosana pura (C2): C2-1 (0,67% (m/v) Ch) e C2-2 (1,33% (m/v) Ch), após 10 e 21 dias de incubação



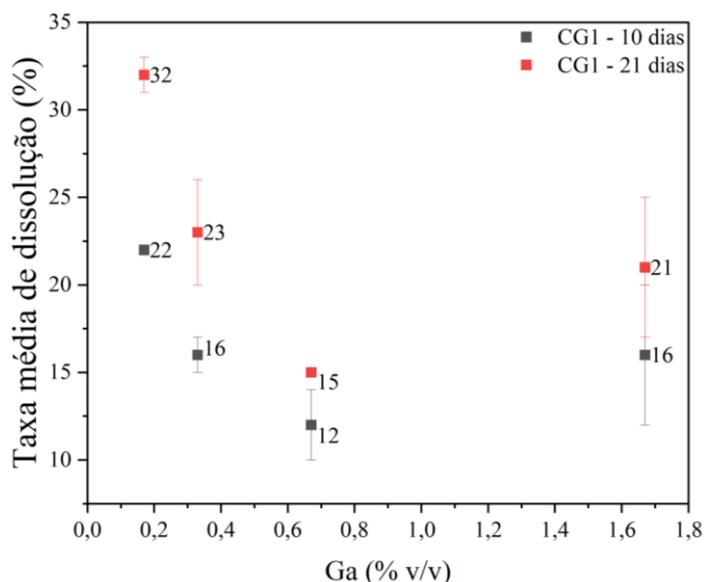
Fonte: Autor

Nos testes de dissolução realizados, a adição de glutaraldeído aos *scaffolds* CG1 (Figura 74) resultou na redução da taxa de dissolução ($22\% \pm 0\%$ para $16\% \pm 4\%$) após 10 dias de incubação, sendo a taxa de dissolução maior após 21 dias de incubação ($32\% \pm 1\%$ para $21\% \pm 4\%$). Conforme descrito por Yahia *et al.* (2023), a taxa de dissolução dos *scaffolds* é influenciada pelo grau de reticulação, sendo que um aumento na extensão da reticulação resulta em uma redução na taxa de dissolução. Em seu estudo, eles descobriram que maiores tempos de reticulação, que correspondem a maiores concentrações de glutaraldeído, reduziram a taxa de dissolução dos *scaffolds*. Foi observado que a imersão dos *scaffolds* em solução de glutaraldeído por 1 minuto, 5 minutos e 15 minutos resultou em uma redução progressiva na taxa de dissolução. As taxas de dissolução observadas foram de $8,5\% \pm 1,1\%$, $2,7\% \pm 0,9\%$ e $1,9\% \pm 1,2\%$, respectivamente.

Adicionalmente, nos *scaffolds* CG1, foram observadas divergências entre as taxas médias de intumescimento e dissolução. Enquanto a taxa média de intumescimento aumentou com o acréscimo da concentração de glutaraldeído, a taxa média de dissolução apresentou uma redução. Portanto, é possível concluir que nos *scaffolds* CG1, o fator

preponderante que contribuiu para a redução da taxa média de dissolução foi a adição do reticulante, neste caso, o glutaraldeído.

Figura 74 - Taxa média de dissolução dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG1): CG1-1 (0,17% (v/v) Ga), CG1-2 (0,33% (v/v) Ga), CG1-3 (0,67% (v/v) Ga) e CG1-4 (1,67% (v/v) Ga), após 10 e 21 dias de incubação



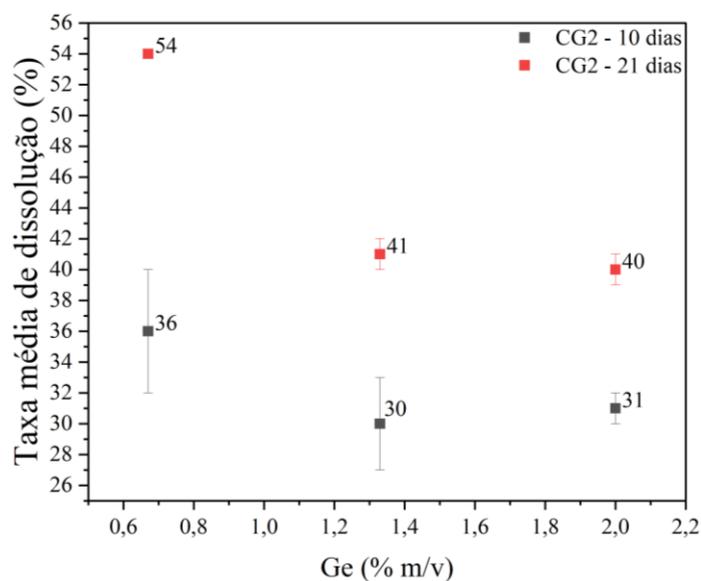
Fonte: Autor

Nos *scaffolds* CG2 (Figura 75) o aumento da concentração de gelatina diminuiu a taxa de dissolução de $36\% \pm 4\%$ para $31\% \pm 1\%$ com 10 dias de incubação e de $54\% \pm 0\%$ para $40\% \pm 1\%$ com 21 dias. De acordo com um estudo conduzido por Wu *et al.* (2010), a adição de gelatina resultou em uma redução na taxa de dissolução dos *scaffolds*. Os resultados indicaram que os *scaffolds* contendo 1% de gelatina apresentaram uma taxa de dissolução de 94,9% após 18 dias, enquanto aqueles com 5% de gelatina apresentaram uma taxa de dissolução de 58,8% para o mesmo período de tempo.

As propriedades morfológicas e a composição do *scaffold* têm um impacto significativo na taxa de dissolução (ESMAEILI *et al.*, 2022). Ao analisar as micrografias obtidas através do MEV dos *scaffolds* CG2, fica evidente que a adição de gelatina resultou em uma redução substancial no diâmetro dos poros. Além disso, a taxa média de porosidade seguiu a mesma tendência de redução com a adição de gelatina, diminuindo de $68\% \pm 1\%$ para $54\% \pm 1\%$.

A partir desses dados, é possível inferir que as alterações nas propriedades morfológicas dos *scaffolds* CG2, devido à incorporação de gelatina, afetaram a capacidade de permeabilidade e a área de contato da solução PBS no interior do *scaffold*, o que, por sua vez, influenciou na taxa média de dissolução. A redução do diâmetro dos poros e da porosidade do material pode ter dificultado a entrada de solução PBS e, conseqüentemente, retardado a dissolução do *scaffold*.

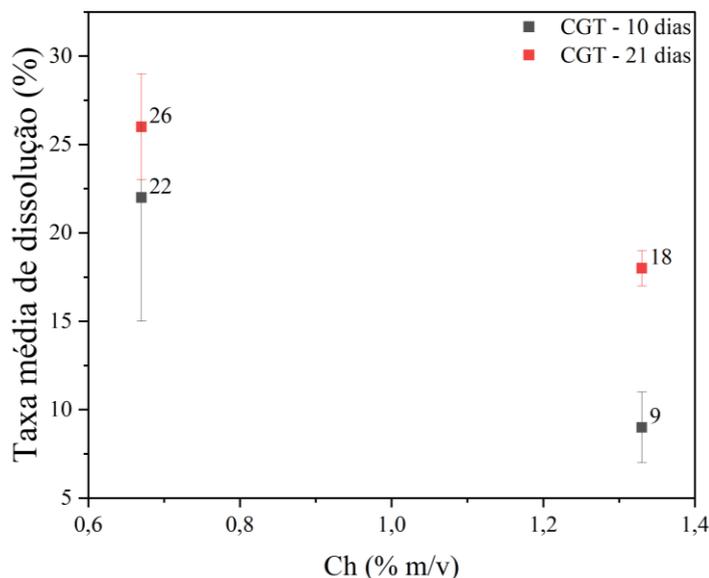
Figura 75 - Taxa média de dissolução dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG2): CG2-1 (0,67% (m/v) Ge), CG2-2 (1,33% (m/v) Ge) e CG2-3 (2,00% (m/v) Ge), após 10 e 21 dias de incubação



Fonte: Autor

Ao analisar os resultados de taxa de dissolução dos *scaffolds* CGT (Figura 76), é evidente que o aumento da concentração de quitosana, de 0,67% (m/v) para 1,33% (m/v), provocou uma redução na taxa de dissolução de $22\% \pm 7\%$ para $9\% \pm 2\%$ após 10 dias de incubação, e de $26\% \pm 3\%$ para $18\% \pm 1\%$ após 21 dias de incubação, respectivamente.

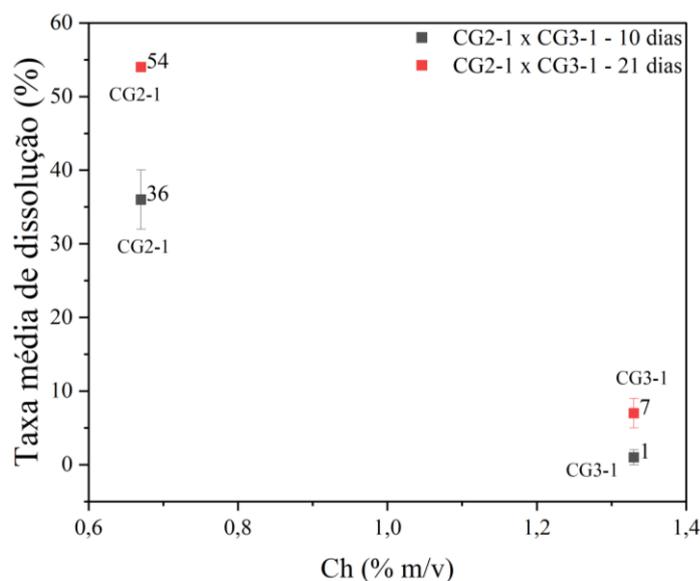
Figura 76 - Taxa média de dissolução dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT): CGT-1 (0,67% (m/v) Ch) e CGT-2 (1,33% (m/v) Ch), após 10 e 21 dias de incubação



Fonte: Autor

Ao comparar os *scaffolds* CG2-1 e CG3-1 (Figura 77), é notável que o aumento da concentração de quitosana, de 0,67% (m/v) para 1,33% (m/v), resultou em uma significativa redução na taxa média de dissolução de $36\% \pm 4\%$ para $1\% \pm 1\%$ após 10 dias de incubação, e de $54\% \pm 0\%$ para $7\% \pm 2\%$ após 21 dias de incubação, respectivamente. Esse comportamento é semelhante ao observado nos *scaffolds* CGT. Portanto, esse resultado pode ser atribuído à associação da quitosana com a gelatina nos *scaffolds* híbridos. Aumentar a concentração de quitosana nesses *scaffolds* resulta em uma diminuição da taxa de dissolução, uma vez que a quitosana possui menor tendência à dissolução em comparação com a gelatina. Adicionalmente, a tendência de dissolução da gelatina em relação à quitosana pode ser evidenciada ao comparar os *scaffolds* de gelatina pura (G) com os de quitosana pura (C1 e C2). Os *scaffolds* de gelatina pura, mesmo após o processo de reticulação com glutaraldeído, não suportaram o tratamento para retirada de materiais não reagidos de glutaraldeído, e após 68 h do teste de dissolução já haviam todos degradado totalmente. Em contraste, os *scaffolds* de quitosana pura (C1 e C2) resistiram ao tratamento para a remoção de materiais não reagidos de glutaraldeído e ácido acético e ainda mantiveram sua integridade após 21 dias do teste de dissolução.

Figura 77 - Comparação da taxa média de dissolução dos *scaffolds* híbridos de quitosana e gelatina CG2-1 (0,67% (m/v) Ch) e CG3-1 (1,33% (m/v) Ch), após 10 e 21 dias de incubação



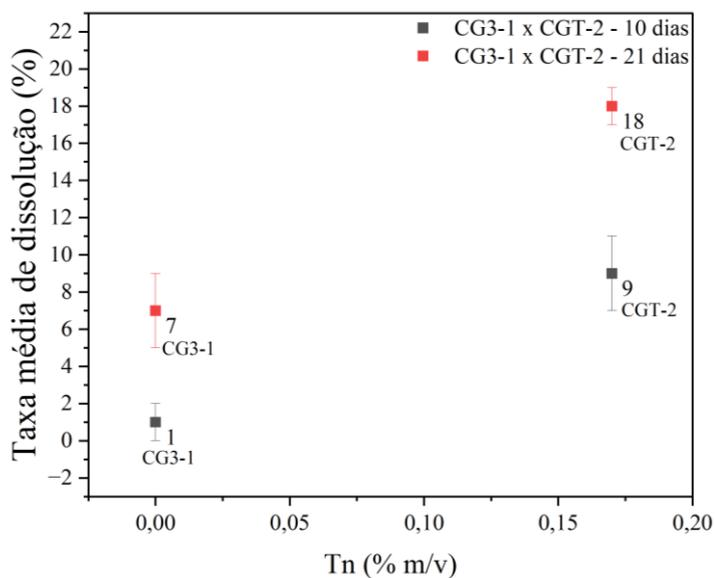
Fonte: Autor

Ao comparar os *scaffolds* CG3-1 (sem tanino) com os CGT-2 contendo 0,17% (m/v) de tanino (conforme Figura 78), observou-se que a adição de tanino resultou em um aumento significativo na taxa de dissolução. Após 10 dias de incubação, a taxa de dissolução aumentou de 1% \pm 1% para 9% \pm 2%, e após 21 dias de incubação, a taxa de dissolução aumentou de 7% \pm 2% para 18% \pm 1%. Esse resultado é contraintuitivo, considerando que a adição de tanino geralmente leva à reticulação da cadeia polimérica, tornando o material mais estável e melhorando suas propriedades mecânicas, o que, por sua vez, reduziria a taxa de dissolução.

Além disso, os resultados de taxa média de intumescimento e taxa média de porosidade também apresentaram redução com a adição de tanino. Esses dois fatores são conhecidos por influenciar a taxa de dissolução, e, portanto, a adição de tanino deveria teoricamente ter reduzido a taxa de dissolução dos *scaffolds* CGT-2.

No entanto, é válido ressaltar que os *scaffolds* CG3-1 apresentaram as menores taxas médias de dissolução, mesmo em comparação com os de quitosana pura (C1 e C2), que possuem concentrações 20 vezes maiores de glutaraldeído, conhecido por reduzir a taxa de dissolução dos materiais.

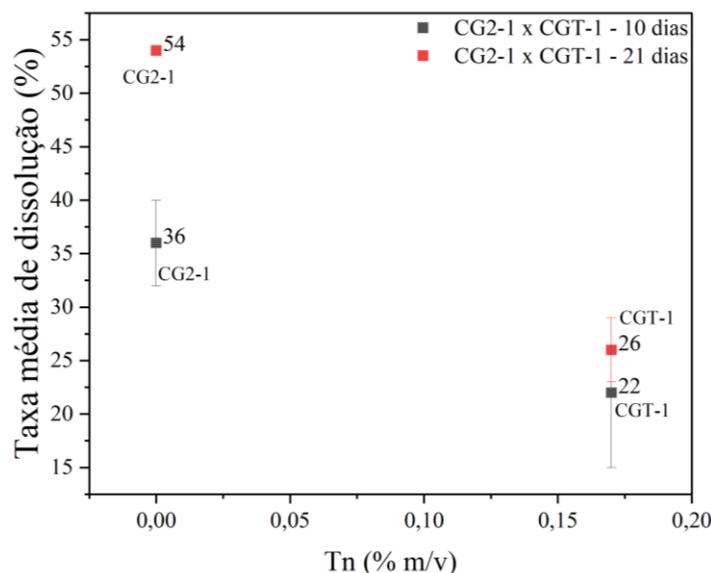
Figura 78 - Comparação da taxa média de dissolução dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG3-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-2), com concentração de quitosana de 0,67% (m/v), após 10 e 21 dias de incubação



Fonte: Autor

Ao comparar os *scaffolds* CG2-1 (sem adição de tanino) com CGT-1 contendo 0,17% de tanino (Figura 79), observamos uma redução significativa na taxa média de dissolução, de $36\% \pm 4\%$ para $22\% \pm 7\%$ após 10 dias de incubação e de $54\% \pm 0\%$ para $26\% \pm 3\%$ após 21 dias de incubação. Esse efeito pode ser atribuído à capacidade do tanino de interagir com os grupos funcionais amina e hidroxila presentes tanto na gelatina quanto na quitosana, promovendo a formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. Essas ligações resultam em uma estrutura mais estável, tornando o material menos suscetível à absorção de água e, conseqüentemente, menos propenso à dissolução (ETXABIDE *et al.*, 2022).

Figura 79 - Comparação da taxa média de dissolução dos *scaffolds* híbridos de quitosana/gelatina (CG2-1) e quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído (CGT-1), com concentração de quitosana de 1,33% (m/v), após 10 e 21 dias de incubação



Fonte: Autor

Os *scaffolds* que apresentaram as maiores taxas de dissolução foram os de gelatina pura (G) seguidos pelos de gelatina/tanino (GT), gelatina/quitosana CG2, quitosana pura C2, gelatina/quitosana CG1, quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído CGT, quitosana pura C1 e quitosana/gelatina CG3. Além disso, em todos os *scaffolds* maiores tempos de incubação levaram a maiores taxas de dissolução.

Considerando que a taxa de dissolução dos *scaffolds* deve estar diretamente relacionada ao tempo de regeneração do tecido danificado, é compreensível que o tempo de dissolução ideal *in vivo* dos *scaffolds* cutâneos possa variar, devido à diversidade de tipos, extensões e localizações das lesões às quais eles se destinam (QIN *et al.*, 2022). Além disso, condições médicas subjacentes dos pacientes, como diabetes e obesidade, podem interferir no tempo de regeneração (SEN *et al.*, 2009). No entanto, em condições normais, estima-se que o tempo médio necessário para a regeneração da pele seja de cerca de 8 semanas, após o qual a ferida pode ser considerada crônica (BLAKYTN; JUDE, 2006).

6 CONCLUSÕES

A análise dos espectros de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos *scaffolds* G, GT, CG e CGT confirmou a presença dos compostos gelatina, gelatina/xerogel tanino-glutaraldeído, gelatina/quitosana e gelatina/quitosana/xerogel tanino-glutaraldeído, respectivamente, utilizados na síntese desses materiais.

Observou-se uma influência marcante da composição dos *scaffolds* nos resultados dos testes de porosidade, especialmente relacionados à proporção de soluto/solvente. Os *scaffolds* com menor concentração de soluto apresentaram maiores taxas de porosidade.

Os ensaios de dissolução evidenciaram a baixa estabilidade dos materiais presentes nos *scaffolds* G. O aumento da concentração de glutaraldeído nos *scaffolds* G tem efeito significativo no diâmetro dos poros formados. Além disso, o aumento da concentração de glutaraldeído permitiu que os *scaffolds* suportassem mais tempo em solução PBS, porém, o máximo de tempo suportado não ultrapassou 68 h.

A incorporação de tanino nos *scaffolds* GT, resultou na redução da taxa de intumescimento, porosidade e dissolução. Contudo, não foi possível determinar a capacidade de adsorção de proteínas, devido a interferência das moléculas de tanino presentes na solução BSA.

A adição de glutaraldeído teve efeitos positivos na porosidade e na taxa de dissolução dos *scaffolds* C1 e CG1, porém reduziu a adsorção de proteínas em ambos os casos. Nos *scaffolds* C1, a taxa de intumescimento diminuiu com o aumento da concentração de glutaraldeído, enquanto nos *scaffolds* CG1, observou-se um leve aumento na taxa de intumescimento.

Nos *scaffolds* C2, a variação da concentração de quitosana melhorou a adsorção de proteínas sem afetar a porosidade, taxa de dissolução e taxa de intumescimento.

À medida que a concentração de gelatina aumentou nos *scaffolds* CG2, foi observada uma redução na porosidade, adsorção de proteínas e taxa de dissolução. No entanto, a concentração de gelatina não teve impacto na taxa de intumescimento dos *scaffolds*.

Comparado o *scaffold* de quitosana/gelatina produzido com maior teor de quitosana CG3-1 (1,33% m/v) ao *scaffold* com menor teor de quitosana (CG2-1, 0,67% m/v), nota-se que o maior teor de quitosana acarreta um aumento nas propriedades de intumescimento e na porosidade do material, enquanto reduz a taxa de dissolução, sendo a adsorção de proteínas pouco afetada. Assim, é possível concluir que o *scaffold* CG3-1 se destaca como a opção mais viável para aplicações na engenharia de tecidos entre os *scaffolds* desenvolvidos a partir da combinação de quitosana e gelatina.

Concentrações mais elevadas de gelatina e tanino afetaram negativamente a taxa de intumescimento, adsorção de proteínas e porosidade dos *scaffolds* de quitosana/gelatina/xerogel de tanino-glutaraldeído, enquanto o aumento da concentração de glutaraldeído aumenta a toxicidade do material. Assim, a composição ótima dessas espécies na composição desse material foi: glutaraldeído 0,08% (v/v), tanino (0,17%-m/v) e gelatina (0,67%-m/v). O *scaffold* CGT-1, com menor concentração de quitosana (0,67%-m/v), demonstrou elevada capacidade de intumescência, sem comprometer a estabilidade do material, o mesmo não foi observado para o CGT-2. Por fim, o principal destaque desses *scaffolds* é a elevada capacidade de adsorção de proteínas, sendo substancialmente superior a todos os outros *scaffolds*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 Sugestões para trabalhos futuros

Sugestões para o prosseguimento do presente trabalho com os *scaffolds* CGT-1 e CG3-1 (que apresentaram melhores resultados):

- Análise de citotoxicidade: realizar testes de citotoxicidade *in vitro* utilizando linhagens celulares relevantes para o tipo de aplicação dos *scaffolds* CGT-1 e CG3-1. Esses ensaios permitirão avaliar se os *scaffolds* apresentam algum efeito tóxico ou prejudicial às células, essencial para a segurança biocompatibilidade dos materiais.
- Avaliação da capacidade de inibição bacteriana: realizar ensaios de cultura bacteriana, para verificar a capacidade dos *scaffolds* CGT-1 e CG3-1 em inibir o crescimento bacteriano. A presença de quitosana e tanino em suas composições pode conferir propriedades antibacterianas, o que pode ser valioso para aplicações biomédicas.
- Definição do tecido ideal de aplicação: com base na composição dos *scaffolds* e nas propriedades observadas nos testes anteriores, identificar o tecido específico mais adequado para a aplicação dos *scaffolds* CGT-1 e CG3-1.
- Diferenciação celular: realizar ensaios para examinar a influência dos *scaffolds* na diferenciação celular, identificando o tipo e nível de especialização das células. Essa abordagem ajuda a entender melhor como o *scaffold* afeta as células, fornecendo informações importantes para prever sua eficácia na engenharia de tecidos.
- Estudo *in situ* em cobaias: após aplicar as sugestões citadas, realizar estudos *in vivo* em cobaias para avaliar o comportamento dos *scaffolds* CGT-1 e CG3-1 quando implantados em tecidos biológicos. Esses estudos proporcionarão informações cruciais sobre a biocompatibilidade, resposta imunológica, integração e degradação dos *scaffolds*.

REFERÊNCIAS

ABDAL-HAY, A. *et al.* A review of protein adsorption and bioactivity characteristics of poly ϵ -caprolactone scaffolds in regenerative medicine. **European Polymer Journal**, v. 162, p. 110892, 5 Jan. 2022.

ABDIAN, N. *et al.* Preparation and characterization of chitosan/hydroxyapatite scaffolds containing mesoporous SiO₂-HA for drug delivery applications. **Materials Chemistry and Physics**, v. 301, p. 127672, June 2023.

AHMADY, A.; ABU SAMAH, N. H. A review: gelatine as a bioadhesive material for medical and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 608, p. 121037, 25 Oct. 2021.

AHMED, S. *et al.* A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 849–862, 1 Sept. 2018.

ALAVARSE, A. C. *et al.* Crosslinkers for polysaccharides and proteins: synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 202, p. 558–596, 31 Mar. 2022.

AL-MUHANNA, M. K. *et al.* Synthesis of tailor-made polysaccharides: an overview. **Tailor-Made Polysaccharides in Drug Delivery**, p. 1–27, 1 Jan. 2023.

ALTUNORDU, G. *et al.* Improvement of bioactivity with dual bioceramic incorporation to nanofibrous PCL scaffolds. **Materialia**, p. 101699, Mar. 2023.

AMIRI, F. *et al.* Fabrication and assessment of a novel hybrid scaffold consisted of polyurethane-gellan gum-hyaluronic acid-glucosamine for meniscus tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 203, p. 610–622, 1 Apr. 2022.

ARISTRI, M. A. *et al.* Thermal and mechanical performance of ramie fibers modified with polyurethane resins derived from *acacia mangium* bark tannin. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 18, p. 2413–2427, 1 May 2022.

ARJUNAN, A. *et al.* Tissue engineering concept. **Encyclopedia of Smart Materials**, p. 103–112, 1 Jan. 2022.

ASGHARI, F. *et al.* Hybrid PCL/chitosan-PEO nanofibrous scaffolds incorporated with *A. euchroma* extract for skin tissue engineering application. **Carbohydrate Polymers**, v. 278, 15 Feb. 2022.

AZMANA, M. *et al.* A review on chitosan and chitosan-based bionanocomposites: promising material for combatting global issues and its applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 832–848, 31 Aug. 2021.

BALDINO, L. *et al.* Complete glutaraldehyde elimination during chitosan hydrogel drying by SC-CO₂ processing. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 103, p. 70–76, 2015.

BAO, L. *et al.* The renaissance of one-dimensional carbon nanotubes in tissue engineering. **Nano Today**, v. 49, p. 101784, 1 Apr. 2023.

BAPTISTA, R.; GUEDES, M. Morphological and mechanical characterization of 3D printed PLA scaffolds with controlled porosity for trabecular bone tissue replacement. **Materials Science and Engineering: C**, v. 118, p. 111528, 1 Jan. 2021.

BARBIERI, D. *et al.* Gelatin-based nanosystems for therapeutic applications. **Polymeric Nanosystems: Theranostic Nanosystems**, v. 1, p. 497–520, 1 Jan. 2023.

BAVARESCO, B. *et al.* Three-dimensional printing of collagen and hyaluronic acid scaffolds with dehydrothermal treatment crosslinking. **Composites Communications**, v. 19, p. 1–5, 1 June 2020.

BHARATHI, R. *et al.* Chitosan-based scaffolds as drug delivery systems in bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, n. Pt A, p. 132–153, 1 Dec. 2022.

BISWAL, A.; PUROHIT, S. S.; SWAIN, S. K. Chitosan based composite scaffolds in skin wound repair: a review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 84, p. 104549, 1 June 2023.

BLAKYTTY, R.; JUDE, E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 23, n. 6, p. 594–608, June 2006.

BLYWEERT, P. *et al.* Greener and more mechanically robust 3D acrylate composites with added tannin. **Industrial Crops and Products**, v. 203, p. 117179, 1 Nov. 2023.

BOGALA, M. R. Three-dimensional (3D) printing of hydroxyapatite-based scaffolds: a review. **Bioprinting**, v. 28, p. e00244, Dec. 2022.

BOULANGER, N.; LENORMAND, C. Skin immunity and microbiome. **Skin and Arthropod Vectors**, p. 1–28, 1 Jan. 2018.

BRAGHIROLI *et al.* Tannin gels and their carbon derivatives: a review. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 587, 8 Oct. 2019.

BRUNIUS, G.; SUNDBOM, B. L. The effect of Ca²⁺ on the thermal stability of trypsin in phosphate-buffered saline solution used for harvesting of human embryonic lung fibroblast cultures. **Journal of Biological Standardization**, v. 15, n. 3, p. 265–270, 1 Jan. 1987.

CAMANI, P. H. *et al.* Comprehensive insight of crosslinking agent concentration influence on starch-based aerogels porous structure. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 34, 10 Sept. 2021.

CAO, S. *et al.* Chitosan nanoparticles, as biological macromolecule-based drug delivery systems to improve the healing potential of artificial neural guidance channels: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 201, p. 569–579, 15 Mar. 2022.

CAO, W.; HENCH, L. L. Bioactive materials. **Ceramics International**, v. 22, n. 6, p. 493–507, 1 Jan. 1996.

CARLSON, B. M. Skin. **The Human Body**, p. 65–85, 1 Jan. 2019.

CARVALHO, E.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Flow nephelometric analysis of protein–tannin interactions. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, n. 1, p. 97–101, 18 June 2004.

CASTAÑO, O. *et al.* Instructive microenvironments in skin wound healing: biomaterials as signal releasing platforms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 129, p. 95–117, 1 Apr. 2018.

CASTRO, C. D. *et al.* Synthesis of bio-based xerogels from lignin precipitated from the black liquor of the paper industry for supercapacitors electrodes. **Biomass and Bioenergy**, v. 155, 1 Dec. 2021.

CHEN, J. *et al.* Nanocomposites drug delivery systems for the healing of bone fractures. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 585, p. 119477, 30 July 2020.

CHEN, S. *et al.* Preparation and application of chitosan-based medical electrospun nanofibers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 226, p. 410–422, 31 Jan. 2023.

CHEN, S.; COHEN, S. Principles of cardiovascular tissue engineering. **Tissue Engineering**, p. 629–660, 1 Jan. 2023.

CHENG, N. C. *et al.* Efficient transfer of human adipose-derived stem cells by chitosan/gelatin blend films. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 100 B, n. 5, p. 1369–1377, July 2012.

CHOW, S. K.-H. *et al.* Modulating macrophage polarization for the enhancement of fracture healing, a systematic review. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 36, p. 83–90, Sept. 2022.

CHRISTENSEN, R. E.; JAFFERANY, M. Psychiatric and psychologic aspects of chronic skin diseases. **Clinics in Dermatology**, 5 Mar. 2023.

COELHO, F. *et al.* Silk fibroin/hydroxyapatite composite membranes: production, characterization and toxicity evaluation. **Toxicology in Vitro**, v. 62, p. 104670, 1 Feb. 2020.

DAI, J. P. *et al.* Pore-scale investigation on the multi-component gas adsorption and diffusion in carbon xerogel microporous structure using molecular simulation methods. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 337, 1 May 2022.

DAVACHI, S. M. *et al.* Development of chitosan/hyaluronic acid hydrogel scaffolds via enzymatic reaction for cartilage tissue engineering. **Materials Today Communications**, v. 30, p. 103230, 1 Mar. 2022.

DEPAN, D.; MISRA, R. D. K. The interplay between nanostructured carbon-grafted chitosan scaffolds and protein adsorption on the cellular response of osteoblasts: structure-function property relationship. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 4, p. 6084–6094, 2013.

DEPCIUCH, J. *et al.* Investigation of novel methods for stress level measurements in athletes employing FTIR and Raman spectroscopy techniques. **Measurement**, v. 220, p. 113316, 1 Oct. 2023.

DESHMUKH, K. *et al.* Biopolymer composites with high dielectric performance: interface engineering. **Biopolymer Composites in Electronics**, p. 27–128, 1 Jan. 2017.

DHANIA, S. *et al.* Scaffolds the backbone of tissue engineering: advancements in use of polyhydroxyalkanoates (PHA). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 208, p. 243–259, 31 May 2022.

DONG, X. *et al.* Investigation of the mechanical properties of a bony scaffold for comminuted distal radial fractures: addition of akermanite nanoparticles and using a freeze-drying technique. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 121, 1 Sept. 2021.

DOU, Z. *et al.* Rat perichondrium transplanted to articular cartilage defects forms articular-like, hyaline cartilage. **Bone**, v. 151, p. 116035, 1 Oct. 2021.

DOUSTDAR, F.; GHORBANI, M. ZIF-8 enriched electrospun ethyl cellulose/polyvinylpyrrolidone scaffolds: the key role of polyvinylpyrrolidone molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 291, 1 Sept. 2022.

DOUSTDAR, F.; OLAD, A.; GHORBANI, M. Development of a novel reinforced scaffold based on chitosan/cellulose nanocrystals/halloysite nanotubes for curcumin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 282, 15 Apr. 2022a.

DOUSTDAR, F.; OLAD, A.; GHORBANI, M. Effect of glutaraldehyde and calcium chloride as different crosslinking agents on the characteristics of chitosan/cellulose nanocrystals scaffold. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 208, p. 912–924, 31 May 2022b.

ECHAVE, M. C. *et al.* Bioinspired gelatin/bioceramic composites loaded with bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) promote osteoporotic bone repair. **Biomaterials Advances**, v. 134, p. 112539, 1 Mar. 2022.

ELBRINK, K. *et al.* Optimization of the different phases of the freeze-drying process of solid lipid nanoparticles using experimental designs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 635, p. 122717, 25 Mar. 2023.

ELDEEB, A. E.; SALAH, S.; ELKASABGY, N. A. Biomaterials for tissue engineering applications and current updates in the field: a comprehensive review. **AAPS PharmSciTech**, v. 23, n. 7, 26 Sept. 2022.

ELSAYED, E. W. *et al.* Formulation and evaluation of alginate-gelatin hydrogel scaffolds loaded with zinc-doped hydroxyapatite and 5-fluorouracil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 237, p. 124147, May 2023.

EL-SEEDI, H. R. *et al.* Gelatin nanofibers: recent insights in synthesis, bio-medical applications and limitations. **Heliyon**, v. 9, n. 5, p. e16228, 1 May 2023.

EREZUMA, I. *et al.* Progress in self-healing hydrogels and their applications in bone tissue engineering. **Biomaterials Advances**, v. 146, p. 213274, 1 Mar. 2023.

ESMAEILI, J. *et al.* Decellularized *Alstroemeria* flower stem modified with chitosan for tissue engineering purposes: a cellulose/chitosan scaffold. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 204, p. 321–332, 15 Apr. 2022.

ETXABIDE, A. *et al.* Developing active and intelligent films through the incorporation of grape skin and seed tannin extracts into gelatin. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 33, p. 100896, 1 Sept. 2022.

FATHY, N. A.; RIZK, M. S.; AWAD, R. M. S. Pore structure and adsorption properties of carbon xerogels derived from carbonization of tannic acid-resorcinol-formaldehyde resin. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 119, p. 60–68, 1 May 2016.

FAZAL, N.; LATIEF, N. *Bombyx mori* derived scaffolds and their use in cartilage regeneration: a systematic review. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 26, n. 12, p. 1583–1594, 1 Dec. 2018.

FICAI, D. *et al.* Advances in the field of soft tissue engineering: from pure regenerative to integrative solutions. **Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials**, p. 355–386, 1 Jan. 2016.

FRANCIS, A. P. *et al.* A review on biomaterials-based scaffold: an emerging tool for bone tissue engineering. **Materials Today Communications**, v. 34, p. 105124, 1 Mar. 2023.

FU, Q. *et al.* Toward strong and tough glass and ceramic scaffolds for bone repair. **Advanced Functional Materials**, v. 23, n. 44, p. 5461–5476, 26 Nov. 2013.

GHADIRIAN, S.; KARBASI, S. Evaluation of the effects of halloysite nanotube on polyhydroxybutyrate - chitosan electrospun scaffolds for cartilage tissue engineering

applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 233, p. 123651, Apr. 2023.

GHAFAARI, R. *et al.* Fabrication and characterization of bilayer scaffolds - nanocellulosic cryogels - for skin tissue engineering by co-culturing of fibroblasts and keratinocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 223, p. 100–107, 31 Dec. 2022.

GHORANI, B.; ALEHOSSEINI, A.; TUCKER, N. Nanocapsule formation by electrospinning. **Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries**, p. 264–319, 1 Jan. 2017.

GRACE, M. H. *et al.* Spray-dried and freeze-dried protein-spinach particles; effect of drying technique and protein type on the bioaccessibility of carotenoids, chlorophylls, and phenolics. **Food Chemistry**, v. 388, p. 133017, 15 Sept. 2022.

HABIBZADEH, F. *et al.* Nanomaterials supported by polymers for tissue engineering applications: a review. **Heliyon**, v. 8, n. 12, p. e12193, 1 Dec. 2022.

HAN, S. *et al.* UV light-driven controlled photodegradation of condensed tannins from larch bark. **Industrial Crops and Products**, v. 177, p. 114403, 1 Mar. 2022.

HARUGADE, A.; SHERJE, A. P.; PETHE, A. Chitosan: a review on properties, biological activities and recent progress in biomedical applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 191, p. 105634, Oct. 2023.

HARWATE, N. *et al.* Gelatin–chitosan macroporous scaffolds integrated with customizable hollow channels for liver tissue engineering. **Food, Medical, and Environmental Applications of Polysaccharides**, p. 667–685, 1 Jan. 2021.

HASSOUNA, A.; ELGHARBAWY, H.; MORSY, R. Development of porous scaffolds based on the in situ synthesis of biphasic calcium phosphate in a gelatin-polyvinyl alcohol matrix for bone tissue engineering. **Journal of Molecular Structure**, v. 1279, p. 134951, 5 May 2023.

HAUG, I. J.; DRAGET, K. I. Gelatin. **Handbook of Hydrocolloids**. 2nd ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 1 Jan. 2009, p. 142–163.

HE, Y. *et al.* An overview on collagen and gelatin-based cryogels: fabrication, classification, properties and biomedical applications. **Polymers**, v. 13, n. 14, p. 2299, 14 July 2021.

HERMANSON, G. T. Enzyme modification and conjugation. **Bioconjugate Techniques**, p. 951–957, 1 Jan. 2013a.

HERMANSON, G. T. Homobifunctional crosslinkers. **Bioconjugate Techniques**, p. 275–298, 1 Jan. 2013b.

HNEDA, D.; GOMES, J. R. Evaluation of the inflammatory process, collagen production, and MMP-2 and MMP-9 expressions produced by *Luffa aegyptiaca Mill* using the subcutaneous rat implanted model. **Acta Histochemica**, v. 124, n. 4, p. 151882, 1 May 2022.

HSIEH, W. C.; CHANG, C. P.; LIN, S. M. Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 57, n. 2, p. 250–255, 15 June 2007.

HSIEH, W. C.; LIAU, J. J.; LI, Y. J. Characterization and cell culture of a grafted chitosan scaffold for tissue engineering. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, 2015.

HUANG, Q.; DING, H.; RASHID SHEYKHAHMAD, F. A skin cancer diagnosis system for dermoscopy images according to deep training and metaheuristics. **Biomedical Signal Processing and Control**, v. 83, p. 104705, 1 May 2023.

IMAHARA, S. D.; KLEIN, M. B. Skin grafts. **Biomaterials for Treating Skin Loss: A volume in Woodhead Publishing Series in Biomaterials**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 1 Jan. 2009, p. 58–79.

INDRA, A. *et al.* The practical process of manufacturing poly(methyl methacrylate)-based scaffolds having high porosity and high strength. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 142, p. 105862, 1 June 2023.

IRFAN, N. I. *et al.* Gelatin-based hemostatic agents for medical and dental application at a glance: a narrative literature review. **The Saudi Dental Journal**, v. 34, n. 8, p. 699–707, 1 Dec. 2022.

IRMAN, N. *et al.* Preparation and characterization of formaldehyde-free wood adhesive from mangrove bark tannin. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 114, p. 103094, 1 Apr. 2022.

JANMOHAMMADI, M. *et al.* Cellulose-based composite scaffolds for bone tissue engineering and localized drug delivery. **Bioactive Materials**, v. 20, p. 137–163, Feb. 2023.

JIANG, Z. *et al.* Construction of chitosan scaffolds with controllable microchannel for tissue engineering and regenerative medicine. **Materials Science and Engineering: C**, v. 126, p. 112178, 1 July 2021.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**: texto e atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANWAR, S.; VIJAYAVENKATARAMAN, S. Design of 3D printed scaffolds for bone tissue engineering: a review. **Bioprinting**, v. 24, p. e00167, 1 Dec. 2021.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474–5491, 1 Sept. 2005.

KATZ, J. S.; BURDICK, J. A. Synthetic biomaterials. **Molecular, Cellular, and Tissue Engineering**. [s.l.] CRC Press, 2018. p. 43-1-43–19.

KAZEMI ASL, S.; RAHIMZADEGAN, M.; OSTADRAHIMI, R. The recent advancement in the chitosan hybrid-based scaffolds for cardiac regeneration after myocardial infarction. **Carbohydrate Polymers**, v. 300, p. 120266, 15 Jan. 2023.

KAZEMIANRAD, F.; KOOCHEKI, A.; GHORANI, B. Encapsulation of caffeine in sandwich structured *Alyssum homolocarpum* seed gum/PVA/gelatin nanofibers using electrospinning technique. **Food Hydrocolloids**, v. 140, p. 108604, July 2023.

KHALILIMOFRAD, Z. *et al.* Collagen type I cross-linked to gelatin/chitosan electrospun mats: application for skin tissue engineering. **Materials Today Communications**, v. 35, p. 105889, 1 June 2023.

KO, M. S.; MARINKOVICH, M. P. Role of dermal-epidermal basement membrane zone in skin, cancer, and developmental disorders. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 1, p. 1–16, 1 Jan. 2010.

KOPAC, T.; BOZGEYIK, K.; YENER, J. Effect of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 322, n. 1–3, p. 19–28, 5 June 2008.

KOU, S. (GABRIEL); PETERS, L.; MUCALO, M. Chitosan: a review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms. **Carbohydrate Polymers**, v. 282, p. 119132, 15 Apr. 2022.

KRISHNAKUMAR, G. S. *et al.* Importance of crosslinking strategies in designing smart biomaterials for bone tissue engineering: a systematic review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 96, p. 941–954, 1 Mar. 2019.

KUMAR, M.; SIDPARA, A. M.; RACHERLA, V. Finishing performance of polyurethane-based flexible tools fabricated using solvent casting and particulate leaching method. **Journal of Manufacturing Processes**, v. 90, p. 166–179, 24 Mar. 2023.

LEITE PEREIRA, C.; LAMGHARI, M.; SARMENTO, B. Advances in nanoenabled 3D matrices for cartilage repair. **Acta Biomaterialia**, v. 150, p. 1–21, 15 Sept. 2022.

LI, J.; STOCUM, D. L. Fracture healing. **Basic and Applied Bone Biology**, p. 205–223, 1 Jan. 2014.

LI, W. *et al.* Effects of casting solvent on microstructure and ionic conductivity of anhydrous sulfonated poly(ether ether ketone)-ionic liquid composite membranes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 1, p. 748–754, Jan. 2012.

LI, Z. *et al.* Polyurethane scaffold with in situ swelling capacity for nucleus pulposus replacement. **Biomaterials**, v. 84, p. 196–209, 1 Apr. 2016.

LIM, Y. M. *et al.* Preparation of porous poly(ϵ -caprolactone) scaffolds by gas foaming process and in vitro/in vivo degradation behavior using γ -ray irradiation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 436–441, July 2008.

LINJU, M. C.; REKHA, M. R. Proline conjugated chitosan as wound healing material: in vitro studies on the influence of the scaffold on collagen production and wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, p. 124688, 1 July 2023.

LIU, C. *et al.* Cellulose/chitosan composite sponge for efficient protein adsorption. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 60, n. 25, p. 9159–9166, 30 June 2021.

LIU, M. *et al.* Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. **Bone Research**, v. 5, p. 17014, 30 May 2017.

LIU, Q.; LU, W. F.; ZHAI, W. Toward stronger robocast calcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering: a mini-review and meta-analysis. **Biomaterials Advances**, v. 134, p. 112578, 1 Mar. 2022.

LIU, X.; WANG, Z. Chitosan-calcium carbonate scaffold with high mineral content and hierarchical structure for bone regeneration. **Smart Materials in Medicine**, v. 4, p. 552–561, 1 Jan. 2023.

LIU, Y. *et al.* Effect of catechin and tannins on the structural and functional properties of sodium alginate/gelatin/ poly(vinylalcohol) blend films. **Food Hydrocolloids**, v. 135, p. 108141, Feb. 2023.

LOO, H. L. *et al.* Application of chitosan-based nanoparticles in skin wound healing. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 299–332, 1 May 2022.

LUKIN, I. *et al.* Sumecton reinforced gelatin-based scaffolds for cell-free bone regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 126023, 26 July 2023.

MAADANI, A. M.; DAVOODIAN, F.; SALAHINEJAD, E. Effects of PLGA coating on biological and mechanical behaviors of tissue engineering scaffolds. **Progress in Organic Coatings**, v. 176, p. 107406, 1 Mar. 2023.

MAHARJAN, B. *et al.* Regenerated cellulose nanofiber reinforced chitosan hydrogel scaffolds for bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117023, 1 Jan. 2021.

MAHENDIRAN, B. *et al.* In vitro and in vivo biocompatibility of decellularized cellulose scaffolds functionalized with chitosan and platelet rich plasma for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 217, p. 522–535, 30 Sept. 2022.

MAIA, F. R. *et al.* Recent approaches towards bone tissue engineering. **Bone**, v. 154, p. 116256, 1 Jan. 2022.

MASCHARAK, S.; DESJARDINS-PARK, H. E.; LONGAKER, M. T. Fibroblast heterogeneity in wound healing: hurdles to clinical translation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 26, n. 12, p. 1101–1106, 1 Dec. 2020.

MCKNIGHT, G.; SHAH, J.; HARGEST, R. Physiology of the skin. **Surgery (Oxford)**, v. 40, n. 1, p. 8–12, 1 Jan. 2022.

MELO, L. F. M. DE *et al.* Biological and pharmacological aspects of tannins and potential biotechnological applications. **Food Chemistry**, v. 414, p. 135645, 15 July 2023.

MESQUIDA, P. *et al.* Evaluation of surface charge shift of collagen fibrils exposed to glutaraldehyde. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10126, 4 July 2018.

MIRANDA, S. C. C. C. *et al.* Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: a promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 1, p. 1–15, 1 Jan. 2011.

MIRMUSAVI, M. H.; AHMADIAN, M.; KARBASI, S. Polycaprolactone-chitosan/multi-walled carbon nanotube: a highly strengthened electrospun nanocomposite scaffold for cartilage tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, p. 1801–1814, 1 June 2022.

MIRTAGHAVI, A. *et al.* Crosslinked porous three-dimensional cellulose nanofibers-gelatine biocomposite scaffolds for tissue regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1949–1959, 1 Dec. 2020.

MOELLER, T. *et al.* Atoms, molecules, and ions. **Chemistry**, p. 20–50, 1 Jan. 1980.

MOGHANIAN, A. *et al.* Synthesis and characterization of Mg and Sr-modified calcium phosphate/gelatin biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. **Ceramics International**, v. 49, n. 11, p. 18255–18263, 1 June 2023.

MOHAMED, S. A.; HARGEST, R. Surgical anatomy of the skin. **Surgery (Oxford)**, v. 40, n. 1, p. 1–7, 1 Jan. 2022.

MOMBINI, S. *et al.* Chitosan-PVA-CNT nanofibers as electrically conductive scaffolds for cardiovascular tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 278–287, 1 Nov. 2019.

MONDAL, S.; LI, C.; WANG, K. Bovine serum albumin adsorption on glutaraldehyde cross-linked chitosan hydrogels. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 60, n. 8, p. 2356–2362, 13 Aug. 2015.

MOULOD, M.; MOGHADDAM, S. Insights from molecular dynamics simulations of albumin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 112, p. 108120, 1 May 2022.

MUSHTAQ, F. *et al.* Preparation, properties, and applications of gelatin-based hydrogels (GHs) in the environmental, technological, and biomedical sectors. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 218, p. 601–633, 1 Oct. 2022.

NACU, I. *et al.* 3D bioprinted scaffolds based on functionalized gelatin for soft tissue engineering. **Reactive and Functional Polymers**, v. 190, p. 105636, 1 Sept. 2023.

NAJAFI, R. *et al.* Alginate sulfate/ECM composite hydrogel containing electrospun nanofiber with encapsulated human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 124098, Mar. 2023.

NASIRI, G. *et al.* Fabrication and evaluation of poly (vinyl alcohol)/gelatin fibrous scaffold containing ZnO nanoparticles for skin tissue engineering applications. **Materials Today Communications**, v. 33, 1 Dec. 2022.

NASIRI, S. S.; AHMADI, Z.; AFSHAR-TAROMI, F. Design and characterization of poly(glycerol sebacate)/poly(3-hydroxybutyrate)/bioglass/curcumin nanocomposite scaffold for wound healing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 245, p. 125521, 1 Aug. 2023.

NAZARNEZHAD, S.; KARGOZAR, S.; HAMBLIN, M. R. Skin wound healing: the critical role of angiogenesis. **Biomaterials for Vasculogenesis and Angiogenesis**, p. 439–463, 1 Jan. 2022.

NIU, Y.; STADLER, F. J.; FU, M. Biomimetic electrospun tubular PLLA/gelatin nanofiber scaffold promoting regeneration of sciatic nerve transection in SD rat. **Materials Science and Engineering: C**, v. 121, p. 111858, 1 Feb. 2021.

OKOLIEOCHA, C. *et al.* Microcellular to nanocellular polymer foams: progress (2004–2015) and future directions – a review. **European Polymer Journal**, v. 73, p. 500–519, 1 Dec. 2015.

OLAD, A.; BAKHT KHOSH HAGH, H. Graphene oxide and amin-modified graphene oxide incorporated chitosan-gelatin scaffolds as promising materials for tissue engineering. **Composites Part B: Engineering**, v. 162, p. 692–702, 1 Apr. 2019.

ORYAN, A. *et al.* Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, n. PartA, p. 678–688, 1 Feb. 2018.

PAN, L.; ZHANG, X.; GAO, Q. Effects and mechanisms of histatins as novel skin wound-healing agents. **Journal of Tissue Viability**, v. 30, n. 2, p. 190–195, 1 May 2021.

PARAU, A. C. *et al.* Comparison of 316L and Ti6Al4V biomaterial coated by ZrCu-based thin films metallic glasses: structure, morphology, wettability, protein adsorption, corrosion resistance, biomineralization. **Applied Surface Science**, v. 612, 1 Mar. 2023.

PARIN, F. N. Fabrication and novel applications of polymeric biomaterials for tissue scaffolds. **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**, 1 Jan. 2022.

PATEL, J. M. *et al.* Bioactive factors for cartilage repair and regeneration: improving delivery, retention, and activity. **Acta Biomaterialia**, v. 93, p. 222–238, 15 July 2019.

PATRA, L.; PANDEY, R. Mechanical properties of 2D materials: a review on molecular dynamics based nanoindentation simulations. **Materials Today Communications**, v. 31, p. 103623, 1 June 2022.

PEIFEN, M. *et al.* New skin tissue engineering scaffold with sulfated silk fibroin/chitosan/hydroxyapatite and its application. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 640, p. 117–124, 15 Jan. 2023.

PERIĆ KAČAREVIĆ, Ž. *et al.* An introduction to bone tissue engineering. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 43, n. 2, p. 69–86, 23 Sept. 2019.

PINA, S.; REIS, R. L.; OLIVEIRA, J. M. Natural polymeric biomaterials for tissue engineering. **Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers, Third Edition**, p. 75–110, 1 Jan. 2022.

PITTENGER, M. F.; KERR, C. L. Stem cells. **Tissue Engineering**, 3rd ed. Amsterdam: Academic Press, 1 Jan. 2023, p. 13–69.

PIZZI, A. Tannins medical / pharmacological and related applications: a critical review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 22, 1 Sept. 2021.

PLOTCHYK, M.; HIGGINS, C. A. Skin biology. **Biomaterials for Skin Repair and Regeneration**, p. 3–25, 1 Jan. 2019.

POURSAMAR, S. A. *et al.* Gelatin porous scaffolds fabricated using a modified gas foaming technique: characterisation and cytotoxicity assessment. **Materials Science and Engineering C**, v. 48, p. 63–70, 1 Mar. 2015.

PRAMANIK, S. *et al.* Natural biopolymers for bone tissue engineering: a brief review. **Engineered Regeneration**, v. 4, n. 2, p. 193–204, 1 June 2023.

PRIYANKA, D. N.; PRASHANTH, K. V. H.; THARANATHAN, R. N. A review on potential anti-diabetic mechanisms of chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 3, p. 100188, 1 June 2022.

PUTRI, T. S. *et al.* Effect of glutaraldehyde on the characteristics of chitosan–gelatin– β -tricalcium phosphate composite scaffolds. **Materials Letters**, v. 304, p. 130672, 1 Dec. 2021.

QAVI, I.; TAN, G. Process control of electrospinning artificial fenestrated capillary vessels. **Materials and Design**, v. 227, p. 111708, 1 Mar. 2023.

QIAN, J. *et al.* The correlation of molecule weight of chitosan oligomers with the corresponding viscosity and antibacterial activity. **Carbohydrate Research**, v. 530, p. 108860, 1 Aug. 2023.

QIN, J. *et al.* Recent advances in bioengineered scaffolds for cutaneous wound healing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 1 Mar. 2022.

QU, H. *et al.* Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. **RSC Advances**, v. 9, n. 45, p. 26252–26262, 2019.

RADHIKA RAJASREE, S. R. *et al.* Fabrication and characterization of chitosan based collagen/ gelatin composite scaffolds from big eye snapper *Priacanthus hamrur* skin for antimicrobial and anti oxidant applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 107, p. 110270, 1 Feb. 2020.

RAEES, S. *et al.* Classification, processing, and applications of bioink and 3D bioprinting: a detailed review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 232, p. 123476, 31 Mar. 2023.

RAFIEYAN, S. *et al.* MLATE: Machine learning for predicting cell behavior on cardiac tissue engineering scaffolds. **Computers in Biology and Medicine**, v. 158, p. 106804, 1 May 2023.

RASHID, A. BIN; SHOWVA, N.-N.; HOQUE, M. E. Gelatin-based scaffolds – an intuitive support structure for regenerative therapy. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, p. 100452, June 2023.

RASTEGAR, A. *et al.* Platelet-rich fibrin-loaded PCL/chitosan core-shell fibers scaffold for enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 269, p. 118351, 1 Oct. 2021.

RESSLER, A. *et al.* Chitosan/collagen/Mg, Se, Sr, Zn-substituted calcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering applications: a growth factor free approach. **European Polymer Journal**, v. 194, p. 112129, 24 July. 2023.

REVATI, R. *et al.* In vitro biodegradation, cytotoxicity, and biocompatibility of polylactic acid/napier cellulose nanofiber scaffold composites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 223, p. 479–489, 31 Dec. 2022.

REY-RAAP, N. *et al.* Advances in tailoring the porosity of tannin-based carbon xerogels. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 100–106, 1 Apr. 2016.

RODRIGUES, L. A. **Síntese e caracterização de criogéis de carbono para adsorção/redução de cromo (VI)**. 119f. Tese (Doutorado em Materiais e Processos de Fabricação) – Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), São José dos Campos, 2013.

RUSSEL, J. B. **Química geral**. 2. ed. [s.l.] Pearson Universidades, 1994. v. 1

RYAN, A. J.; O'BRIEN, F. J. Insoluble elastin reduces collagen scaffold stiffness, improves viscoelastic properties, and induces a contractile phenotype in smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 73, p. 296–307, 1 Dec. 2015.

SADEGHIANMARYAN, A. *et al.* Fabrication of chitosan/alginate/hydroxyapatite hybrid scaffolds using 3D printing and impregnating techniques for potential cartilage regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 204, p. 62–75, 15 Apr. 2022.

SAGADEVAN, S. *et al.* Recent advancements in polymer matrix nanocomposites for bone tissue engineering applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 82, p. 104313, 1 Apr. 2023.

SAINZ, M. A. *et al.* Protein adsorption and in vitro behavior of additively manufactured 3D-silicon nitride scaffolds intended for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 115, 1 Oct. 2020.

SALEVIĆ-JELIĆ, A. *et al.* Biodegradable and active zein-gelatin-based electrospun mats and solvent-cast films incorporating sage extract: formulation and comparative characterization. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 35, 1 Mar. 2023.

SANCHO-TELLO, M. *et al.* Cartilage regeneration and tissue engineering. **Advances in Biomechanics and Tissue Regeneration**, p. 361–378, 1 Jan. 2019.

SANDOMIERSKI, M. *et al.* Chitosan - zeolite scaffold as a potential biomaterial in the controlled release of drugs for osteoporosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 223, p. 812–820, 31 Dec. 2022.

SARKAR, S.; KUNDU, S. Protein (BSA) adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces. **Materials Today: Proceedings**, 5 May 2023.

SCHREMENTI, M.; CHEN, L.; DIPIETRO, L. A. The importance of targeting inflammation in skin regeneration. **Skin Tissue Models**, p. 255–275, 1 Jan. 2018.

SEHMI, S. K. *et al.* The bactericidal activity of glutaraldehyde-impregnated polyurethane. **MicrobiologyOpen**, v. 5, n. 5, p. 891–897, 1 Oct. 2016.

SEN, C. K. *et al.* Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 17, n. 6, p. 763–71, 2009.

ŞENOL, M. S.; ÖZER, H. Architecture of cartilage tissue and its adaptation to pathological conditions. **Comparative Kinesiology of the Human Body: Normal and Pathological Conditions**, p. 91–100, 1 Jan. 2020.

SERRANO-AROCA, Á. *et al.* Scaffolds in the microbial resistant era: fabrication, materials, properties and tissue engineering applications. **Materials Today Bio**, v. 16, p. 100412, 1 Dec. 2022.

SHI, X. N.; WANG, W. B.; WANG, A. Q. Effect of surfactant on porosity and swelling behaviors of guar gum-g-poly(sodium acrylate-co-styrene)/attapulgitite superabsorbent hydrogels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 279–286, 1 Nov. 2011.

SHIRMOHAMMADLI, Y.; EFHAMISISI, D.; PIZZI, A. Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 316–332, 15 Dec. 2018.

SHOUEIR, K. R. *et al.* Chitosan based-nanoparticles and nanocapsules: overview, physicochemical features, applications of a nanofibrous scaffold, and bioprinting. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 1176–1197, 15 Jan. 2021.

SI, J. *et al.* Controlled degradable chitosan/collagen composite scaffolds for application in nerve tissue regeneration. **Polymer Degradation and Stability**, v. 166, p. 73–85, 1 Aug. 2019.

SIDDIQUI, M. A. *et al.* Effect of Cu on the passivity of Ti–xCu (x = 0, 3 and 5 wt%) alloy in phosphate-buffered saline solution within the framework of PDM-II. **Electrochimica Acta**, v. 386, p. 138466, 1 Aug. 2021.

SILVESTRO, I. *et al.* Chitosan scaffolds with enhanced mechanical strength and elastic response by combination of freeze gelation, photo-crosslinking and freeze-drying. **Carbohydrate Polymers**, v. 267, 1 Sept. 2021.

SINGH, Y. P. *et al.* Gelatin/monetite electrospun scaffolds to regenerate bone tissue: fabrication, characterization, and in-vitro evaluation. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 137, p. 105524, 1 Jan. 2023.

SMÓLKA, K.; FIRYCH-NOWACKA, A.; WIAK, S. Analysis of the electrostatic field distribution to improve the electrospinning process - practical tips. **Journal of Computational Science**, v. 59, p. 101542, 1 Mar. 2022.

SOMUNCU, Ö. S. *et al.* In vitro artificial skin engineering by decellularized placental scaffold for secondary skin problems of meningocele. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 59, p. 291–297, 1 Jan. 2019.

SONG, L. *et al.* Prediction of mechanical properties of composite materials using multimodal fusion learning. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 358, p. 114433, 16 Aug. 2023.

SRIWONG, C.; BOONRUNGSIMAN, S.; SUKYAI, P. Sugarcane bagasse cellulose-based scaffolds incorporated hydroxyapatite for promoting proliferation, adhesion and differentiation of osteoblasts. **Industrial Crops and Products**, v. 192, 1 Feb. 2023.

STOJIC, M. *et al.* Skin tissue engineering. **Biomaterials for Skin Repair and Regeneration**, p. 59–99, 1 Jan. 2019.

SUAMTE, L. *et al.* Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. **Smart Materials in Manufacturing**, v. 1, p. 100011, 1 Jan. 2023.

SUAMTE, L.; TIRKEY, A.; BABU, P. J. Design of 3D smart scaffolds using natural, synthetic and hybrid derived polymers for skin regenerative applications. **Smart Materials in Medicine**, v. 4, p. 243–256, 1 Jan. 2023.

SUBRAMANIAN, K. G.; VIJAYAKUMAR, V. Hydrogels: classification, synthesis, characterization, and applications. **Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials**. [s.l.] Taylor & Francis, 2015. p. 3879–3892.

SUKEGAWA, R.; KONO, S.; NAKAGAWA, K. Development of a nondestructive monitoring technique for vial freeze-drying process using microwave resonance spectroscopy. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 179, p. 109071, 1 Sept. 2022.

SUN, H. *et al.* Contribution of perichondrium to the mechanical properties of auricular cartilage. **Journal of Biomechanics**, v. 126, p. 110638, 20 Sept. 2021.

SZCZUREK, A. *et al.* The use of tannin to prepare carbon gels. Part I: carbon aerogels. **Carbon**, v. 49, n. 8, p. 2773–2784, 1 July 2011.

TAJVAR, S.; HADJIZADEH, A.; SAMANDARI, S. S. Scaffold degradation in bone tissue engineering: an overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 180, p. 105599, 1 May 2023.

THOMPSON, J. C. **Netter atlas de anatomia ortopédica**. 2. ed. [s.l.] GEN Guanabara Koogan, 2011.

TIEN, N. D. *et al.* Solution blow spinning of highly deacetylated chitosan nanofiber scaffolds for dermal wound healing. **Biomaterials Advances**, v. 137, p. 212871, 1 June 2022.

TZU, J.; LI, J.; MARINKOVICH, M. P. Basement membrane and extracellular matrix molecules in the skin. **Advances in Developmental Biology**, v. 15, p. 129–151, 1 Jan. 2005.

UQUILLAS, J. A.; MORONI, L.; DE BOER, J. An introduction to tissue engineering; the topic and the book. **Tissue Engineering**, p. 1–12, 1 Jan. 2023.

VAN VLIERBERGHE, S. *et al.* Porous hydrogel biomedical foam scaffolds for tissue repair. **Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications**, p. 335–390, 1 Jan. 2014.

VARADWAJ, A.; VARADWAJ, P. R.; YAMASHITA, K. Do surfaces of positive electrostatic potential on different halogen derivatives in molecules attract? like attracting like! **Journal of Computational Chemistry**, v. 39, n. 7, p. 343–350, 15 Mar. 2018.

VARSHNEY, C.; KUMAR, B.; KAMBLE, S. C. Natural compound-based scaffold to design in vitro disease systems. **New Horizons in Natural Compound Research**, p. 373–389, 1 Jan. 2023.

VENKATESAN, K. *et al.* Fabrication of surface modified antibacterial Ti6Al4V alloy powder reinforced gelatin/chitosan composite scaffold for tissue engineering applications. **Advanced Powder Technology**, v. 34, n. 8, p. 104098, 1 Aug. 2023.

VINODKUMAR, V.; AMRUTHA, C.; NAGESH, D. S. Biomaterials for medical products. **Biomedical Product and Materials Evaluation: Standards and Ethics**, p. 25–62, 1 Jan. 2022.

VOGLER, E. A. Protein adsorption in three dimensions. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1201–1237, 1 Feb. 2012.

VOLLER, T. *et al.* Measuring bone healing in fractures and fusions. **Orthopaedics and Trauma**, v. 36, n. 4, p. 218–222, 1 Aug. 2022.

WAHID, F. *et al.* Nanocomposite scaffolds for tissue engineering; properties, preparation and applications. **Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery**, p. 701–735, 1 Jan. 2018.

WANG, H. *et al.* Interconnected and porous carbon nanofiber using glutaraldehyde crosslinking and sacrificial pore-forming strategies for supercapacitor electrode application. **Materials Letters**, v. 320, p. 132357, 1 Aug. 2022a.

WANG, P. *et al.* Characterization and antioxidant activity of trilayer gelatin/dextran-propyl gallate/gelatin films: electrospinning versus solvent casting. **LWT**, v. 128, p. 109536, 1 June 2020.

WANG, X. *et al.* Engineered gelatin-based conductive hydrogels for flexible wearable electronic devices: fundamentals and recent advances. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 7, n. 3, p. 100451, 1 Sept. 2022.

WANG, Y. *et al.* Gelatin tailored pore structure and mechanical properties of freeze-cast porous boron carbide ceramics. **Ceramics International**, v. 47, n. 2, p. 2897–2902, 15 Jan. 2021.

WANG, Y. *et al.* Mussel-inspired collagen-hyaluronic acid composite scaffold with excellent antioxidant properties and sustained release of a growth factor for enhancing diabetic wound healing. **Materials Today Bio**, v. 15, 1 June 2022c.

WANG, Y. *et al.* A bio-orthogonally functionalized chitosan scaffold with esterase-activatable release for nerve regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 229, p. 146–157, 28 Feb. 2023.

WEI, W. *et al.* Advanced hydrogels for the repair of cartilage defects and regeneration. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 4, p. 998–1011, 1 Apr. 2021.

WILLIAMS, D. Concepts in biocompatibility: new biomaterials, new paradigms and new testing regimes. **Biocompatibility and Performance of Medical Devices**, p. 3–17, 1 Jan. 2012.

WILLIAMS, D. F. Biocompatibility pathways and mechanisms for bioactive materials: the bioactivity zone. **Bioactive Materials**, v. 10, p. 306–322, 1 Apr. 2022.

WLASCHEK, M. *et al.* Connective tissue and fibroblast senescence in skin aging. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 4, p. 985–992, 1 Apr. 2021.

WU, X. *et al.* Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 1167–1177, 1 Mar. 2010.

XIANG, W. *et al.* Applications of chitosan-based biomaterials: from preparation to spinal cord injury neuroprosthetic treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 230, p. 123447, 1 Mar. 2023.

XU, J. *et al.* A biological functional hybrid scaffold based on decellularized extracellular matrix/gelatin/chitosan with high biocompatibility and antibacterial activity for skin tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, p. 840–849, 30 Sept. 2021.

XU, J. *et al.* Chitosan-based high-strength supramolecular hydrogels for 3D bioprinting. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 219, p. 545–557, 31 Oct. 2022a.

XU, J. *et al.* A 3D bioprinted decellularized extracellular matrix/gelatin/quaternized chitosan scaffold assembling with poly(ionic liquid)s for skin tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 220, p. 1253–1266, 1 Nov. 2022b.

XU, W. *et al.* Engineering the biomechanical microenvironment of chondrocytes towards articular cartilage tissue engineering. **Life Sciences**, v. 309, p. 121043, 15 Nov. 2022c.

YADAV, M. *et al.* Advances and challenges in the use of chitosan and its derivatives in biomedical fields: a review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 5, p. 100323, 1 June 2023.

YAHIA, S.; KHALIL, I. A.; EL-SHERBINY, I. M. Fortified gelatin-based hydrogel scaffold with simvastatin-mixed nanomicelles and platelet rich plasma as a promising bioimplant for tissue regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 225, p. 730–744, 15 Jan. 2023.

YAN, D. *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and chitosan derivatives in the treatment of enteric infections. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7136, 1 Jan. 2021.

YANG, Y. *et al.* Chitosan nanocarriers containing essential oils as a green strategy to improve the functional properties of chitosan: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 236, p. 123954, 1 May 2023.

YOU, B. C. *et al.* Dielectric and biodegradation properties of biodegradable nano-hydroxyapatite/starch bone scaffold. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 18, p. 3215–3226, 1 May 2022.

ZHANG, F. *et al.* Fabrication of gelatin–hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 3, p. 474–481, 1 Apr. 2011.

ZHANG, M. *et al.* Electrospun nanofiber/hydrogel composite materials and their tissue engineering applications. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 162, p. 157–178, 1 Nov. 2023a.

ZHANG, R. *et al.* Application of chitosan with different molecular weights in cartilage tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 314, p. 120890, 15 Aug. 2023b.

ZHANG, W. *et al.* Preparation of chitosan-sodium alginate/bioactive glass composite cartilage scaffolds with high cell activity and bioactivity. **Ceramics International**, v. 49, n. 2, p. 1987–1996, 15 Jan. 2023c.

ZHANG, X. *et al.* A novel approach to directly achieve SiO₂ hollow nanofibers via mono-axis electrospinning united with fluorination technique. **Materials Letters**, v. 330, 1 Jan. 2023d.

ZHANG, Y. *et al.* Evolution of biomimetic ECM scaffolds from decellularized tissue matrix for tissue engineering: a comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 246, p. 125672, 15 Aug. 2023e.

ZHANG, Z. *et al.* A review of preparation methods of porous skin tissue engineering scaffolds. **Materials Today Communications**, v. 32, p. 104109, 1 Aug. 2022.

ZHAO, Q. *et al.* Recent advances on formation mechanism and functionality of chitosan-based conjugates and their application in o/w emulsion systems: a review. **Food Chemistry**, v. 380, p. 131838, 30 June 2022a.

ZHAO, W. *et al.* Chitosan/silk fibroin biomimic scaffolds reinforced by cellulose acetate nanofibers for smooth muscle tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 298, p. 120056, 15 Dec. 2022b.

ZHU, M. *et al.* Chondroinductive/chondroconductive peptides and their-functionalized biomaterials for cartilage tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 9, p. 221–238, 1 Mar. 2022.

ZHU, Y. *et al.* Novel microsphere-packing synthesis, microstructure, formation mechanism and in vitro biocompatibility of porous gelatin/hydroxyapatite microsphere scaffolds. **Ceramics International**, v. 47, n. 22, p. 32187–32194, 15 Nov. 2021.