

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS LAMELARES  
E POROSAS DE XANTANA E QUITOSANA PARA APLICAÇÃO  
NO TRATAMENTO DE LESÕES DE PELE**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À FACULDADE  
DE ENGENHARIA QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO  
DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA,  
NA ÁREA DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**AUTORA:**

**Márcia Zilioli Bellini**

**ORIENTADORA:**

**Profa. Dra. Ângela Maria Moraes**

**CO-ORIENTADOR:**

**Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto**

**Campinas, 09 de fevereiro de 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

B417d	<p>Bellini, Márcia Zilioli</p> <p>Desenvolvimento de membranas lamelares e porosas de xantana e quitosana para aplicação no tratamento de lesões de pele / Márcia Zilioli Bellini. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientadores: Ângela Maria Moraes, Pedro de Oliva Neto.</p> <p>Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.</p> <p>1. Biomateriais. 2. Quitosana. 3. Xantana. 4. células-tronco. I. Moraes, Ângela Maria. II. Oliva Neto, Pedro de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.</p>
-------	---

Título em Inglês: Development of lamellar and porous chitosan and xanthan membrane for treatment of skin lesions

Palavras-chave em Inglês: Biomaterials, Chitosan, Xanthan, Stem cells

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

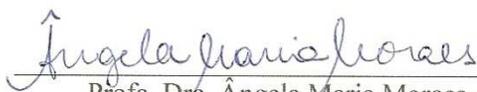
Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Ana Paula Rodrigues, Cacília Amélia de Carvalho Zavaglia,  
Kamilla Swiech, Maria Beatriz Puzzi

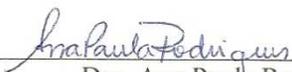
Data da defesa: 09-02-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

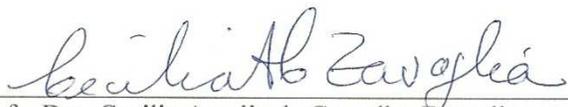
Tese de Doutorado defendida por Márcia Zilioli Bellini e aprovada em 09 de fevereiro de 2012  
pela banca examinadora constituída pelos doutores:

  
Prof. Dra. Ângela Maria Moraes- Orientadora

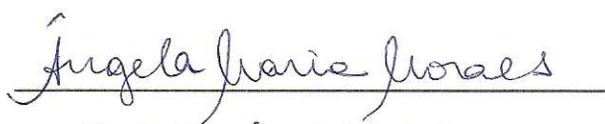
  
Prof. Dra. Kamilla Swiech

  
Dra. Ana Paula Rodrigues

  
Prof. Dra. Maria Beatriz Puzzi

  
Prof. Dra. Cecilia Amelia de Carvalho Zavaglia

Este exemplar corresponde à versão final da tese intitulada *Desenvolvimento de Membranas Lamelares e Porosas de Xantana e Quitosana Para Aplicação no Tratamento de Lesões de Pele* defendida por Márcia Zilioli Bellini, orientada pela Profa. Dra. Ângela Maria Moraes e co-orientada pelo Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto.

A handwritten signature in black ink, reading "Ângela Maria Moraes", written over a horizontal line.

**Profa. Dra. Ângela Maria Moraes**

## **Agradecimentos**

A Deus.

Aos meus filhos, Lays e Pedro, e também ao meu esposo Rogério, pelo apoio e total compreensão.

À Profa Ângela Maria Moraes pela amizade e orientação em todas as etapas deste trabalho.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP pela disponibilidade de recursos físicos e de equipamentos.

Ao Prof. Pedro de Oliva Neto, pelo apoio, orientação e doação de amostras de goma xantana.

Ao Prof. João Tadeu Ribeiro Paes, pelo auxílio na extração e cultivo de células-tronco mesenquimais.

Ao Sr. Manuel Marcos Cunha Quatter da empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda pela esterilização das membranas utilizando-se o óxido de etileno.

À Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo e suporte financeiro.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro na compra de equipamentos, materiais de consumo.

Ao Laboratório de Cultura Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto (Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP), ao Prof. Júlio César Voltarelli e, em especial, à aluna de doutorado Carolina Caliári Oliveira pela parceria na realização dos ensaios *in vivo*.

Ao Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC/FEQ/UNICAMP) e à técnica Kelly Palma pelo auxílio na realização das microscopias eletrônicas de varredura.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica – IB, pela realização das microscopias eletrônicas de varredura das amostras com células aderidas.

Às Bancas de Qualificação e de Defesa de Tese, compostas pelos professores Beatriz Puzzi Cecília Zavaglia, Kamilla Swiech, Luismar Marques Porto, João Tadeu Ribeiro Paes, Ana Paula Rodrigues e Bronislaw Palokiewicz, pelas correções e sugestões para a conclusão deste trabalho.

Aos demais professores e funcionários da FEQ e amigos da UNICAMP, que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu aprendizado e para o bom andamento do trabalho.

## RESUMO

Materiais poliméricos são frequentemente utilizados na engenharia de tecidos como cobertura ou suporte para o crescimento celular, permitindo a adesão, o crescimento e a manutenção da função das células neles cultivadas, de forma a viabilizar o desenvolvimento e/ou a cicatrização de tecidos como a pele. Dentre os requisitos para a seleção destes materiais destacam-se propriedades como biocompatibilidade, tamanho e formato de poros, comportamento na presença de fluidos biológicos, assim como as próprias características do tecido a ser regenerado. Este trabalho visou ao desenvolvimento e à avaliação do uso de membranas constituídas de complexos polieletrólitos obtidos com os polímeros xantana e quitosana como curativos dérmicos e suportes de adesão e crescimento de células-tronco mesenquimais (CTMs). Para tal, amostras lamelares e porosas foram preparadas e caracterizadas quanto à morfologia, espessura, comportamento em soluções aquosas e resistência mecânica, assim como quanto à citotoxicidade direta e indireta a células L929. Testes de adesão e proliferação de CTMs sobre o biomaterial também foram realizados. Os resultados obtidos mostram que diferentes proporções poliméricas, a inclusão ou não da etapa de desaeração e a adição de tensoativos resultam em materiais com distintas características. Membranas com maior concentração de xantana mostram-se instáveis frente à exposição por longos períodos a meio de cultivo celular, enquanto que membranas com proporção polimérica equivalente sem adição de surfatantes e desaeradas tendem a ser finas e transparentes, apresentando elevada capacidade de absorção de água (85,57g/g) e de fluido corpóreo simulado (15,78g/g), com perda de massa máxima de 17% quando expostas por 144h a meio de cultura de células animais. Tais membranas não são citotóxicas a células L929 e apresentam adequada estrutura para adesão e proliferação de CTMs, revelando-se ideais para o uso como curativos dérmicos bioativos. A adição de Pluronic F68 durante a preparação das amostras de igual proporção polimérica possibilitou a obtenção de membranas porosas e espessas, com características favoráveis para a aplicação como suportes para engenharia de tecidos, como a presença de poros interconectados e distribuídos de forma homogênea pela estrutura, baixa toxicidade *in vitro*, espessura de 1,84 mm, elevada absorção de fluidos fisiológicos (17,99g/g) e de meio de cultivo celular (8,58g/g) e perda de massa em meio de cultivo de 33% em 144 horas, além de adequada estrutura para adesão e proliferação de CTMs.

**PALAVRAS-CHAVE:** biomateriais, quitosana, xantana, curativos, suportes, célula-tronco mesenquimal.

## ABSTRACT

Polymeric materials are frequently used in tissue engineering as dressings or scaffolds, allowing the adhesion, growth and maintenance of function of the cells cultured on their surfaces, in order to facilitate the development and / or healing of tissues such as skin. The requirements for the selection of these materials include properties such as biocompatibility, pore size and shape, behavior in the presence of biological fluids, as well as the actual characteristics of the tissue to be regenerated. This work aimed to develop and evaluate the use of membranes formed by polyelectrolyte complexes obtained from the polymers xanthan and chitosan as dermal dressings and supports for the attachment and growth of mesenchymal stem cells (MSCs). Lamellar and porous samples were prepared and characterized according to morphology, thickness, behavior in aqueous solutions and mechanical strength, as well as direct and indirect cytotoxicity to L929 cells. Tests of adhesion and proliferation of MSCs on the obtained biomaterial were also performed. The results show that different polymer ratios, the inclusion or not of a deaeration step and the addition of surfactants result in materials with different characteristics. Membranes with high proportions of xanthan were not stable for long periods of exposure to animal cell culture medium, while membranes with equivalent polymeric proportion, degassed and not prepared in the presence of surfactants tended to be thin and transparent, presenting high absorption capacity of water (85.57 g/g) and simulated body fluid (15.78 g/g) and mass loss of up to 17% when exposed for 144h to animal cells culture medium. Those membranes were not cytotoxic to L929 cells and provided adequate structure for adhesion and proliferation of MSCs, showing characteristics suitable for use as dressings for skin lesions. The addition of Pluronic F68 during the preparation of samples of equal proportion of xanthan and chitosan resulted in thick porous membranes, with favorable characteristics for application as scaffolds for tissue engineering, such as the presence of homogeneously distributed interconnected pores, low toxicity in vitro, thickness of 1.84 mm, high absorption of physiological fluids (17.99 g/g) and cell culture medium (8.58 g/g), mass loss in culture medium of 33% after 144 hours, and adequate structure for adhesion and proliferation of MSCs.

**KEYWORDS:** biomaterials, chitosan, xanthan, wound dressing, scaffolds, mesenchymal stem cells.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
ÍNDICE .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Engenharia de tecidos .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Curativos e substitutos dérmicos .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Terapia celular e células-tronco mesenquimais .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4. Suportes poliméricos para o cultivo celular .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4.1. Composição dos scaffolds .....</b>	<b>18</b>
2.4.1.1. <i>Quitosana</i> .....	19
2.4.1.2. <i>Xantana</i> .....	25
2.4.1.3. <i>O Complexo Xantana-Quitosana</i> .....	28
<b>2.4.2. Agentes porogênicos.....</b>	<b>30</b>
2.4.2.1. <i>Tween 80</i> .....	30
2.4.2.2. <i>Pluronic F68</i> .....	31
<b>2.5. Estratégias de análise da adequação do uso de membranas como scaffolds .....</b>	<b>33</b>
<b>2.5.1. Caracterização físico-química .....</b>	<b>33</b>
<b>2.5.2. Caracterização biológica .....</b>	<b>34</b>
2.5.2.1. <i>Testes in vitro</i> .....	34
2.5.2.2. <i>Testes in vivo</i> .....	37
<b>2.6. Considerações finais .....</b>	<b>38</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Materiais .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.1. Reagentes Químicos.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.2. Células e animais .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2. Métodos .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2.1. Preparação dos suportes poliméricos .....</b>	<b>41</b>

<b>3.2.2. Caracterização físico-química dos suportes poliméricos</b> .....	44
3.2.2.1. <i>Aspecto e morfologia da superfície e da secção transversal</i> .....	44
3.2.2.2. <i>Espessura</i> .....	44
3.2.2.3. <i>Capacidade de absorção e estabilidade durante exposição a             soluções aquosas</i> .....	44
3.2.2.4. <i>Comportamento no meio de cultura RPMI-1640 suplementado</i> .....	45
3.2.2.5. <i>Tensão e alongamento na ruptura</i> .....	45
3.2.2.6. <i>Expansão volumétrica</i> .....	46
<b>3.2.3. Caracterização biológica quanto à citotoxicidade</b> .....	47
3.2.3.1. <i>Preservação e reativação das células L929 e obtenção do inóculo</i> .....	47
3.2.3.2. <i>Caracterização da cultura de células L929</i> .....	48
3.2.3.3. <i>Análise da citotoxicidade indireta pelo ensaio de eluição e             avaliação com cristal violeta</i> .....	49
3.2.3.4. <i>Ensaio MTT ((3-(4,5-dimeteiltiazol-2-il) - 2,5-difenil             tetrazolium brometo)</i> .....	50
3.2.3.5. <i>Ensaio de citotoxicidade direta com cristal violeta</i> .....	51
3.2.3.6. <i>Ensaio de proliferação celular</i> .....	52
<b>3.2.4. Avaliação da mutagenicidade</b> .....	53
<b>3.2.5. Obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais</b> .....	53
3.2.5.1. <i>Extração da medula óssea dos animais</i> .....	53
3.2.5.2. <i>Cultura das células-tronco mesenquimais</i> .....	54
3.2.5.3. <i>Imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais</i> .....	55
<b>3.2.6. Adesão e proliferação das CTMs nas membranas</b> .....	56
<b>3.2.7. Análise das CTMs aderidas nas membranas por MEV</b> .....	56
<b>3.2.8. Ensaio preliminar <i>in vivo</i></b> .....	57
3.2.8.1. <i>Procedimento experimental</i> .....	58
3.2.8.2. <i>Avaliação clínico-fotográfica do quadro evolutivo das lesões</i> .....	59
<b>4. RESULTADOS</b> .....	61
<b>4.1. Caracterização físico-química das membranas preparadas com xantanas             de qualidade analítica e alimentícia, desaeradas e sem adição de             tensoativos</b> .....	61

4.1.1. Aspecto e morfologia do material .....	61
4.1.2. Efeito da composição na espessura das membranas .....	64
4.1.3. Capacidade de absorção de soluções aquosas .....	66
4.1.4. Variação de massa durante exposição a soluções aquosas.....	68
4.1.5. Absorção e perda de massa durante a exposição ao RPMI-1640 suplementado .....	69
4.2. <i>Caracterização físico-química das membranas preparadas sem desaeração adicionando ou não tensoativos</i> .....	70
4.2.1. Aspecto e morfologia do material .....	71
4.2.2. Efeito da composição na espessura das membranas .....	75
4.2.3. Capacidade de absorção de soluções aquosas .....	77
4.2.4. Variação de massa durante exposição a soluções aquosas.....	78
4.2.5. Absorção e perda de massa durante a exposição ao RPMI-1640 suplementado.....	79
4.3. <i>Avaliação das propriedades mecânicas e expansão volumétrica</i> .....	81
4.3.1. Propriedades mecânicas.....	81
4.3.2. Expansão volumétrica .....	82
4.4. <i>Caracterização da membrana preparada utilizando xantana produzida em escala piloto</i> .....	84
4.4.1. Aspecto e morfologia .....	85
4.4.2. Caracterização físico-química .....	86
4.5. <i>Comportamento das células L929 em cultivo</i> .....	89
4.6. <i>Avaliação da toxicidade das membranas de xantana e quitosana a células L929</i> .....	90
4.6.1. Ensaio de citotoxicidade indireta com cristal violeta .....	91
4.6.2. Ensaio de citotoxicidade indireta com MTT .....	94
4.6.3. Teste de contato direto .....	95
4.6.4. Ensaio de proliferação celular .....	98
4.6.5. Caracterização das células-tronco mesenquimais obtidas de camundongos C57Bl6 e ratos Wistar.....	99
4.6.6. Teste de adesão e proliferação das CTMs nas membranas .....	103

4.7. Análise da mutagenicidade .....	109
4.8. Testes preliminares <i>in vivo</i> .....	110
5. DISCUSSÃO .....	113
6. CONCLUSÕES.....	129
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	130
8. BIBLIOGRAFIA .....	131
ANEXOS .....	151

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>1A:</b>	membrana de proporção mássica 1:1 ( $X_{\sigma}:Q$ ) desaerada, sem tensoativos
<b>1B:</b>	membrana de proporção mássica 1:1 ( $X_{\text{keltrol}}:Q$ ) desaerada, sem tensoativos
<b>1C:</b>	membrana de proporção mássica 1:1 ( $X_{\sigma}:Q$ ) não desaerada, sem tensoativos
<b>1D:</b>	membrana de proporção mássica 1:1 ( $X_{\sigma}:Q$ ) não desaerada, preparada na presença de Tween 80
<b>1E:</b>	membrana de proporção mássica 1:1 ( $X_{\sigma}:Q$ ) não desaerada, preparada na presença de Pluronic F68
<b>1F:</b>	membrana de proporção mássica 1:1 ( $X_{\text{pilot}}:Q$ ) desaerada, sem tensoativos
<b>2A:</b>	membrana de proporção mássica 1,2:0,8 ( $X_{\sigma}:Q$ ) desaerada, sem tensoativos
<b>2B:</b>	membrana de proporção mássica 1,2:0,8 ( $X_{\text{keltrol}}:Q$ ) desaerada, sem tensoativos
<b>2C:</b>	membrana de proporção mássica 1,2:0,8 ( $X_{\sigma}:Q$ ) não desaerada, sem tensoativos
<b>2D:</b>	membrana de proporção mássica 1,2:0,8 ( $X_{\sigma}:Q$ ) não desaerada, preparada na presença de Tween 80
<b>2E:</b>	membrana de proporção mássica 1,2:0,8 ( $X_{\sigma}:Q$ ) não desaerada, preparada na presença de Pluronic F68
<b>3A:</b>	membrana de proporção mássica 1,5:0,5 ( $X_{\sigma}:Q$ ) desaerada, sem tensoativos
<b>3B:</b>	membrana de proporção mássica 1,5:0,5 ( $X_{\text{keltrol}}:Q$ ) desaerada, sem tensoativos
<b><math>\alpha</math>-MEM:</b>	meio essencial mínimo
<b>CT:</b>	célula-tronco
<b>CTA:</b>	célula-tronco adulta
<b>CTE:</b>	célula-tronco embrionária
<b>CTG:</b>	célula-tronco germinativa
<b>CTH:</b>	célula-tronco hematopoética
<b>CTM:</b>	célula-tronco mesenquimal
<b>DMSO:</b>	dimetil sulfóxido
<b>FCS:</b>	fluido corpóreo simulado
<b>IL:</b>	índice de lise

<b>IZ:</b>	índice de zona
<b>L929:</b>	linhagem fibroblastóide de ratos
<b>MEV:</b>	microscopia eletrônica de varredura
<b>MTT:</b>	3-(4,5-dimetilazol-2-il)brometo-2,5-difeniltetrazol
<b>OE</b>	óxido de etileno
<b>PBS/EDTA:</b>	tampão fosfato salino/ácido etileno diamino tetracetato dissódico
<b>PEC:</b>	complexo polieletrólito
<b>Q:</b>	quitosana
<b>RPMI 1640:</b>	meio de cultivo celular Roswell Park Memorial Intitut
<b>SDS:</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>SFB:</b>	soro fetal bovino
<b>SS:</b>	solução salina (NaCl a 0,9% m/v em água)
<b>X:</b>	xantana
<b>X<sub>keltrol</sub>®:</b>	xantana de grau alimentício tipo Keltrol® – CPKelco
<b>X<sub>piloto</sub>:</b>	xantana produzida em escala piloto com tecnologia desenvolvida na UNESP de Assis
<b>X<sub>sigma</sub>:</b>	xantana de grau analítico – Sigma Chemical Co.

## 1. INTRODUÇÃO

A pele, maior órgão do corpo humano, constitui a primeira barreira de defesa do organismo, desempenhando importantes funções na homeostasia, como a regulação da temperatura corporal e a proteção contra a desidratação, além de proporcionar apoio aos vasos sanguíneos e nervos (Rodrigues *et al.*, 2008; Ratner *et al.*, 1996). Lesões extensas e profundas da pele e mucosas podem causar destruição da derme e dos elementos epidérmicos, resultando em um processo de reparo lento e sujeito a complicações.

Uma solução corrente para este tipo de problema consiste em enxertos de pele humana, autólogos ou não, que hospedam o tecido conjuntivo e estimulam o desenvolvimento de vasos sanguíneos (Souto *et al.*, 2006). No entanto, esta solução é limitada pela escassez de doadores, por envolver sempre um considerável risco de rejeição e, em geral os enxertos são degradados precocemente (Souto *et al.*, 2009).

Neste contexto, epidermes artificiais podem servir como substitutos temporários, recobrando a lesão e reduzindo a perda de fluidos e a ocorrência de infecções, além de possibilitar a melhora do prognóstico do paciente e diminuir seu tempo de internação.

É neste cenário que surge um novo campo da biotecnologia - a Engenharia de Tecidos – que consiste em um conjunto de conhecimentos e técnicas para a reconstrução de órgãos e tecidos. Baseada em conhecimentos das áreas das ciências biológicas e médicas, e da engenharia de materiais, dentre outras, esta técnica envolve o cultivo *in vitro* de células viáveis do doador sobre suportes, em geral poliméricos, os chamados *scaffolds* (Silva, 2008; Asti *et al.*, 2005; Barbanti *et al.*, 2005).

Uma das abordagens tidas como ideais na engenharia de tecidos para a regeneração de pele lesada fundamenta-se no uso de matrizes tridimensionais obtidas a partir de substâncias biocompatíveis, nas quais as células possam se desenvolver. Antes de sua aplicação na lesão, tais matrizes seriam inoculadas com células saudáveis obtidas por biópsia, idealmente do próprio paciente. Estas células proliferariam na matriz que, então, seria colocada na região danificada.

Com o passar do tempo, a matriz se degradaria naturalmente, sendo substituída por um tecido saudável.

Atualmente os curativos utilizados em lesões de pele buscam primordialmente proteger as lesões do ambiente circundante. Entretanto, um curativo ideal deve apresentar algumas propriedades peculiares, dentre elas: prevenir infecções secundárias, prover um microambiente de regeneração úmido, possibilitar o isolamento térmico, poder ser removido sem causar danos ao tecido em recuperação, ser livre de partículas e toxinas, estimular a reconstituição tecidual, além de absorver o exsudato presente na lesão (Wittaya-Areekul e Prahsarn, 2006).

A seleção do material a ser usado na preparação do suporte é um dos primeiros passos para a reconstrução de um órgão, dependendo do tecido a ser regenerado. Propriedades como biocompatibilidade do material, resistência mecânica, tamanho e formato de poros são de grande relevância, além de sua interação com as células, de modo a permitir sua adesão, crescimento, migração e diferenciação, caso seja requerida (Machado *et al.*, 2006; Hutmacher, 2000).

Usualmente, biomateriais porosos são produzidos por liofilização, uma técnica de desidratação pela qual a água e outros solventes contidos no material são removidos por sublimação, porém trata-se de um método oneroso, trabalhoso e que geralmente apresenta dificuldades no aumento em escala. Outra forma de obtenção de poros no biomaterial é a adição de agentes porogênicos solubilizáveis, como glicose ou NaCl (Bueno e Moraes, 2011; Ma *et al.*, 2001), no entanto, caso não sejam removidos eficientemente, podem ocasionar um aumento da osmolalidade do meio de cultivo celular. Alternativamente, é possível a obtenção de membranas porosas pela incorporação dos tensoativos Tween 80 e Pluronic F68 em complexos polieletrólitos propiciando a formação de poros e ainda facilitando a dispersão polimérica (Bueno e Moraes, 2011).

Diversos estudos têm apontado o uso de polímeros biorreabsorvíveis de origem natural como quitosana, alginato, gelatina, celulose e seus derivados (Meng *et al.*, 2010; Wittaya-Areekul e Prahsarn, 2006; Zhao *et al.*, 2002), separadamente ou combinados, para aplicações em engenharia de tecidos. Assim, sistemas à base de polissacarídeos como a quitosana e a xantana representam uma alternativa promissora para a produção destes suportes.

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, formado por dois monômeros, a D-glicosamina e a N-acetil-D-glicosamina (Meng *et al.*, 2010). Características como elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades de absorção e adsorção, aliados a sua capacidade de acelerar a cicatrização e a sua atividade antimicrobiana (Campos *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2008; Mi *et al.*, 2001), possibilitam sua utilização na confecção de curativos dérmicos e de *scaffolds*.

A natureza policatiônica da quitosana permite seu uso na preparação de complexos polieletrólitos (PECs) com espécies aniônicas (Meng *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2008; George e Abraham, 2006). Sendo a xantana um poliânion, sua interação com a quitosana, em condições apropriadas, possibilita a formação de um complexo iônico com características interessantes para o uso como curativos (Veiga e Moraes, 2011).

Assim como a quitosana, a xantana é um polissacarídeo atóxico, sendo obtido por fermentação pela bactéria *Xantomonas campestris*, podendo apresentar atividade emulsificante, estabilizante e flocculante, formando géis, filmes e membranas (Bejenariu *et al.*, 2008). Sua complexação com quitosana, através de interações entre os grupos amino da quitosana e carboxil da xantana, possibilita a obtenção de matrizes que apresentam elevada absorção de soluções aquosas e com estabilidade comprovada em fluidos biológicos (Veiga e Moraes, 2011). Tais características são fundamentais na aplicação como curativos e suportes tridimensionais para o cultivo celular na área de engenharia de tecidos.

Atualmente, a terapia celular voltada para o tratamento de lesões cutâneas ulceradas depende frequentemente de transplantes autólogos de epiderme reconstituída *in vitro*. Entretanto, nos últimos anos, a expansão do conhecimento sobre células-tronco (CTs) abriu perspectivas para sua utilização no tratamento de várias patologias, inclusive de lesões cutâneas. Células-tronco mesenquimais (CTMs) são CTs encontradas em diversos tecidos adultos, como medula óssea, tecido adiposo e sangue do cordão umbilical. O potencial regenerativo das CTMs deve-se à sua grande capacidade de diferenciação (multipotencialidade). Além disso, as CTMs secretam um largo espectro de moléculas bioativas capazes de equilibrar o microambiente de regiões lesadas (Oliveira, 2010).

Dessa forma, o desenvolvimento de curativos bioativos associando-se CTMs a dispositivos porosos constituídos de polissacarídeos biocompatíveis pode representar uma alternativa viável para o tratamento de lesões de pele. Assim, o presente trabalho tem como principal objetivo analisar o potencial uso de membranas poliméricas, obtidas pela complexação de xantana e quitosana, como curativos e *scaffolds* para adesão e multiplicação de CTMs, destinados ao uso terapêutico em lesões de pele, sendo este o foco inovador deste trabalho.

Como objetivos específicos, neste trabalho propõem-se:

- Padronizar a produção e caracterização de membranas de xantana e quitosana, testando diferentes tipos de goma xantana e diferentes proporções dos polímeros quitosana e xantana;
- Avaliar a influência da adição de tensoativos nas características destas membranas;
- Avaliar o grau citotóxico e mutagênico do material produzido;
- Avaliar a aplicabilidade do uso das membranas produzidas como curativos para a cobertura de lesões cutâneas ulceradas;
- Testar a adesão e crescimento de células-tronco mesenquimais de camundongos e ratos nas matrizes produzidas, verificando a viabilidade de seu uso como *scaffolds*;
- Avaliar a recuperação da pele lesada mediada pelos dispositivos produzidos através de testes *in vivo*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O tema deste trabalho envolve o conhecimento de princípios da engenharia e das ciências da vida. Assim sendo, para sua melhor compreensão, fez-se necessária a realização de uma detalhada revisão da literatura a cerca destes assuntos, os quais são abordados a seguir.

### 2.1. Engenharia de tecidos

A busca pelo homem por padrões de vida superiores e maior longevidade tem gerado a necessidade de alternativas para o reparo e substituição de tecidos vivos vitimados por traumas ou patologias. Neste contexto, o uso de biomateriais, definidos como materiais farmacologicamente inertes, utilizados em implantes ou incorporados a sistemas biológicos a fim de suplementar ou substituir funções de tecidos ou órgãos (Bhat, 2005), aparece com grande destaque.

Atualmente as terapias disponíveis consistem fundamentalmente de reconstruções cirúrgicas e de transplantes de órgãos. No caso de lesões cutâneas, podem ser citados o enxerto dermo-epidérmico e os retalhos dermo-cutâneo e fásquio-cutâneo (Calil *et al.*, 2001). Embora não exista dúvida que essas terapias têm salvado e melhorado incontáveis vidas, elas têm sérias limitações terapêuticas e metodológicas. Dois dos maiores problemas associados a tais abordagens são os efeitos colaterais causados pelo uso contínuo de agentes imunossupressores para evitar a rejeição e a própria escassez de tecidos e órgãos disponíveis para transplantes (Tabata, 2009), o que é agravado no caso de grandes áreas queimadas.

É neste cenário que a engenharia de tecidos aparece como real opção, visando resolver esses problemas, propondo terapias alternativas para a reparação e regeneração tecidual, buscando restabelecer a capacidade funcional de tecidos lesados (Smith *et al.*, 2009). A engenharia de tecidos apresenta-se como um campo de pesquisa multidisciplinar, envolvendo conhecimentos das áreas de biologia, ciências da saúde e de engenharia e ciência dos materiais. Uma de suas abordagens mais recentes, e que oferece ótimas perspectivas para a obtenção de tecidos complexos em laboratório, é a utilização de matrizes porosas tridimensionais (*scaffolds*),

naturais ou sintéticas, que servem como moldes estruturais para o crescimento celular direto (Hou *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2007; Vacanti, 2006; Barbanti *et al.* 2005).

Esses suportes são inoculados com células vivas, provenientes de biópsias ou de células multipotentes que, na presença de fatores de crescimento e diferenciação, proliferam-se, como ilustrado na Figura 2.1. Providas das condições adequadas, as células criarão um tecido vivo que poderá ser usado como substituto ao ser reimplantado (Barbanti *et al.*, 2005; Asti *et al.*, 2005; Levenberg *et al.*, 2003).

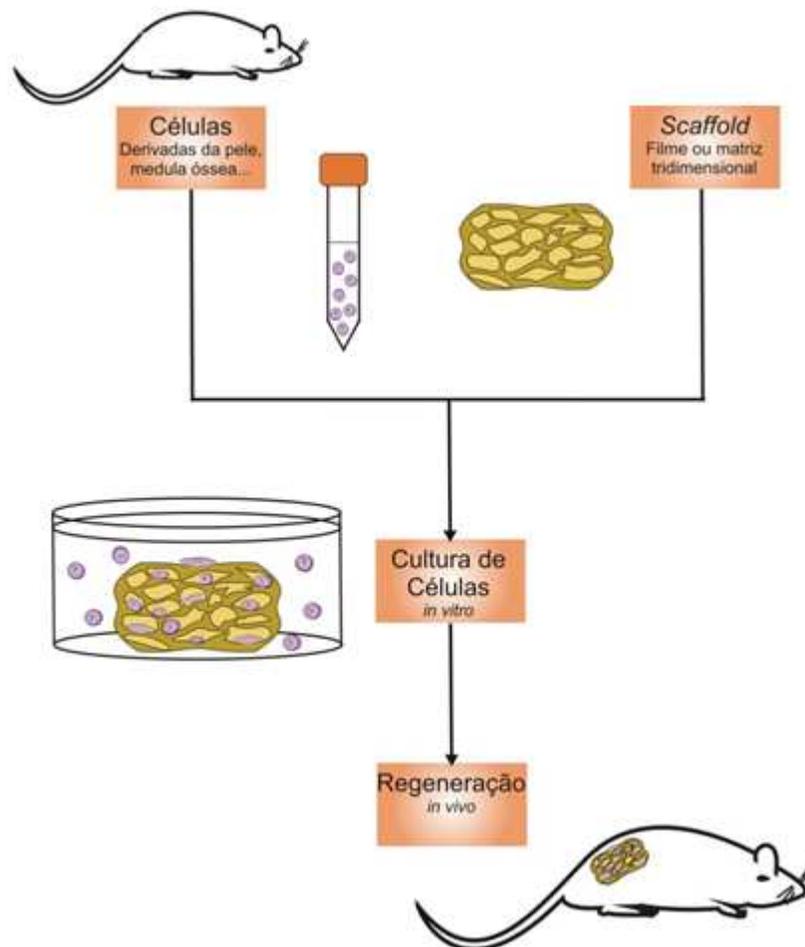


Figura 2.1 - Representação esquemática da técnica da Engenharia de Tecidos. Através da retirada de material do próprio paciente, células viáveis são expandidas *in vitro* sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds*, para então serem reinseridas no paciente, promovendo a regeneração de órgãos e tecidos vivos.

Um dos grandes desafios da medicina tem sido a reconstituição de pele em pessoas que sofrem queimaduras extensas. Substitutos de pele obtidos por engenharia de tecidos representam hoje uma opção terapêutica avançada para o tratamento de queimaduras graves e outros tipos de lesões cutâneas.

## ***2.2. Curativos e substitutos dérmicos***

A pele constitui a primeira barreira de defesa do corpo humano, desempenhando importantes funções na proteção contra uma grande variedade de agressões ambientais e na manutenção da homeostasia através da termo-regulação e do balanço de fluidos (Oliveira, 2010). É o maior órgão do corpo humano, com dimensões que variam, no adulto, de 1,5 a 2,0 m<sup>2</sup> e corresponde, em média, a 16% do peso corpóreo (Souto *et al.*, 2006; Dallan, 2005).

O epitélio cutâneo é composto de duas camadas principais, a epiderme e a derme, camadas que recobrem a hipoderme (Huss *et al.*, 2008). A epiderme, camada mais externa da pele, está posicionada sobre uma membrana basal que a separa da derme. As células da camada basal são mitoticamente ativas, conferindo à epiderme grande capacidade regenerativa (Ghazizadeh e Taichman, 2001).

Enquanto a epiderme atua como uma barreira externa, a derme confere força e flexibilidade. A elasticidade e resistência da derme são características essenciais que determinam os aspectos funcionais e estéticos da pele (Gagnani *et al.*, 2003). Desta forma, para uma completa regeneração da pele lesionada, ambas, derme e epiderme, devem ser substituídas ou a ferida irá se curar com uma cicatriz (Huss *et al.*, 2008).

Diversos tipos de lesões podem acometer esse tecido, porém, devido a seu alto potencial regenerativo, grande parte das lesões é corrigida espontaneamente, através do crescimento e da proliferação das células remanescentes da derme (fibroblastos e outras células do estroma) e da epiderme (queratinócitos e melanócitos). No entanto, em queimaduras graves (como as de segundo grau profundo e as de terceiro grau) e úlceras crônicas de várias etiologias, esse processo

de regeneração espontânea é gravemente comprometido, havendo frequentemente a necessidade de intervenções terapêuticas.

Desde o início da história da civilização há relatos de tentativas para se curar feridas abertas na pele. O homem de Neanderthal da região do Iraque já tratava de queimaduras com extratos de plantas, cerca de 60.000 anos a.C. Na Mesopotâmia, as feridas eram limpas com leite e/ou água e cobertas com resina, mel, lã de carneiro e cascas de árvores, e no Egito antigo foi observado que a úlcera fechada com versões primitivas de curativos cicatrizava antes que a mantida aberta. No início do século XIX curativos feitos de algodão e lã eram largamente utilizados (Bosnardo, 2010).

Atualmente são conhecidos diversos tipos de curativos para o tratamento das lesões de pele, indo desde os curativos tradicionais com gaze, pomadas e ataduras aos curativos bioativos, que liberam substâncias ativas na cicatrização da ferida, interagindo diretamente com as camadas da pele e promovendo a aceleração do processo de cura, mas que são caros e nem sempre acessíveis às condições econômicas do paciente.

Ao contrário dos curativos convencionais que favorecem uma proteção passiva da ferida, um curativo eficaz nos dias de hoje deve não só a proteger a ferida de ambientes vizinhos, como também promover o processo de cura, proporcionando um microambiente ideal, hidratado e com isolamento térmico, removendo o excesso de exsudato e ainda ser livre de partículas e produtos tóxicos (Wittaya-Areekul e Prahsarn, 2006).

Diversos tipos de curativos e coberturas para o tratamento de lesões dérmicas encontram-se disponíveis hoje em dia no mercado. Dentre muitos, podem ser citados os produzidos a partir de alginato de cálcio, como: Algoderm®, Curasorb®, Kaltostat®, Melgisorb® e SeaSorb®, os produzidos com alginato de cálcio associados à prata (Actcoal®), carvão ativado (Carboflex®), além dos dispositivos à base de poliuretano (Allevyn®) e de hidrocolóides como gelatina e pectina (Ultec PRO®). Destacam-se ainda as matrizes de regeneração dérmica à base de colágeno bovino (Integra®, Kollagen®) e suíno (TransCyte®), as biomembranas derivadas do látex vegetal de seringueira *Hevea brasiliensis*, com fator de crescimento vaso-endothelial, que acelera a formação do tecido de granulação (Biocure®) e as derivadas de microfibras de celulose (Membracel®) que, de acordo com o fabricante, apresentam elevada elasticidade.

Hoje em dia a forma convencional de tratamento de lesões extensas e profundas da pele são os enxertos de pele humana, que podem ser autólogos ou não. Esses enxertos hospedam o tecido conjuntivo e estimulam o desenvolvimento de vasos sanguíneos. No entanto, esta solução é limitada pela extensão da área doadora, pela condição clínica dos pacientes e pela escassez de doadores, além do que os enxertos podem ser rejeitados ou então degradados precocemente, garantindo apenas uma cobertura temporária da lesão (Rehder *et al.*, 2004).

Nos últimos anos a engenharia de tecidos tem apresentado grandes avanços, em especial na área da dermatologia. As primeiras aplicações clínicas de células humanas começaram por volta de 1980, com experimentos usando fibroblastos e queratinócitos para a regeneração em tecidos de pele (Ikada, 2006), e desde então, técnicas promissoras de produção de curativos dérmicos bioativos têm sido descritas.

Curativos à base de derme acelular, obtida de bancos de pele, com posterior cultivo de células autólogas dérmicas e epidérmicas possibilitam a sobrevivência de pacientes com lesões graves, que nas últimas décadas levavam os indivíduos à morte e continuam a evoluir desta forma em lugares onde não há esse tipo de tecnologia (Gagnani *et al.*, 2003).

Recentes estudos relatam a formação de pele humana, reconstituída *in vitro*, morfológica e funcionalmente compatível com a pele humana observada *in vivo*. Rehder e colaboradores (2004) reconstruíram *in vitro* epiderme humana completamente diferenciada através da cultura de queratinócitos e melanócitos sobre uma derme humana morta desepidermizada.

Souto e colaboradores (2006) reproduziram *in vitro* a formação de pele composta de derme e epiderme associadas, inoculando células epidérmicas humanas (queratinócitos e melanócitos) em uma matriz de colágeno bovino contendo fibroblastos em seu interior.

No entanto, técnicas que envolvam a utilização de matrizes biológicas, humanas ou não, como suportes de crescimento celular tornam-se limitadas devido à escassez de doadores e à possibilidade de transmissão de agentes patogênicos. Neste contexto, o desenvolvimento de matrizes poliméricas produzidas em laboratórios com materiais inertes destinadas ao uso como suportes de crescimento e desenvolvimento celular é de grande relevância.

Outra grande limitação de técnicas que utilizam matrizes biológicas é o tempo necessário para a produção desses substitutos dérmicos, cerca de 4 a 5 semanas (Souto *et al.*, 2006). Este longo período de espera pode causar desidratação e predispor o paciente a infecções. Assim, epidermes artificiais produzidas a partir de células multipotentes poderiam servir de substitutos temporários enquanto o paciente aguardaria por enxertos autólogos ou mesmo a própria recuperação.

Nos últimos anos, a expansão do conhecimento sobre células-tronco (CTs) abriu perspectivas para sua utilização no tratamento de várias patologias, inclusive de lesões cutâneas. Pesquisadores franceses liderados pela Dra. Christiane Baldeschi conseguiram produzir uma epiderme pluriestratificada a partir de células-tronco embrionárias humanas. Inicialmente, a equipe induziu a diferenciação destas células em queratinócitos que, posteriormente, foram transplantados em camundongos imunodeficientes. Doze semanas após o transplante, os animais desenvolveram uma pele com as mesmas características da pele adulta humana (Guenou *et al.*, 2009).

No entanto, o uso de células-tronco humanas embrionárias no Brasil e no mundo vem sendo alvo de grande polêmica. Desta forma, a utilização de linhagens celulares multipotentes provenientes do tecido adulto é especialmente interessante. As possibilidades de diferenciação conferidas às diversas linhagens e tipos de células-tronco adultas (CTAs), tanto em ensaios *in vitro* quanto em modelos experimentais de entidades clínicas *in vivo*, disponibilizam suficiente embasamento teórico para a aplicação terapêutica no espectro da engenharia de tecidos.

O emprego de células-tronco mesenquimais (CTMs) na bioengenharia tecidual, em especial, para o tratamento de lesões de pele, é alvo de crescente e intenso interesse em decorrência das propriedades a elas conferidas. Características como o fácil isolamento, multipotencialidade, potencial regenerativo e imunomodulador (Oliveira, 2010) favorecem o uso das CTMs para terapia celular de várias patologias, o que é especialmente interessante para a medicina regenerativa e a engenharia de tecidos.

### 2.3. Terapia celular e células-tronco mesenquimais

As células-tronco (CTs) representam uma promissora fonte terapêutica no contexto do emprego em transplantes, embora o controle de sua proliferação e diferenciação envolva o domínio de mecanismos complexos (Levenberg *et al.*, 2003). No entanto, devido ao potencial de diferenciação das CTs, tem sido alvo de crescente e intenso interesse, em especial, nas aplicações de bioengenharia tecidual (Atala, 2008).

Segundo Melton e Cowan (2004), célula-tronco é uma entidade clonal autorenovável, pluripotente e capaz de originar vários tipos celulares diferenciados. As CTs caracterizam-se pela capacidade de realizar divisões assimétricas, ou seja, podem originar células que permanecem indiferenciadas, repondo o *pool* de CTs para a substituição, remodelação e reparo tecidual, ou alternativamente, podem se diferenciar em células especializadas (Ribeiro-Paes *et al.*, 2009). As divisões assimétricas podem ser ainda direcionadas para a formação de tipos celulares maduros ou indiferenciados, de acordo com a necessidade do organismo (Silva Junior e Borojevic, 2007), como ilustra a Figura 2.2.

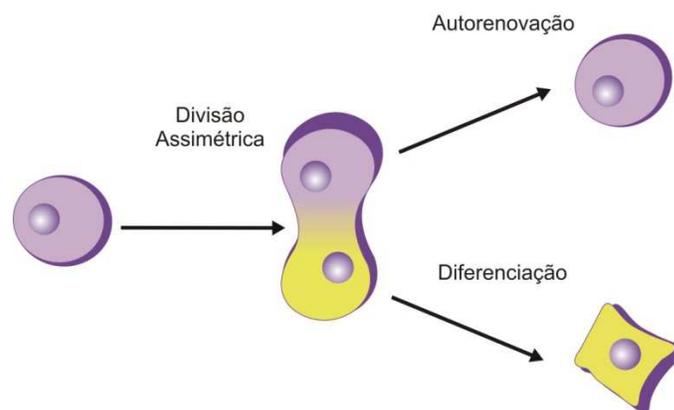


Figura 2.2 - Divisão assimétrica de células-tronco.

Desde a década de 40 sabe-se que na medula óssea existem células não diferenciadas que repõem as células maduras do sangue que vão sendo eliminadas. Estas são as denominadas células-tronco hematopoéticas (CTH). O sangue fetal é muito rico neste tipo celular e as células

podem ser recuperadas após a secção do cordão umbilical. Em muitos países, incluindo o Brasil, é permitida a coleta do sangue placentário após o parto, podendo-se armazená-lo para futuro uso terapêutico.

Em função da origem, é possível a definição de três tipos gerais de CT: células-tronco embrionárias (CTE), oriundas da massa celular interna do blastocisto; células-tronco germinativas (CTG), oriundas da crista gonadal; e células-tronco adultas (CTA), ou tecido-específicas, categoria esta que inclui as CTMs (Ribeiro-Paes *et al.*, 2009; Martin, 1981).

Também chamadas de células mesenquimais estromais multipotentes (Dominici *et al.*, 2006), as CTMs foram descritas pioneiramente por Friedenstein e colaboradores em 1966. Estas células foram identificadas a partir de células mononucleares da medula óssea murina e denominadas unidades de colônias formadoras de fibroblastos ou CFU-F (*Colony forming units - fibroblastic*). As CTMs constituem uma pequena população celular da medula óssea, correspondendo de 0,001% a 0,01% do total de células nucleadas medulares (Pittenger *et al.*, 1999). CTMs são rotineiramente isoladas da medula óssea e de tecidos de origem mesodérmica, tais como o tecido adiposo, muscular, ósseo e cartilaginoso (Verfaille, 2004). No entanto, estudos revelam o isolamento de CTMs a partir de outros tecidos de origem não mesodérmica (Meirelles *et al.*, 2008).

A fim de justificar a vasta distribuição desse tipo celular pelo organismo vários estudos têm sugerido a natureza perivascular das CTMs. Crisan e colaboradores (2008) isolaram células perivasculares a partir de tendão adulto, músculo esquelético fetal, pâncreas fetal, placenta, coração fetal, pele fetal, pulmões, cérebro, olhos, intestino, medula óssea, cordão umbilical e observaram que essas células expressavam nativamente marcadores comuns às CTMs, indicando que esses tipos celulares estariam intimamente relacionados.

Paralelamente, Covas e colaboradores (2008) caracterizaram em detalhes a ocorrência de CTMs e pericitos na parede vascular, apontando que tais células não só coexistem, mas compartilham características como a diferenciação em outros tipos celulares. Para os autores, as paredes vasculares, de forma geral, constituem um compartimento fornecedor de CTMs que se estende por todo o organismo, sendo responsável não só pela manutenção de tecidos como também pelo reparo de lesões.

A caracterização fenotípica das CTMs é feita a partir da análise por citometria de fluxo de marcadores de superfície positivos e negativos, uma vez que não existe um marcador específico para identificar estas células. As CTMs geralmente não têm marcadores de superfície das células hematopoiéticas (CD14, CD34, CD11b e CD45), eritrócitos (Glicoforina A), plaquetas e moléculas de células endoteliais de adesão (CD31). Eles expressam níveis variáveis de CD105 (SH2), CD73 (SH3 / 4), CD44, antígeno estromal 1, e um grupo de moléculas de adesão e outros receptores, incluindo CD166, CD54, CD102 e CD49 (Abdi *et al.*, 2008).

De acordo com critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISTC), são características mínimas para a definição de CTMs: a propriedade de aderir a superfícies quando mantidas em garrafas de cultura; a expressão dos marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 e a expressão menor que 2% ou ausência de expressão dos marcadores de superfície celular CD45, CD34, CD31, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$  ou CD19 e HLA classe II e a capacidade de se diferenciarem em adipócitos, condrócitos e osteócitos após a indução específica *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006).

A diferenciação adipogênica ocorre quando a monocamada celular é cultivada em presença de isobutilmetilxantina. Já a diferenciação osteogênica das CTMs é observada na presença de indutores como betaglicerolfosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino. Essas substâncias sinalizam o destino morfológico das CTMs em osteoblastos, a expressão de fosfatase alcalina e a deposição de uma matriz extracelular rica em cálcio (Zago e Covas, 2006). A diferenciação condrogênica ocorre ao cultivar as CTMs em ambiente tridimensional, em meios com baixa concentração de soro fetal bovino e na presença de fator de crescimento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ). Nestas condições, a morfologia fibroblastóide característica é alterada e a célula passa a secretar componentes próprios de uma matriz cartilaginosa, como fibromodulina, colágeno tipo II e proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (Barry *et al.*, 2001).

O isolamento das CTMs pode ser realizado a partir de aspirados medulares obtidos da crista ilíaca superior, tíbia, fêmur e coluna vertebral lombar e torácica de humanos e mamíferos de grande e pequeno porte (Pittenger *et al.*, 1999). As células mononucleares são separadas por gradiente de densidade e inoculadas em frascos de cultura, sendo a concentração inicial de

plaqueamento variável ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> a  $4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>). A manutenção da cultura é realizada com meio mínimo essencial suplementado com 10 a 20% de soro fetal bovino. Preservadas as condições adequadas de cultura, as CTMs aderem à superfície plástica do frasco de cultura, apresentando morfologia fibroblastóide e, em geral, não são verificados sinais de senescência durante a propagação, mesmo após 15 passagens (Zago e Covas, 2006).

A expansão do conhecimento sobre a multipotencialidade das CTMs tem aberto novas perspectivas para a sua utilização terapêutica, em especial na medicina regenerativa. Diferentes trabalhos demonstram o elevado potencial de diferenciação deste tipo celular. Em 1999 Pittenger e colaboradores (1999) demonstraram que CTMs são capazes de se diferenciar em cartilagem, osso, tendão, gordura e músculo. Posteriormente foram demonstradas diferenciações das CTMs em células endoteliais (Reyes *et al.*, 2002), células neurais (Kang *et al.*, 2004), hepatócitos (Sato *et al.*, 2005) e células da epiderme (Sasaki *et al.*, 2008).

Ademais, as CTMs apresentam elevado potencial regenerativo, uma vez que secretam um largo espectro de moléculas bioativas como citocinas e fatores de crescimento, importantes na reestruturação tecidual (Oliveira, 2010). Estas características, aliadas às propriedades imunorreguladoras e imunomoduladoras *in vitro* e *in vivo* (Abdi *et al.*, 2008), permitem a veiculação das CTMs no tratamento de lesões de pele.

O processo de regeneração da pele, após uma lesão cutânea severa, envolve um mecanismo complexo de remodelação tecidual que acompanha a formação e regeneração de vários outros tecidos, como cartilagem, glândulas sebáceas, folículos pilosos e a reformulação dos vasos sanguíneos (Metcalf e Ferguson, 2008). A Figura 2.4 ilustra, de forma esquemática, a estratégia empregada pela engenharia de tecidos com aplicação em lesões de pele.

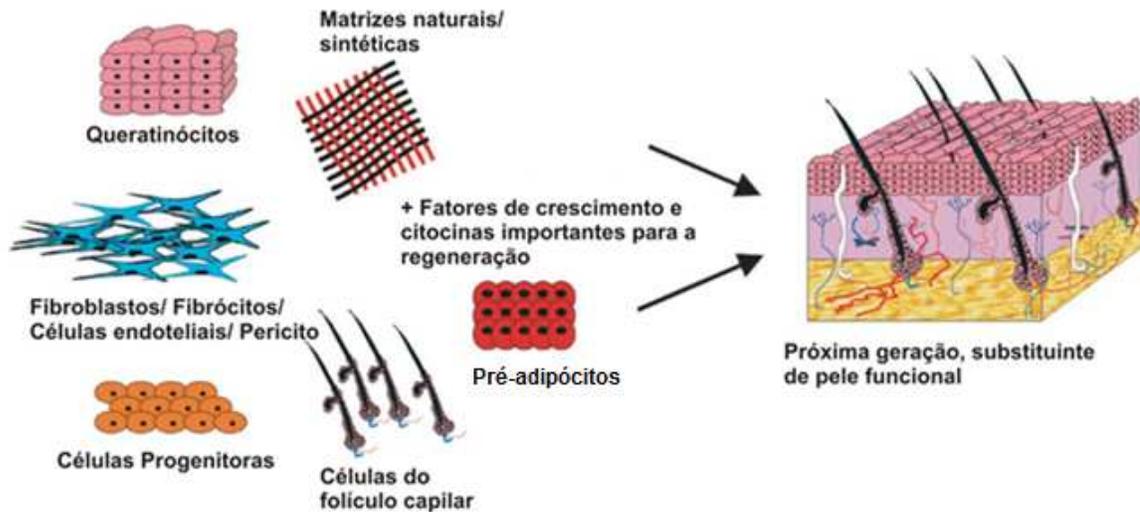


Figura 2.3 - Representação esquemática da engenharia do tecido de pele. As células progenitoras são representadas por linhagens de maior potencial, como as CTMs (adaptada de Metcalfe e Ferguson, 2008).

No intuito de demonstrar a contribuição das CTMs no reparo de lesões da pele, Sasaki e colaboradores (2008) relataram eventos de diferenciação em múltiplos tipos celulares da pele. Os autores inocularam intravenosamente CTMs provenientes de camundongos machos com *back ground* genético C57BL/6 transgênicos capazes de expressar a proteína EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) em camundongos fêmeas C57BL/6 lesados por biópsia de punção. Duas semanas após a injeção, foi verificada regeneração tecidual em todos os animais. A análise dos resultados por imunofluorescência e citometria de fluxo indicou a migração de CTMs até o sítio da lesão, bem como a diferenciação em queratinócitos, células endoteliais e pericitos presentes na parede vascular. Tais resultados são de extrema relevância quanto ao emprego de CTMs no âmbito da engenharia tecidual para regeneração de pele.

Sabe-se que o direcionamento da diferenciação celular baseia-se na manipulação das características do ambiente extracelular, bem como na determinação de fatores intrínsecos às células. Levenberg *et al.* (2003) inocularam células-tronco embrionárias humanas em *scaffolds* poliméricos compostos por poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e poli(ácido L-lático) (PLLA)

e demonstraram que a diferenciação celular e a formação de estruturas tridimensionais não são apenas dirigidas por fatores de crescimento específicos, mas também podem ser influenciadas pelo tipo de suporte no qual são cultivadas.

Outros estudos comprovam que a composição química e propriedades físico-químicas das matrizes de crescimento influenciam a diferenciação de células multipotentes. Mohan e Nair (2010) semearam CTMs sobre *scaffolds* de origem sintética (poli(álcool vinílico)-poli(caprolactona)) e de origem natural (gelatina-albumina) em meio específico para diferenciação condrogênica e verificaram que o *scaffold* sintético favoreceu a diferenciação, resultando em células com adequada morfologia e secreção de componentes da matriz extracelular, enquanto que as células inoculadas no *scaffold* natural mantiveram a morfologia fibroblastóide, característica das CTMs não diferenciadas.

Desta forma, a utilização de linhagens celulares progenitoras em combinação com matrizes celulares de reconhecida biocompatibilidade e adequada morfologia, bem como fatores de estimulação, resultariam no surgimento de novas gerações teciduais ou substitutos biológicos, capazes de restaurar e proporcionar manutenção funcional em tecidos lesados (Ragety *et al.*, 2010a).

Diversos trabalhos relatam o emprego de suportes poliméricos como superfícies de aderência, crescimento e diferenciação para CTMs no tratamento de tecidos lesados com insuficiência de reparo, fornecendo embasamento experimental para a utilização de *scaffolds* como promotores de diferenciação seletiva de CTMs.

Ragety e colaboradores (2010a) avaliaram o efeito da estrutura de uma matriz de quitosana sobre a proliferação e condrogênese de CTMs. *Scaffolds* fibrosos e esponjosos de quitosana foram inoculados com CTMs murinas em meio de estimulação condrogênica. A viabilidade celular foi mantida superior a 90%, sendo a condrogênese das CTMs maior quando da utilização de matrizes fibrosas quando comparada às matrizes esponjosas.

Weir e Xu (2010) investigaram a resposta, proliferação e diferenciação osteogênica de CTMs humanas em *scaffolds* de quitosana conjugada a cimento de fosfato de cálcio. A utilização do suporte polimérico desencadeou maior atividade da fosfatase alcalina, bem como maior área

de mineralização em comparação ao grupo controle. O perfil de aderência celular foi considerado excelente, bem como a viabilidade celular e a biocompatibilidade do material.

Neste contexto, a utilização de suportes poliméricos para aderência, proliferação e diferenciação de CTMs em aplicações na engenharia de tecidos é potencialmente viável e promissora.

#### ***2.4. Suportes poliméricos para o cultivo celular***

Os *scaffolds* são suportes tridimensionais nos quais podem ser inoculadas células em meios de cultura adicionados de fatores de crescimento, o que torna possível a proliferação tecidual, bem como a regeneração de tecidos com insuficiência de reparo. Estes suportes devem desempenhar seu propósito básico: servir como molde temporário para o crescimento, migração e diferenciação celular (Barbanti *et al.*, 2005).

Para cumprir essa função, estes suportes devem possuir propriedades como biocompatibilidade, formato e poros de tamanhos adequados, além de resistência mecânica compatível com a do tipo de tecido lesado (Machado *et al.*, 2006).

No contexto da medicina regenerativa, a composição e arquitetura interna dos *scaffolds* compreendem aspectos relevantes para o sucesso da reparação tecidual. Desta forma, diversos biomateriais e técnicas de produção são avaliados no espectro da engenharia de tecidos com a finalidade de averiguar potenciais estratégias miméticas do ambiente extracelular. Estudos representativos que objetivam a produção de *scaffolds* de composições poliméricas variadas como ferramentas para a regeneração de diferentes tipos de tecidos, tais como pele (Souto *et al.*, 2009; Sasaki *et al.*, 2008; Huss *et al.*, 2008), osso (Kuo *et al.*, 2009), cartilagem (Silva *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010) e músculo (Stern-Straeter *et al.*, 2007), têm reportado resultados promissores quanto ao reparo tecidual.

A porosidade é um requisito muito importante para um material que se destina ao uso como *scaffold*. A estrutura porosa do suporte é responsável pelo transporte, dentro da matriz, de nutrientes, metabólitos, proteínas, gases, assim como pela vascularização geral e regeneração dos

tecidos (Adekogbe e Ghanem, 2005). Estudos indicam que materiais destinados à aplicação na engenharia de tecidos devem apresentar porosidade superior a 85%; este critério também é decorrente da demanda de espaço para a entrada e proliferação das células no *scaffold* antes de sua implantação (Yang *et al.*, 2010; Kuo e Lin, 2006; Mao *et al.*, 2003). De acordo com a literatura consultada, o tamanho ótimo de poro de um material utilizado na bioengenharia está na faixa de 100 a 500  $\mu\text{m}$  (Ikada, 2006, Adekogbe e Ghanem, 2005).

#### **2.4.1. Composição dos *scaffolds***

A escolha da matéria-prima do biomaterial destinado ao uso como *scaffold* é muito importante. Alguns critérios devem ser atendidos, como não toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, e de preferência, a matéria-prima deve ser de fonte renovável e de baixo custo (Hutmacher, 2000; Barbanti *et al.*, 2005).

Diversos materiais de considerável biocompatibilidade encontram-se disponíveis para a fabricação de suportes teciduais, podendo-se citar as biocerâmicas, os metais, os biopolímeros (polímeros de origem natural) e os polímeros de origem sintética. Propriedades e características inerentes a cada material são importantes critérios de escolha para o emprego na elaboração do *scaffold*.

Polímeros de origem sintética, ao contrário dos naturalmente encontrados, têm características mais previsíveis e são mais facilmente adaptáveis para o estabelecimento de diversas propriedades de interesse. Dentre os polímeros biodegradáveis e biorreabsorvíveis mais comumente utilizados e estudados encontram-se os poli( $\alpha$ -hidroxi ácidos) representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, dos quais fazem parte o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e a poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) (Barbanti *et al.*, 2005).

No entanto, a busca por polímeros naturais para a fabricação de suportes destinados à aplicação na engenharia de tecidos vem aumentando, uma vez que a intensa degradação sofrida por polímeros sintéticos, quando implantados no organismo, pode ocasionar a liberação de

subprodutos ácidos e consequentes reações inflamatórias quando há baixa vascularização e atividade metabólica na região tecidual adjacente.

Vários polissacarídeos obtidos de fontes naturais têm sido utilizados na composição de materiais com aplicação clínica e farmacêutica. Dentre os principais polissacarídeos naturais empregados estão a celulose e seus derivados (Wittaya-Areekul e Prahsarn, 2006; Hutmacher, 2000), a heparina (Kikuchi e Noda, 1976), a dextrana (Kikuchi e Fukuda, 1974), o alginato (George e Abraham, 2006; Lai *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Ikada, 1996) e a quitosana, que têm desenvolvido especial interesse na composição de *scaffolds* para regeneração tecidual (Uygun *et al.*, 2010). Dispositivos que combinam quitosana e alginato na forma de complexos iônicos são particularmente atrativos, visto que possibilitam que se contornem limitações individuais de ambos os polissacarídeos (Florczyk *et al.*, 2011).

Assim, serão discutidas a seguir as características da quitosana no âmbito da finalidade deste trabalho, e da xantana, um polissacarídeo bacteriano proposto para substituir o alginato neste tipo de aplicação, uma vez que se trata de um polímero biocompatível capaz de ser produzido por processo fermentativo em grande escala, com condições controladas e em um curto espaço de tempo.

#### **2.4.1.1. Quitosana**

A quitosana tem sido comumente utilizada na composição de suportes empregados na área de engenharia de tecidos. Por ser um polissacarídeo linear e com estrutura semelhante à das glicosaminoglicanas (GAGs) presentes na cartilagem, possui propriedades muito interessantes para este tipo de aplicação, permitindo o desenvolvimento de vários tipos de *scaffolds* (Ragetyly *et al.*, 2010b). Outra vantagem do uso da quitosana é que ela pode ser moldada em diversas formas, possibilitando a formação de estruturas com diferentes tamanhos de poros. Além disso, é metabolizada por certas enzimas humanas, especialmente a lisozima, sendo, por esta razão considerada biodegradável (Alves da Silva *et al.*, 2010; Berger *et al.*, 2004).

A quitosana é um copolímero formado por dois monômeros, a D-glicosamina e a N-acetil-D-glicosamina. É produzida através da desacetilação da quitina (2-acetamido-2-desoxi  $\beta$ -1,4-D-glucana), vastamente encontrada na natureza (em crustáceos, fungos, insetos, anelídeos e moluscos, dentre outros). Comercialmente a quitosana é produzida a partir da quitina de crustáceos, devido a sua abundância e viabilidade de processamento (Dumitriu, 2002). Na Figura 2.4 estão representadas as estruturas químicas parciais da quitina e da quitosana.

Para a desacetilação da quitina, dois caminhos distintos podem ser tomados, um por adição de solução de NaOH a 50% (m/m) seguida de aquecimento a 110°C por 5 h e outro por degradação parcial com enzimas específicas. Ambos os processos promovem a formação de grupos amino na cadeia, que na sua forma natural estão ligados a grupos acetila. Como a remoção das acetilas não é total, ou seja, alguns complexos amina-acetila permanecem ligados, não se pode considerar o polímero quitosana como regular, mas um composto formado de grupos parcialmente desacetilados (Miyaguti, 2008; Adati, 2006). O termo quitosana é, então, aplicado para a denominação da quitina contendo mais de 50% de grupos desacetilados.

A solubilidade é um importante critério para diferenciar o uso da quitina e da quitosana. Por muitos anos a quitina não foi usada por ser insolúvel em quase todos os solventes. A grande quantidade de pontes de hidrogênio garante que a degradação da quitina ocorra antes de se atingir seu ponto de fusão, propriedade esta que dificulta a dissolução em água, ácidos diluídos, bases e solventes orgânicos. Hoje se sabe que a quitina é solúvel em ácido fórmico, álcool hexafluoroisopropílico, hexafluoroacetona, dentre outros, porém sua aplicação industrial é restrita devido à toxicidade, corrosividade e propriedades mutagênicas destes solventes (Hon, 1996).

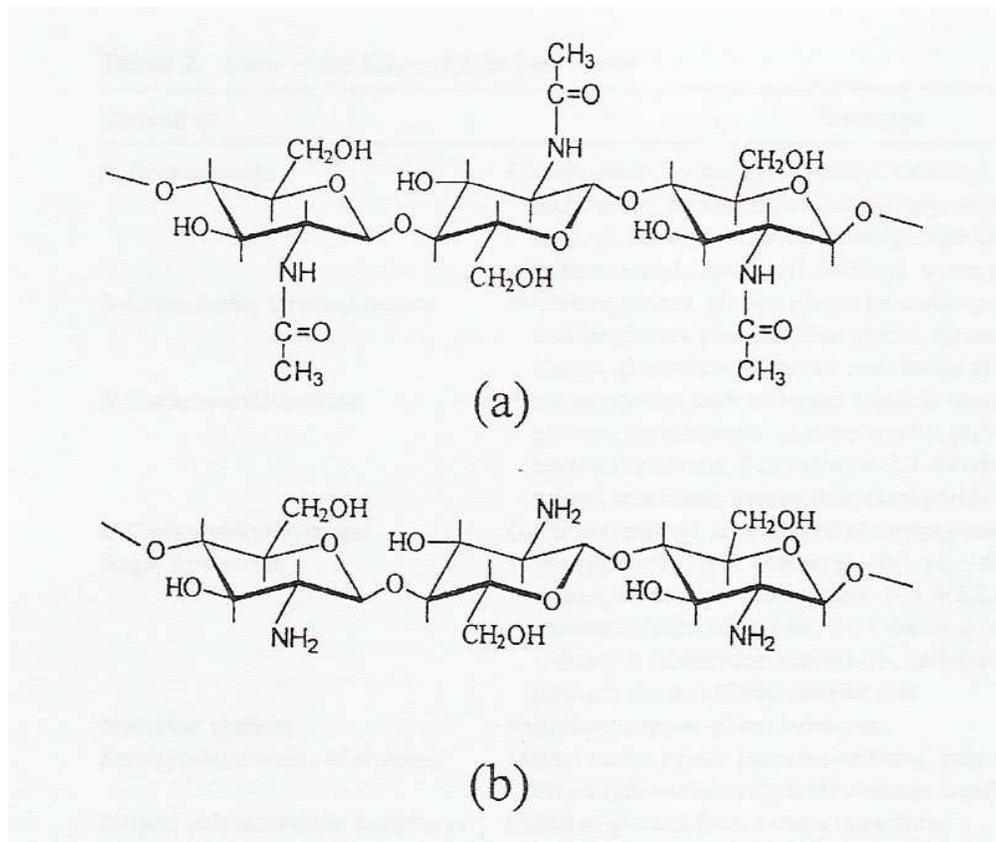


Figura 2.4 - Estruturas químicas parciais: a) quitina; b) quitosana (Hon, 1996).

A quitosana, por outro lado, é solúvel em ácidos diluídos e pode facilmente formar géis, filmes ou membranas através da evaporação do solvente. Devido à sua carga positiva em meios ácidos, causada pela protonação do grupo amino, torna-se um hidrogel higroscópico, amplamente usado na indústria alimentícia e na clarificação de águas, tendo a capacidade de remover óleos, graxas, metais pesados e partículas que causam a turvação de materiais (Juang e Ju, 1997).

A atividade imunoestimuladora da quitosana, assim como sua propriedade anticoagulante, além da ação antifúngica e bactericida, garantem seu extenso uso na constituição de biomateriais, como por exemplo, no desenvolvimento de membranas e fibras para aplicação em hemodiálise e na constituição de pele artificial, dentre outras áreas (Campos *et al.*, 2009).

Devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de sua capacidade de acelerar a cicatrização, a quitosana é frequentemente considerada na composição de curativos,

recobrando e protegendo a ferida, e ainda sendo eficaz no controle da liberação de fármacos nela incorporados (Dallan, 2005; Berger *et al.*, 2004; Kurita, 1998). Ainda, no contexto de compatibilidade celular, estudos mostram que a quitosana promove a diferenciação das células em cultura *in vitro*, estimulando o crescimento celular e promovendo a organização arquitetônica do tecido (Dumitriu, 2002).

No entanto, filmes produzidos unicamente a partir de quitosana não se mostram favoráveis à adesão celular. Dallan e colaboradores (2007) verificaram baixos valores de adesão de células Vero em superfícies de membranas de quitosana, sugerindo a utilização deste tipo de filme como curativos do tipo barreira, já que estes apresentam como funções principais a proteção física e microbiológica do ferimento, além do controle da perda de fluidos corpóreos, e não como curativos do tipo *scaffold*, utilizados como suportes para o crescimento de células. O grau de desacetilação da quitosana também interfere na adesão e crescimento celular em filmes confeccionados com este material. Chatetet e colaboradores (2011) comprovaram que quanto maior o grau de acetilação menor é a adesão celular sobre filmes de quitosana.

Devido à característica de baixa adesão celular, filmes de quitosana têm sido utilizados para minimizar a formação de aderências peritonias induzidas por telas de polipropileno. Paulo e colaboradores (2009) avaliaram *in vivo* o efeito de barreira de filmes de quitosana associados a telas de polipropileno na formação de aderências induzidas experimentalmente em ratos Wistar, verificando-se um efeito protetor dos filmes de quitosana, bem como a não exacerbação da inflamação associada às lesões peritoneais.

A ação bactericida confere à quitosana uma vasta aplicação na medicina. Várias hipóteses tentam explicar esta ação, uma delas fundamenta-se na formação de ligações cruzadas entre os policátions da quitosana e os ânions da superfície das bactérias, o que promove uma alteração na permeabilidade da membrana celular. Estudos mostram que esta mudança na permeabilidade está relacionada com propriedades estruturais da quitosana, como o grau de acetilação e a massa molar, apontando que baixos graus de acetilação e/ou elevadas massas molares são necessários para o aumento da permeabilidade da membrana das bactérias (Dumitriu, 2002; Artursson *et al.*, 1994). Destaca-se, entretanto, que na forma de filmes a quitosana não mais apresenta

atividade microbicida, somente na forma de géis ou soluções (Foster e Butt, 2011), na qual seus grupos amino apresentam-se positivamente carregados.

Propriedades como absorção de água e de soluções aquosas, resistência mecânica e permeação controlada de fármacos, dentre outras, de um hidrogel hidrofílico podem ser alteradas por meio de sua modificação química, como sua reticulação, e de sua complexação com outros polímeros. Vários métodos estão disponíveis para a reticulação da quitosana, no entanto, precauções devem ser tomadas quanto à toxicidade dos agentes de reticulação, que podem comprometer a biocompatibilidade do dispositivo final (Wang *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2009).

A natureza policatiônica da quitosana possibilitam seu uso para a preparação de complexos polieletrólitos (PECs) com poliânions. Diversos estudos indicam uma variedade de polímeros aniônicos capazes de formar complexos iônicos insolúveis com a quitosana, dentre eles pode-se citar a dextrana (Kikuchi e Fukuda, 1974), a carboximetildextrana (Fukuda e Kikuchi, 1978), o alginato (Rodrigues *et al.*, 2008; George e Abraham, 2006; Lai *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002), poliésteres (Alves da Silva *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2007), fibras de seda (She *et al.*, 2008), gelatina (Yin *et al.*, 2005) e a xantana (Veiga e Moraes 2011; Eftaiha *et al.*, 2009). Muitos destes complexos são atualmente utilizados na engenharia de tecidos como matrizes de adesão e crescimento celular e ainda para a liberação controlada de fármacos (Jiang *et al.*, 2010; Deming, 2007).

Campos e colaboradores (2009) descrevem a preparação de um filme curativo de quitosana reticulado com 1,6-bis hexametileno (aminocarboxissulfonato) para a difusão de gentamicina, com potencial para cobrir e proteger feridas. Os autores relataram que a taxa de difusão do fármaco foi direcionada por meio da concentração inicial de gentamicina e pelo grau de reticulação. Valores elevados quanto à concentração inicial do fármaco, bem como quanto ao grau de reticulação proporcionaram liberação lenta do medicamento, aproximadamente 20% da concentração inicial em 14 dias. Já os extremos mínimos dos mesmos parâmetros provocaram liberação mais rápida da gentamicina, o equivalente a 70% da concentração inicial em 14 dias.

Costa-Júnior e colaboradores (2009) sintetizaram e caracterizaram a biocompatibilidade de misturas de poli(álcool vinílico) (PVA) e quitosana, quimicamente reticuladas com glutaraldeído para aplicação potencial na reparação de pele. A microestrutura e morfologia dos

hidrogéis foram caracterizadas através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (EI-TF) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A biocompatibilidade, citotoxicidade e viabilidade celular foram avaliadas através do indicador metabólico MTT (3-(4,5-dimetilazol-2-il)brometo-2,5-difeniltetrazol) empregando culturas de células da linhagem VERO. Os hidrogéis testados não se mostraram citotóxicos, apresentando propriedades apropriadas para o uso potencial na engenharia de tecidos.

Visando a obtenção de um biomaterial a ser usado em terapias de lesões de pele, Wang e colaboradores (2001) propuseram a preparação de filmes de quitosana e alginato misturando gradualmente soluções destes dois polímeros. Após a mistura, os autores obtiveram um precipitado que foi centrifugado e ressuspensão em solução de cloreto de cálcio, levando à formação de uma suspensão que, após seca, formou uma membrana flexível, insolúvel em água e com efetivo controle na liberação de materiais nela incorporados.

Rodrigues e colaboradores (2008) desenvolveram uma metodologia escalonável de preparação e caracterização de membranas produzidas com quitosana e alginato complexados, empregando condições controladas de adição e agitação durante a mistura dos polissacarídeos. Fazendo parte do mesmo grupo de pesquisa, Veiga e Moraes (2011) propuseram a substituição do alginato por xantana, um polímero de origem microbiana, na produção dessas membranas. Esta mudança promoveu um aumento na capacidade de absorção de solventes.

A preferência por biopolímeros de origem microbiana ao invés daqueles oriundos de plantas, algas ou animais deve-se fundamentalmente às vantagens da produção independente de condições climáticas, permitindo que estes sejam obtidos em condições controladas e em lotes homogêneos, com qualidade mais assegurada. No espectro da produção de biopolímeros, a goma xantana tem como vantagem características associadas à sua manutenção de qualidade, garantidas mediante utilização de linhagens bacterianas específicas para sua produção, bem como de condições fermentativas padronizadas (Becker *et al.*, 1998). As características deste composto de maior relevância no âmbito do desenvolvimento deste trabalho serão discutidas a seguir.

#### 2.4.1.2. *Xantana*

A goma xantana é um exopolissacarídeo microbiano produzido por linhagens de *Xantomonas campestris* pertencentes à família *Pseudomonodaceae*. Estas bactérias reproduzem-se por divisão binária, consistindo de células em forma de bastonetes, gram-negativas e que ocorrem predominantemente isoladas. Suas colônias são geralmente lisas, viscosas e amarelas, resultantes da produção de um pigmento insolúvel em água conhecido como xantomanidina (Kennedy e Bradshaw, 1984; Bradbury, 1984). Estas colônias são de fácil cultivo *in vitro*, apresentando temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30°C, rápido crescimento e produzindo turbidez característica de proliferação celular em meio líquido em 2 a 3 dias de fermentação (Silva, 2007).

A biossíntese da goma xantana, em condições adequadas de cultura, envolve a formação de uma estrutura primária composta por unidades repetidas de pentapolissacarídeos. A estrutura do exopolissacarídeo é composta, em geral, por uma cadeia principal de celulose formada por unidades de  $\beta$ -D-glicose conjugadas por ligações 1 $\rightarrow$ 4. Uma cadeia lateral trissacarídica, na posição C(3) de cada resíduo de glicose alternada, compreende unidades de  $\beta$ -D-manose-1,4- $\beta$ -D-ácidoglicurônico-1,2- $\alpha$ -D-manose. É possível a existência de grupos *O*-acetil na posição C(6) da  $\alpha$ -D-manose interna e 4,6-ácido pirúvico na  $\beta$ -D-manose terminal (Jansson *et al.*, 1975; Stankowski *et al.*, 1993). A unidade estrutural da goma xantana é apresentada na Figura 2.5.

A estrutura química da biomolécula é responsável pelas características funcionais da xantana, como a capacidade de emulsificar, estabilizar, flocular e suspender soluções aquosas, formando assim géis e membranas (Bejenariu *et al.*, 2008).

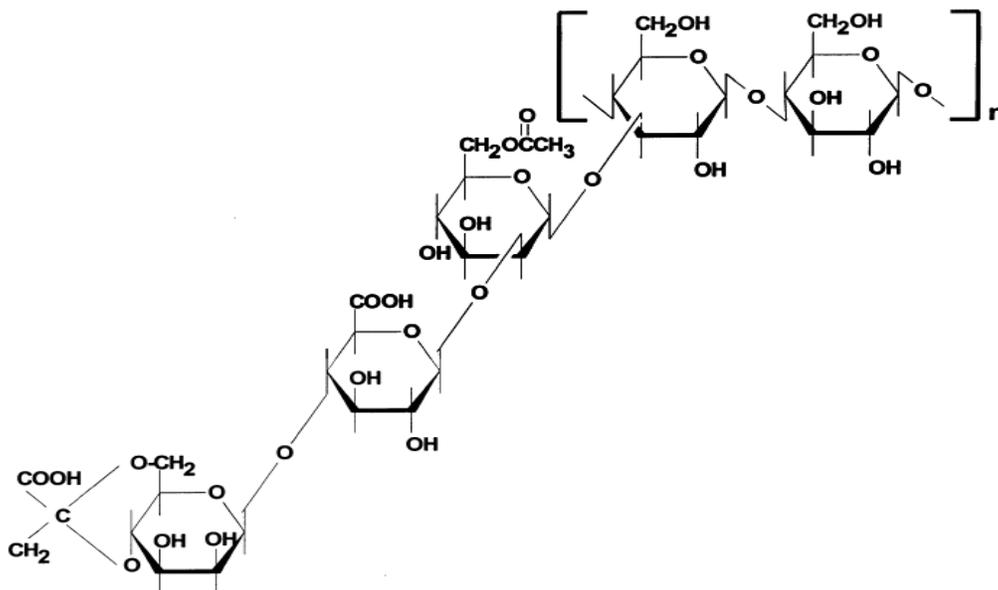


Figura 2.5 - Unidade estrutural da goma xantana (Takeuchi *et al.*, 2009).

Descoberta na década de 50, durante uma triagem para identificar micro-organismos capazes de produzir gomas solúveis em água de interesse comercial, a xantana teve sua primeira produção industrial em 1960 e tornou-se comercialmente disponível em 1964 (Coviello *et al.*, 2007). Aprovada como aditivo em alimentos em 1965 pelo Decreto de Lei nº 55.871 da Legislação Brasileira de Alimentos (Lima *et al.*, 2001) e, em 1969, pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA, a goma xantana é estabelecida como um produto atóxico, incapaz de promover irritação na pele e olhos, sensibilização ou inibição de crescimento (García-Ochoa *et al.*, 2000). Embora a legislação brasileira permita a utilização da goma xantana como espessante na composição produtos farmacológicos, não foram localizadas informações acerca da regulamentação com referência a seu uso interno.

A goma xantana destaca-se no mercado de biopolímeros por suas aplicações industriais e compreende 15,6% da pauta de importações brasileira de polissacarídeos (Cunha *et al.*, 2009). É amplamente utilizada em diversos segmentos industriais como na indústria alimentícia, petrolífera, farmacêutica, cosmética, têxtil, de tintas e de produtos agrícolas, devido a suas

propriedades reológicas, como alto grau de pseuplasticidade, alta viscosidade mesmo em pequenas concentrações, compatibilidade e estabilidade com a maioria dos sais metálicos, excelente solubilidade e estabilidade tanto em meio ácido quanto alcalino, resistência à degradação em elevadas temperaturas assim como a oscilações de pH (Faria, 2005; Nitschke *et al.*, 2001; Quinn, 1999; Sutherland, 1993).

Géis de xantana são usados em uma variedade de aplicações biomédicas como oftalmologia, implantologia, engenharia de tecidos e sistemas de liberação controlada de fármacos (Bejenariu *et al.*, 2008). Vendruscolo e colaboradores (2005) avaliaram os mecanismos de liberação *in vitro* da teofilina mediante utilização de matrizes de xantana isolada ou associada à galactomanana proveniente de sementes de bracinga (*Mimosa scrabella*). A variação da concentração polimérica influenciou a liberação do fármaco. Houve diminuição da disponibilização da teofilina quando do emprego de concentrações poliméricas mais elevadas. A formulação mais adequada quanto ao perfil de dissolução foi evidenciada pela utilização da mistura xantana-galactomana contendo 8% de xantana, tendo sido observada a liberação do equivalente a 90% do fármaco em 8 horas.

Chiou e colaboradores (2009) avaliaram a biocompatibilidade de lipossomas bioadesivos intranasais constituídos de goma xantana para a liberação controlada de um agente vacinal, não observando efeitos tóxicos ou anormalidade morfológica de macrófagos provenientes do baço de galinhas expostas aos dispositivos. Mesmo em altas concentrações poliméricas, a viabilidade celular não foi influenciada, fato que evidencia a ausência de dano celular quando da utilização de xantana em suportes ou veículos experimentais para a liberação de agentes bioativos.

A atividade antitumoral da xantana também é reportada na literatura. Takeuchi e colaboradores (2009) administraram oralmente a goma xantana em camundongos e avaliaram o efeito antitumoral do polímero por meio do receptor TLR4 (*Toll-like receptor 4*). A administração da goma xantana foi realizada durante cinco dias mediante aplicação intragástrica de 100  $\mu$ L de uma suspensão a 10 mg/mL. Após a inoculação subcutânea de células de melanoma B16<sup>b</sup> em camundongos C57BL6, realizada no segundo dia da administração da goma xantana, foi observada a supressão do crescimento das células tumorais e o aumento da sobrevivência dos animais. Ainda, os grupos tratados com xantana apresentaram maior atividade de células *natural*

*killer* (NK) e de resposta tumor-específica de células T CD8 quando comparados ao grupo controle.

Desta forma, a biocompatibilidade da goma xantana aliada a sua comprovada atividade antitumoral sinaliza o impacto da administração, de forma segura e profilática, deste biopolímero como agente ativo na engenharia de tecidos.

#### 2.4.1.3. O Complexo Xantana-Quitosana

Conforme já mencionado, a quitosana e a xantana podem formar um complexo polieletrólito (PEC), estabelecido por meio de interações iônicas entre os grupos amino da quitosana e carboxil da xantana, conforme indicado na Figura 2.6. A interação iônica proveniente da complexação polimérica possibilita variar as características relativas à sensibilidade ao pH, permitindo a imobilização de células, agentes terapêuticos e enzimas (Chellat *et al.*, 2000).

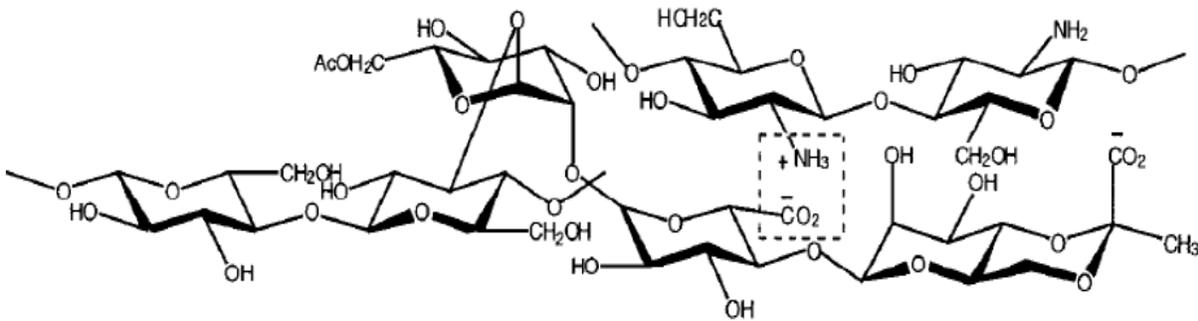


Figura 2.6 - Representação esquemática da interação entre xantana e quitosana na formação de hidrogéis (fonte: Chellat *et al.*, 2000).

A biocompatibilidade do complexo xantana-quitosana é relatada na literatura. Chellat e colaboradores (2000) testaram o efeito citotóxico de comprimidos de xantana-quitosana através de ensaios *in vitro* com células fibroblastóides L929 utilizando o agente MTT (3(4,5-

dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio) e de ensaios *in vivo* mediante a implantação subcutânea dos comprimidos em ratos Wistar. Os ensaios *in vitro* não evidenciaram citotoxicidade e o ensaio *in vivo* resultou em reação inflamatória, sem, contudo, se observar reação necrótica. Ainda, os produtos da degradação das amostras não resultaram em eventos de citotoxicidade, apontando a resistência do complexo à ação enzimática como relativamente alta.

Mais recentemente, Argin-Soysal e colaboradores (2009) demonstraram que o controle das propriedades do complexo xantana-quitosana pode ser manipulado mediante variação de parâmetros, especialmente da concentração de xantana e do pH da solução de quitosana. Os autores avaliaram o efeito da concentração da mistura xantana-quitosana e do pH da solução de quitosana na complexação polimérica e no grau de intumescimento de cápsulas preparadas pelo método de extrusão (coacervado complexo), efetuando-se o gotejamento de 300 mL de solução de xantana sobre 50 mL solução de quitosana (vazão não reportada). Três concentrações diferentes de solução de xantana (0,7; 1,0 e 1,5% m/v) e duas de solução de quitosana (0,7 e 1,0% m/v) em condições de pH variando de 4,5 a 6,2 foram testadas. Foram obtidos hidrogéis completamente reticulados em todas as condições quando a concentração de xantana era de 1,5% (m/v) e observou-se que o aumento da concentração de xantana afeta significativamente o grau de intumescimento, sendo que os melhores e mais significativos resultados obtidos foram para cápsulas preparadas com quitosana a 0,7% m/v em pH 5,5 e xantana a 0,7% m/v.

Popa e colaboradores (2010) descreveram a formulação de comprimidos a partir do complexo poliônico xantana-quitosana para a liberação controlada de teofilina. Ensaio *in vitro* evidenciaram a estabilidade da matriz em diferentes condições de pH e os perfis de liberação em solução de HCl (pH 1,5) e tampão fosfato (pH 7,4) revelaram que a teofilina foi totalmente liberada dentro de um período de 12 h, com comportamento semelhante nas duas condições de pH. A difusão da teofilina pela matriz polimérica foi considerada como possível em estudos *in vivo* e, portanto, o dispositivo obtido mostrou grande potencial para a administração oral do composto bioativo no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica.

Desta forma a utilização do complexo xantana-quitosana em dispositivos biomédicos pode ser considerada segura e potencialmente promissora como estratégia terapêutica auxiliar na engenharia de tecidos.

### **2.4.2. Agentes porogênicos**

A porosidade é uma característica importante em um material que se destina à aplicação como suportes para crescimento celular. Biomateriais porosos podem ser produzidos pela adição de agentes porogênicos solubilizáveis, como glicose ou NaCl (Ma *et al.*, 2001), ou então por outros métodos, como inversão de fases, gaseificação por alta pressão, liofilização e processos de eletrofição (Shoichet, 2010).

A liofilização é o método mais comumente utilizado para a produção de poros em suportes para fins de aplicação na engenharia tecidual (Kucharska *et al.*, 2008; She *et al.*, 2008; Öztürk *et al.*, 2006), no entanto trata-se de um método caro, trabalhoso e que geralmente apresenta dificuldades no aumento em escala (Bueno e Moraes, 2011). Desta forma, outras estratégias para a elaboração de suportes porosos são de considerável interesse.

É possível a obtenção de membranas porosas pela incorporação dos tensoativos Tween 80 e Pluronic F68 em misturas de polissacarídeos (Bueno e Moraes, 2011). A adição destes tensoativos em complexos polieletrólitos, além de facilitar a dispersão polimérica, propicia a obtenção de uma estrutura porosa homogênea, conveniente para utilização como suporte de adesão e crescimento celular.

Os surfatantes Tween 80 e Pluronic F68 pertencem à classe dos surfatantes não-iônicos, considerados menos prejudiciais à pele, sendo usados como aditivos em formulações cosméticas e no preparo de emulsões tópicas (Rhein, *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2003). Por esta razão foram selecionados para o desenvolvimento deste trabalho e serão mais detalhadamente descritos a seguir.

#### **2.4.2.1. Tween 80**

Os tensoativos da classe Tween representam uma família de surfatantes compostas por ésteres de sorbitol etoxilados. Conforme o tipo de ácido graxo de origem e o grau de etoxilação podem-se obter produtos com diferentes balanços hidrofílico-lipofílico (HLB), que se adaptam a diversas aplicações (Preté, 2000). O Tween 80, ou polisorbato 80 (Figura 2.7) é um éster

polietileno sorbitol, com uma massa molar de 1310 Da, apresentando 20 unidades de óxido de etileno, uma de sorbitol, e uma de ácido oléico como o principal ácido graxo (Sigma-Aldrich, 2011a).

O Tween 80 tem sido amplamente utilizado em aplicações bioquímicas, como a solubilização de proteínas e a emulsificação e dispersão de substâncias em medicamentos e alimentos (Preté, 2000). É conhecido por suas propriedades crioprotetoras (Hillgren *et al.*, 2002), além de ser capaz de aumentar a permeabilidade de numerosas drogas *in vitro* em células Caco-2, bem como em tecidos *ex-vivo*, como saco intestinal invertido de rato (Zhang *et al.*, 2003).

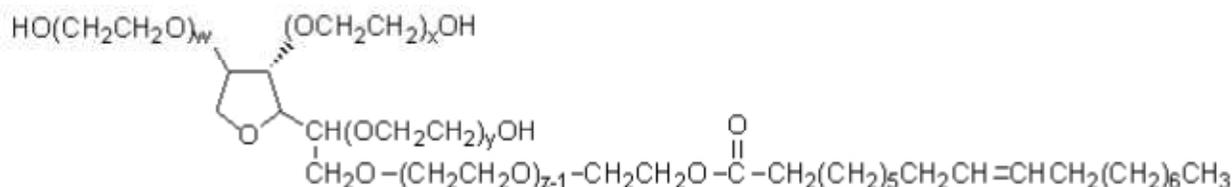


Figura 2.7 – Estrutura química do Tween 80, para o qual  $x + y + w + z = 20$  (Sigma-Aldrich, 2011a)

O surfatante Tween 80 é miscível em água (0,1 mL Tween 80 por mililitro água) e apresenta-se na forma de um líquido viscoso e inodoro, de coloração castanha. É também solúvel em álcool, óleo de algodão, óleo de milho, acetato de etila, metanol e tolueno, no entanto é insolúvel em óleo mineral. Sua concentração micelar crítica (CMC) em água pura é de 0,012 mM e o pH de uma solução aquosa a 1% varia entre 5,5 e 7,2 (Sigma-Aldrich, 2011a).

#### 2.4.2.2. Pluronic F68

Assim como o Tween 80, o Pluronic F68 é um surfatante não-iônico amplamente utilizado em formulações farmacêuticas. Pertencente à família dos Pluronic, ou Poloxamers, é

um copolímero de polioxipropileno (PPO) e polioxietileno (PEO), com estrutura tri-bloco PEO-PPO-PEO, conforme apresentado na Figura 2.8 (Santander-Ortega *et al.*, 2006).

A estrutura química de um poloxamer apresenta um bloco central hidrofóbico de polioxipropileno (PPO) com  $m$  unidades monoméricas, bloco este ligado em cada extremidade a uma cadeia hidrofílica de polioxietileno com  $n$  unidades monoméricas. A variação dos valores de  $m$  e  $n$  conferem diferentes características aos Pluronic. Particularmente, o Pluronic F68 apresenta valores de  $n$  e  $m$  iguais a 75 e 30 unidades, respectivamente, conferindo-lhe uma massa molar equivalente a 8500 daltons (Santander-Ortega *et al.*, 2006). Apresenta-se na forma de um pó branco, insípido, inodoro e solúvel em água (100 mg Pluronic F68 por mililitro de água). O pH de uma solução aquosa de Pluronic F68 a 2,5% varia entre 5 e 7,5 a 25 °C e seu CMC em água é 0,04 mM (Sigma-Aldrich, 2011b). Diferentemente dos outros Pluronic, o Pluronic F68 não se acumula no núcleo nem mesmo no citoplasma celular, e sim nos endossomos e lisossomos, uma vez que é absorvido pela via endocítica (Gigout *et al.*, 2008).

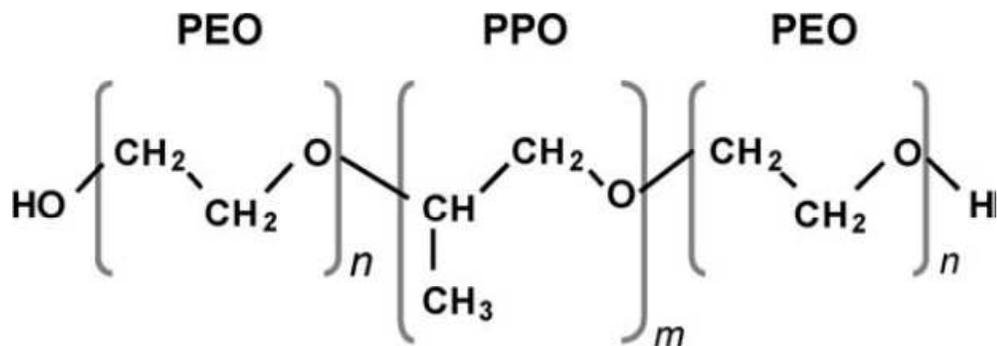


Figura 2.8 – Estrutura química de um Poloxamer (Fonte: Santander-Ortega *et al.*, 2006).

O Pluronic F68 é um surfatante comumente empregado na engenharia de micro e nanopartículas para a obtenção de dispositivos de liberação de fármacos (Santander-Ortega *et al.*, 2006), e é também muito utilizado como aditivo em meios de cultura de células animais em larga escala, em especial em células de mamíferos e de insetos, devido a sua ação protetora contra o cisalhamento (Gigout, *et al.*, 2008).

Além de ser um valioso complemento citoprotetor, recentes estudos comprovam a atividade promotora de crescimento celular do Pluronic F68. Clink e colaboradores (2011) mostraram que a adição de Pluronic F68 em meio de cultura para células CHO estimula o crescimento celular, aumenta a viabilidade, reduz a taxa de lise celular em até quatro vezes e ainda proporciona um aumento da produção de  $\gamma$ -interferon. Kerleta e colegas (2010) demonstraram ainda que meios de cultivos suplementados com de 0,5% de Pluronic F68 proporcionam um aumento da viabilidade e da proliferação das células Caco-2 após subcultivos e ciclos de congelamento e descongelamento.

Desta forma, a adição dos surfatantes Tween 80 e Pluronic F68 em complexos polieletrólitos de quitosana e xantana para a produção de matrizes tridimensionais porosas destinadas ao uso como *scaffolds* mostra-se como alternativa viável e segura.

## ***2.5. Estratégias de análise da adequação do uso de membranas como scaffolds***

Para que um material polimérico possa ser destinado para a regeneração de pele bem como para o uso como suportes de crescimento celular com aplicação na área de engenharia de tecidos, este deve apresentar características que atendam os requisitos descritos anteriormente.

Desta forma faz-se necessária a caracterização físico-química e biológica dos materiais utilizados, fazendo uso de técnicas complexas e progressivas, pelas quais é possível avaliar as propriedades intrínsecas do material, de sua superfície, assim como as consequências biológicas decorrentes de sua utilização (Dallan *et al.*, 2007).

### **2.5.1. Caracterização físico-química**

Os ensaios de caracterização de membranas com potencial aplicação em processos de reparo tecidual são, de acordo com diversos autores: determinação da espessura; determinação do grau de hidratação ou intumescimento das membranas quando da imersão em água, solução tampão ou outras soluções fisiológicas; avaliação da permeabilidade das membranas ao vapor

d'água e ao oxigênio; análise da morfologia da superfície e da secção transversal; exame da porosidade e distribuição quanto aos tamanho dos poros; determinação da resistência à tração e do alongamento na ruptura; estabilidade física e mecânica, dentre outros (Li *et al.*, 2010; Chesnutt *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2007; Marreco *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2002; Mi *et al.*, 2001). Quando as membranas são formuladas com agentes ativos incorporados, faz-se também necessária a determinação da eficiência de incorporação e do perfil cinético de sua liberação (Mi *et al.*, 2003; Lai *et al.*; 2003).

### **2.5.2. Caracterização biológica**

Dentre as técnicas reportadas na literatura quanto à caracterização biológica destes dispositivos, as mais frequentemente citadas são os testes de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, e de adesão e crescimento celular sobre a superfície das membranas.

#### **2.5.2.1. Testes *in vitro***

A preferência por ensaios de toxicidade iniciais *in vitro* ao invés de testes *in vivo* em modelos de materiais curativos, como membranas de quitosana isolada ou complexada com outros compostos, permite a avaliação do desempenho do dispositivo fora do corpo, além de garantir maior reprodutibilidade e facilidade quanto à avaliação clínica (Cheong *et al.*, 2008, Keong e Halim, 2009). Desta forma, o emprego de células animais em ensaios *in vitro* admite a avaliação biológica destes biomateriais quanto à possibilidade de efeitos tóxicos ou de sua influência sobre eventos de adesão, crescimento e diferenciação celular, no intuito de analisar a qualidade e o desempenho do biomaterial (Santos Jr., 2001).

A averiguação da biocompatibilidade de materiais com potencial aplicação médica tem início nos ensaios de citotoxicidade. A mensuração dos efeitos sobre as células durante sua exposição a agentes tóxicos em diversas concentrações e por tempos determinados caracterizam os testes de citotoxicidade (Keong & Halim, 2009). A classificação de um biomaterial como não citotóxico está relacionada a sua capacidade de não provocar a morte das células ou alteração

funcional nas mesmas. Desta forma, a análise da morfologia, da integridade da membrana (por meio de indicadores de atividade metabólica), da proliferação celular e da atividade biossintética, dentre outros parâmetros, permite a avaliação da citotoxicidade (Freshney, 1989).

O resultado negativo de citotoxicidade sinaliza ausência ou quantidades insuficientes de componentes prejudiciais no material avaliado, ou seja, sem potencial de estímulo de efeitos agudos em células isoladas, sob condições extremas. Um resultado positivo, ao contrário, indica a presença de uma ou mais substâncias que são extraídas e que podem ter importância clínica, sendo necessárias outras investigações para a determinação da utilidade do material (Dallan *et al.*, 2007).

Existem dois tipos de testes de citotoxicidade *in vitro*: os de contato direto e os de contato indireto. Nos ensaios de contato direto, o biomaterial é colocado diretamente sobre a monocamada celular ou então, as células em suspensão são inoculadas sobre o material. Já os de contato indireto podem ser divididos em dois tipos: aqueles em que o material a ser testado é separado das células por uma barreira de difusão (ágar ou agarose) e aqueles em que substâncias são extraídas do material a ser testado, através de um solvente, e colocadas em contato com as células em variadas concentrações (Dallan *et al.*, 2007).

Os testes de citotoxicidade podem ser realizados com base em protocolos padronizados, conforme descrito nas normas ASTM-F813-83 (método de contato direto para avaliação de materiais e dispositivos médicos frente à cultura de células), ASTM-F895-84 (método de difusão em ágar de cultura de células para seleção de materiais por citotoxicidade) e ISO-10993-5E (para a avaliação biológica de dispositivos médicos, parte 5, categoria de testes para citotoxicidade, métodos *in vitro*) (Dallan, 2005).

Nos métodos padronizados, além de aspectos referentes ao procedimento, há também especificação quanto às linhagens celulares recomendadas, ao meio de cultura e às técnicas para avaliação da citotoxicidade. Em geral, são utilizadas linhagens de células estabelecidas e bem caracterizadas, devido à facilidade de obtenção e manutenção em laboratório (Northup, 1986). Dentre as linhagens celulares recomendadas para os testes de citotoxicidade destacam-se a NTC, a Balb/3T3, a MRC-5, a WI-38, a BHK-21, a V-79, a Vero e a L-929 (Dallan *et al.*, 2007).

Uma das primeiras linhagens a ser estabelecida em cultura contínua e amplamente utilizada em ensaios de citotoxicidade é a linhagem L929 (Liu *et al.*, 2010; Mortazavi *et al.*, 2010; Salgado, 2005). Descrita nos anos 40 por W.R. Earle, a linhagem foi estabelecida a partir do tecido normal subcutâneo areolar e adiposo de um camundongo C3H/An macho com 100 dias de idade. Após 95 subculturas da geração L parental, Sanford e colaboradores estabeleceram o NTCC-clone 929, ou L929 (Sanford *et al.*, 1948). Por terem sido adotadas na avaliação de biocompatibilidade neste trabalho, as células L929 são mais detalhadamente enfocadas a seguir.

As células L929 apresentam morfologia fibroblastóide e são aderentes. São frequentemente empregadas para avaliar a adequação de superfícies à adesão celular e a biocompatibilidade de materiais diversos, tais como membranas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (Serrano *et al.*, 2005), N-isopropilacrilamida e metil metacrilado (Varghese *et al.*, 2010), quitosana (Karakecili *et al.*, 2007) e complexos polieletrólitos de quitosana-xantana (Chellat *et al.*, 2000).

À medida que ocorre a propagação celular, há o espalhamento horizontal das células sobre a superfície do material, formando uma monocamada aderente. A superfície das células L929, entretanto, não é lisa, mas revestida densamente por filopodia. A existência de filopodia na membrana celular proporciona um aumento de duas a quatro vezes a superfície de contato se comparado a células lisas de dimensões semelhantes (Lamb e Mac Kinnon, 1971).

Outra metodologia comumente empregada para a determinação da citocompatibilidade de biomateriais refere-se ao ensaio colorimétrico que emprega o indicador metabólico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo). A técnica é baseada na capacidade seletiva das células viáveis de reduzir o brometo de tetrazólio a *formazan*, um composto azul púrpura solúvel em solventes orgânicos, que pode ser quantificado por espectrofotometria, sendo a sua quantidade proporcional ao número de células vivas. A medida da extensão da formação dos cristais de *formazan* é estreitamente relacionada à atividade metabólica mitocondrial e com frequência é utilizada em testes de citotoxicidade (Keong e Halim, 2009).

No espectro da avaliação de biossegurança, os ensaios de mutagenicidade têm sido alvo de especial atenção em virtude da possibilidade de existência de agentes genotóxicos no biomaterial a ser implantado *in vivo*, mesmo quando resultados negativos são obtidos em testes de citocompatibilidade *in vitro*. A avaliação da atividade mutagênica deve assegurar a ausência

de componentes tóxicos com potencial de exercer efeitos sobre o material genético das células, como a diminuição ou alteração do crescimento celular. Os testes de mutagenicidade podem ser realizados de forma padronizada, de acordo com a norma ISO 10993-3 (Keong e Halim, 2009).

Dentre os vários testes para detecção de danos ao DNA, o teste mais comumente utilizado é o originalmente descrito por Ames e colaboradores (1973). O método emprega *Salmonella typhimurium*, uma linhagem de bactéria incapaz de produzir histidina e, que, portanto, requer a adição deste aminoácido no meio de cultura. No entanto, a ausência de expressão de histidina pode ser revertida por mutações reversas. Diversas linhagens de *Salmonella* com várias mutações no sítio do operon da histidina são empregadas neste teste para assegurar a sensibilidade a uma ampla variedade de substâncias com potencial mutagênico. Desta forma, se bactérias desta espécie forem cultivadas na ausência de agentes mutagênicos, a pequena quantidade de colônias capazes de expressar histidina corresponderá à taxa de mutação espontânea. Quando, no entanto, a frequência de colônias mutadas capazes de sintetizar histidina for maior que a taxa espontânea, é possível a presença de composto mutagênico no cultivo.

#### **2.5.2.2. Testes *in vivo***

Os ensaios *in vitro*, embora eficientes e práticos, podem mascarar alguns resultados importantes associados ou inerentes à situação *in vivo*. Este quadro é evidenciado mediante observação de diferenças quanto à sensibilidade de linhagens celulares primárias e estabelecidas. O comportamento *in vivo* de materiais com aplicação médica constitui-se de um evento complexo, compartilhado por reações imunológicas e diversas interações com células inflamatórias. Desta forma, apesar dos ensaios *in vitro* fornecerem dados em uma situação ambientalmente mais controlada se comparada à realidade *in vivo*, são pequenas as possibilidades de substituição total dos ensaios *in vivo* por modelos *in vitro*, sendo que a representação fidedigna do comportamento dos dispositivos nos pacientes é dificultada (Keong & Halim, 2009).

Diferentes modelos experimentais *in vivo* são encontrados na literatura com o propósito de produzir lesões de pele em diferentes linhagens animais para posterior tratamento com curativos de polímeros biodegradáveis ou associados a células. A maioria dos trabalhos consultados na literatura aponta o uso de linhagens murinas, tanto de ratos (Chen *et al.*, 2009;

Chellat *et al.*, 2000) quanto de camundongos (Sasaki *et al.*, 2008), como modelos animais para indução de lesão de pele. Em geral, os modelos de indução de feridas utilizam água quente, peso aquecido (Baoyoung *et al.*, 2010) ou biópsia por punção (Chen *et al.*, 2009; Sasaki *et al.*, 2008). A título de exemplo, pode-se mencionar o trabalho de Baoyoung e colaboradores (2010) que realizaram um estudo no qual um curativo desenvolvido a partir de uma proteína recombinante proveniente de seda de aranhas foi testado em ratos SD como modelo *in vivo*. Os animais foram lesados por um peso aquecido em água a 90°C e posteriormente receberam o curativo proposto. Foram recolhidas amostras em tempos determinados para análises histológicas, imunoistoquímicas e biomecânicas.

Em geral, nos modelos de indução de lesão e tratamento com curativo, além das análises citadas, há ainda o exame macroscópico inicial para estimativa do grau de regeneração por meio do cálculo da área de cicatrização. Observa-se que a análise *in vivo* é, frequentemente, precedida pela *in vitro*, e que ambas se complementam.

## **2.6. Considerações finais**

Tendo em vista os tópicos abordados nesta revisão bibliográfica, verifica-se a importância do desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, bem como de biomateriais adequados, destinados ao tratamento de queimaduras graves e outros tipos de lesões cutâneas. *Scaffolds* e curativos bioativos obtidos pela associação de células multipotentes a dispositivos porosos constituídos de polissacarídeos biocompatíveis representam alternativas terapêuticas relevantes para o tratamento deste tipo de lesão.

Membranas de quitosana-xantana apresentam potencial aplicação no tratamento de lesões com alta produção de exsudato. Porém, não foram localizados trabalhos referentes à associação deste biomaterial a células multipotentes. Desta forma, optou-se por explorar neste trabalho a associação de células-tronco mesenquimais, derivadas da medula óssea, a membranas poliméricas de quitosana-xantana para a confecção de um *scaffold* para a adesão e multiplicação celular e um curativo bioativo, destinados ao uso terapêutico em lesões de pele.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. *Materiais*

##### 3.1.1. Reagentes Químicos

Para obtenção das membranas foram utilizados os seguintes reagentes: quitosana 96% desacetilada e goma xantana ambos de grau analítico e da marca Sigma Chemical Co., lotes 9012-76-4 e 056K0007, respectivamente; ácido acético glacial da Merck; goma xantana tipo Keltrol<sup>®</sup>F lote 7J1238A gentilmente doada pela CPKelco Brasil S/A, goma xantana produzida em escala piloto com tecnologia desenvolvida na UNESP – Assis SP, Pluronic F-68 da marca Sigma Chemical Co. lote 30K0135, Tween 80 U.S.P. da Synth lote 58033.

Os seguintes reagentes foram utilizados nos ensaios de caracterização físico-química e biológica das membranas: meio de cultura RPMI-1640 suplementado (assim definido deste ponto em diante) com 0,3g/L de L-glutamina, 2,0g/L de D-glicose, 2,0g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 10.000 UI/L de penicilina, 0,05g/L de estreptomicina, 5,958g/L de HEPES e 10% (v/v) de soro fetal bovino; meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado (assim definido deste ponto em diante) com 0,584g/L de L-glutamina, 4,5g/L de D-glicose, 3,7g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 10.000 UI/L de penicilina, 0,05g/L de estreptomicina, 5,958g/L de HEPES e 10% (v/v) de soro fetal bovino; tripsina bovina/EDTA (ácido etileno-diamino-tetracetato-dissódico) a 0,25% (m/v), todos fornecidos pela Nutricell; azul Trypan da Sigma Chemical Co. lote 75996MJ-319; fluido corpóreo simulado (FCS) preparado conforme Kokubo *et al.*, (1990), com formulação apresentada na Tabela 3.1; tampão PBS/EDTA, com formulação apresentada na Tabela 3.2; dimetil sulfoxido (DMSO), brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), paraformaldeído, glutaraldeído a 25% (m/v) para microscopia eletrônica, cacodilato de sódio, tetróxido de ósmio a 2% (m/v) em água, todos da Sigma Chemical Co.; cristal violeta fornecido pela Vetec; álcool etílico absoluto fornecido pela Impex; Thiopentax (tiopental sódico) da Cristália, quetamina da Agener União e xilazina da Dopaser-Calier.

Toda a água utilizada nos ensaios foi destilada e deionizada em sistema Milli-Q da Millipore.

Tabela 3.1 - Composição do fluido corpóreo simulado (FCS) em solução tampão TRIS-HCl (Kokubo *et al.*, 1990). O pH da solução final foi ajustado para 7,4.

Íons	Concentração (mM)
Na <sup>+</sup>	142,0
K <sup>+</sup>	5,0
Ca <sup>2+</sup>	2,5
Mg <sup>2+</sup>	1,5
Cl <sup>-</sup>	148,8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5

Tabela 3.2 – Composição do tampão PBS/EDTA. O pH da solução final foi ajustado para 7,4 com solução de HCl 1M e a solução foi esterilizada em autoclave a 120°C durante 30 minutos.

Reagente	Concentração (mM)
Fosfato dibásico de sódio	0,008
Fosfato monobásico de potássio	0,002
Cloreto de sódio	0,140
Cloreto de potássio	0,003
EDTA	1,000

### 3.1.2. Células e animais

Três linhagens celulares foram empregadas, uma de fibroblastos de camundongo (L929), gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Campinas, SP, Brasil), e duas de células-tronco mesenquimais, uma proveniente de camundongo C57BL/6 e a outra de rato Wistar, isoladas e mantidas em cultura no Laboratório Multiusuário do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências e Letras (UNESP, campus de Assis, SP, Brasil).

Foram utilizados camundongos C57BL/6, com peso médio em torno de 15 g a 25 g e ratos Wistar com peso médio de 180 a 250 g, todos com idade entre 4 e 6 semanas, mantidos em caixas forradas com serragem, em sala com temperatura e luminosidade controladas (22°C, 12 h de luz e 12 h de escuro). Durante todo o procedimento experimental os animais receberam, de livre acesso, dieta sólida (Nuvilab CR1 – Nuvital) e água filtrada.

Os protocolos dos experimentos *in vitro* envolvendo animais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Ciências e Letras da UNESP, campus de Assis, local onde foram manipulados os animais e realizados os ensaios de testes das membranas com as células deles isoladas, sob o registro de nº 011/2010 (cópia no Anexo I). Os procedimentos experimentais *in vivo* estão de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, local onde foram realizados os experimentos, sob o registro de nº 158/2010 (cópia no Anexo II).

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Preparação dos suportes poliméricos

A preparação das membranas foi realizada de acordo com os protocolos estabelecidos por Rodrigues e colaboradores (2008) para membranas de quitosana/alginato e utilizado após adaptações por Veiga e Moraes (2011) na produção de membranas de quitosana/carragena, quitosana/pectina e quitosana/xantana, que inclui uma etapa de desaeração do material antes de sua secagem para a formação da membrana.

Membranas de xantana e quitosana complexadas foram preparadas em três razões poliméricas distintas, variando-se a proporção de uma solução aquosa de xantana a 1% (m/v) e de uma solução de quitosana a 1% (m/v) em ácido acético 2% (v/v), totalizando sempre 200 mL de volume final de mistura com 2 g de polissacarídeos. Foram preparadas, também, membranas de xantana e quitosana complexadas na presença dos tensoativos Pluronic F68 e Tween 80, totalizando 12 formulações, conforme apresentado na Tabela 3.3.

As membranas contendo apenas xantana e quitosana foram preparadas adicionando a solução de quitosana, com o auxílio de uma bomba peristáltica (Tecnal, modelo 7553-85), na solução de xantana em um reator de vidro encamisado, a uma vazão de 10 mL/min. A temperatura do reator foi mantida a 25°C utilizando um banho termostático (Tecnal, modelo TE 184) durante todo o processo e o sistema foi mantido sob constante agitação de 1000 rpm através de agitador mecânico de alto torque (Tecnal, modelo TE 038).

A mistura foi desaerada em bomba de vácuo (Tecnal, modelo TE 058) por 2 horas, transferida para uma placa de poliestireno de 15 cm de diâmetro e seca em estufa com circulação de ar (Tecnal, modelo TE 394/1) a 37°C até a formação de uma membrana seca, por aproximadamente 24 horas.

Tabela 3.3 – Formulações das membranas de xantana (X) e quitosana (Q) utilizadas nos ensaios.

Formulação	Proporção mássica X:Q (g/g)	Tipo de xantana	Tensoativo	Desaeração
1A	1:1	X <sub>Sigma</sub>	-	(+)
1B	1:1	X <sub>Keltrol®</sub>	-	(+)
1C	1:1	X <sub>Sigma</sub>	-	(-)
1D	1:1	X <sub>Sigma</sub>	Tween 80	(-)
1E	1:1	X <sub>Sigma</sub>	Pluronic F-68	(-)
1F	1:1	X <sub>piloto</sub>	-	(+)
2A	1,2:0,8	X <sub>Sigma</sub>	-	(+)
2B	1,2:0,8	X <sub>Keltrol®</sub>	-	(+)
2C	1,2:0,8	X <sub>Sigma</sub>	-	(-)
2D	1,2:0,8	X <sub>Sigma</sub>	Tween 80	(-)
2E	1,2:0,8	X <sub>Sigma</sub>	Pluronic F-68	(-)
3A	1,5:0,5	X <sub>Sigma</sub>	-	(+)
3B	1,5:0,5	X <sub>Keltrol®</sub>	-	(+)

(+) com desaeração; (-) sem desaeração

Também foram preparadas membranas contendo apenas os polissacarídeos xantana e quitosana excluindo a etapa de desaeração, transferindo-se a mistura diretamente para uma placa de poliestireno de 15 cm de diâmetro e secando-se em estufa com circulação de ar (Tecnal, modelo TE 394/1) a 37°C até a formação de um filme espesso seco, por aproximadamente 24 horas.

As membranas contendo os tensoativos foram preparadas seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente, dissolvendo-os na solução de xantana antes do gotejamento da solução de quitosana. A quantidade adicionada dos tensoativos Tween 80 e Pluronic F-68 foi de 1,5 mL e 1,5 g, respectivamente. A mistura foi transferida diretamente, sem desaeração, para uma placa de poliestireno de 15 cm de diâmetro e seca em estufa com circulação de ar (Tecnal, modelo TE 394/1) a 37°C até a formação de uma membrana seca, por aproximadamente 48 horas.

Para neutralizar o pH das membranas, que apresentavam ácido acético residual, visto que as mesmas foram testadas como suporte de adesão e crescimento celular, após a secagem foram realizadas sucessivas lavagens inicialmente imergindo-as em 500 mL de água destilada e deionizada por 30 minutos, repetindo-se este processo por três vezes, seguido da imersão em 200 mL de tampão HEPES 10 mM por 30 minutos e, novamente em 500 mL de água por 30 minutos. Este procedimento serviu também para a remoção dos tensoativos, quando requerido. Posteriormente às lavagens, as amostras foram secas em estufa com circulação de ar a 37°C por um período de 18 a 24 horas.

As amostras foram cortadas em tamanhos apropriados e esterilizadas com óxido de etileno (OE) por exposição a Oxyfume-30 (30% OE e 70% dióxido de carbono) por 8 h a 40°C e umidade relativa de 30 a 80%. Esta esterilização foi feita na empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda (Campinas, SP, Brasil). Inicialmente foi usado vácuo a 0,4 a 0,6 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 min e Oxyfume-30 foi adicionado até a câmara atingisse a pressão de 0,5 kgf/cm<sup>2</sup>. Após um período de 3,5 h, o vácuo foi restabelecido (0,4 a 0,6 kgf/cm<sup>2</sup>) e as amostras foram aeradas com ar filtrado por 10 min. O OE residual foi removido mantendo-se as amostras sob aeração por 48 h.

### 3.2.2. Caracterização físico-química dos suportes poliméricos

As membranas de xantana e quitosana complexadas, desaeradas ou não, assim como as obtidas na presença dos tensoativos foram avaliadas conforme descrito a seguir.

#### 3.2.2.1. Aspecto e morfologia da superfície e da secção transversal

As membranas foram analisadas a olho nu e seu aspecto foi registrado por fotografia digital. A morfologia foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio modelo LEO 440i, Leica. Amostras de 2 cm x 1 cm foram fixadas em um suporte adequado e metalizadas (mini Sputter coater, SC 7620) através da deposição de uma fina camada de ouro (92 Å) em suas superfícies. Para a avaliação da secção transversal, as amostras foram criofraturadas com nitrogênio líquido antes da deposição da camada de ouro.

#### 3.2.2.2. Espessura

A espessura média dos suportes foi obtida utilizando um micrômetro (Digimess), realizando-se sete medidas perto da borda da membrana e em ângulos de 90°. Os resultados foram expressos como médias.

#### 3.2.2.3. Capacidade de absorção e estabilidade durante exposição a soluções aquosas

A capacidade das membranas absorverem água e soluções salinas, sendo elas solução aquosa de NaCl a 0,9% (SS) e fluido corpóreo simulado (FCS), foi determinada utilizando corpos de prova de 6 cm x 1 cm, em triplicata, com massa seca inicial ( $M_s$ ) determinada em balança analítica. As amostras foram hidratadas em 7 mL das soluções previamente mencionadas, e nelas mantidas por 24 horas em estufa a 37°C. Após este período, as amostras foram novamente pesadas para a determinação das massas úmidas finais ( $M_u$ ) e a capacidade de absorção ( $C_i$ ) de cada solução (descrita pelo índice i) foi calculada através da Equação 1:

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

A estabilidade das membranas foi avaliada pela variação da massa de amostras expostas aos mesmos fluidos por 24 h, após sua secagem (até que atingissem massa constante, por cerca de 10 h), em estufa com circulação de ar a 37°C, obtendo-se, assim, suas massas secas finais ( $M_f$ ). A variação de massa ( $V_m$ ) após a exposição a cada solução foi calculada através da Equação 2:

$$V_m = \frac{[M_f - (M_s + M_{ss})]}{M_s} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

onde  $M_{ss}$  refere-se à massa estimada de sólidos da solução incorporados pelas amostras, considerando-se que as concentrações de sólidos de partida nas soluções SS e FCS eram de 9,00 g/L e 15,32g/L, respectivamente.

#### 3.2.2.4. Comportamento no meio de cultura RPMI-1640 suplementado

Com o intuito de verificar o comportamento das membranas expostas por longos períodos a um meio típico de cultivo de células animais, amostras circulares com 1,5 cm de diâmetro, estéreis, foram pesadas para a determinação de sua massa seca inicial e, dentro de uma câmara de fluxo laminar, foram depositadas no interior de tubos cônicos de 15 mL, estéreis, contendo 3 mL de meio RPMI-1640 suplementado. Os tubos foram fechados, lacrados com parafilme e incubados em estufa a 37°C por 144 horas, visando simular o período médio de incubação das células animais em teste.

A capacidade de absorção ( $C_i$ ) e a variação de massa ( $V_m$ ) foram determinadas como mencionado no item 3.2.2.3, considerando-se a concentração de sólidos de partida nesta solução como sendo de 19,28 g/L.

#### 3.2.2.5. Tensão e alongamento na ruptura

As propriedades mecânicas das membranas foram avaliadas com base no método ASTM D-882.

Utilizando oito replicatas para cada tipo de membrana, amostras de 2,54 cm x 10 cm com espessura pré-determinada foram fixadas em garras de 5 cm de um texturômetro (modelo TA.XT2, Stable Micro System SMD, Inglaterra), com velocidade de afastamento de 1 cm/s e célula com carga de 5,098 kgf. A tensão ( $T$ ) e o alongamento ( $A$ ) na ruptura foram calculados através das Equações 3 e 4, respectivamente:

$$T_{(MPa)} = \frac{F_m}{A_S} \quad (\text{Equação 3})$$

$$A = \frac{d_{final}}{d_{initial}} \quad (\text{Equação 4})$$

onde  $F_m$  é a força máxima no rompimento em N,  $A_S$  é a área da seção transversal da amostra do filme em  $\text{mm}^2$  (espessura x largura), e  $d$  é a distância de separação das garras.

#### 3.2.2.6. Expansão volumétrica

A expansão tridimensional das membranas foi determinada de modo indireto, com base no método proposto por Zeng e Ruckenstein (1996), quantificando-se o volume de solvente que ocupa os poros das amostras com este saturadas. Como solventes utilizou-se água e meio RPMI-1640 suplementado.

Amostras secas de 2 cm x 4 cm com massas conhecidas ( $M_S$ ) foram imersas em 10 mL de água ou meio de cultura RPMI-1640 suplementado a 37°C. Após 2 e 24 horas a 37 °C em água ou meio, respectivamente, as dimensões das amostras, bem como suas massas ( $M_f$ ), foram determinadas. A extração do solvente livre foi efetuada usando vácuo por 20 minutos e a massa das amostras foi novamente medida ( $M_{pós\ vácuo}$ ). A expansão tridimensional ( $\square$ ), o volume de meio de preenchimento ( $V_p$ ) e o volume de meio de hidratação ( $V_h$ ) foram calculados de acordo com as Equações 5, 6 e 7, respectivamente.

$$\varepsilon(\%) = \frac{\left(\frac{M_f - M_S}{d_{solv}}\right)}{V} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

$$V_p = \frac{M_f - M_s}{M_s} \quad (\text{Equação 6})$$

$$V_h = \frac{M_{\text{pós vácuo}} - M_s}{M_s} \quad (\text{Equação 7})$$

onde  $d_{\text{solv}}$  é a densidade do solvente (água ou meio RPMI-1640 suplementado) a 37°C e  $V$  é o volume da amostra no estado úmido.

### 3.2.3. Caracterização biológica quanto à citotoxicidade

Para estes ensaios foram utilizadas células L929 (fibroblastos de camundongos), amplamente empregadas em estudos de citotoxicidade e de interações entre biomateriais e células (Liu *et al.*, 2010; Mortazavi *et al.*, 2010; Salgado, 2005). O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640 suplementado, com composição descrita anteriormente.

Para a avaliação qualitativa da citotoxicidade das membranas foram realizados os ensaios de contato direto e o de eluição utilizando o corante cristal violeta, considerados como padrão de acordo com a norma ISO 10.993-5 (Salgado, 2005). Para análise quantitativa da citotoxicidade foi empregado o reagente MTT (3-(4,5-dimetilazol-2-yl) brometo-2,5-difeniltetrazol), técnica desenvolvida por Mosmann (1983) e adaptada por Dallan (2005) para membranas à base de quitosana. Para a avaliação da citotoxicidade direta, foram realizados ensaios de proliferação celular sobre as membranas, estabelecendo-se curvas de crescimento. Tais metodologias são descritas nos itens 3.2.3.3 a 3.2.3.4, mas anteriormente aos ensaios de caracterização biológica das membranas, foram realizados experimentos visando conhecer o comportamento típico das células L929, conforme exposto no item 3.2.3.2, após a descrição da forma de obtenção e preservação das suspensões celulares no item 3.2.3.1.

#### 3.2.3.1. Preservação e reativação das células L929 e obtenção do inóculo

Células L929 conservadas em nitrogênio líquido em criotubos com capacidade de 1,5 mL contendo  $10^6$  células suspensas em 600  $\mu$ L de meio RPMI-1640 suplementado, 300  $\mu$ L de SFB e 100  $\mu$ L de DMSO foram descongeladas em banho a 37° C transferindo-se, em seguida, todo o volume para um tubo cônico tipo Falcon de 15 mL. A esta suspensão foram adicionados vagarosamente, gota a gota, 10 mL de meio RPMI-1640 suplementado. A amostra foi centrifugada por 2 min a 1100 rpm, descartando-se o sobrenadante e ressuspensando-se o precipitado em 5 mL de RPMI-1640 suplementado. O material foi transferido para garrafas de poliestireno (TPP) com 25 cm<sup>2</sup> de área e incubado em estufa a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub> (Tecnal, modelo TE-399). Assim que a monocamada celular atingiu aproximadamente 90% de confluência o meio foi descartado e a garrafa lavada com 2 mL de tampão PBS/EDTA para a retirada das proteínas do soro. Para o desprendimento das células da parede da garrafa, adicionou-se 1 mL de tripsina bovina/EDTA a 0,25% (m/v), aguardando-se de 3 a 5 minutos em estufa a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após observação em microscópio invertido (Nikon eclipse TS100) e verificado o desprendimento das células, foram acrescentados 2 mL de meio RPMI-1640 suplementado para a neutralização da enzima, transferindo-se a suspensão para um tubo cônico tipo Falcon de 15 mL e centrifugando-se por 9 min a 1100 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado em 2 mL de RPMI-1640 suplementado, obtendo-se suspensões celulares que foram utilizadas para a propagação da cultura, para obter a curva de crescimento e como inóculo nos testes de citotoxicidade.

A contagem das células viáveis foi feita em câmara de Neubauer utilizando azul de trypan como corante.

### 3.2.3.2. Caracterização da cultura de células L929

Alíquotas de 2 mL de meio RPMI-1640 suplementado contendo  $0,5 \times 10^5$  cél/mL foram inoculadas em cada poço de placas de poliestireno contendo 6 orifícios (35 mm de diâmetro cada). As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Decorridas 24h, o meio de dois poços foi descartado, os poços foram lavados com 1 mL de PBS/EDTA cada, sendo adicionados 700  $\mu$ L de tripsina bovina/EDTA a 0,25% por poço. A placa foi novamente incubada por 3 a 5 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para que ocorresse o desprendimento celular; a enzima

foi então neutralizada com 700  $\mu\text{L}$  de meio RPMI-1640 suplementado e a concentração de células viáveis foi analisada utilizando o corante azul Trypan. A cada 24 horas foi realizada a tripsinização e a contagem das células de dois poços até a verificação da fase de declínio. Destaca-se que o meio de cultura dos poços remanescentes foi renovado a cada 72 horas para que as células não ficassem desprovidas de nutrientes.

A concentração de células viáveis foi graficada contra o tempo para a identificação das fases lag, log, estacionária e de declínio. A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) correspondente à máxima inclinação da parte linear da curva e o tempo de duplicação ( $t_g$ ) celular foram calculados segundo as Equações 8 e 9.

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln 2}{t_g} \quad (\text{Equação 8})$$

$$t_g = \frac{0,693}{\mu_{\text{máx}}} \quad (\text{Equação 9})$$

### *3.2.3.3. Análise da citotoxicidade indireta pelo ensaio de eluição e avaliação com cristal violeta*

Inicialmente, extratos das membranas foram obtidos após a manutenção das mesmas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado a uma concentração de 0,05g de material seco por mililitro de meio, durante 24 horas em estufa de cultivo celular a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Foram utilizados como controles negativo e positivo extratos de fragmentos da própria placa de cultura e de látex (na forma de tubos de coloração amarelada regularmente utilizados como torniquetes em procedimentos de coleta de sangue), respectivamente.

Alíquotas de 2 mL de meio RPMI-1640 suplementado contendo  $1 \times 10^5$  cél/mL de células L929 foram inoculadas em cada poço de 35 mm de placas de fundo chato de poliestireno com 6 poços (TPP) e mantidas em estufa a 37° C a 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. Após este período, observando-se a formação de uma monocamada celular, os meios foram removidos e substituídos por 1,5 mL dos extratos e as placas foram novamente incubadas em estufa a 37° C a 5% de CO<sub>2</sub> por 24h.

Decorrido este período o meio foi removido, as monocamadas foram lavadas com 1 mL de tampão PBS/EDTA e 5 gotas de solução de cristal violeta a 2% (m/v) em solução aquosa de etanol a 20% (v/v) foram adicionadas. O corante foi aspirado logo em seguida e a monocamada foi lavada por duas vezes com água deionizada, deixando-se a mesma secar ao ar livre por aproximadamente 10 minutos. As monocamadas foram examinadas em microscópio invertido, determinando-se a porcentagem de células afetadas, ou índice de lise (IL), conforme classificação apresentada na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Descrição dos índices de lise para a avaliação de resultados no teste de contato direto e eluição.

IL	Descrição	Classificação
0	Nenhuma lise	Nenhuma
1	Menos de 20% da zona afetada	Leve
2	Entre 20 e 39% da zona afetada	Suave
3	Entre 40 e 59% da zona afetada	Moderada
4	Mais de 60% da zona afetada	Severa

#### 3.2.3.4. Ensaio MTT ((3-(4,5-dimeteiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo)

A análise da toxicidade indireta das membranas a fibroblastos da linhagem L929 foi feita também com base no teste de atividade mitocondrial pelo método de redução do MTT. Este teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em *formazan*, um composto de coloração púrpura detectável espectrofotometricamente a 620 nm.

Como anteriormente, extratos das membranas foram obtidos após a manutenção das mesmas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado a uma concentração de 0,05g de material seco por mililitro de meio durante 48 horas em estufa de cultivo celular a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Foram utilizados como controles negativo e positivo extratos de fragmentos da própria placa de cultura e de látex, respectivamente.

Alíquotas de 100 µL de uma suspensão contendo  $1 \times 10^5$  células/mL em meio RPMI-1640 suplementado foram transferidas para cada poço de placas de fundo chato de 96 poços (TPP) e mantidas por 24 horas em estufa a 37° C a 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, e observada a formação de uma monocamada celular, os sobrenadantes foram removidos e substituídos por 100 µL dos extratos, e a placa foi novamente mantida em estufa a 37° C a 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Os extratos foram então removidos e cada poço lavado duas vezes com 100 µL de tampão PBS/EDTA. Após a lavagem, foram adicionados, em cada poço, 100 µL de RPMI-1640 suplementado, etapa esta seguida da adição de 10 µL de MTT a 5 mg/mL em tampão PBS/EDTA. Após quatro horas de incubação em estufa a 37°C, foram adicionados, em cada poço, 100 µL de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 100g/L dissolvido em uma solução de dimetil sulfóxido (DMSO) contendo 0,6% de ácido acético. As amostras foram gentilmente homogeneizadas e as culturas retornaram para incubação a 37°C por uma hora. Decorrido este período, as amostras foram levadas para leitura de sua absorbância a 620 nm em espectrofotômetro ELISA (Thermo Scientific, Multiskan FC, Finland).

#### *3.2.3.5. Ensaio de citotoxicidade direta com cristal violeta*

As amostras de membranas utilizadas neste teste foram mantidas por uma noite em meio RPMI-1640 suplementado a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> para que ficassem completamente intumescidas de meio.

O método do contato direto foi realizado seguindo o protocolo estabelecido pela ASTM-F813-83 (1983) e adaptado por Salgado (2005). Células L929 foram semeadas, a uma concentração de  $1 \times 10^5$  cél/mL em um volume de 2 mL de meio RPMI-1640 suplementado, em cada poço de 35 mm em placas de fundo chato de 6 poços (TPP) e incubadas em estufa a 37° C a 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h de permanência na estufa e observada a formação de uma monocamada celular, o meio foi retirado e amostras circulares de 1,5 cm de diâmetro das membranas previamente intumescidas e do controle positivo (látex) foram colocadas, em triplicata, em contato direto com a superfície da monocamada celular, adicionando-se, vagarosamente, 1,5 mL de meio RPMI-1640 suplementado.

Decorridas mais 24h em estufa a 37° C a 5% de CO<sub>2</sub>, os biomateriais foram removidos, as monocamadas lavadas com tampão PBS/EDTA e coradas com cristal violeta a 2% (m/v) em solução aquosa de etanol a 20%, conforme descrito no item 4.2.3.3.

As monocamadas foram examinadas em microscópio invertido avaliando-se a área que esteve em contato com o material e a área adjacente, determinando-se, assim, o índice de lise (IL) e o índice de zona (IZ) definido como a área subjacente ao material, conforme indicado nas Tabelas 3.4 e 3.5, respectivamente.

Tabela 3.5 - Descrição dos índices de zona para avaliação do teste de contato direto.

IZ	Descrição	Classificação
0	Nenhuma zona sob e aoredor da amostra	Nenhuma
1	Zona limitada sob a amostra	Leve
2	Zona inferior a 0,5 cm ao redor da amostra	Suave
3	Zona limitada entre 0,5 a 1 cm ao redor da amostra	Moderada
4	Zona superior a 1 cm ao redor da amostra	Severa

#### 3.2.3.6. Ensaio de proliferação celular

Este ensaio teve como objetivo estudar o comportamento das células L929 quando em contato direto com as membranas. Os fibroblastos foram inoculados diretamente sobre as membranas e o crescimento celular foi acompanhado durante 72 horas.

Alíquotas de 50 µL de uma suspensão contendo  $1 \times 10^5$  células/mL foram inoculadas sobre membranas com 1,5 cm de diâmetro, previamente intumescidas com meio de cultivo conforme descrito anteriormente, dispostas em poços de placas de fundo chato de 24 poços (TPP). Células inoculadas diretamente sobre poços sem amostras foram definidas como controle.

As culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas e, após este período, foram acrescidos 950 µL de meio RPMI-1640 suplementado. O material foi incubado em estufa por 72 horas, sendo retiradas amostras em triplicata a cada 24 horas.

As amostras retiradas foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão PBS/EDTA, 500 µL de tripsina/EDTA foram adicionados e o material foi incubado por 5 min a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Decorrido este período a tripsina foi inativada com 500 µL de meio RPMI-1640 suplementado e as células em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante azul Trypan.

### **3.2.4. Avaliação da mutagenicidade**

Este teste foi realizado visando assegurar a ausência de componentes tóxicos nos dispositivos produzidos com potencial de exercer efeitos sobre o material genético das células. Foi empregado o Teste de AMES, que avalia o potencial mutagênico do biomaterial na indução de mutação reversa em bactérias utilizando linhagens mutantes de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para histidina (Mortelmans e Zeiger, 2000).

Os ensaios foram realizados pela empresa Tecam Laboratórios, especializada na elaboração de ensaios toxicológicos e mutagênicos e reconhecida por agências do governo como o IBAMA, a ANVISA, e o Ministério da Agricultura, dentre outros seguindo os procedimentos descritos nos guias OECD Guidelines for testing of chemicals (1997), ISO10993-1 (2003), ISO10993-3 (1992) e ISO10993-12 (2007). Destaca-se que este ensaio somente foi realizado para amostras de membranas com formulações mais promissoras segundo os variados ensaios de caracterização efetuados devido ao seu elevado custo.

### **3.2.5. Obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais**

#### *3.2.5.1. Extração da medula óssea dos animais*

Para a extração das células-tronco mesenquimais foi empregada a técnica desenvolvida e padronizada pela equipe de pesquisa liderada pelo Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes no Laboratório de Genética e Terapia Celular do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências e Letras (UNESP campus de Assis, SP). O meio de cultura utilizado foi o  $\alpha$ -MEM

suplementado com L-glutamina (0,3g/L), D-glicose (2,0g/L), NaHCO<sub>3</sub> (2,0g/L), penicilina (10.000 UI/L), estreptomicina (0,05g/L), Hepes (5,958g/L) e soro fetal bovino (SFB) 15%.

Os camundongos foram sacrificados utilizando o método de deslocamento cervical (movimento de empurrar a base do crânio do animal para baixo e para frente e puxar a cauda para cima e para trás, ao mesmo tempo), e os ratos foram sacrificados através da aplicação de tiopental sódico 10% (25 mg/kg), via intramuscular. Em seguida os animais foram lavados com solução de etanol a 70% e submetidos à remoção cirúrgica dos fêmures e tíbias.

A seguir, as epífises dos mesmos foram cortadas e em uma das extremidades do orifício do osso foi acoplada uma agulha de 0.3cc fixa à seringa de 1mL (Medinject) contendo PBS/EDTA. Em seguida, a extração da medula óssea (MO) foi realizada através do procedimento de lavagem do osso (conhecido por “*flushing*”). Durante o “*flushing*” os ossos foram posicionados sobre o tubo coletor em posição vertical, com o auxílio de uma pinça. O procedimento foi repetido até que se verificasse aparente ausência dos componentes da medula óssea no interior dos ossos.

Após a coleta, a suspensão celular foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm, ressuspendendo-se o pellet em 2 mL de meio  $\alpha$ -MEM suplementado para a contagem das células viáveis em hemocítmetro de Neubauer utilizando-se azul de trypan como corante. Cada animal forneceu, em média, cerca de  $7 \times 10^7$  células totais da medula óssea, que foram plaqueadas em meio de cultura Alpha-MEM suplementado, em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (TPP) incubadas em estufa a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub> para o isolamento das CTMs pela propriedade de aderência ao plástico.

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar em condições assépticas, utilizando material cirúrgico esterilizado, seringas e tubos descartáveis.

### 3.2.5.2. *Cultura das células-tronco mesenquimais*

Garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo as células mononucleares da MO foram mantidas em 20 mL de meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera umidificada. Após 72 horas as células não aderentes foram retiradas através da troca de

todo o meio de cultura. A garrafa de cultura foi mantida por mais 72 horas nas condições especificadas anteriormente e a partir desse momento foram realizadas trocas de metade do volume do meio de cultura (10 mL) a cada 72 horas até o estabelecimento da cultura primária com predominância de células fibroblastóides.

Ao atingir em torno de 80% de confluência, a cultura primária passou pelo procedimento de tripsinização para que as células aderentes fossem desprendidas e o primeiro repique fosse feito. A tripsinização foi realizada quando a cultura atingia confluência de 80%, de modo que a cada passagem, a população de CTMs foi se tornando mais homogênea e pura, apresentando expressão menor que 2% para os marcadores de superfície das células hematopoiéticas, eritrócitos, plaquetas e moléculas de células endoteliais de adesão.

A tripsinização foi feita após a retirada de todo o meio de cultura da garrafa e da lavagem cuidadosa das células aderidas com 10 mL de PBS/EDTA por três vezes. Após a retirada do PBS, 5 mL de solução de tripsina bovina/EDTA 0,25% (m/v) foram adicionados à garrafa de cultura. Após cinco minutos, em estufa de cultivo celular, a solução de tripsina foi inativada através da adição de 10 mL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado. A suspensão celular foi centrifugada por 10 min à 1200 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense em PBS/EDTA e centrifugado novamente por 10 min à 1200 rpm. Esse procedimento de lavagem das células em PBS/EDTA foi repetido por mais uma vez. Imediatamente após a segunda lavagem das células em PBS/EDTA as mesmas foram ressuspensas em meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado e contadas em hemocitômetro de Neubauer utilizando-se azul Trypan como corante. Após a contagem das células, alíquotas das mesmas foram destinadas ao repique para expansão da cultura e/ou para a caracterização dos marcadores de superfície positivos e negativos por citometria de fluxo, e/ou para os procedimentos experimentais de adesão e de terapia celular em modelo vivo. O número máximo de passagens utilizadas foi de 15.

### 3.2.5.3. *Imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais*

Alíquotas de 100  $\mu$ L de contendo  $1 \times 10^6$  células/mL foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro com 5  $\mu$ L de anticorpos monoclonais ou isotipos controle diretamente conjugados ao fluorocromo ficoeritrina. Foram feitas marcações simples para a

análise dos diversos anticorpos. Após a incubação, as células foram centrifugadas por cinco minutos a 1800 rpm, lavadas duas vezes com PBS/EDTA, ressuspensas em 200  $\mu$ L de PBS/EDTA e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo FACSort (Becton-Dickson). Foram adquiridos dados de 20000 eventos/amostra com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). As análises foram realizadas utilizando-se o software Cellquest (BD). Para a caracterização imunofenotípica das CTMs murinas foram utilizados os anticorpos monoclonais contra os marcadores CD45, CD34, CD105, CD31 e CD73 (eBioscience, EUA).

### **3.2.6. Adesão e proliferação das CTMs nas membranas**

Amostras circulares de 1,5 cm de diâmetro foram dispostas em placas de poliestireno de fundo chato com 24 poços (TPP) e lavadas 3 vezes com tampão PBS/EDTA. Após as lavagens, 700  $\mu$ L de meio  $\alpha$ -MEM suplementado foram adicionados em cada poço e as placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por uma noite, para que ficassem intumescidas.

Após este período o excesso de meio foi retirado e 100  $\mu$ L de uma suspensão de  $1 \times 10^7$  células/mL foram semeados sobre cada amostra. Após 2 a 3 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> adicionou-se vagarosamente 900  $\mu$ L de meio  $\alpha$ -MEM suplementado e as amostras foram mantidas por até 14 dias em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo metade do meio (500  $\mu$ L) trocada a cada 48 horas.

### **3.2.7. Análise das CTMs aderidas nas membranas por MEV**

Decorrido o período de inoculação (7 ou 14 dias), as amostras foram gentilmente transferidas para novos poços de placas de cultivo de fundo chato com 24 poços e as células aderidas no biomaterial foram fixadas para análise por MEV. O processo de fixação consistiu da imersão das amostras em análise em duas diferentes soluções fixadoras, seguida pela desidratação das mesmas.

Inicialmente foi adicionado 1 mL da primeira solução fixadora, constituída de paraformaldeído a 4%(v/v) e glutaraldeído a 2% (m/v) em tampão cacodilato a 0,2 M

armazenado em geladeira e pH 7,2, em cada poço. As amostras permaneceram imersas neste fixador por cerca de uma hora em geladeira e após este período as mesmas foram lavadas com 1 mL de tampão cacodilato a 0,2 M gelado por 15 minutos cerca de três vezes a cada lavagem. A segunda fixação ocorreu adicionando-se, em cada amostra, 1 mL de solução de tetróxido de ósmio a 1% (m/v) em tampão cacodilato a 0,2M. As amostras permaneceram imersas neste fixador por cerca de 15 minutos em geladeira, sendo posteriormente lavadas por 3 vezes com tampão cacodilato a 0,2 M gelado por 10 minutos a cada lavagem.

Em seguida foi realizada a desidratação das amostras imergindo-as em soluções de etanol em água a 50, 70, 90, 100, 100 e 100%, por 15 minutos cada etapa. Após a desidratação em solução alcoólica, o etanol contido nos materiais foi substituído por CO<sub>2</sub> líquido e posteriormente as amostras foram secas em ponto crítico (critical point dryer CPD 030 marca Balzers). Depois de secas, as amostras foram metalizadas (sputter SCD 050 marca Balzers) através da deposição de uma fina camada de ouro (92A) e as morfologias das superfícies das membranas foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (modelo JSM 5800 LV marca JEOL) no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia – UNICAMP.

### **3.2.8. Ensaio preliminar *in vivo***

Visando a comprovação da aplicabilidade da biomembrana e almejando atingir o objetivo da Medicina Translacional, que busca transformar descobertas biológicas apropriadas em medicamentos e dispositivos médicos que podem ser utilizados no tratamento de pacientes, foi proposta a realização de testes *in vivo* utilizando a formulação tida como mais promissora no processo de cicatrização de lesões de pele de acordo com os outros métodos de caracterização das amostras. O experimento proposto consistiu de um teste piloto, utilizando um pequeno número animais, de forma a avaliar, em caráter preliminar, o comportamento do biomaterial.

Estes ensaios foram realizados com a colaboração do Prof Dr Júlio César Voltarelli, professor titular do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, coordenador da Divisão de Imunologia Clínica, do Laboratório de Imunogenética (HLA) e da Unidade de Transplante de Medula Óssea do HC-FMRP-USP e de sua aluna de doutorado Carolina Caliári Oliveira.

### 3.2.8.1. Procedimento experimental

Ratos Wistar pesando em torno de 300 g foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo Campus Ribeirão Preto e aclimatados no Biotério de Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da mesma Universidade antes da realização dos experimentos. Os animais foram mantidos em temperatura e ciclos claro-escuro controlados e com água e alimentação *ad libitum* durante todo o período do experimento. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos como mostrado na Tabela 3.6.

Os animais utilizados no experimento foram anestesiados, por via intraperitoneal, com 400 µL de solução na concentração de 1:1 (v/v) de quetamina a 10% (Agener União, Brasil) e xilazina 20mg/mL (Dopaser-Calier, Espanha). Após a anestesia, os animais foram tricotomizados. A tricotomia foi realizada em duas etapas, em um primeiro momento os pêlos dos animais foram removidos com o auxílio de máquina elétrica (PHILIPS, Brasil), em um segundo momento, o mesmo animal teve a região dorsal recoberta por creme depilatório (Depilart, Brasil) por 5 minutos, esse creme foi removido com auxílio de gaze úmida. A pele recém tricotomizada foi seca com auxílio de papel toalha e em seguida foram realizadas três lesões circulares de 1,5 cm de diâmetro na região dorsal de cada animal, com a retirada cirúrgica da derme e epiderme como indicado na Figura 3.1 (A e B).

Aproximadamente 30 minutos após a realização das lesões, com os animais ainda anestesiados, os mesmos foram submetidos ao tratamento pelo uso de membranas contendo ou não CTMs, conforme ilustrado na Figura 3.1 (C e D). O tamanho das membranas foi exatamente igual ao das lesões, ou seja, 1,5 cm de diâmetro. As membranas sem células foram previamente imersas por uma noite em PBS/EDTA e a adesão das células nas membranas do grupo GR03 foi realizada seguindo o protocolo estabelecido no item 3.2.6., utilizando-se CTMs de rato com um período de incubação de 4 dias. Ensaios controle foram efetuados sem o uso das membranas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais.

Tabela 3.6. Distribuição dos animais utilizados no experimento.

Grupo	animais	n (lesões)	Tratamento
GR01	3	9	Controle – sem membrana
GR02	3	9	Membrana sem células
GR03	3	9	Membrana com CTMs aderidas



Figura 3.1 – Procedimento experimental para a obtenção e tratamento das lesões: A) rato Wistar marcado; B) ferida cirúrgica; C) manipulação do curativo; D) animal com lesão recoberta com o curativo.

### 3.2.8.2. Avaliação clínico-fotográfica do quadro evolutivo das lesões

A avaliação clínico-fotográfica das lesões foi realizada por método não invasivo, pela determinação da porcentagem de cicatrização das ulcerações, observada a partir da captura e análise de imagens pelo programa *Image J*<sup>®</sup> (versão 1.40g para Windows<sup>TM</sup>).

O *Image J*<sup>®</sup> – *Image Processing and Analysis in Java* (Bethesda, Maryland, EUA) é um programa de análise de imagem de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband do *National Institutes of Health* (NIH). É um sucessor do *NIH Image*, possuindo a vantagem de ter aplicação multidisciplinar, na pesquisa e na prática clínica.

A captura de imagens foi realizada imediatamente após a lesão (tempo considerado como dia zero) e nos períodos de 5, 10, 15, 20 e 25 dias após o início do experimento. No momento da captura das imagens os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, com 400 µL de solução de quetamina a 10% e xilazina a 20 mg/mL na razão 1:1 (v/v).

No momento da captura da imagem uma régua foi colocada ao lado de cada animal fotografado para calibração do programa e posterior análise computacional. As imagens foram capturadas por uma câmera fotográfica digital Fuji Film Finepix S2000HD com resolução de 10.0 megapixels. A porcentagem de cicatrização foi avaliada a partir dos dados de medição da área das lesões, em diferentes períodos, em pixels fornecidos pelo programa *Image J*<sup>®</sup> aplicados à Equação 10.

$$\text{Porcentagem de cicatrização} = 100 - \frac{\text{Área final da úlcera}_{(\text{pixels})}}{\text{Área inicial da úlcera}_{(\text{pixels})}} \times 100 \quad (\text{Equação 10})$$

A análise estatística baseou-se na comparação da variável entre os grupos experimentais, utilizado-se o Teste t não paramétrico para determinar as diferenças existentes entre os grupos experimentais. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando p valor foi menor que 5% (p <0,05). Esses testes foram realizados com auxílio do programa estatístico PRISMA 5.0.

## 4. RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos neste trabalho, enfocando a caracterização físico-química e biológica das membranas produzidas pela complexação de xantana e quitosana, com ou sem adição de tensoativos, bem como os testes de adesão e proliferação das células-tronco mesenquimais de rato e camundongo no biomaterial e a análise do comportamento do biomaterial obtido *in vivo*.

### ***4.1. Caracterização físico-química das membranas preparadas com xantanas de qualidade analítica e alimentícia, desaeradas e sem adição de tensoativos***

Preliminarmente foram produzidas membranas seguindo o protocolo estabelecido por Rodrigues e colaboradores (2008) para membranas de quitosana/alginato e utilizado após adaptações por Veiga e Moraes (2011) na produção de membranas de quitosana/carragena, quitosana/pectina e quitosana/xantana, que inclui uma etapa de desaeração do material antes de sua secagem para a formação da membrana.

Nesta etapa foram obtidas membranas com três proporções mássicas distintas dos polissacarídeos xantana (X) e quitosana (Q), a saber X:Q a 1:1, 1,2:0,8 e 1,5:0,5, e goma xantana de diferentes procedências, uma de qualidade analítica da marca Sigma Chemical Co. ( $X_{\text{Sigma}}$ ), outra do tipo Keltrol<sup>®</sup> F, de qualidade alimentícia ( $X_{\text{Keltrol}}$ ), como descrito na Tabela 3.3.

#### **4.1.1. Aspecto e morfologia do material**

Observou-se nas formulações 1A e 1B, de proporção polimérica X:Q igual a 1:1, contendo xantana da Sigma Chemical Co. e da CPKelco, respectivamente, a formação de um complexo homogêneo, translúcido e de alta viscosidade, que se prendia à hélice do sistema de agitação. A agitação da mistura ocasionou a formação de grande quantidade de bolhas de ar, as quais foram retiradas através da etapa de desaeração. A secagem, visando a evaporação de

solvente e, conseqüentemente a formação da membrana, ocorreu em 24 horas, em conformidade com o verificado por Veiga e Moraes (2011) para membranas obtidas com os mesmos polissacarídeos.

Durante as sucessivas lavagens realizadas para a remoção do ácido acético residual, estas amostras apresentaram aumento de tamanho, em especial no seu diâmetro, mostrando-se muito delicadas. Após a segunda secagem, que durou em média 18 horas, observou-se a formação de membranas finas, flexíveis e transparentes, com a superfície ondulada (Figura 4.1).

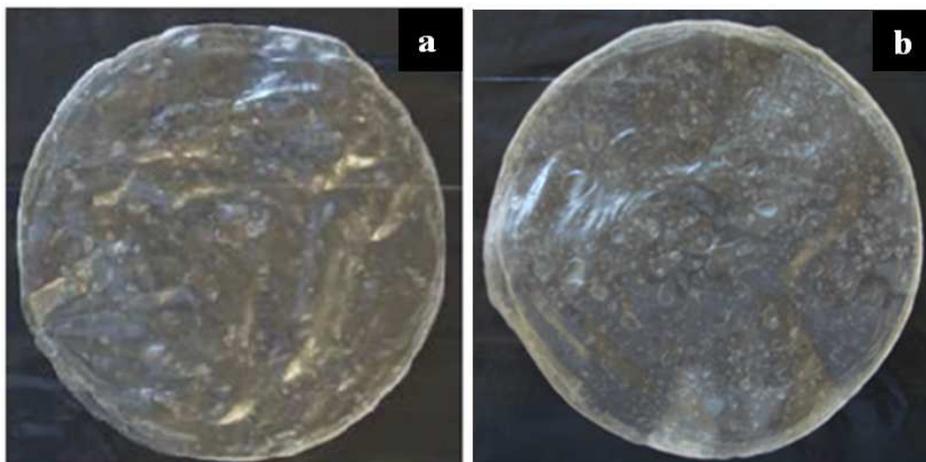


Figura 4.1 - Aspecto das membranas com proporção polimérica de X:Q 1:1 preparadas com xantana da marca Sigma Chemical Co. - 1A (a) e da CPKelco - 1B (b) após a segunda secagem.

As formulações com proporção polimérica de X:Q igual a 1,2:0,8 (2A e 2B, com xantana da Sigma Chemical Co. e CPKelco, respectivamente), também apresentaram-se como uma mistura viscosa, porém com viscosidade menor que as amostras com proporção equivalente dos polímeros. A desaeração mostrou-se eficiente, reduzindo bastante o número de bolhas no complexo. A primeira secagem durou em média 24 horas e durante as lavagens as membranas se mostraram firmes e de mais fácil manuseio. Após a segunda secagem, que ocorreu em 18 horas aproximadamente, obteve-se a formação de membranas transparentes e finas, aparentemente

firmes e resistentes, praticamente sem a presença de bolhas e com superfície ondulada (Figura 4.2).

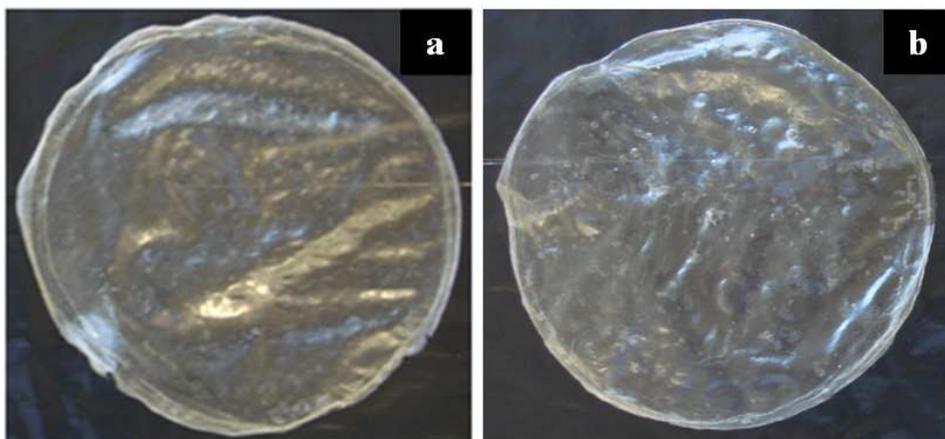


Figura 4.2 - Aspecto das membranas com proporção polimérica de X:Q 1,2:0,8 preparadas com xantana da marca Sigma Chemical Co. - 2A (a) e da CPKelco - 2B (b) após a segunda secagem.

Nas membranas com maior proporção de xantana (3A e 3B), a mistura polimérica mostrou-se menos viscosa, a evaporação total do solvente ocorreu, em média, em 24 horas e durante as lavagens as amostras mostraram-se resistentes, porém muito escorregadias, possivelmente porque devido ao excesso de xantana, tal composto não estivesse totalmente complexado com a quitosana, dissolvendo-se parcialmente na água durante as lavagens. Após a segunda secagem foram obtidas membranas transparentes, finas e flexíveis, com presença de ondulações na superfície. O aspecto das membranas obtidas nestes ensaios é apresentado na Figura 4.3.

Todas as membranas obtidas empregando-se desaeração a vácuo, independentemente da proporção polimérica ou tipo de goma xantana, não apresentaram poros aparentes em sua superfície, mostrando-se finas e transparentes tanto no estado seco quanto úmido.

A morfologia da superfície e da secção transversal das membranas foi analisada por MEV e os resultados típicos são mostrados na Figura 4.4.

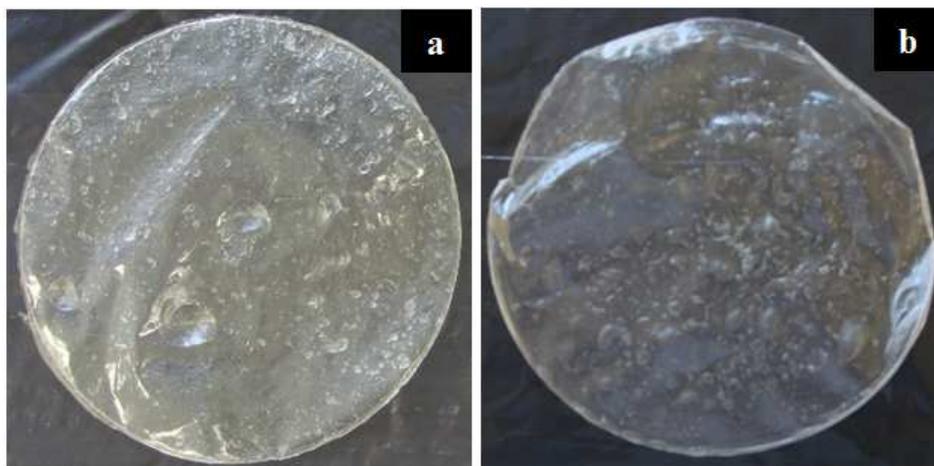


Figura 4.3 - Aspecto das membranas com proporção polimérica de X:Q 1,5:0,5 preparadas com xantana da marca Sigma Chemical Co.– 3A (a) e da CPKelco 3B (b) após a segunda secagem.

Por meio das micrografias observou-se que as membranas apresentam superfície íntegra, com estruturas fibrilares distribuídas de forma bastante homogênea e sem poros superficiais aparentes.

Os cortes transversais revelaram estruturas lamelares, com diferenças significativas na compactação polimérica ao longo da espessura das membranas. Membranas de proporção polimérica X:Q igual a 1:1, independentemente do tipo de goma xantana utilizada, mostraram-se mais densas, enquanto que as formulações 2A, 2B, 3A e 3B apresentaram maior número de lamelas.

#### 4.1.2. Efeito da composição na espessura das membranas

Os valores correspondentes à espessura média das membranas secas, preparadas com a etapa de desaeração, são apresentados na Tabela 4.1. As espessuras variaram de 102,90 a 208,57  $\mu\text{m}$ .

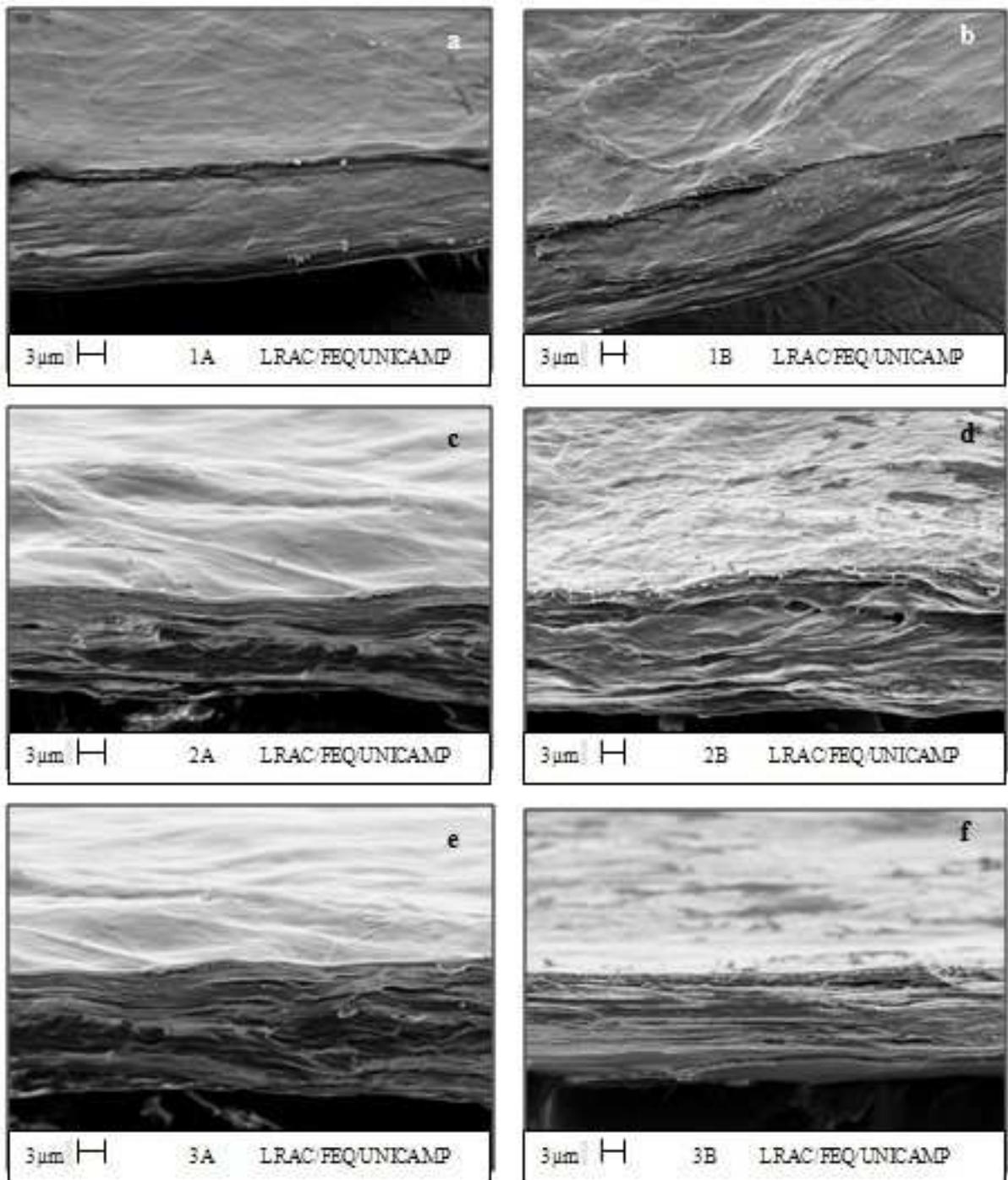


Figura 4.4 - Morfologia das membranas de formulações: (a) 1A, (b) 1B, (c) 2A, (d) 2B, (e) 3A, (f) 3B.

Tabela 4.1 - Valores da espessura das membranas de xantana (X) e quitosana (Q) preparadas em diferentes condições.

Formulação	Proporção X:Q (g/g)	Espessura ( $\mu\text{m}$ )
1A	1:1	102,90 $\pm$ 39,90 <sup>a</sup>
1B	1:1	127,14 $\pm$ 5,00 <sup>a</sup>
2A	1,2:0,8	130,06 $\pm$ 31,20 <sup>a</sup>
2B	1,2:0,8	131,42 $\pm$ 22,17 <sup>a</sup>
3A	1,5:0,5	208,57 $\pm$ 12,58 <sup>b</sup>
3B	1,5:0,5	200,00 $\pm$ 18,92 <sup>b</sup>

Letras iguais indicam que as formulações não diferem estatisticamente entre si a 95% de confiança (Teste de Tukey).

De acordo com o teste de Tukey as amostras de proporções poliméricas X:Q 1:1 e 1,2:0,8, independentemente do tipo de xantana utilizado, não apresentaram diferenças de espessura.

Dentre as amostras que passaram pela etapa de desaeração, as formulações 3A e 3B, que continham maior concentração de xantana, mostraram-se mais espessas.

#### 4.1.3. Capacidade de absorção de soluções aquosas

Os valores listados na Tabela 4.2 correspondem à capacidade de absorção de água e soluções salinas das membranas obtidas empregando-se a etapa de desaeração. Todas as membranas apresentaram capacidades elevadas de absorção, variando de 36,17 a 91,96 g de H<sub>2</sub>O por grama de membrana seca, 10,63 a 24,55 g de SS por grama de membrana seca e 8,89 a 22,30 g de FCS por grama de membrana seca.

As membranas com proporção polimérica de X:Q igual a 1:1, independentemente do tipo da goma xantana utilizada, apresentaram maiores índices de absorção em água, 91,96 e 85,57 g/g, para membranas preparadas com goma xantana de grau alimentício e analítico, respectivamente, não havendo diferença significativa entre elas. Estes valores são muito superiores aos reportados na literatura para membranas lamelares de quitosana/alginato destinadas à aplicação como

curativos dérmicos, a saber 9,5 g H<sub>2</sub>O por grama de membrana seca (Wang *et al.*, 2001), 12,0 g H<sub>2</sub>O por grama membrana seca (Yan *et al.*, 2000) e 11,1 a 19,2 g H<sub>2</sub>O por grama membrana seca (Rodrigues *et al.*, 2008).

Tabela 4.2 – Valores observados para a capacidade média de absorção ( $C_i$ ) de água e soluções salinas (SS e FCS), após 24 horas, de membranas de xantana e quitosana preparadas incluindo-se a etapa de desaeração.

Formulação	Proporção X:Q (g/g)	$C_{\text{água}}$ (g/g)	$C_{\text{SS}}$ (g/g)	$C_{\text{FCS}}$ (g/g)
1A	1:1	85,57 ± 3,70 <sup>a,A</sup>	24,55 ± 2,36 <sup>c,B</sup>	15,78 ± 0,10 <sup>f,C</sup>
1B	1:1	91,96 ± 2,70 <sup>a,D</sup>	17,62 ± 0,69 <sup>d,E</sup>	8,89 ± 0,14 <sup>g,F</sup>
2A	1,2:0,8	48,85 ± 1,12 <sup>b,G</sup>	16,12 ± 0,49 <sup>d,H</sup>	11,86 ± 0,03 <sup>h,I</sup>
2B	1,2:0,8	43,52 ± 1,72 <sup>b,J</sup>	10,63 ± 0,53 <sup>e,K</sup>	8,99 ± 0,23 <sup>g,K</sup>
3A	1,5:0,5	36,17 ± 0,91 <sup>b,L</sup>	19,87 ± 0,09 <sup>d,M</sup>	21,16 ± 1,16 <sup>i,M</sup>
3B	1,5:0,5	40,59 ± 6,95 <sup>b,N</sup>	20,28 ± 0,06 <sup>d,O</sup>	22,30 ± 0,54 <sup>i,O</sup>

Resultados com letras iguais indicam que as formulações não diferem estatisticamente entre si a 95% de confiança. Letras maiúsculas correspondem à avaliação por formulação (coluna) e letras minúsculas, por solução aquosa (linha) (Teste de Tukey).

A elevada capacidade de absorção de água do complexo quitosana/xantana é reportada na literatura. Hidrogéis de quitosana-xantana utilizados para a liberação controlada de fármacos apresentaram absorção de água de 64 g H<sub>2</sub>O por grama de hidrogel (Popa *et al.*, 2010). Veiga e Moraes (2011) demonstraram que membranas lamelares de quitosana e xantana absorvem entre 24,22 e 61,23 g H<sub>2</sub>O por grama de membrana seca.

De acordo com o teste de Tukey, o tipo de goma xantana não interferiu nos resultados de absorção de água em todas as proporções poliméricas e das soluções salinas SS e FCS na proporção polimérica de X:Q igual a 1,5:0,5. No entanto, a capacidade de absorção de SS e FCS das amostras de proporções poliméricas 1:1 e 1,2:0,8 preparadas com goma xantana de grau alimentício apresentaram valores inferiores aos das amostras preparadas com xantana de grau analítico.

A capacidade de absorção de soluções salinas, em especial de FCS, foi mais elevada para as amostras com maior proporção de xantana (3A e 3B). Uma possível explicação para estes resultados seria a interação de carboxilas livres, mais presentes na proporção polimérica X:Q igual a 1,5:0,5, com os cátions das soluções, que, por sua vez, podem ter contribuído para o aumento da hidratação das cadeias poliméricas (efeito equivalente ao do *salting in* para proteínas).

#### 4.1.4. Variação de massa durante exposição a soluções aquosas

A observação do comportamento das membranas obtidas a partir de material desaerado frente à exposição a diferentes soluções salinas visou avaliar a estabilidade dos complexos de polieletrólitos para prever possíveis perdas de massa que poderiam ocorrer quando as membranas estivessem em contato com os meios de cultivo celular e/ou com fluidos corpóreos. Os resultados obtidos para a variação de massa das membranas expostas a diferentes soluções aquosas salinas e água por 24 horas estão listados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Valores obtidos para a variação de massa das membranas com desaeração durante a exposição a soluções aquosas por 24 h a 37°C.

Formulação	Proporção X:Q (g/g)	V <sub>m</sub> H <sub>2</sub> O (%)	V <sub>m</sub> SS (%)	V <sub>m</sub> FCS (%)
1A	1:1	-13,96 ± 0,86 <sup>a,A</sup>	-12,71 ± 2,16 <sup>e,A</sup>	-10,27 ± 1,37 <sup>f,A</sup>
1B	1:1	-20,73 ± 2,99 <sup>b,B</sup>	-11,23 ± 1,49 <sup>e,C</sup>	-10,16 ± 0,38 <sup>f,C</sup>
2A	1,2:0,8	-9,75 ± 0,15 <sup>a,c,D</sup>	-7,06 ± 1,16 <sup>e,D</sup>	-6,72 ± 2,53 <sup>f,D</sup>
2B	1,2:0,8	-7,73 ± 0,32 <sup>c,d,E</sup>	-6,33 ± 1,92 <sup>e,E</sup>	-5,34 ± 1,48 <sup>f,E</sup>
3A	1,5:0,5	-12,23 ± 3,73 <sup>a,d,F</sup>	-12,06 ± 3,73 <sup>e,F</sup>	-12,75 ± 2,80 <sup>f,F</sup>
3B	1,5:0,5	-9,96 ± 2,11 <sup>a,d,G</sup>	-7,78 ± 0,06 <sup>e,G</sup>	-7,73 ± 3,21 <sup>f,G</sup>

Resultados com letras iguais indicam que as formulações não diferem estatisticamente entre si a 95% de confiança. Letras maiúsculas correspondem à avaliação por formulação (coluna) e letras minúsculas, por solução aquosa (linha) (Teste de Tukey).

Todas as membranas perderam massa, sendo que a perda variou de 5,34 e 20,73%. As amostras apresentaram maior perda de massa quando expostas a água do que quando às soluções SS e FCS, no entanto, estatisticamente não se observou diferença significativa, com exceção da amostra 1B, que perdeu duas vezes mais massa em água do que em FCS.

As formulações expostas a SS e FCS não apresentaram diferença estatística significativa entre si, entretanto pode-se notar que as amostras de proporção X:Q igual a 1,2:0,8 mostraram-se mais estáveis, apresentando menor perda de massa frente às soluções aquosas.

#### 4.1.5. Absorção e perda de massa durante a exposição ao RPMI-1640 suplementado

A avaliação do comportamento das membranas frente à exposição por longo período em meio RPMI-1640 suplementado foi realizada, principalmente, para verificar seu potencial uso como suporte de adesão e crescimento de células mesenquimais. Os valores obtidos para a capacidade máxima de absorção de meio RPMI-1640 suplementado e de variação de massa das amostras encontram-se listados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Valores obtidos para a capacidade média de absorção ( $C_i$ ) e variação de massa ( $V_m$ ) das membranas de proporção polimérica X:Q 1:1 e 1,2:0,8 com desaeração, durante a exposição a meio de cultivo RPMI-1640 suplementado por 144 h a 37°C.

Formulação	Proporção X:Q (g/g)	$C_{\text{RPMI}}$ (g/g)	$V_m$ RPMI (%)
1A	1:1	$6,31 \pm 1,81^a$	$-17,13 \pm 3,20^b$
1B	1:1	$5,16 \pm 0,80^a$	$-14,88 \pm 1,00^b$
2A	1,2:0,8	$7,49 \pm 0,33^a$	$-23,25 \pm 2,67^c$
2B	1,2:0,8	$8,86 \pm 0,11^a$	$-25,63 \pm 0,98^c$

Letras iguais indicam que as formulações não diferem estatisticamente entre si a 95% de confiança (Teste de Tukey).

As massas das amostras 3A e 3B não puderam ser medidas, visto que as membranas se dissolveram parcialmente no meio de cultura durante o período de exposição. Este resultado descarta a possibilidade do uso da proporção polimérica X:Q igual a 1,5:0,5 na preparação dos suportes. As demais formulações mostraram-se estáveis durante a exposição, apresentando capacidades de absorção muito semelhantes, verificando-se um aumento da perda de massa com a elevação da concentração de xantana.

De acordo com o teste de Tukey não foi observada diferença estatística significativa nos resultados de absorção para amostras de mesma proporção polimérica preparadas com xantana de distintas procedências, o que indica que não há influência direta do tipo de xantana utilizada.

Comparando-se os valores de capacidade de absorção de meio de cultura RPMI-1640 suplementado das formulações testadas com os relatados na Tabela 4.2 para água, SS e FCS, nota-se que os valores de absorção em meio de cultura foram mais similares aos verificados para exposição a SS e FCS, provavelmente em função da elevada concentração de sais e de outros compostos no meio, como aminoácidos, açúcares e proteínas, dentre outros.

A perda de massa para as formulações de proporção polimérica 1,2:0,8 foi bem superior à das amostras preparadas na proporção 1:1, independente do tipo de xantana utilizada, sugerindo maior estabilidade da mistura de polímeros em iguais proporções frente à exposição ao meio de cultivo celular por longos períodos.

#### ***4.2. Caracterização físico-química das membranas preparadas sem desaeração adicionando ou não tensoativos***

Com o intuito de obter membranas porosas, uma vez que a porosidade é uma das características esperadas em um *scaffold*, foram produzidas membranas seguindo o procedimento estabelecido por Bueno e Moraes (2011), que propõe a adição de surfatantes no complexo polieletrólito e a não desaeração do material antes de sua secagem. A presença do surfatante promoveria a dispersão dos polímeros e a estabilização das bolhas de ar no hidrogel, e assim, após a evaporação do solvente, seria possível a obtenção de membranas porosas que pudessem acomodar células em proliferação no interior de sua estrutura, além de em suas superfícies. Desta

forma, foram adicionados à mistura polimérica os tensoativos Tween 80 e Pluronic F68 durante a preparação do material, excluindo-se a etapa de desaeração. Foram também preparadas membranas sem a presença dos tensoativos excluindo-se a etapa de desaeração.

Diante dos resultados obtidos com as amostras preparadas com a inclusão da etapa de desaeração, para a obtenção destas membranas foram escolhidas as proporções poliméricas de X:Q iguais a 1:1 e 1,2:0,8, uma vez que membranas preparadas com estas proporções mostraram-se mais estáveis frente a exposições por longos períodos em meio de cultura para crescimento de células animais. A goma xantana utilizada para a produção destas amostras foi a de grau analítico (Sigma Chemical Co.), uma vez que gomas de grau alimentício poderiam conter agentes antiemectantes, estabilizantes e ainda, tipos diferentes de açúcares, interferindo desta forma nos resultados dos ensaios relacionados à avaliação da biocompatibilidade do material, bem como na osmolalidade do meio de cultivo celular.

Foram então preparadas e testadas, nesta etapa, um total de 6 formulações distintas (1C, 1D, 1E, 2C, 2D e 2E), as quais encontram-se listadas na Tabela 3.3 (página 41).

#### **4.2.1. Aspecto e morfologia do material**

Os complexos polieletrólitos das formulações 1D e 1E, de proporção polimérica equivalente e que continham, respectivamente Tween 80 e Pluronic F68, mostraram-se como uma espuma opaca, densa e homogênea, com a presença de pequenas bolhas de ar uniformemente distribuídas pela mistura. As misturas não se prenderam à hélice do sistema de agitação, apresentando coloração esbranquiçada. Diferentemente, a formulação 1C (sem adição de tensoativo) mostrou-se translúcida, como uma mistura viscosa heterogênea, com a presença de bolhas de ar de tamanhos irregulares, prendendo-se à hélice do sistema de agitação. A secagem visando à evaporação do solvente ocorreu em 24 horas para a amostra 1C, semelhante ao período verificado para as membranas que passaram pela etapa de desaeração, no entanto as amostras que continham tensoativos, 1D e 1E, demoraram cerca de 48 horas para ficar completamente secas.

Durante as sucessivas lavagens para a remoção do ácido acético residual e dos tensoativos, estas amostras mantiveram-se firmes e de fácil manuseio, sendo que o período da

segunda secagem foi de cerca de 24 horas para as formulações 1D e 1E e de 18 horas para a amostra 1C. Após esta etapa as membranas obtidas sem adição de tensoativos (1C) mostraram-se translúcidas, firmes e flexíveis, com bolhas visíveis espalhadas por toda a sua extensão. As membranas contendo os tensoativos Tween 80 e Pluronic F68, 1D e 1E, respectivamente, apresentaram-se opacas e esponjosas, com aparente resistência e flexibilidade. O aspecto típico das membranas obtidas com esta proporção polimérica (X:Q de 1:1) é mostrado na Figura 4.5.

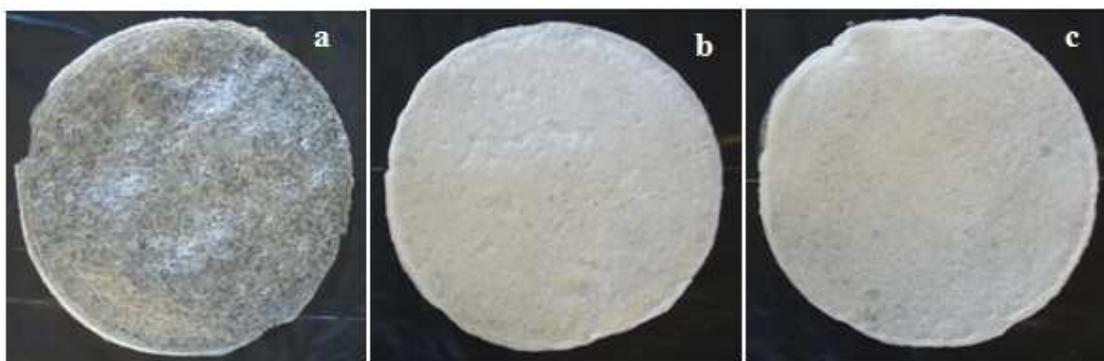


Figura 4.5 - Aspecto das membranas de proporção polimérica X:Q 1:1 sem tensoativos - 1C (a), X:Q 1:1 + Tween 80 - 1D (b) e X:Q 1:1 + Pluronic F68 - 1E (c) após a segunda secagem.

As formulações com maior concentração de xantana (2C, 2D e 2E) apresentaram comportamento semelhante ao observado nas amostras com igual proporção polimérica. A formulação 2C resultou em complexos heterogêneos e viscosos, com parcial retenção na hélice do sistema de agitação. As amostras 2D e 2E, contendo os tensoativos Tween 80 e Pluronic F68 respectivamente, mostraram-se como uma emulsão homogênea, com bolhas de ar pequenas e uniformemente distribuídas pela mistura, não ficando presas na hélice de agitação. Assim como relatado para as formulações com proporção X:Q igual a 1:1, a presença do tensoativo elevou o período de secagem para a evaporação do solvente, visto que as amostras 2D e 2E secaram em aproximadamente 48 horas, enquanto que a formulação 2C, sem adição de tensoativos, secou em 24 horas.

Durante as lavagens a membrana 2E mostrou ser muito frágil e escorregadia, indicando complexação incompleta entre os reagentes, notando-se sua dissolução parcial na água durante as lavagens. O tempo da segunda secagem foi, em média, 24 horas para membranas com adição de tensoativos e 18 horas para a que continha apenas os polissacarídeos xantana e quitosana. As membranas obtidas apresentaram-se firmes, flexíveis e aparentemente resistentes, como pode ser visualizado na Figura 4.6.

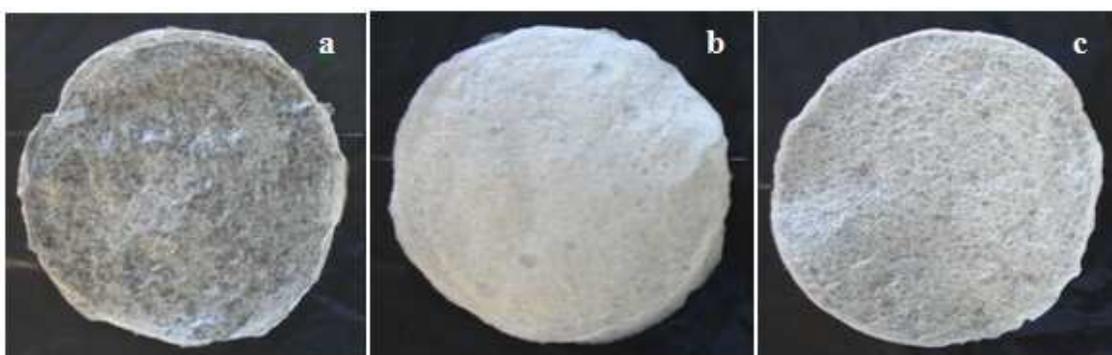


Figura 4.6 - Aspecto das membranas de proporção polimérica X:Q 1,2:0,8 sem tensoativos - 2C (a), X:Q 1,2:0,8 + Tween 80 - 2D (b) e X:Q 1,2:0,8 + Pluronic F68 - 2E (c) após a segunda secagem.

As morfologias típicas da superfície e da secção transversal das membranas produzidas sem desaeração foram analisadas por MEV e podem ser vistas nas Figuras 4.7 e 4.8.

Pode-se notar, por meio das micrografias, que as amostras 1C e 2C apresentam estrutura lamelar, com a presença de poucos e grandes poros na secção transversal. Observa-se também a presença de elevações uniformemente distribuídas ao longo de uma superfície não totalmente íntegra.

Nas amostras 1D, 1E, 2D e 2E, preparadas com adição de tensoativos, nota-se a formação de uma estrutura alveolar, com a presença de poros intercomunicantes distribuídos uniformemente, com diâmetros entre 90 e 300  $\mu\text{m}$ .

Não foram observadas diferenças relevantes no aspecto das membranas preparadas empregando diferentes proporções de xantana e quitosana ou mesmo variando-se o tipo de tensoativo utilizado para a formação dos poros.

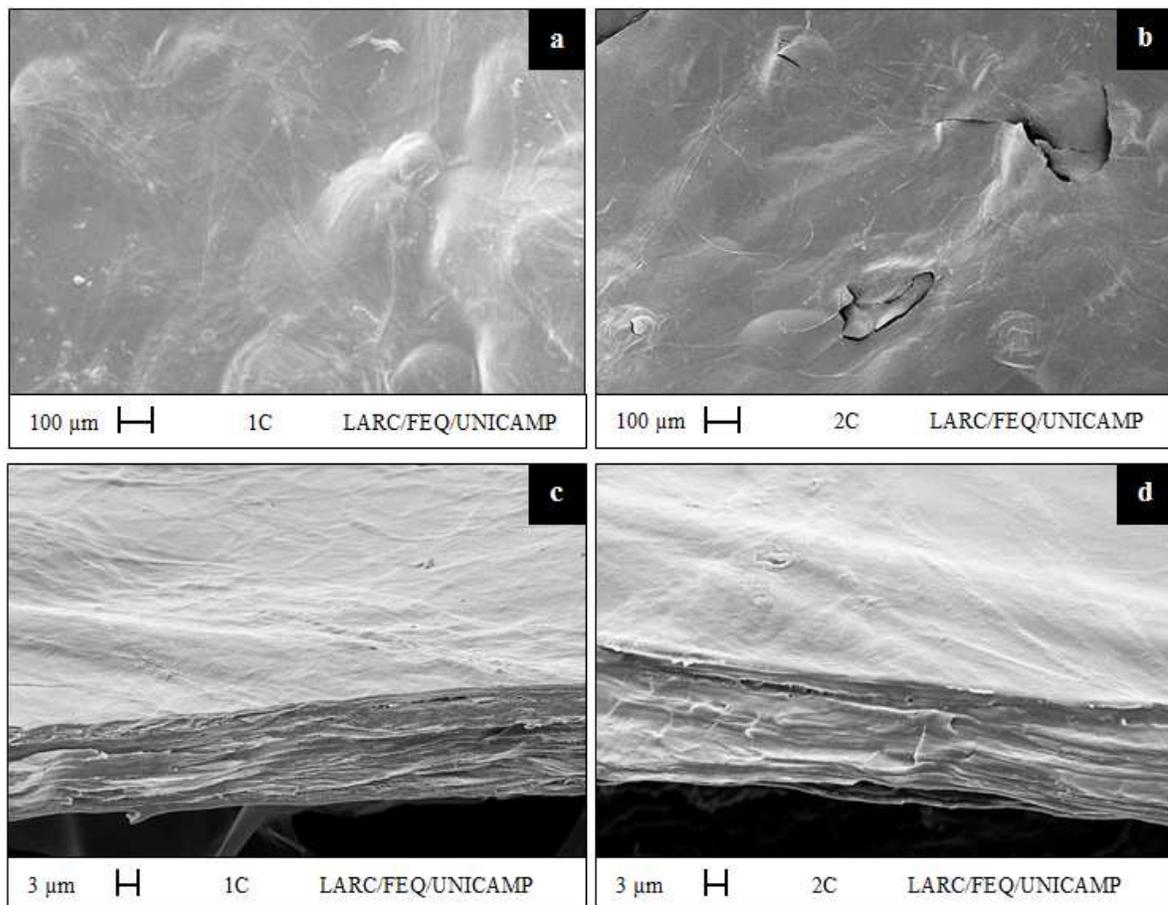


Figura 4.7 – Morfologia da superfície das membranas de proporção polimérica X:Q 1:1 sem tensoativo - 1C (a) e X:Q 1,2:0,8 sem tensoativo - 2C (b) e da secção transversal das membranas X:Q 1:1 sem tensoativo - 1C (c) e X:Q 1,2:0,8 sem tensoativo - 2C (d).

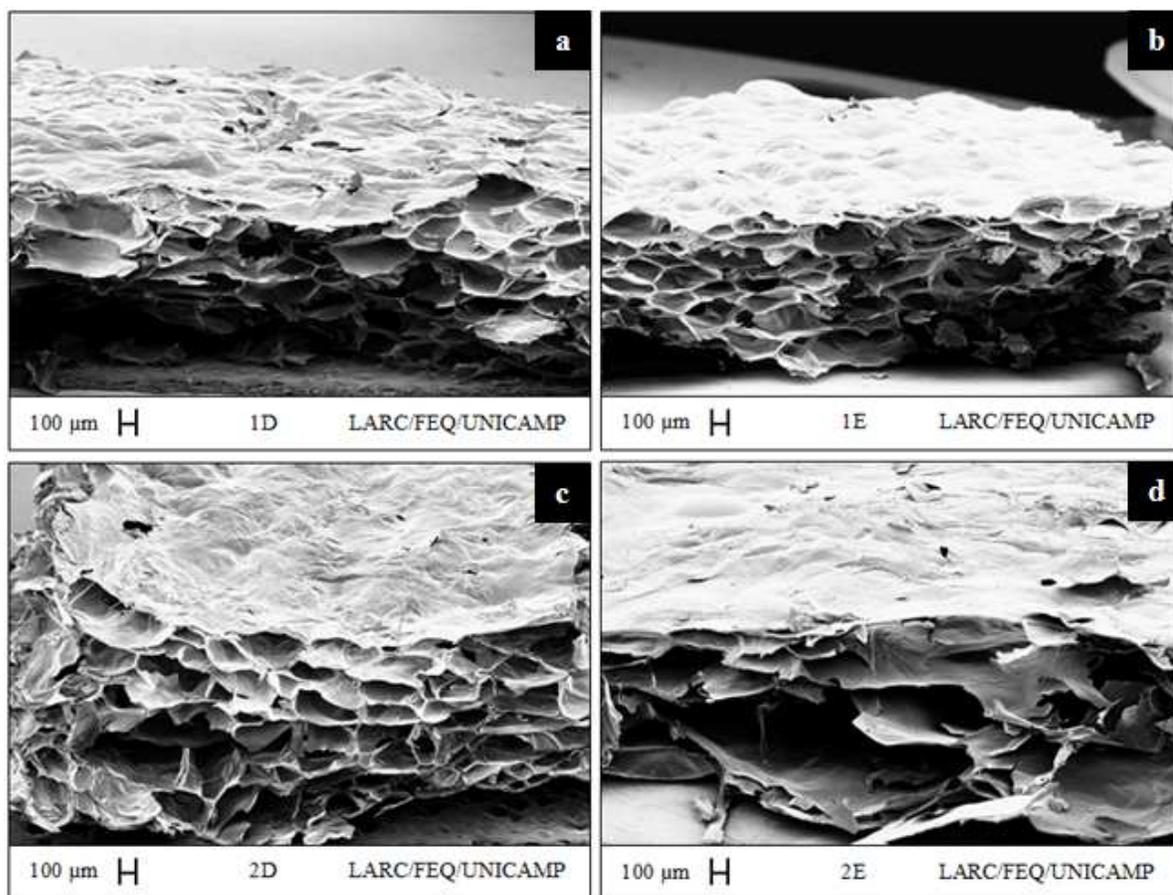


Figura 4.8 – Morfologia da superfície e da secção transversal das membranas de proporção polimérica X:Q 1:1 + Tween 80 – 1D (a), X:Q 1:1 + Pluronic F68 – 1E (b), X:Q 1,2:0,8 + Tween 80 – 2D (c) e X:Q 1,2:0,8 + Pluronic F68 – 2E (d).

#### 4.2.2. Efeito da composição na espessura das membranas

Os valores correspondentes à espessura média das membranas preparadas na presença de tensoativos e sem desaeração são apresentados na Tabela 4.5. As espessuras variaram de 0,31 a 3,08 mm, resultados muito superiores aos observados nas membranas que passaram pela etapa de desaeração. Estes resultados eram esperados, visto que a não desaeração da mistura possibilita a retenção das bolhas de ar, formadas durante a agitação, após a evaporação do solvente.

Tabela 4.5 - Valores da espessura das membranas de proporções poliméricas de X:Q de 1:1 e 1,2:0,8 preparadas sem desaeração, na presença e na ausência de tensoativos.

Formulação	Proporção X:Q (g/g)	Tensoativo	Espessura (mm)
1C	1:1	-	0,31 ± 0,03 <sup>a</sup>
1D	1:1	Tween 80	2,49 ± 0,24 <sup>b</sup>
1E	1:1	Pluronic F68	1,84 ± 0,23 <sup>c</sup>
2C	1,2:0,8	-	0,36 ± 0,02 <sup>a</sup>
2D	1,2:0,8	Tween 80	3,08 ± 0,37 <sup>d</sup>
2E	1,2:0,8	Pluronic F68	1,86 ± 0,15 <sup>c</sup>

Letras iguais indicam que as formulações não diferem estatisticamente entre si a 95% de confiança (Teste de Tukey).

As amostras que sofreram adição de tensoativos (formulações 1D, 1E, 2D e 2E) apresentaram maior espessura. Estes surfatantes são capazes de alterar as propriedades superficiais e interfaciais da mistura, reduzindo a tensão superficial da solução, e assim, promovendo a estabilização das bolhas distribuídas na estrutura.

A análise estatística não revelou diferença significativa na espessura das membranas preparadas sem a etapa de desaeração (1C e 2C), nem entre as amostras preparadas na presença de Pluronic F68 (1E e 2E). Membranas preparadas com adição do surfatante Tween 80 mostraram-se mais espessas, independente da proporção polimérica, verificando-se uma tendência de aumento da espessura com o aumento da proporção de xantana.

Os valores obtidos para amostras produzidas na presença dos surfatantes são superiores aos reportados por Bueno e Moraes (2011) para membranas de quitosana/alginato produzidas com os mesmos tensoativos (entre 0,38 e 0,41 mm quando secas), mas comparáveis aos de outros materiais esponjosos descritos na literatura com aplicação em engenharia de tecidos, como *scaffolds* de colágeno com espessura de 1 mm (George *et al.*, 2008), membranas porosas de quitosana-alginato obtidas por liofilização, com espessura média de 2,5 mm (Kucharska *et al.*, 2008) e de quitosana-poli(lactato) com espessura de 4 mm (Wan *et al.*, 2007).

### 4.2.3. Capacidade de absorção de soluções aquosas

Os valores correspondentes à capacidade de absorção de água, SS e FCS das membranas produzidas com tensoativos e sem desaeração encontram-se listados na Tabela 4.6. Todas as membranas apresentaram capacidades elevadas de absorção de água, variando de 29,45 a 72,87 g de H<sub>2</sub>O por grama de membrana seca. Estes valores são inferiores aos observados para as membranas sem tensoativos e desaeradas, que apresentaram capacidades de absorção de água, variando de 36,17 a 91,96 g de H<sub>2</sub>O por grama de membrana seca, porém ainda superiores aos verificados por Veiga e Moraes (2011), que variaram de 24,22 a 61,23 g de H<sub>2</sub>O por grama de membrana seca de quitosana e xantana para amostras preparadas com a mesma vazão de adição de xantana e com soluções de concentrações inferiores a 1% e aos encontrados por Rodrigues e colaboradores (2008), que variaram de 11,1 a 19,2 g H<sub>2</sub>O por grama de membrana seca para amostras de quitosana-alginato preparadas na razão mássica 1:1.

Tabela 4.6 – Valores para capacidade média de absorção ( $C_i$ ) de água e soluções salinas (SS e FCS), após 24 horas, das membranas de proporções poliméricas de X:Q de 1:1 e 1,2:0,8 preparadas sem desaeração, na presença e na ausência de tensoativos.

Formulação	Tensoativo	$C_{\text{água}}$ (g/g)	$C_{\text{SS}}$ (g/g)	$C_{\text{FCS}}$ (g/g)
1C	-	72,87 ± 3,58 <sup>a,A</sup>	23,70 ± 0,43 <sup>d,B</sup>	17,28 ± 1,15 <sup>f,C</sup>
1D	Tween 80	34,06 ± 1,69 <sup>b,D</sup>	15,76 ± 0,94 <sup>e,E</sup>	14,53 ± 0,84 <sup>g,E</sup>
1E	Pluronic F68	29,84 ± 1,80 <sup>b,F</sup>	17,14 ± 1,15 <sup>e,G</sup>	17,99 ± 0,32 <sup>f,G</sup>
2C	-	52,67 ± 1,86 <sup>c,H</sup>	23,16 ± 1,26 <sup>d,I</sup>	20,50 ± 0,14 <sup>h,I</sup>
2D	Tween 80	30,40 ± 1,32 <sup>b,J</sup>	14,59 ± 0,74 <sup>e,K</sup>	14,00 ± 0,79 <sup>g,K</sup>
2E	Pluronic F68	29,45 ± 1,21 <sup>b,L</sup>	16,58 ± 1,18 <sup>e,M</sup>	15,37 ± 0,22 <sup>g,M</sup>

Resultados com letras iguais indicam que as formulações não diferem estatisticamente entre si a 95% de confiança quando usada a mesma solução aquosa. Letras maiúsculas correspondem à avaliação por formulação (coluna) e letras minúsculas por solução aquosa (linha) (Teste de Tukey).

A presença dos tensoativos durante a preparação das membranas interferiu diretamente na absorção de água e solução salina. Amostras preparadas apenas com os polissacarídeos

absorveram mais água e SS do que as obtidas pela adição de tensoativos, não havendo diferença estatística significativa entre os valores verificados para as membranas preparadas com os distintos tensoativos.

As amostras sem tensoativos (formulações 1C e 2C) apresentaram capacidade de absorção de SS e FCS variando entre 17,28 e 23,70 g de solução por grama de membrana seca, valores estes que se assemelham com a capacidade de absorção destas soluções pelas membranas preparadas com os mesmos polímeros incluindo-se o processo de desaeração (entre 11,86 e 24,55 g de solução por grama de membrana seca).

O teste de Tukey revelou que as absorções de SS e FCS pelas membranas de mesma formulação não diferem significativamente, com exceção da amostra 1C que absorveu mais SS do que FCS (23,70 g de SS por grama de membrana seca e 17,28 g de FCS por grama de membrana seca, respectivamente).

#### **4.2.4. Variação de massa durante exposição a soluções aquosas**

Os resultados obtidos para a variação de massa das membranas preparadas na presença ou ausência dos tensoativos sem a desaeração da mistura e expostas a diferentes soluções aquosas salinas e água por 24 horas estão listados na Tabela 4.7.

Todas as amostras perderam massa. As membranas livres de tensoativos na preparação e que não foram desaeradas (1C e 2C) apresentaram perda de massa variando entre 4,68 e 10,48%, similarmente ao observado nas membranas de proporções poliméricas equivalentes preparadas incluindo-se a etapa de desaeração, que variaram de 5,34 a 12,71%. Estes valores também corroboram com os observados por Veiga e Moraes (2011) para membranas de xantana e quitosana complexadas desaeradas, que foram de 13% em água, 8% em SS e 10% em FCS, indicando que a inclusão ou não da etapa de desaeração não interfere diretamente na perda de massa.

Tabela 4.7 - Valores obtidos para a variação de massa das membranas de proporções poliméricas de X:Q de 1:1 e 1,2:0,8 preparadas sem desaeração, na presença e na ausência de tensoativos, durante a exposição a soluções aquosas dos suportes poliméricos por 24 h a 37°C.

Formulação	Tensoativo	V <sub>m</sub> H <sub>2</sub> O (%)	V <sub>m</sub> SS (%)	V <sub>m</sub> FCS (%)
1C	-	-13,76 ± 0,63 <sup>a,b,A</sup>	-8,79 ± 2,36 <sup>d,f,A</sup>	-10,48 ± 0,61 <sup>h,A</sup>
1D	Tween 80	-20,38 ± 2,47 <sup>b,c,B</sup>	-19,58 ± 1,73 <sup>e,B</sup>	-16,78 ± 1,63 <sup>h,B</sup>
1E	Pluronic F68	-16,86 ± 0,35 <sup>a,b,C</sup>	-24,88 ± 1,59 <sup>e,C</sup>	-34,70 ± 7,51 <sup>i,C</sup>
2C	-	-11,49 ± 1,34 <sup>a,D</sup>	-6,02 ± 1,08 <sup>f,E</sup>	-4,68 ± 0,85 <sup>h,E</sup>
2D	Tween 80	-10,72 ± 2,92 <sup>a,F</sup>	-13,22 ± 2,10 <sup>d,e,F</sup>	-12,95 ± 1,86 <sup>h,F</sup>
2E	Pluronic F68	-25,24 ± 0,15 <sup>c,G</sup>	-33,89 ± 0,51 <sup>g,H</sup>	-51,44 ± 2,91 <sup>j,I</sup>

Resultados com letras iguais indicam que as formulações não diferem estatisticamente entre si a 95% de confiança quando usada a mesma solução aquosa. Letras maiúsculas correspondem à avaliação por formulação (coluna) e letras minúsculas por solução aquosa (linha) (Teste de Tukey).

No entanto, as membranas às quais foram adicionados tensoativos apresentaram apreciável perda de massa, em especial as produzidas na presença de Pluronic F68, que tiveram perda de até 51,4% (amostra 2E). Estes resultados sugerem que os tensoativos não foram totalmente retirados durante as sucessivas lavagens das membranas ou que impediram a total complexação dos polissacarídeos. Rodrigues e colaboradores (2008) obtiveram perda mássica máxima de 20%, em água, para membranas sem adição de tensoativos compostas por quitosana e alginato.

#### 4.2.5. Absorção e perda de massa após exposição ao meio RPMI-1640 suplementado

Os valores obtidos para a capacidade máxima de absorção de meio RPMI-1640 suplementado e de variação de massa das amostras obtidas com tensoativos e livres da etapa de desaeração encontram-se listados na Tabela 4.8.

As amostras 1C e 2C, que contêm apenas os polímeros xantana e quitosana em sua composição, apresentaram capacidade de absorção de meio RPMI-1640 suplementado de 5,51 e 9,32 g de meio por grama de membrana seca, respectivamente. Estes valores são muito próximos

dos observados para as membranas de mesma proporção polimérica produzidas incluindo a etapa de desaeração (entre 5,15 e 8,86 g de meio por grama de membrana seca). O mesmo se observa para os valores de variação de massa; membranas desaeradas apresentaram perda de massa entre 17,13 e 23,25%, enquanto que as amostras sem desaeração variaram sua massa entre 16,04 e 18,47%. Estes resultados indicam que a desaeração ou não do complexo antes da secagem dos solventes para a obtenção da membrana não interfere na estabilidade do material, nem mesmo na absorção de soluções com elevada concentração de sais e de outros compostos como proteínas, aminoácidos, açúcares, dentre outros.

Tabela 4.8 - Valores obtidos para a capacidade média de absorção ( $C_i$ ) e variação de massa ( $V_m$ ) das membranas de proporções poliméricas de X:Q de 1:1 e 1,2:0,8 preparadas sem desaeração, na presença e na ausência de tensoativos, durante a exposição ao meio RPMI-1640 suplementado por 144 h a 37°C.

Formulação	Tensoativo	$C_{RPMI} (g/g)$	$V_m RPMI (%)$
1C	-	$5,51 \pm 0,39^a$	$-16,04 \pm 0,96^d$
1D	Tween 80	$7,15 \pm 0,37^b$	$-24,42 \pm 0,39^e$
1E	Pluronic F68	$8,58 \pm 0,44^a$	$-33,18 \pm 1,30^f$
2C	-	$9,32 \pm 0,40^c$	$-18,47 \pm 1,26^d$
2D	Tween 80	$9,32 \pm 0,62^b$	$-19,65 \pm 1,46^d$
2E	Pluronic F68	$12,37 \pm 1,22^b$	$-34,57 \pm 0,58^f$

Letras iguais indicam que as formulações não diferem estatisticamente entre si a 95% de confiança (Teste de Tukey).

Assim como observado para SS e FCS, membranas preparadas com a adição de tensoativos apresentaram maior perda de massa quando expostas a meio RPMI-1640 suplementado, em especial as formulações 1E e 2E, que continham Pluronic F68 (33,18 e 34,57% respectivamente). Estes resultados sugerem, mais uma vez, que parte dos surfatantes adicionados permaneceria ainda retida na membrana mesmo após as sucessivas lavagens e que estes estariam sendo liberados quando em contato com o meio de cultura, provocando perda de massa da

amostra. Adicionalmente, perturbações na complexação dos polissacarídeos podem ter também contribuído para a redução de sua estabilidade.

### **4.3. Avaliação das propriedades mecânicas e expansão volumétrica**

Diante dos resultados obtidos e relatados nos itens 4.1 e 4.2, foram selecionadas as formulações 1A e 2A, preparadas sem adição de tensoativos e incluindo-se a etapa de desaeração a vácuo e as formulações 1D, 1E, 2D e 2E, preparadas na presença de tensoativos e sem a etapa de desaeração, para serem avaliadas quanto à resistência à ruptura e também quanto à expansão tridimensional frente a água e meio de cultivo celular.

#### **4.3.1. Propriedades mecânicas**

Adequadas propriedades mecânicas como módulo de elasticidade e resistência à tração, compatíveis com as do tecido lesado, são requisitos importantes e esperados para materiais destinados à regeneração tecidual. Os resultados obtidos para as propriedades mecânicas das membranas são mostrados na Tabela 4.9. Os valores variaram de 0,41 e 25,12 MPa para a tensão na ruptura e os dados para a porcentagem de alongamento obtidos foram de 1,05 a 2,13%.

Amostras preparadas na ausência de surfatantes e incluindo a etapa de desaeração a vácuo (1A e 2A ) apresentaram maior resistência à ruptura, observando-se que o aumento da proporção de xantana em relação à de quitosana de 1:1 para 1,2:0,8 reduz tal propriedade (25,12 MPa e 8,73MPa, respectivamente). Esses valores são comparáveis aos reportados na literatura para membranas lamelares de quitosa/alginate destinadas à aplicação como curativos dérmicos, que apresentaram tensão na ruptura entre 6,86 e 31,14 MPa (Rodrigues *et al.*, 2008) e superiores aos descritos para membranas de quitosana/quitina e quitosana somente, que variam entre 3,03 e 6,53 MPa (Dallan *et al.*, 2007). No entanto, estas amostras apresentaram baixos índices de alongamento, 2,02% para membrana de igual proporção polimérica (1A) e 1,05% para amostras desaeradas de proporção X:Q igual 1,2:0,8 (2A).

Os valores de tensão e alongamento na ruptura das membranas preparadas com os tensoativos Tween 80 e Pluronic F68 não diferiram significativamente entre si. No entanto, a adição de qualquer um destes na formulação das membranas acarretou grande queda na resistência à ruptura. As amostras porosas apresentaram tensão na ruptura entre 0,41 e 1,25 MPa, o que já era esperado em decorrência da introdução das bolhas na estrutura do material. Bueno e Moraes (2011) também observaram baixa resistência mecânica em membranas de quitosana/alginato preparadas com a adição destes mesmos surfatantes. Os autores relataram que amostras com a presença de Tween 80 apresentaram resistência à ruptura de 1,54 MPa enquanto que as produzidas na presença do tensoativo Pluronic F68 sofreram ruptura na tensão de 0,98 MPa.

Tabela 4.9 – Propriedades mecânicas das membranas de proporções poliméricas de X:Q de 1:1 e 1,2:0,8 preparadas sem desaeração, na presença e na ausência de tensoativos.

Formulação	Tensoativo	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
1A	-	25,12 ± 7,8 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,72 <sup>d</sup>
1D	Tween 80	0,53 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,10 ± 0,40 <sup>d</sup>
1E	Pluronic F68	1,25 ± 0,17 <sup>b</sup>	2,13 ± 0,63 <sup>d</sup>
2A	-	8,73 ± 3,01 <sup>c</sup>	1,05 ± 0,31 <sup>e</sup>
2D	Tween 80	0,41 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,82 ± 0,28 <sup>d</sup>
2E	Pluronic F68	1,22 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,71 ± 0,12 <sup>d,e</sup>

Letras iguais indicam que as formulações não diferem estatisticamente entre si a 95% de confiança (Teste de Tukey).

### 4.3.2 Expansão volumétrica

A avaliação da expansão tridimensional de um material, destinado ao uso como *scaffold*, frente a um determinado meio de hidratação é de extrema importância uma vez que este dado indicaria a disponibilidade de espaço para entrada e acomodação das células, bem como a garantia do transporte de diferentes compostos dentro da matriz, tanto para o fornecimento de nutrientes quanto para a remoção de metabólitos.

A fim de verificar o comportamento dos suportes em meio de cultivo celular, foram avaliadas as expansões tridimensionais das membranas quando imersas por 24 horas em meio de cultivo RPMI-1640 suplementado. Foi avaliada a quantidade total de meio que penetra no material, mas computando-se de forma isolada a massa de meio de preenchimento (correspondente ao meio retido nas lamelas e poros) e a massa de meio firmemente ligada à matriz (considerada como meio de hidratação). Foram selecionadas as amostras de proporções poliméricas X:Q iguais a 1:1 e 1,2:0,8 com e sem adição do surfatante Pluronic F68 (formulações 1A, 1D, 1E, 2A, 2D e 2E). Na Tabela 4.10 são apresentados os valores de expansão tridimensional em meio RPMI-1640 suplementado, bem como as quantidades determinadas como meio de preenchimento e de hidratação.

Tabela 4.10 - Valores de meio de hidratação, meio de preenchimento e expansão tridimensional das membranas poliméricas

Formulação	Tensoativo	Meio de hidratação (g meio/g membrana)	Meio de Preenchimento (g meio/g membrana)	Expansão tridimensional (%)
1A	-	2,67 ± 0,34 <sup>a</sup>	2,10 ± 0,22 <sup>d</sup>	77,15 ± 8,44 <sup>f</sup>
1D	Tween 80	6,25 ± 0,14 <sup>b</sup>	2,69 ± 0,26 <sup>d,e</sup>	77,17 ± 0,86 <sup>f</sup>
1E	Pluronic F68	9,97 ± 1,01 <sup>c</sup>	3,45 ± 0,47 <sup>e</sup>	98,53 ± 13,56 <sup>g</sup>
2A	-	3,28 ± 0,37 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,37 <sup>d</sup>	96,53 ± 1,25 <sup>g</sup>
2D	Tween 80	8,49 ± 0,10 <sup>c</sup>	2,94 ± 0,67 <sup>d,e</sup>	65,26 ± 0,06 <sup>f</sup>
2E	Pluronic F68	10,11 ± 1,16 <sup>c</sup>	3,48 ± 0,71 <sup>e</sup>	136,08 ± 3,49 <sup>h</sup>

Letras iguais indicam que as formulações não diferem estatisticamente entre si a 95% de confiança (Teste de Tukey).

Todas as amostras analisadas apresentaram elevada expansão tridimensional, variando entre 77,15 e 136,08%. O meio de hidratação variou entre 2,67 e 10,11 g de meio por grama de membrana seca e o meio de preenchimento das amostras ficou entre 2,10 e 3,45 g de meio por grama de membrana seca.

As amostras 1A e 2A, preparadas sem adição de tensoativo, apresentaram valores de meio de preenchimento correspondentes a 78 e 70% do total de meio absorvido pela amostra, respectivamente, mais uma vez comprovando o elevado volume de vazios internos deste material.

A adição do tensoativo Pluronic F68 favoreceu a absorção de meio de cultivo, 9,97 e 10,11g de meio/g de membrana seca, bem como a expansão tridimensional, 98,57 e 136,08% para as amostras 1E e 2E, respectivamente. No entanto, estas amostras apresentaram baixos valores de meio de preenchimento, correspondentes a 34% do valor total de meio absorvido pelas amostras.

Os valores de expansão tridimensional das amostras preparadas na presença do surfactante Tween 80 variaram entre 65,26 e 77,17%, valores estes inferiores aos apresentados pelas amostras com adição de Pluronic F68, porém, não diferindo estatisticamente da amostra 1A. O valores de meio de preenchimento destas membranas correspondem a 43 e 34,6% do total de meio absorvido pelas amostras 1D e 2D, respectivamente.

#### ***4.4. Caracterização da membrana preparada utilizando xantana produzida em escala piloto***

Neste item serão apresentados o aspecto e a morfologia, bem como os valores dos resultados dos ensaios de caracterização físico-química de membranas preparadas com xantana produzida em escala piloto utilizando tecnologia desenvolvida pelo Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto e sua equipe, do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências e Letras da UNESP, campus de Assis, SP, denominada X<sub>piloto</sub>. A formulação escolhida para estes testes foi a de proporção polimérica X:Q igual a 1:1, incluindo-se a etapa de desaeração, sem adição de tensoativos, uma vez que os dados de caracterização desta formulação utilizando outros tipos de xantana apontaram propriedades favoráveis ao uso na engenharia de tecidos, como transparência e espessura adequadas, elevada expansão tridimensional e absorção de água e soluções salinas, além de resistência à tração compatível com a da pele.

#### 4.4.1. Aspecto e morfologia

Durante o preparo das membranas de proporção polimérica X:Q de 1:1, preparadas utilizando-se  $X_{\text{piloto}}$ , desaeradas e sem tensoativos (1F), observou-se a formação de um complexo polieletrólito (PEC) homogêneo, translúcido e de alta viscosidade, muito similar ao observado para as amostras de mesma proporção polimérica preparadas com xantana comercial. Semelhantemente, a agitação ocasionou grande quantidade de bolhas de ar, as quais foram removidas através da etapa de desaeração.

A primeira secagem do PEC, visando a evaporação do solvente e a formação da membrana, ocorreu em 24 horas, em conformidade com o verificado para as membranas sem tensoativos. Durante as lavagens as amostras tiveram um elevado aumento de tamanho, em especial no diâmetro, no entanto, mostraram-se firmes ao manuseio. Após a segunda secagem, que ocorreu em 18 horas, observou-se a formação de membranas finas, flexíveis e transparentes, com a superfície ondulada, muito semelhante às amostras sem tensoativos. Na Figura 4.9 é apresentado o aspecto típico das membranas obtidas nestas condições.



Figura 4.9 – Aspecto da membrana com proporção polimérica de X:Q de 1:1 preparada com xantana produzida em escala piloto, desaerada e sem adição de tensoativos.

A morfologia da superfície e da secção transversal da membrana 1F foi analisada por MEV e pode ser vista na Figura 4.10. Pode-se notar que a membrana apresenta superfície íntegra, sem poros superficiais aparentes. Por toda a membrana observa-se a presença de estruturas fibrilares distribuídas homogeneamente. O corte transversal revela uma estrutura lamelar semelhante à das amostras preparadas com xantana comercial sem adição de tensoativos.

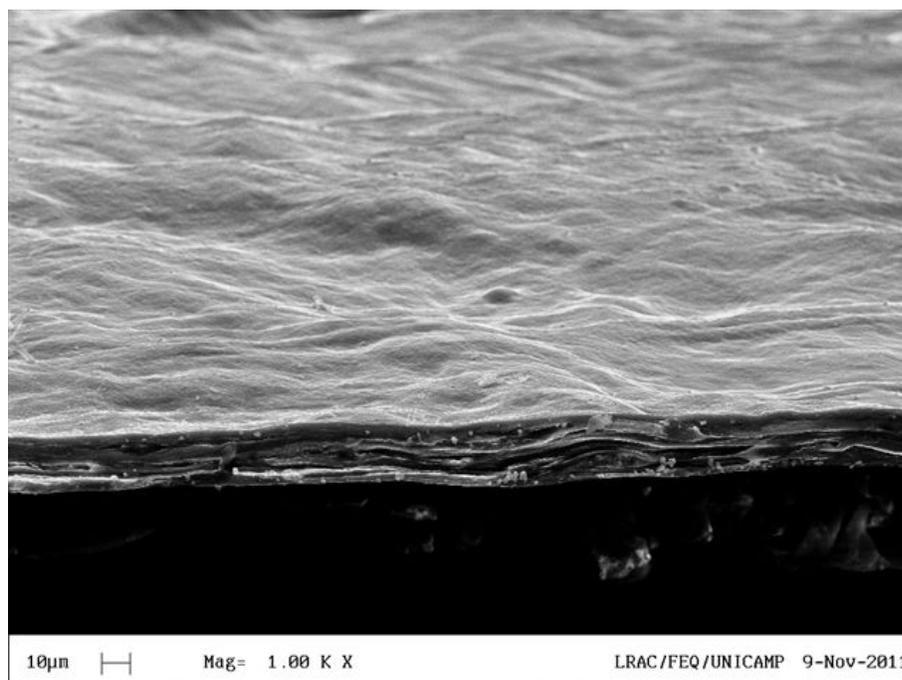


Figura 4.10 – Morfologia da superfície e da secção transversal da membrana de proporção polimérica X:Q igual a 1:1 preparada com xantana produzida em escala piloto, com desaeração e sem presença de tensoativos.

#### 4.4.2 Caracterização físico-química

Os valores listados na Tabela 4.11 correspondem à espessura, capacidade de absorção e variação de massa em soluções aquosas, resistência mecânica e expansão volumétrica da formulação 1F, preparada na ausência de tensoativos, com desaeração, na proporção polimérica X:Q de 1:1 empregando a  $X_{\text{piloto}}$ .

Tabela 4.11 - Valores de espessura, capacidade de absorção, variação de massa, resistência mecânica, massa retida de meio de hidratação e de meio de preenchimento e porosidade da membrana de proporção polimérica X:Q de 1:1 preparada com xantana produzida em escala piloto, com desaeração e sem presença de tensoativos (formulação 1F).

Propriedade		Valor médio
Espessura ( $\mu\text{m}$ )		$104,28 \pm 15,11$
Capacidade de absorção (g/g)	H <sub>2</sub> O (24 h)	$58,49 \pm 4,03$
	SS (24 h)	$3,94 \pm 0,26$
	FCS (24 h)	$13,02 \pm 0,95$
	RPMI (144 h)	$6,93 \pm 0,43$
Variação de massa (%)	H <sub>2</sub> O (24 h)	$-25,52 \pm 1,85$
	SS (24 h)	$-15,74 \pm 0,92$
	FCS (24 h)	$-17,73 \pm 1,29$
	RPMI (144 h)	$-25,51 \pm 3,43$
Resistência mecânica	Tensão de ruptura (MPa)	$12,67 \pm 1,98$
	Alongamento na ruptura (%)	$2,1 \pm 0,26$
Meio de hidratação (g/g)		$3,51 \pm 0,18$
Meio de preenchimento (g/g)		$2,61 \pm 0,57$
Expansão tridimensional (%)		$96,46 \pm 5,25$

A formulação 1F apresentou espessura de 104,28  $\mu\text{m}$ , semelhante às espessuras mostradas para as membranas preparadas seguindo o mesmo procedimento e utilizando xantana comercial, que variaram entre 102,90 e 131,42  $\mu\text{m}$ .

A capacidade de absorção de água foi de 58,49 g H<sub>2</sub>O por grama de membrana. Membranas preparadas na mesma proporção polimérica, na ausência de tensoativos, desaeradas e com xantana de grau analítico e alimentício, 1A e 1B, respectivamente, apresentaram capacidades de absorção de água superiores (85,57 e 91,96 g H<sub>2</sub>O por grama de membrana, respectivamente). Porém, os valores encontrados são maiores que os descritos na literatura para membranas de quitosana-alginato, que variam entre 11 e 19 g/g em H<sub>2</sub>O (Rodrigues *et al.*, 2008).

A capacidade de absorção de SS da amostra 1F também foi inferior à observada para as amostras 1A e 1B. Enquanto a amostra 1F absorveu 3,94 g de SS por grama de membrana, as amostras 1A e 1B absorveram 24,55 e 17,62 g de SS por grama de membrana, respectivamente. No entanto, os valores de capacidade de absorção de FCS e RPMI mostraram-se semelhantes. A amostra 1F absorveu cerca de 13,03 e 6,93 g/g de FCS e RPMI, respectivamente enquanto que as amostras 1A e 1B absorveram 15,78 e 8,89 g/g de FCS, e 6,31 e 5,16 g/g de RPMI-1640 suplementado, respectivamente. Este resultado favorece o uso desta membrana como curativos dérmicos bioativos, que devem apresentar a importante característica de absorção de fluidos corpóreos.

Os valores de variação de massa frente às soluções aquosas da amostra 1F mostraram-se compatíveis com os reportados para as membranas preparadas nas mesmas condições utilizando xantana comercial. A amostra 1F, preparada com xantana produzida em escala piloto, apresentou perda de massa de 25,51% quando exposta ao meio de cultura RPMI-1640 suplementado, enquanto que amostras preparadas com xantana de grau analítico e alimentício apresentaram variação de massa máxima frente ao mesmo solvente de 25,63%.

Os resultados obtidos para as propriedades mecânicas da membrana de formulação 1F foram de 12,67 MPa para a tensão na ruptura e de 2,1% para a porcentagem de alongamento. Membranas preparadas nas mesmas condições com xantana de grau analítico (1A) apresentaram maior resistência à ruptura (25,12 MP), porém o valor observado para a amostra 1F ainda é superior aos descritos para membranas de quitosana/quitina e quitosana somente, que variam entre 3,03 e 6,53 MPa (Dallan *et al.*, 2007). O valor para o alongamento na ruptura da amostra analisada corrobora com o verificado para as amostras preparadas com xantana comercial, que variaram entre 1,05 e 2,13%.

A amostra 1F apresentou elevada expansão tridimensional (96,46%) e meio de preenchimento correspondente a 74,3% do total de meio absorvido pela amostra, comprovando, assim como as amostras preparadas com xantana de grau analítico, o elevado volume de vazio interno deste material.

#### ***4.5. Comportamento das células L929 em cultivo***

Uma vez que para os testes de citotoxicidade foram selecionadas as células da linhagem L929, a análise do comportamento destas células em meio de cultura RPMI-1640 suplementado se fez necessária, a fim de padronizar as condições de cultivo. Estas células crescem de forma aderida, apresentando morfologia fusiforme, como pode ser visualizado na Figura 4.11.

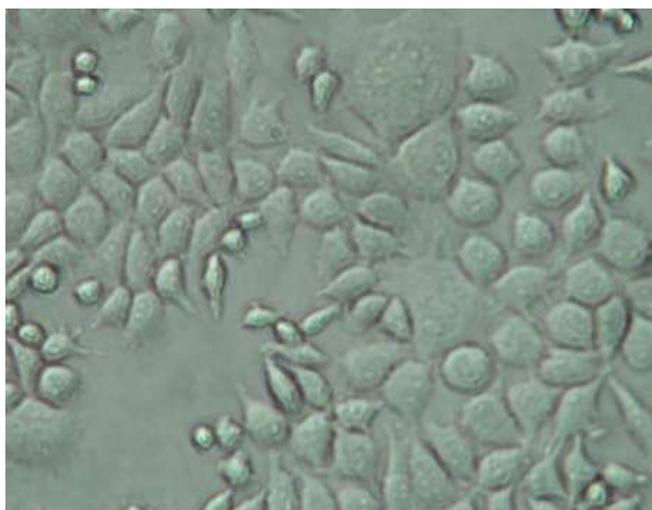


Figura 4.11 – Morfologia típica das células L929 cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado por 48 horas.

A curva de crescimento de células inoculadas a uma concentração inicial de  $0,5 \times 10^5$  células/mL por poço de 35 mm de diâmetro de placas de poliestireno contendo 2 mL de meio RPMI-1640 suplementado foi analisada, e os dados obtidos estão apresentados na Figura 4.12.

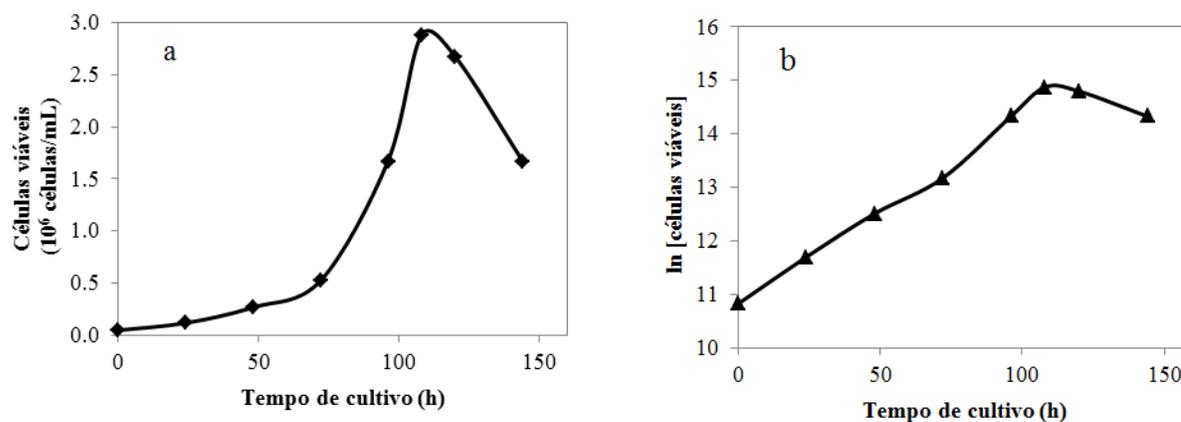


Figura 4.12 – Curva de crescimento das células L929 cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado (a); curva de crescimento linearizada (b).

Observou-se que a cultura inicia sua fase de crescimento exponencial logo nas primeiras 24 horas de inoculação, sem fase visível de adaptação, mantendo-se na mesma até 108 horas de cultivo, quando ocorre uma acentuada queda no número de células viáveis em decorrência da falta de espaço (inibição por contato).

Estabelecendo como fase log o período entre 24 e 108 horas de cultivo calculou-se a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), de  $0,0376 \text{ h}^{-1}$ , e o tempo de duplicação celular, de, aproximadamente, 18 horas.

#### 4.6. Avaliação da toxicidade das membranas de xantana e quitosana a células L929

Além da caracterização físico-química de um curativo ou *scaffold* se faz necessária a avaliação de sua atividade citotóxica, uma vez que este material estará em contato direto inicialmente com as células neles inoculadas e, posteriormente, com o próprio organismo no qual será implantado. Embora os resultados dos testes que avaliam a citotoxicidade *in vitro* possam não ter uma relação direta com os *in vivo*, é seguro afirmar que, se um material induz,

comprovadamente, uma reação citotóxica em testes envolvendo culturas de células, é muito provável que resulte em toxicidade quando aplicado em tecido vivo (Osorio *et al.*, 1998).

Inicialmente foram realizados testes de citotoxicidade indiretos (análise dos eluatos com cristal violeta e MTT), posteriormente foram feitos testes de citotoxicidade direta pelo contato do biomaterial com uma monocamada celular e, finalmente, testes de adesão e proliferação celular sobre as amostras.

Os ensaios de citotoxicidade direta e indireta foram feitos de forma comparativa pela avaliação concomitante dos efeitos do látex (como controle positivo) e do poliestireno de alta densidade das placas de cultivo (como controle negativo).

#### **4.6.1. Ensaio de citotoxicidade indireta com cristal violeta**

Um dos primeiros requisitos esperado para um material cujo destino é ser usado como suporte de adesão e crescimento celular, é que ele não libere, no meio de cultura, compostos capazes de provocar a lise das células. Neste contexto faz-se necessária a realização da análise da citotoxicidade dos eluatos, visando à verificação da liberação ou não, no meio de cultura, de agentes tóxicos por parte das amostras.

Para este ensaio foram escolhidas as formulações de proporção polimérica X:Q iguais a 1:1 e 1,2:0,8 preparadas com xantana de grau analítico, na presença ou ausência de tensoativos, incluindo ou não a etapa de desaeração (1A, 1C, 1D, 1E, 2A, 2C, 2D e 2E). O aspecto típico das culturas das células L929 expostas por 24 horas aos eluatos das amostras, bem como os controles negativos e positivos, pode ser visualizado nas Figuras 4.13 a 4.15. Os resultados foram avaliados de acordo com os índices de lise (IL) definidos conforme a Tabela 4.4 citada anteriormente.

Observou-se que as células expostas ao extrato do controle negativo para citotoxicidade formaram uma monocamada íntegra e homogênea com células de aspecto fibroblastóide, apresentando citoplasma com coloração roxa e núcleos de tonalidade mais escura, verificando-se ausência de lise celular aparente (IL=0) ou nenhuma citotoxicidade. Nos ensaios realizados com os extratos obtidos por meio da exposição ao látex (controle positivo) notou-se significativa lise celular, superior a 80% (IL=4), caracterizando citotoxicidade severa.

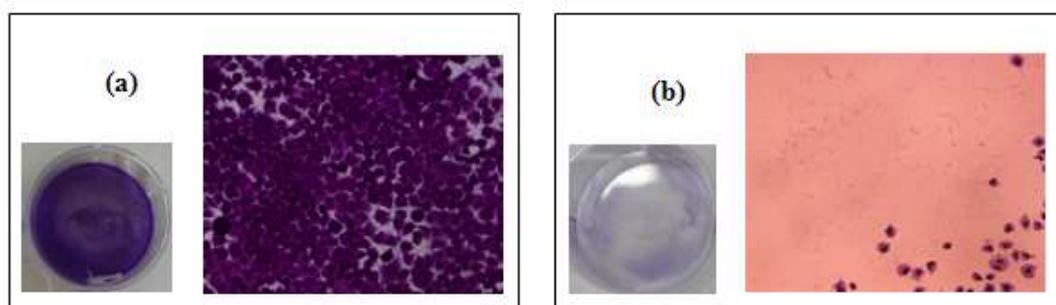


Figura 4.13 – Aspecto das células L929 expostas a eluatos de placas de cultivo como controle negativo (a) e de látex como controle positivo de citotoxicidade (b).

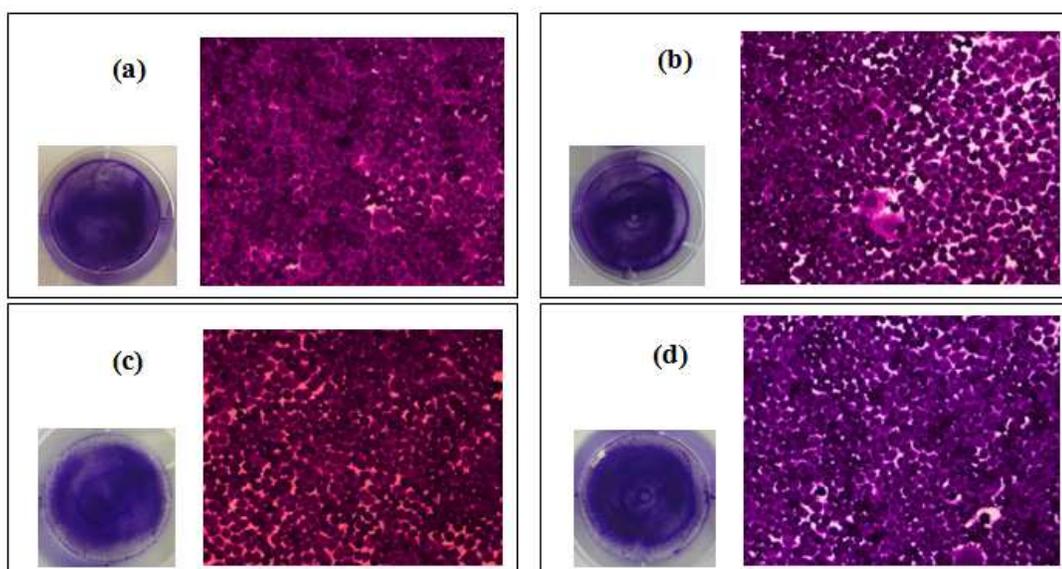


Figura 4.14 – Aspecto das células L929 expostas por 24 h aos eluatos das amostras de proporção polimérica X:Q igual a 1:1 desaerada - 1A (a), X:Q de 1,2:0,8 desaerada - 2A (b), X:Q de 1:1 não desaerada - 1C (c), X:Q de 1,2:0,8 não desaerada - 2C (d).

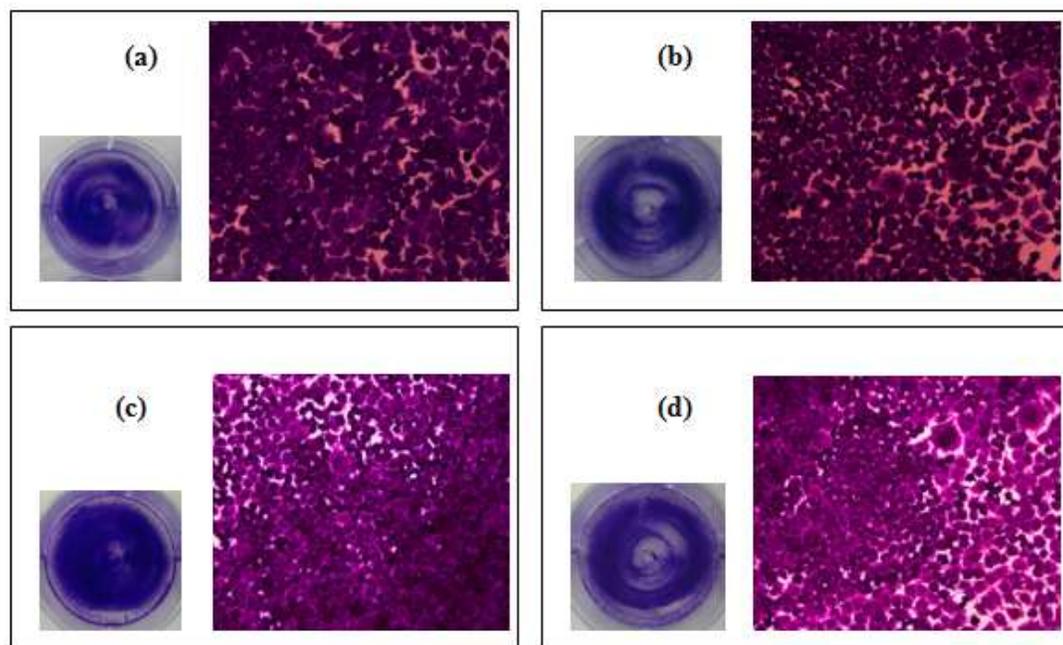


Figura 4.15 – Aspecto das células L929 expostas por 24 h aos eluatos das amostras de proporção polimérica X:Q de 1:1 + Tween 80 – 1D (a), X:Q de 1,2:0,8 + Tween 80 – 2D (b), X:Q de 1:1 + Pluronic F68 - 1E (c), X:Q de 1,2:0,8 + Pluronic F68 – 2E (d).

Ao cultivar as células expostas aos eluatos das amostras obtidas sem a adição de tensoativos (1A, 2A, 1C e 2C), observou-se a formação de uma monocamada de elevada confluência, composta de fibroblastos com núcleos arroxeados e citoplasma rosado. Notou-se a ocorrência de zonas de lise inferiores a 20% (IL=1), caracterizando toxicidade leve.

Nos ensaios realizados com os eluatos das membranas preparadas na presença de tensoativos (1D, 2D, 1E e 2E) notou-se a formação de monocamadas menos homogêneas se comparadas ao controle negativo, apresentando zona de lise entre 20 e 39% (IL=2), o que caracteriza toxicidade suave, sinalizando quantidades insuficientes de componentes prejudiciais no material avaliado.

Assim, notou-se que, quando avaliadas por esta metodologia, as membranas produzidas apresentam, quando muito, toxicidade suave.

#### 4.6.2. Ensaio de citotoxicidade indireta com MTT

Com o intuito de confirmar a não citotoxicidade dos extratos obtidos das amostras, optou-se por fazer um ensaio quantitativo indireto de citotoxicidade. Neste teste, após a exposição das células aos materiais em teste, quantifica-se a conversão, pelas mesmas, do MTT, que é solúvel em água, em *formazan*, um composto insolúvel de coloração púrpura detectável espectrofotometricamente. Este ensaio foi realizado com as amostras de proporção X:Q de 1:1 e 1,2:0,8 com desaeração a vácuo e sem a presença de qualquer surfatante (1A e 2A), com as formulações 1D, 1E, 2D e 2E, preparadas na presença dos tensoativos Tween 80 e Pluronic F68. Este ensaio também foi realizado com amostras preparadas na ausência de surfactantes, desaeradas e utilizando-se xantana produzida em escala piloto na proporção X:Q de 1:1 (formulação 1F). Na Figura 4.16 são apresentados os resultados obtidos neste estudo.

Os extratos das amostras preparadas com proporção polimérica X:Q de 1:1 na ausência de surfatantes independentemente do tipo de xantana utilizada, de grau analítico ou produzida em escala piloto, mostraram-se não citotóxicos para células L929, resultando em atividade metabólica similar à observada em presença do meio RPMI-1640 suplementado, usado como controle negativo.

A adição do tensoativo Tween 80 na etapa de formulação das membranas causou citotoxicidade elevada, próxima de 100%. No entanto, amostras preparadas utilizando-se Pluronic F68 apresentaram citotoxicidade baixa, em especial a formulação X:Q de proporção 1:1. Membranas com maior proporção da goma xantana em sua formulação apresentaram maiores índices de citotoxicidade quando comparadas às amostras com proporções poliméricas equivalentes.

Os resultados obtidos para amostras preparadas na presença de Tween 80 não corroboram os relatados anteriormente no ensaio com cristal violeta, que apontou citotoxicidade suave para estas amostras. Buscando elucidar esta questão foi realizado um ensaio de análise de citotoxicidade por contato direto das membranas com a monocamada celular.

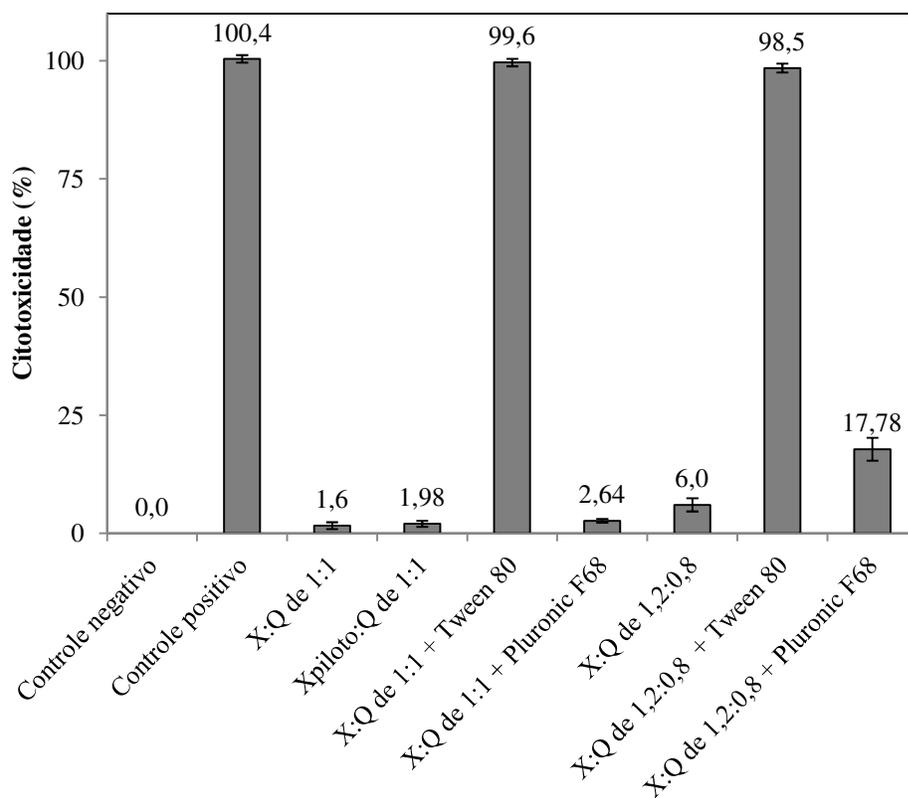


Figura 4.16 - Citotoxicidade dos extratos às células L929 analisada pelo método MTT.

#### 4.6.3. Teste de contato direto

A avaliação da resposta celular quando da exposição direta ao material é importante para a averiguação da potencialidade de seu caráter inócuo visando o uso como curativo dérmico ou *scaffold*. Os resultados típicos decorrentes da exposição de monocamadas de células L929 cultivadas por 24 h às membranas produzidas e às amostras controle, também por um período de 24 horas, são ilustrados nas Figuras 4.17 a 4.19. Os efeitos foram avaliados pela determinação dos índices de lise (IL) e de zona (IZ) conforme as Tabelas 3.4 e 3.5 apresentadas no capítulo anterior.

Na presença do controle negativo (Figura 4.17a) notou-se a formação de uma monocamada íntegra e de elevada confluência, com células de aspecto fusiforme coradas de roxo escuro, verificando-se ausência de lise aparente (IL = 0 e IZ = 0), conferindo um IR de 0/0.

A monocamada que ficou em contato direto com o látex (Figura 4.17b), controle positivo de citotoxicidade, apresentou lise celular superior a 80% (IL=4) e zona de lise envolvendo toda a placa (IZ=4), obtendo-se um IR de 5/5.

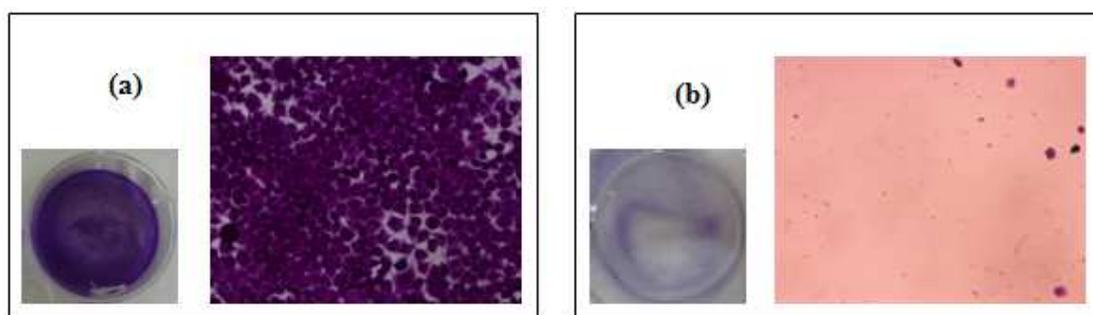


Figura 4.17 Aspecto das células L929 expostas às placas de cultivo, como controle negativo (a), e diretamente a látex, como controle positivo (b).

Todas as monocamadas celulares expostas diretamente às membranas sofreram algum grau de perturbação. As monocamadas expostas às amostras 1A e 1C mostraram-se mais homogêneas, com lise inferior a 20% (IL = 1), limitando-se somente à região sob as membranas (IZ = 1), o que aponta leve grau de citotoxicidade. As monocamadas das amostras 2A e 2C apresentaram lise entre 20 e 39% (IL = 2), estendendo-se sob e ao redor da amostra em até 0,5 cm (IZ = 2), indicando citotoxicidade suave.

Os resultados obtidos neste ensaio corroboram os verificados anteriormente no ensaio de análise de toxicidade indireta com MTT. Amostras preparadas com adição de Tween 80 mostraram efeitos citotóxicos mais acentuados, notando-se zonas de lise sob as amostras superiores a 80% (IL = 4), estendendo-se, entre 0,5 e 1 cm para áreas adjacentes (IZ = 3). Membranas de proporção X:Q igual a 1:1 preparadas na presença ou não do surfatante Pluronic

F68 apresentaram baixa toxicidade direta, com zonas de lise inferiores a 20% (IL = 1), limitando-se à região abaixo das amostras (IZ = 1).

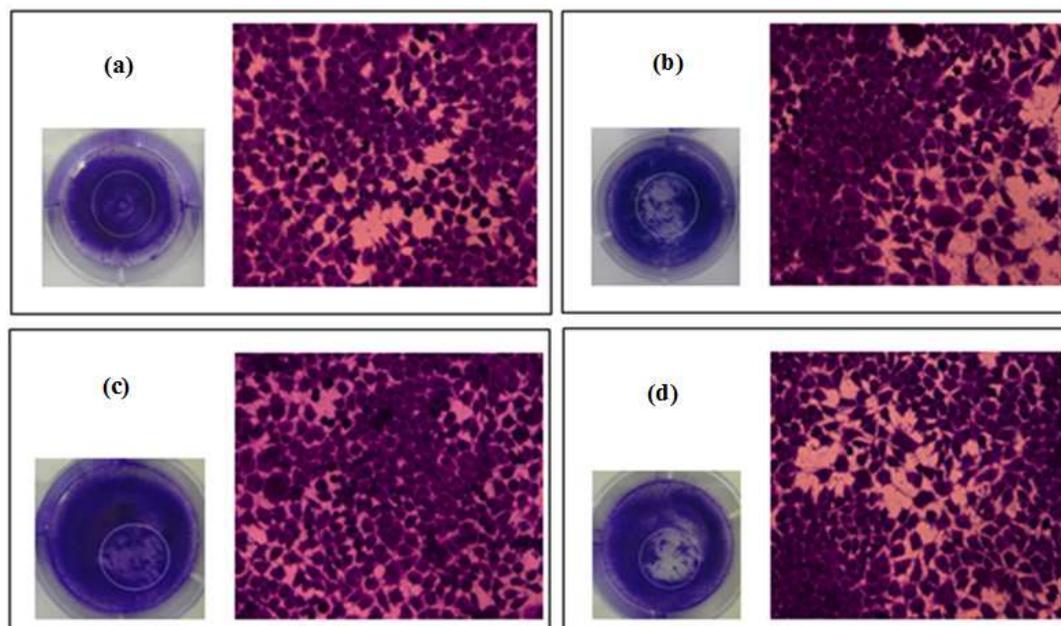


Figura 4.18 – Cultura de células L929 expostas diretamente às amostras de proporção polimérica X:Q de 1:1 des aerada - 1A (a), X:Q de 1,2:0,8 des aerada - 2A (b), X:Q de 1:1 não des aerada – 1C (c), X:Q de 1,2:0,8 não des aerada – 2C (d).

A análise comparativa dos resultados de ambos os testes (citotoxicidade indireta com MTT e direta com cristal violeta) confirmou que membranas com maior proporção da goma xantana em sua formulação apresentam maiores índices de citotoxicidade quando comparadas às amostras com proporção polimérica equivalente.

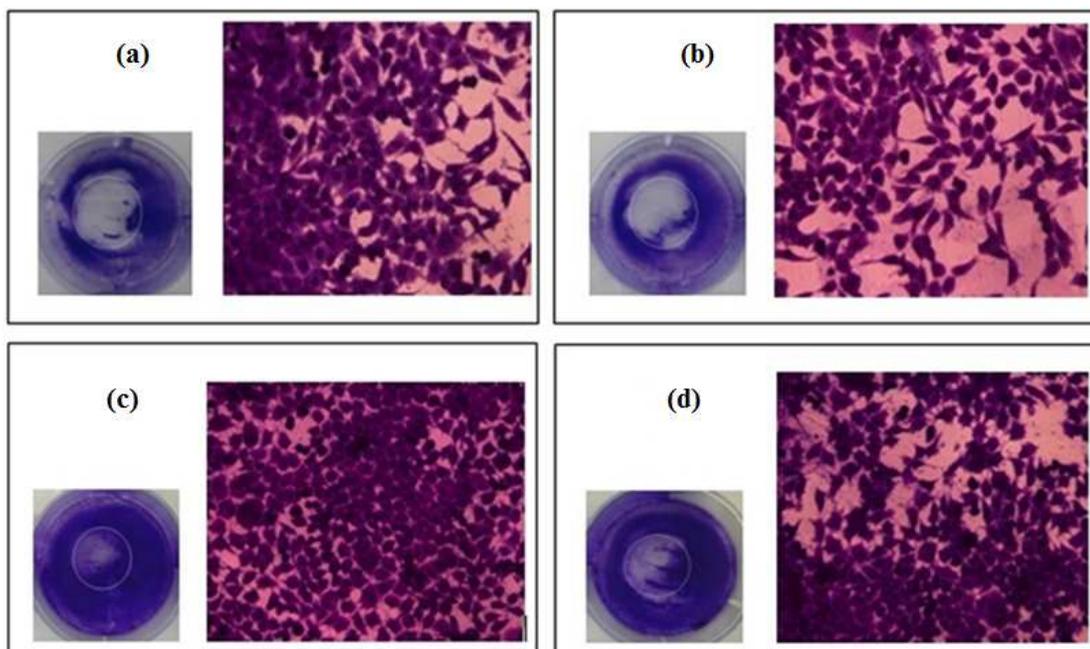


Figura 4.19 – Cultura de células L929 expostas diretamente às amostras de proporção polimérica X:Q de 1:1 + Tween 80 – 1D (a), X:Q de 1,2:0,8 + Tween 80 – 2D (b), X:Q de 1:1 + Pluronic F68 - 1E (c), X:Q de 1,2:0,8 + Pluronic F68 – 2E (d).

#### 4.6.4. Ensaios de proliferação celular

Para este ensaio foram escolhidas as formulações 1A e 1E, preparadas com xantana de grau analítico que, de acordo com os testes realizados anteriormente, apresentam baixa citotoxicidade *in vitro*. Os dados dos testes de proliferação das células L929 inoculadas sobre as membranas de proporção polimérica X:Q de 1:1 preparadas com e sem a adição de Pluronic F68 estão apresentados na Figura 4.20.

Observa-se na Figura 4.20 que as células inoculadas sobre as amostras cresceram e se multiplicaram. Porém, os valores obtidos para o grupo controle mostraram-se discretamente superiores aos resultados alcançados para ambos os materiais testados. No entanto, acredita-se que os dados de crescimento celular podem estar subestimados pela dificuldade de coleta das células que se desenvolveram no interior da estrutura.

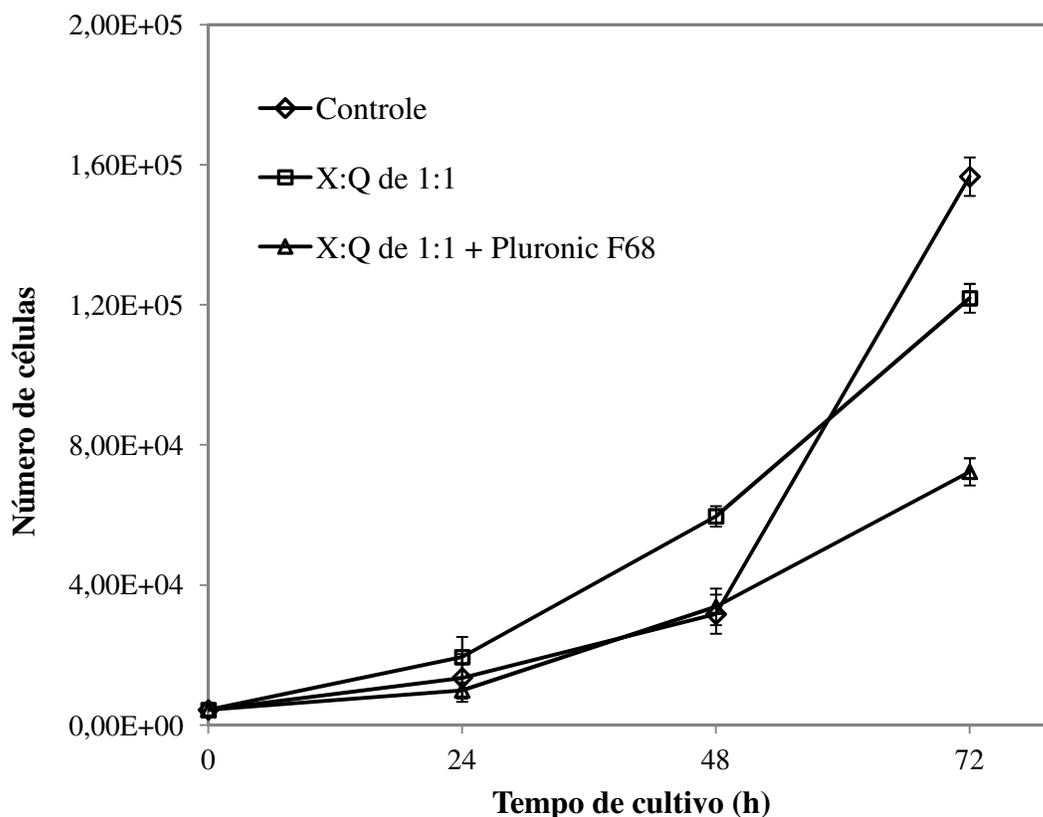


Figura 4.20 – Curva de crescimento das células L929 cultivadas sobre as membranas.

Assim, diante dos resultados apresentados de citotoxicidade e de adesão e multiplicação celular, membranas preparadas na proporção polimérica X:Q de 1:1, na presença ou ausência de Pluronic F68, mostram-se viáveis na aplicação como *scaffolds* e curativos dérmicos bioativos, respectivamente, para o tratamento de lesões de pele.

#### 4.6.5. Caracterização das células-tronco mesenquimais obtidas de camundongos C57Bl6 e ratos Wistar

Inicialmente foram isoladas células-tronco mesenquimais a partir da medula óssea de camundongos BL6. Tais células foram mantidas em cultura em meio  $\alpha$ -MEM suplementado. A partir da terceira passagem foram retiradas amostras e as CTMs foram imunofenotipadas e

submetidas à análise de multipotencialidade. A caracterização imunofenotípica, por citometria de fluxo, foi repetida a cada passagem até se obter uma cultura pura. As Figuras 4.21 e 4.22 mostram perfis típicos de caracterização imunofenotípica da população de CTMs de camundongo cultivadas na 3ª e 8ª passagem, respectivamente.

A análise dos histogramas das células na terceira passagem (Figura 4.21) revelou que os marcadores de superfície CD45, CD31 e CD11-B apresentaram expressão de 59,2, 30,6 e 46,1%, respectivamente, indicando que a cultura ainda apresentava contaminação por células hematopoéticas, endoteliais e macrófagos.

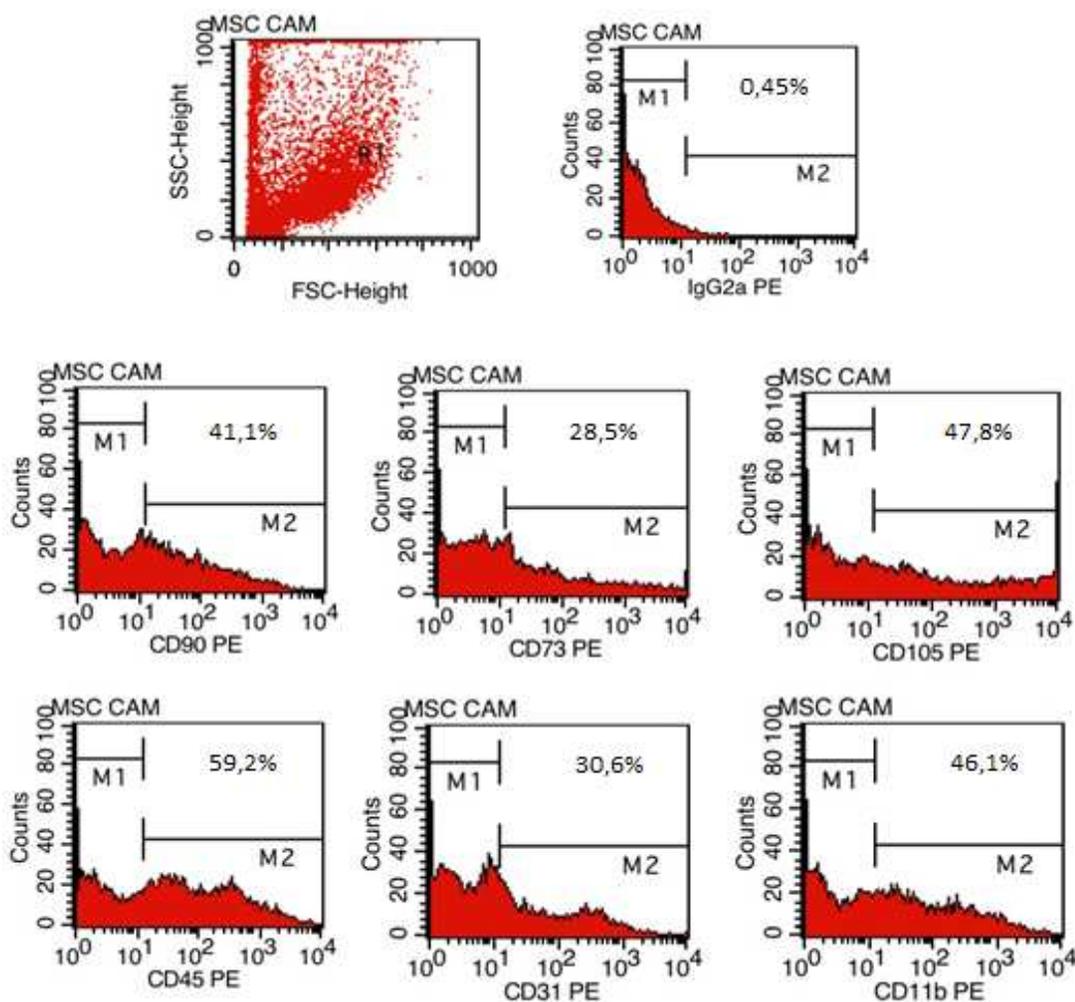


Figura 4.21 - Histogramas obtidos por citometria de fluxo, representativos da população de CTMs de camundongos BL6 em terceira passagem.

Como de acordo com critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISTC) as CTMs devem apresentar expressão menor que 2% ou ausência de expressão destes marcadores de superfície (Dominici *et al.*, 2006), foi necessário repicar a cultura por mais cinco passagens até se obter uma população de CTMs pura, expressando marcadores negativos entre 0,67 e 1,2% (Figura 4.22). A partir da 8ª passagem, então, as CTMs foram utilizadas nos ensaios de adesão e proliferação nas membranas, usando-se o número máximo de 15 passagens.

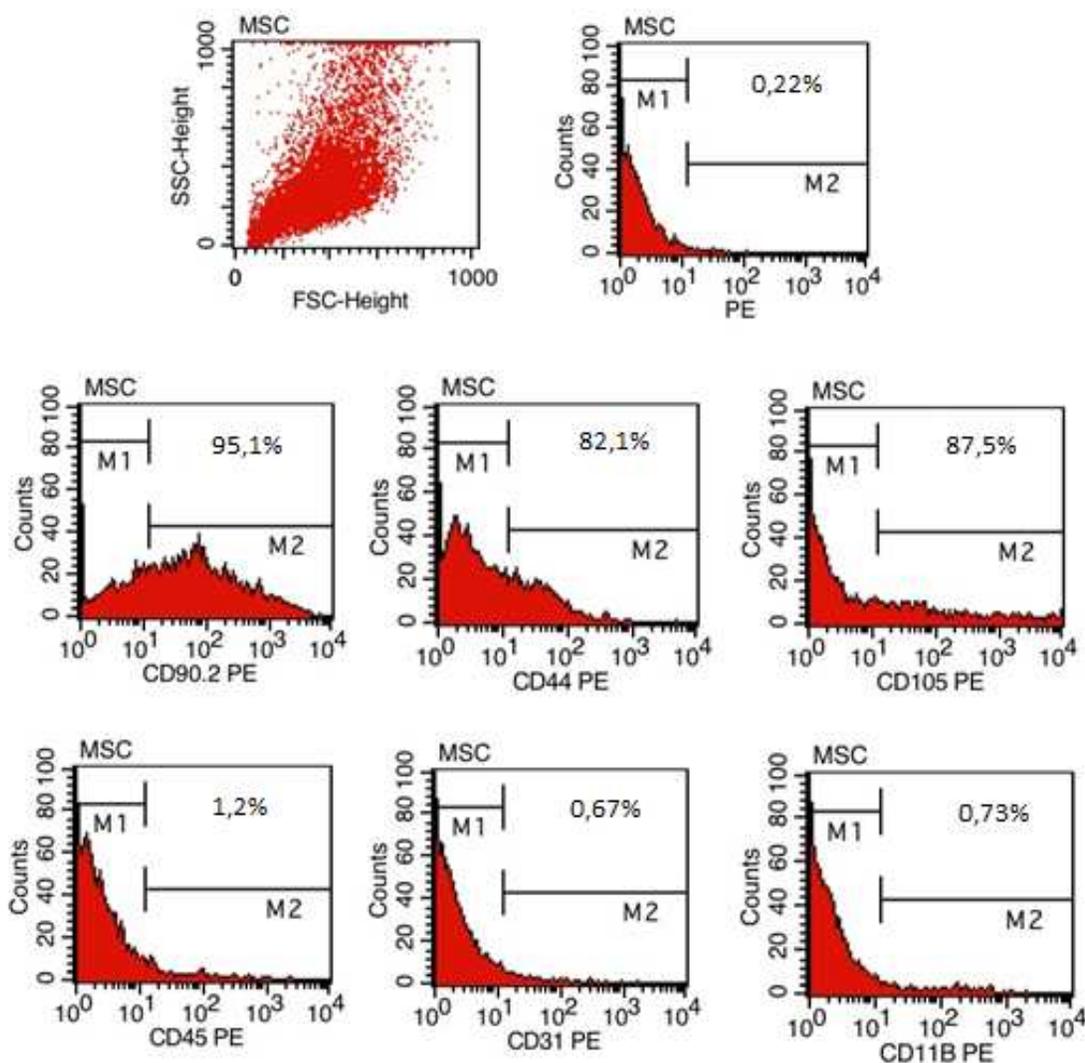


Figura 4.22 - Histogramas obtidos por citometria de fluxo, representativos da população de CTMs de camundongos BL6 em oitava passagem.

Posteriormente foram isoladas CTMs a partir da medula óssea de ratos Wistar. As células foram mantidas em meio  $\alpha$ -MEM suplementado até atingirem a 3ª passagem, quando foram caracterizadas por citometria de fluxo. Os histogramas obtidos (Figura 4.23) revelaram o alcance de uma cultura pura já na 3ª passagem, com marcadores de superfície CD31 e CD45 inferiores a 2%. Assim como para as CTMs provenientes de camundongos, as culturas puras foram utilizadas nos ensaios de adesão e proliferação celular sobre as membranas até o limite de 15 passagens.

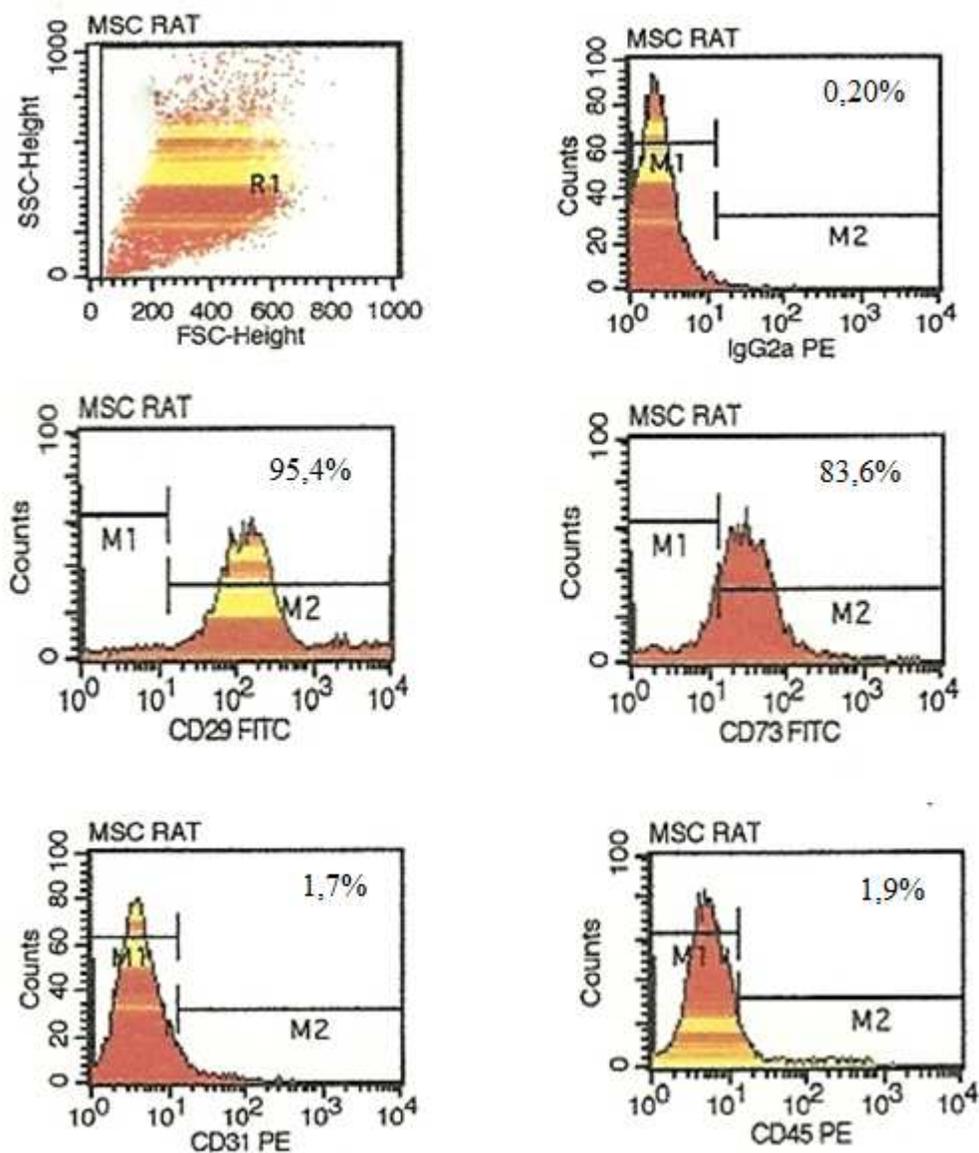


Figura 4.23 - Histogramas obtidos por citometria de fluxo, representativos da população de CTMs de rato Wistar em terceira passagem.

#### 4.6.6. Teste de adesão e proliferação das CTMs nas membranas

Para este ensaio foram escolhidas as formulações 1A e 1E de proporção X:Q igual a 1:1 sem adição e com a inclusão de Pluronic F68, respectivamente, uma vez que a caracterização físico-química e biológica destas amostras revelou resultados favoráveis para aplicação na engenharia de tecidos, para o tratamento de lesões de pele.

Células-tronco mesenquimais de camundongo e de rato foram inoculadas sobre as membranas e após 7 dias de incubação as células aderidas foram fixadas ao material. Os resultados típicos das morfologias das células e das membranas, obtidos em microscópio eletrônico de varredura, são mostrados nas Figuras 4.24 a 4.28. Outras micrografias eletrônicas de varredura das membranas com CTMs inoculadas podem ser visualizadas no Anexo III.

A transparência das membranas 1A se manteve mesmo após a inoculação das células e através da análise das micrografias é possível constatar que tanto as CTMs de ratos quanto as de camundongos inoculadas nas membranas aderiram e proliferaram sobre o biomaterial. As células-tronco mesenquimais de camundongo inoculadas na membrana 1A distribuíram-se por toda a superfície da amostra, como pode ser observado na Figura 4.25. As células cultivadas na amostra 1E proliferaram de forma muito intensa (Figura 4.26b), tanto na superfície quanto no interior dos poros, observando-se a presença de extensões citoplasmáticas típicas de células-tronco mesenquimais não diferenciadas.

No caso das CTMs de rato inoculadas nas membranas 1A e 1E (Figuras 4.27 e 4.28) observa-se a presença de células grandes e arredondadas, com diâmetro variando de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , diferentes em comparação à morfologia fibroblastóide que estas células apresentam quando tipicamente aderidas em superfícies planas. Nota-se também da formação de matriz extracelular.

Os resultados obtidos apontam que a aplicação destas membranas na engenharia de tecidos pode ser considerada viável. Membranas de formulação 1A, de proporção polimérica X:Q de 1:1 sem adição de tensoativos, poderiam ser direcionadas ao uso como curativos dérmicos bioativos, já que permanecem transparentes mesmo após a inoculação das células, apresentam superfície íntegra e possibilitam a distribuição das células por toda a sua extensão. As membranas de formulação 1E, de mesma proporção polimérica e preparadas na presença do surfatante

Pluronic F68, seriam direcionadas à aplicação como *scaffolds*, uma vez que as células podem se desenvolver no interior dos poros da matriz, moldando-se à estrutura do material.

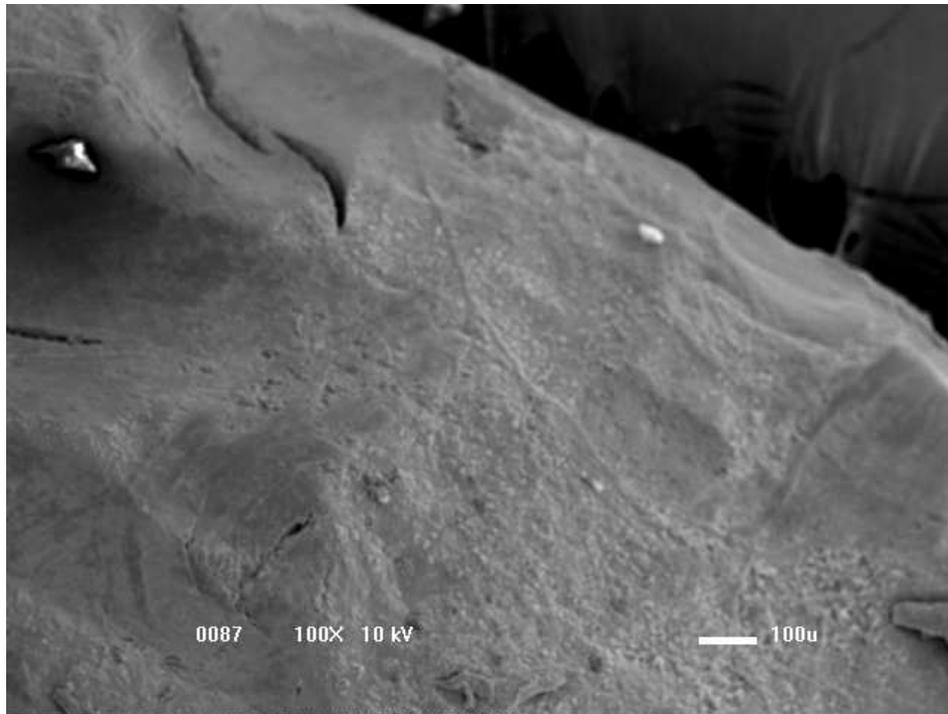


Figura 4.24 - Micrografia eletrônica de varredura da membrana de proporção X:Q de 1:1 (1A) sem células inoculadas.

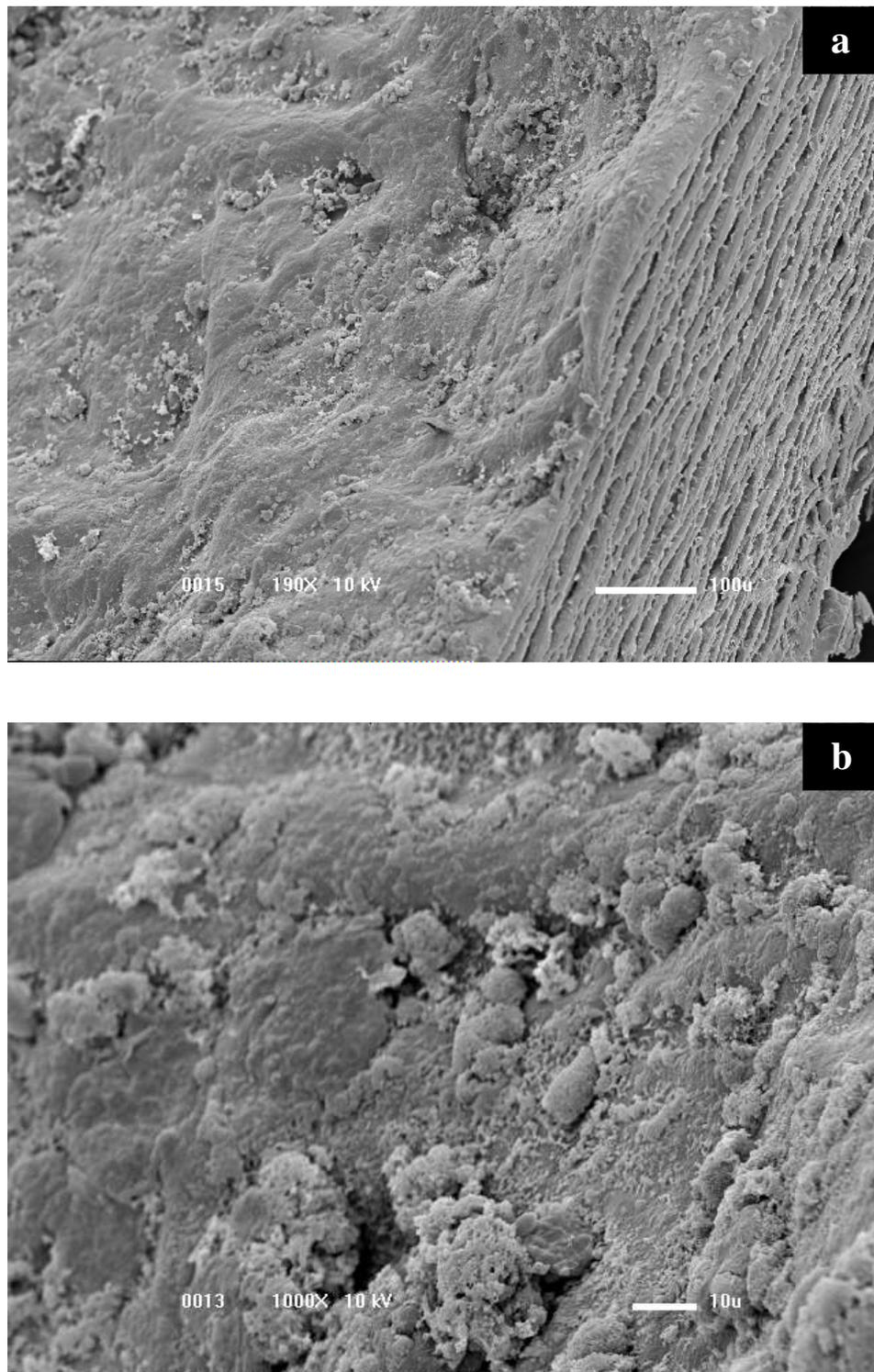


Figura 4.25 - Micrografias eletrônicas de varredura da membrana de proporção X:Q de 1:1 (1A) após 7 dias de inoculação de CTMs de camundongo: aumento de 190x (a); aumento de 1000x (b).

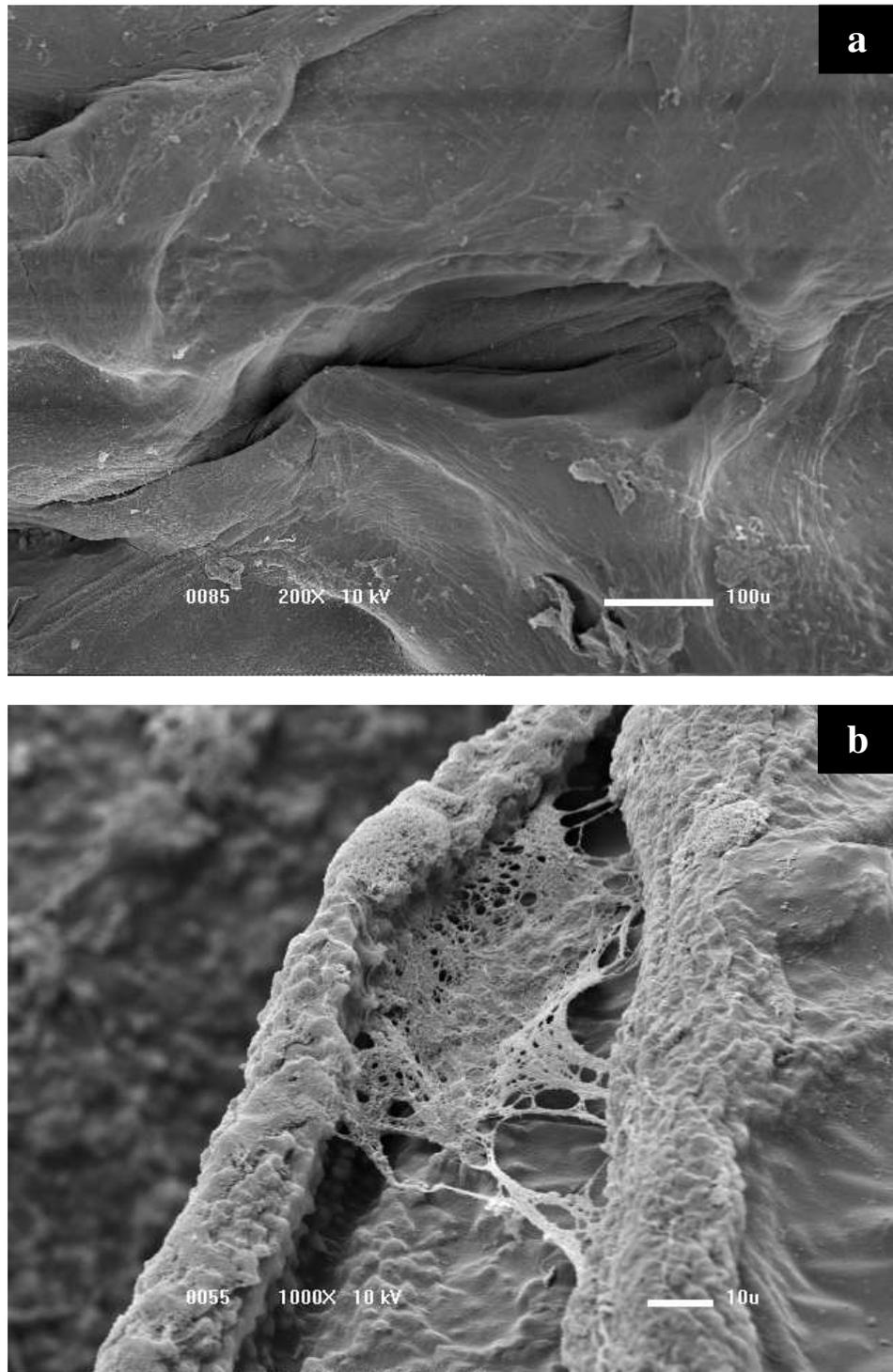


Figura 4.26 - Micrografias eletrônicas de varredura da membrana de proporção X:Q de 1:1 + Pluronic F68 – 1E: sem células (a); após 7 dias de inoculação de CTMs de camundongo (b).

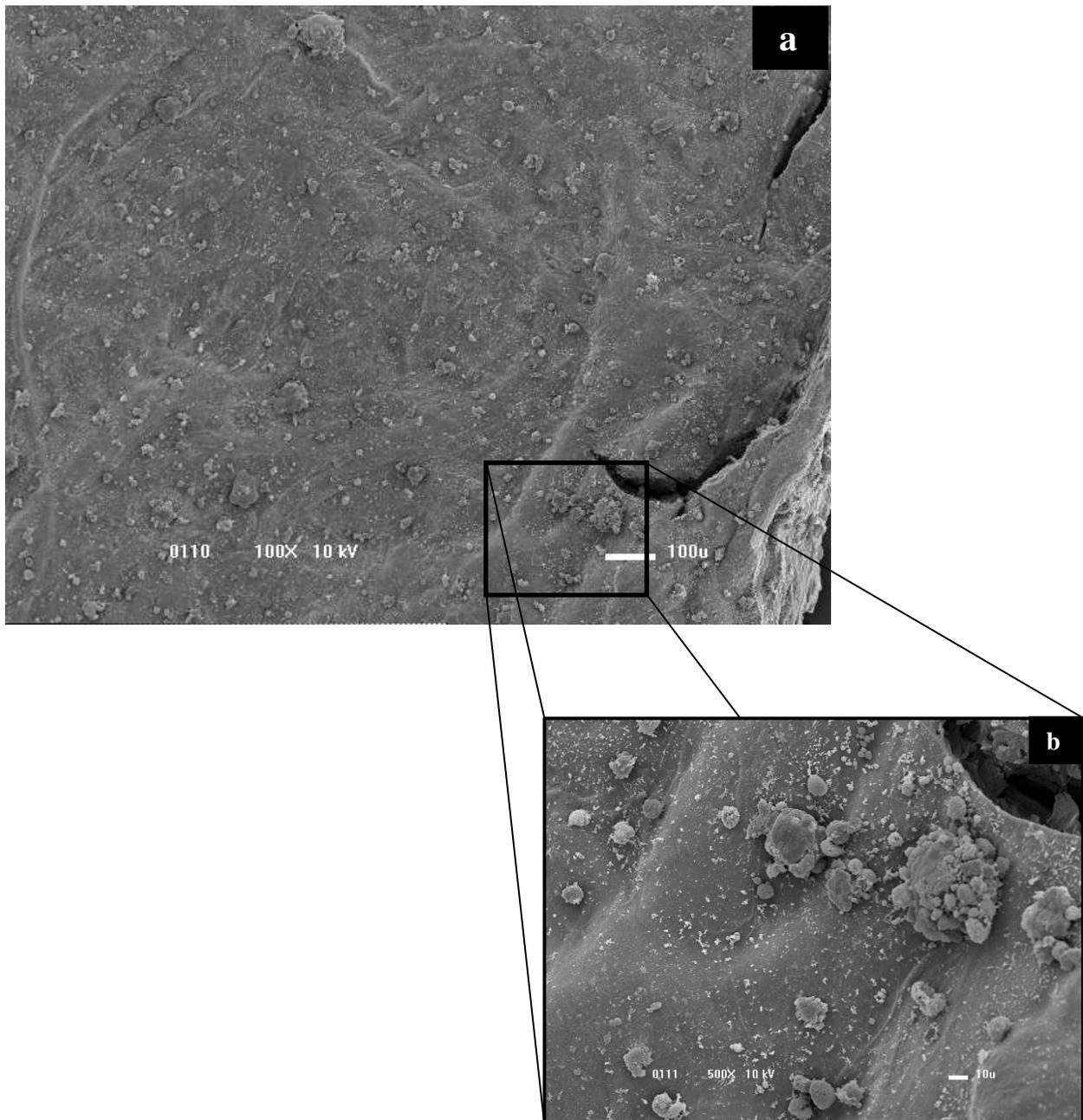


Figure 4.27 - Micrografias eletrônicas de varredura da membrana de proporção X:Q de 1:1 (1A) após 7 dias de inoculação de CTMs de rato: aumento de 100x (a); aumento de 500x (b).

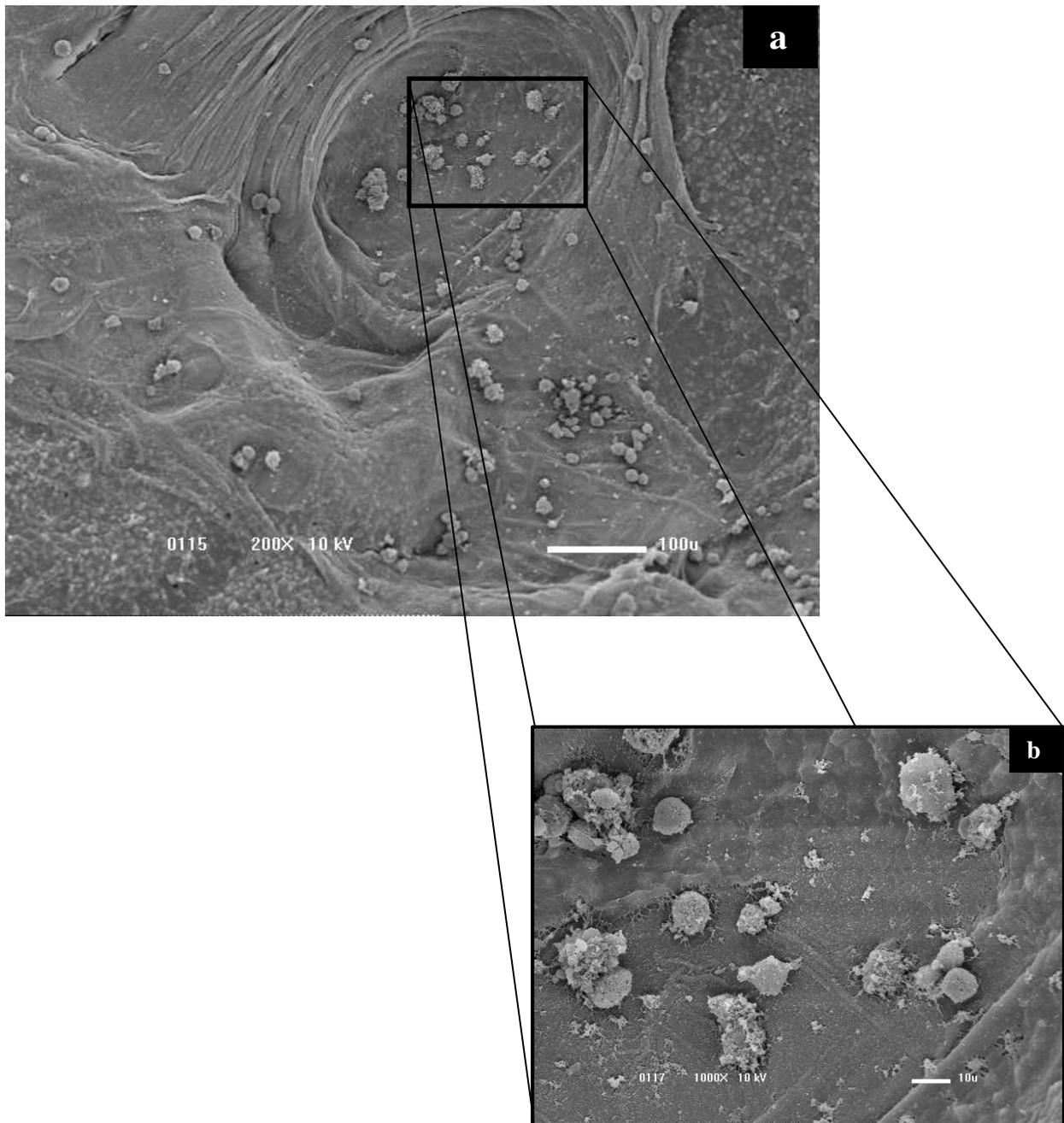


Figura 4.28 - Micrografias eletrônicas de varredura da membrana de proporção X:Q 1:1 + Pluronic F68 (1E) após 7 dias de inoculação de CTMs de rato aumento de 100x (a); aumento de 1000x (b).

#### 4.8. Análise da mutagenicidade

Uma vez que os resultados apresentados anteriormente indicaram que as formulações 1A e 1E, de proporção polimérica X:Q igual a 1:1, preparadas na ausência e presença de tensoativos, respectivamente, são viáveis para a aplicação na engenharia de tecidos, faz-se necessário a avaliação de sua mutagenicidade, para que se possa considerar estas biomaterias como seguros.

Os resultados detalhados dos testes de mutagenicidade das amostras analisadas estão descritos nos itens 3 dos Anexos V e VI, respectivamente (relatórios fornecidos pela empresa contratada), sendo sumarizados nas Tabelas 4.12 e 4.13.

Tabela 4.12 – Resultados do teste AMES de mutagenicidade na ausência de ativação metabólica das membranas poliméricas 1A e 1E.

Formulação	<i>Salmonella typhimurium</i>				
	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Controle negativo (água deionizada)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Controle positivo (5,0µg/placa de azina sódica)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1E	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Tabela 4.13 – Resultados do teste AMES de mutagenicidade na presença de ativação metabólica das membranas poliméricas 1A e 1E.

Formulação	<i>Salmonella typhimurium</i>				
	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Controle negativo (água deionizada)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Controle positivo (2,5µg/placa de 2-Aminoantraceno)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1E	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(-) não mutagênico; (+) mutagênico

De acordo com os resultados, após 72 horas de incubação das amostras com as cepas TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537 de *Salmonella typhimurium* na ausência e presença de ativação metabólica, nenhuma das amostras foi considerada mutagênica.

#### **4.7. Testes preliminares in vivo**

Conforme já mencionado no item 3.2.8.1, ratos Wistar submetidos a lesões cirúrgicas, com a retirada da derme e epiderme, foram divididos em três grupos, de acordo com o tratamento a que foram submetidos. Em um dos grupos (controle, GR01) as lesões não foram recobertas, em outro grupo (GR02) as lesões foram tratadas somente com a membrana, sem a adição de células mesenquimais e no grupo restante (GR03), as lesões foram recobertas com membrana inoculada com células-tronco mesenquimais também de rato. Cada grupo era composto de três animais, cada um com três lesões.

A transparência das membranas de formulação 1A, mesmo após a inoculação das células, aliada à intensa proliferação celular em uma superfície íntegra não porosa, serviu de embasamento para a escolha desta formulação para este ensaio *in vivo* em específico. Uma vez que os animais utilizados foram ratos Wistar, optou-se pelo uso de células-tronco mesenquimais de ratos e não de camundongo para que não se tivesse a avaliação da aplicação de uma linhagem xenogênica.

Os resultados aqui relatados foram obtidos em parceria com a equipe do Laboratório de Cultura Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto (Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP), com especial participação da aluna de doutorado Carolina Caliári Oliveira.

O aspecto típico das lesões ao longo do tratamento é mostrado na Figura 4.29 em animais representativos de cada grupo, disponibilizando-se no Anexo IV as imagens registradas para todas as lesões após 20 dias de tratamento.

A avaliação fotográfica dos animais evidenciou que após 20 dias de tratamento todos os animais já se encontravam em processo final de reepitelização. O resultado da análise estatística da porcentagem de cicatrização vinte dias após se ter causado as lesões cirúrgicas utilizando-se o

Teste t não paramétrico para determinar as diferenças existentes entre os grupos experimentais é mostrado na Figura 4.30.

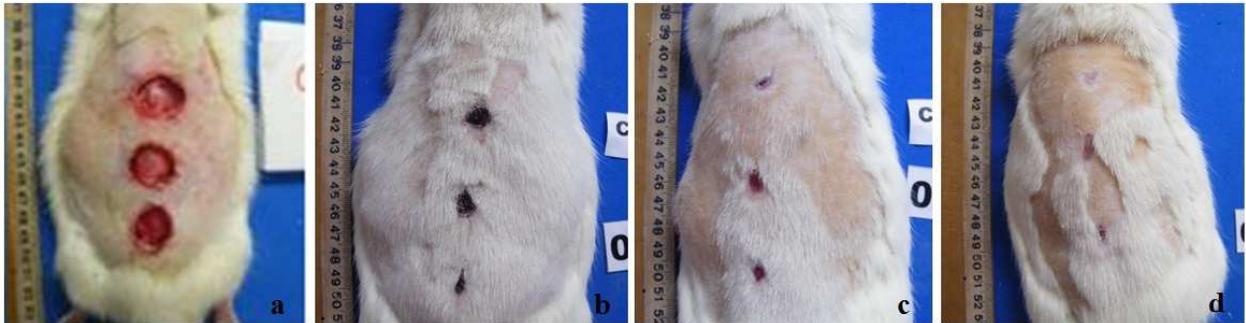


Figura 4.29 – Aspectos típicos das lesões: a) primeiro dia de tratamento; b) GR01 (controle) após 20 dias; c) GR02 após 20 dias de tratamento com membrana de formulação 1A sem células; d) GR03 após 20 dias de tratamento com membrana de formulação 1A com CTMs de rato.

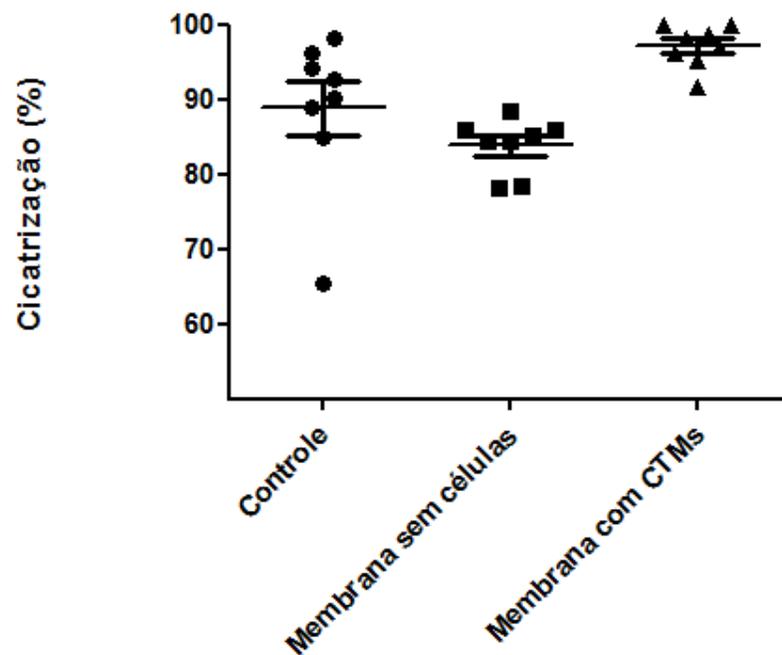


Figura 4.30 – Análise estatística da porcentagem de cicatrização vinte dias após injúria cirúrgica. (Teste t -  $p < 0,05$ , PRISMA 5.0).

Nota-se que o grupo tratado com a membrana contendo CTMs aderidas apresentou cicatrização das úlceras ( $97,10 \pm 2,6\%$ ) significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais do grupo controle ( $88,81 \pm 9,6\%$ ). A diferença também foi significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao do grupo tratado com membrana sem células ( $83,83 \pm 3,4\%$ ). Observa-se também que a média das porcentagens de cicatrização das lesões do GR01 (controle) é superior à do GR02, tratados com membranas sem células, no entanto, o teste de Tukey não relevou diferença significativa entre esses dois grupos.

## 5. DISCUSSÃO

Quando em solução ácida, a quitosana apresenta-se como um polieletrólito catiônico que, ao ser misturado com a xantana (um polieletrólito aniônico), forma um complexo polieletrólito. Entretanto, a interação entre os grupos positivos da quitosana e os negativos da xantana não necessariamente envolve todas as aminas e carboxilas presentes em função de questões estéricas ligadas ao dobramento das moléculas. Além disso, as proporções de aminas e carboxilas nas moléculas isoladas não são iguais, havendo quantidade muito maior de aminas na quitosana utilizada (com grau de desacetilação de 96%) do que de carboxilas na xantana se comparadas na mesma base mássica. Ou seja, a interação entre as cadeias possivelmente não é estequiométrica, havendo um excesso de aminas não ligadas que provavelmente formam uma fase relativamente contínua na qual se dispersam os PECs formados, contribuindo com sua coesão e dando um aspecto de homogeneidade macroscópica às membranas secas.

De forma geral, os resultados obtidos para as membranas preparadas com xantana e quitosana indicam que boa parte das formulações testadas apresentam propriedades convenientes visando a utilização do material como curativos dérmicos e *scaffolds*.

Nota-se, por exemplo, que todas as amostras apresentaram espessuras dentro das faixas apropriadas para uma ou outra aplicação proposta (dados mostrados de forma comparativa na Figura 5.1). De acordo com Ma *et al.* (2001), biomateriais com aplicação como substitutos dérmicos devem ser idealmente mais finos que a derme humana, cuja espessura varia entre 0,5 e 2 mm, dependendo da idade, sexo, bem como, da região do corpo, entretanto *scaffolds* com até 4 mm de espessura já foram relatados na literatura (Wan *et al.*, 2007).

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

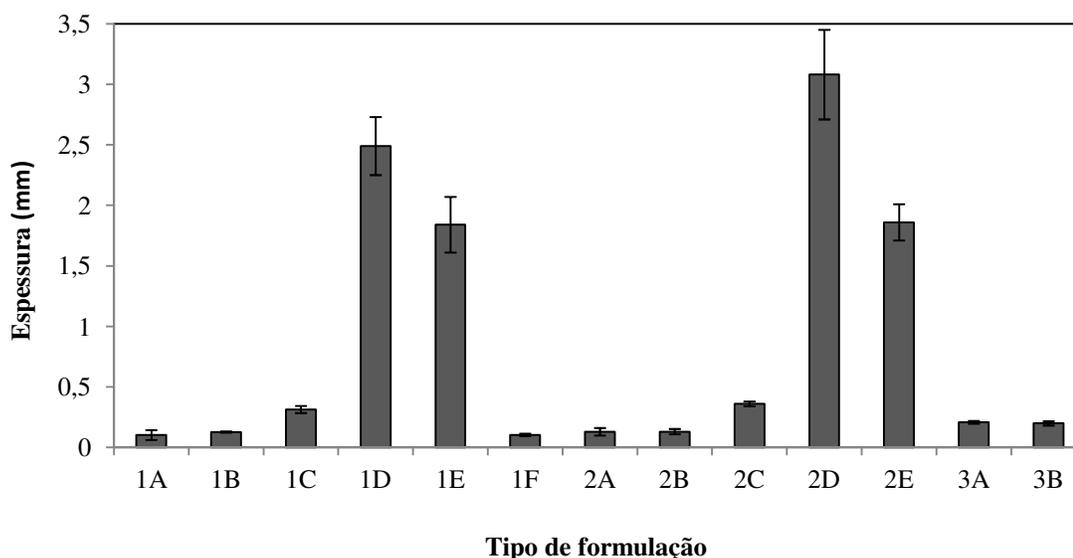


Figura 5.1 - Espessuras das membranas preparadas com diferentes proporções poliméricas, empregando xantana de distintas procedências, adicionando-se ou não tensoativos durante a preparação e expondo-se ou não os coacervados a vácuo.

Dentre as membranas que passaram pela etapa de desaeração, as formulações 3A e 3B, que continham maior concentração de xantana, mostraram-se mais espessas. Este comportamento pode ser atribuído, provavelmente, à diminuição do número de ligações eletrostáticas entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxil da xantana, uma vez que os grupos pertencentes ao polímero xantana estão em maior proporção nestas amostras, podendo causar repulsão entre as lamelas e aumentar, assim, a espessura das membranas.

Membranas de proporções poliméricas X:Q iguais a 1:1 e 1,2:0,8 preparadas na ausência de surfatantes e incluindo a etapa de desaeração (formulações 1A, 1B, 1F, 2A e 2B) apresentam-se mais finas, com espessuras variando entre 102 e 130  $\mu\text{m}$ , não se verificando diferença estatisticamente significativa entre elas.

Membranas de quitosana e alginato preparadas similarmente apresentam espessuras inferiores, variando entre 23,5 e 26,0  $\mu\text{m}$  (Wang *et al.*, 2001) e entre 66 e 80  $\mu\text{m}$  (Rodrigues *et al.*, 2008). Veiga e Moraes (2011) relataram um aumento na espessura de membranas lamelares de quitosana quando se substitui o alginato por xantana, reportando espessuras equivalentes às

obtidas neste trabalho para amostras preparadas com a etapa de desaeração, entre 137 e 200  $\mu\text{m}$ . Segundo os autores, este aumento da espessura pode estar relacionado ao tipo de coacervação e ao empacotamento dos agregados obtidos e à ausência de acetona como co-solvente durante a coacervação, provocando a expansão da estrutura.

Membranas obtidas na presença dos surfatantes apresentaram espessuras mais elevadas, variando entre 1,84 a 3,08 mm. Tais valores são superiores aos reportados por Bueno e Moraes (2011) para membranas de quitosana/alginato produzidas com os mesmos tensoativos (entre 0,38 e 0,41 mm quando secas), mas comparáveis aos de outros materiais esponjosos descritos na literatura com aplicação em engenharia de tecidos, como *scaffolds* de colágeno com espessura de 1 mm (George *et al.*, 2008), membranas porosas de quitosana/alginato obtidas por liofilização, com espessura média de 2,5 mm (Kucharska *et al.*, 2008) e de quitosana/poli(láctico), com espessura de 4 mm quando secas, chegando a 6 mm quando hidratadas (Wan *et al.*, 2007).

As membranas obtidas empregando-se desaeração a vácuo e na ausência de surfatantes mostraram-se transparentes tanto no estado seco quanto úmido, assim como observado por Rodrigues *et al.* (2008) para membranas de alginato e quitosana e por Veiga e Moraes (2011) para membranas de xantana e quitosana. A transparência do material é uma característica de grande relevância considerando-se a aplicação como curativo dérmico, uma vez que permitiria a eficaz observação do leito da ferida durante a recuperação da pele.

Através da análise das fotomicrografias (Figuras 4.4 e 4.8) pode-se notar, em todas as amostras, agregados na forma de fibras dispersas pela matriz formada provavelmente por quitosana excedente. Amostras preparadas sem adição de tensoativos apresentaram aspecto lamelar mais compactado e superfície sem poros aparentes, em conformidade com o descrito na literatura para membranas de quitosana/alginato (Rodrigues *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2002) e de quitosana/xantana (Veiga e Moraes, 2011). A integridade da camada superficial é de fundamental importância em materiais destinados ao uso como curativos dérmicos, uma vez que os mesmos poderiam atuar como barreira contra a entrada de micro-organismos causadores de infecções em lesões de pele.

Regiões aparentemente menos organizadas são observadas nas amostras mais espessas, o que pode ser justificado pelo próprio tipo de método empregado para a obtenção das matrizes

secas, a moldagem em placas de poliestireno. Esta estratégia favorece o alinhamento das cadeias poliméricas que estão em contato direto com a superfície do molde durante a secagem, resultando em maior organização destas moléculas em relação às que estão expostas diretamente ao ar, o que pode resultar em um aumento de cristalinidade local, conforme observado por Uygun e colaboradores (2010). Assim, membranas mais espessas, que têm mais material afastado da superfície do molde, têm possivelmente menor grau de cristalinidade.

Diferenças significativas não somente na compactação e organização polimérica das formulações analisadas foram observadas, mas também na porosidade. Amostras preparadas com adição dos tensoativos Tween 80 e Pluronic F68 apresentaram a presença de poros intercomunicantes distribuídos na estrutura lamelar, com diâmetros entre 90 e 300  $\mu\text{m}$ . Estes valores são similares ao reportado por Bueno e Moraes (2011) para membranas de alginato e quitosana preparadas com a adição destes mesmos surfatantes e comparáveis aos descritos para suportes esponjosos de colágeno bovino obtidos por liofilização, destinados para a aplicação na área engenharia de tecidos com foco em pele, que apresentaram diâmetros dos poros variando entre 200 e 400  $\mu\text{m}$  (George *et al.*, 2008). Uma rede extensa de poros interconectados na estrutura de um *scaffold* constitui-se de uma característica ideal para a migração, proliferação e adesão celular, facilitando a oxigenação e o transporte de nutrientes até as porções mais internas do suporte (Liu *et al.*, 2007). De acordo com Ikada (2006) e Adekogbe e Ghanem (2005), o tamanho ótimo dos poros de um material utilizado na área de engenharia de tecidos varia entre 100 e 500  $\mu\text{m}$ .

Diante do exposto, as membranas porosas produzidas neste trabalho pelo uso de tensoativos apresentam adequada espessura, estrutura e porosidade para atuarem como *scaffolds* na engenharia de tecidos com aplicação na regeneração de pele e as membranas lamelares produzidas sem adição de surfatantes e incluindo-se a etapa de desaeração a vácuo poderiam ser potencialmente empregadas como curativos dérmicos, uma vez que se mostraram finas e transparentes, além de apresentarem a camada superficial íntegra.

Outra importante característica de um material utilizado na engenharia de tecidos com foco na regeneração de pele relaciona-se à sua capacidade de absorção dos exsudatos liberados pelo organismo. Na Figura 5.2 são apresentados, de forma comparativa, os resultados obtidos nos estudos de absorção de água, soluções salinas SS e FCS e meio de cultivo referente aos ensaios

com membranas de proporções X:Q iguais a 1:1 e 1,2:0,8, sem adição de tensoativos e incluindo-se a etapa de desaeração (formulações 1A, 1F e 2A) e das amostras 1D, 1E, 2D e 2E, preparadas na presença dos surfatantes, empregando-se a xantana de qualidade analítica e a obtida na UNESP de Assis.

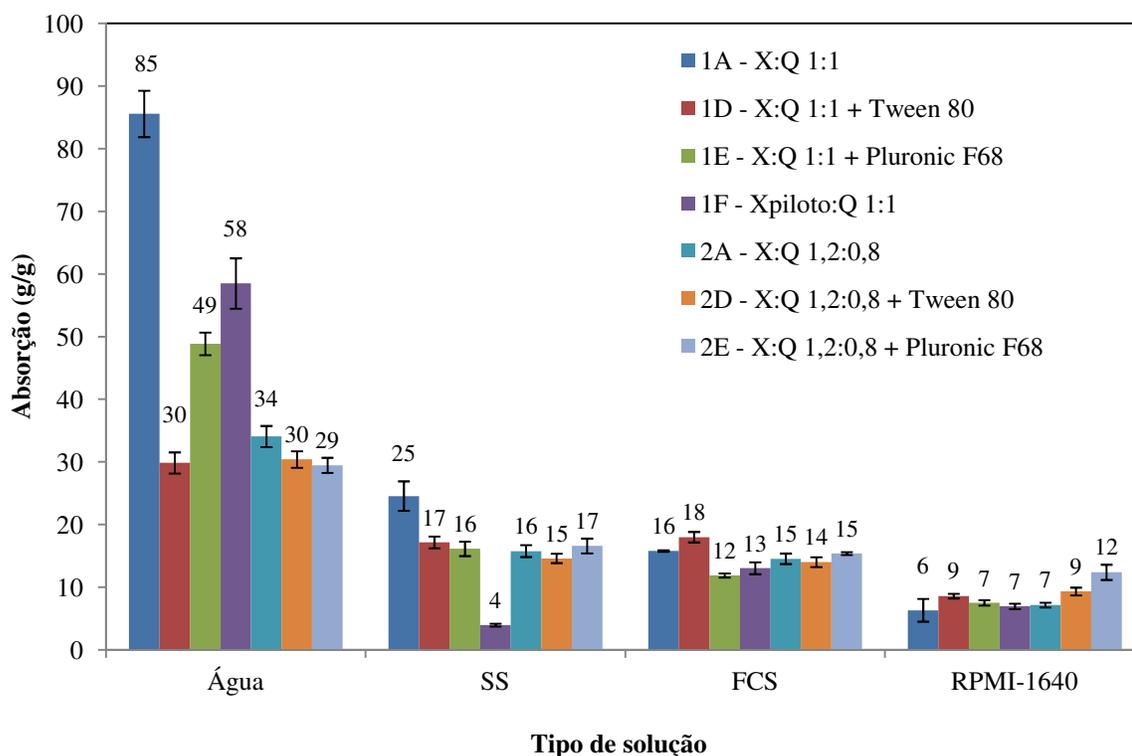


Figura 5.2 - Valores das capacidades médias de absorções em água, solução salina NaCl 0,9% (SS), fluido corpóreo simulado (FCS) e meio RPMI-1640 suplementado das membranas.

Membranas preparadas sem adição de tensoativos apresentaram elevada capacidade de absorção de água, variando de 48 a 85 g de H<sub>2</sub>O/g de membrana seca. Esses valores são superiores aos descritos na literatura para membranas de quitosana-alginato, que variam entre 11 e 19 g/g em H<sub>2</sub>O (Rodrigues *et al.*, 2008) e de quitosana/xantana (entre 24 e 61 g/g em H<sub>2</sub>O) preparadas em condições similares (Veiga e Moraes, 2011).

A maior absorção de água verificada para as membranas com proporção polimérica de X:Q igual a 1:1 pode ser explicada devido a uma ligação sub-ótima entre os polímeros, causada pelo excesso relativo de grupos amino da quitosana em relação às carboxilas da xantana, resultando em redes poliméricas mais soltas, capazes de absorver mais água. Isto também foi verificado por Macleod *et al.* (1999) para membranas de pectina (P) e quitosana (Q) em diferentes proporções poliméricas. Os autores observaram que a proporção polimérica P:Q igual a 2:1, na qual a rede estaria mais unida, apresentou absorção de água cinco vezes inferior à proporção P:Q igual a 1:1. A elevação da capacidade de absorção deveu-se, segundo os autores, ao excesso de grupos  $\text{NH}_3$  da quitosana na proporção 1:1, causando um decréscimo na quantidade de pontes de hidrogênio formados com a água, resultando em uma rede polimérica mais frouxa, que absorvia mais líquido.

Para um mesmo tipo de solução aquosa, praticamente não houve variação significativa entre os resultados de capacidade de absorção das membranas preparadas com os diferentes tensoativos. Por outro lado, houve variações significativas na absorção ao se alterar as soluções fisiológicas testadas. As maiores capacidades de absorção observadas foram em água. De acordo com Bueno e Moraes (2011), o aumento da força iônica causaria uma maior aproximação entre as cadeias dos polissacarídeos, dificultando a penetração de água na estrutura da membrana e resultando em menores valores de capacidade de absorção das soluções remanescentes.

Membranas preparadas na presença dos tensoativos absorveram menor quantidade de água quando comparadas às que continham somente polissacarídeos em sua formulação. No entanto, diferenças significativas não foram observadas na capacidade de absorção de soluções salinas, em especial de fluido corpóreo simulado. A capacidade de absorção de fluidos corpóreos é uma característica muito importante para biomateriais destinados à regeneração de pele, uma vez que a formação de exsudato em lesões cutâneas ulceradas pode ser bastante intensa e, em alguns casos, com ocorrência de mau cheiro, como é o que ocorre em pacientes tratados com selante de fibrina. Assim, um curativo ideal deve absorver o líquido do corpo para a transferência de nutrientes celulares e metabólitos através do material, além de evitar o acúmulo de exsudatos na lesão ou sua desidratação excessiva, controlando a perda de água pela pele (Öztürk *et al.*, 2006).

Os valores de absorção encontrados para as membranas com surfatantes adicionados em sua preparação são superiores aos reportados por Bueno e Moraes (2011) para membranas porosas de quitosana e alginato, que relatam absorção média de 13,83 g/g em H<sub>2</sub>O, 11,96 g/g em SS e 7,74 g/g em FCS. As capacidades de absorção de soluções aquosas encontradas neste trabalho também podem ser comparadas às descritas para materiais esponjosos obtidos por liofilização, como membranas porosas de quitosana-alginato, que absorveram cerca de 12 g/g em tampão fosfato, pH 7,4 após 10 min (Öztürk *et al.*, 2006) e curativos esponjosos de quitosana-alginato, que foram capazes de absorver 17,5 g/g em água após 180 min de imersão (Kucharska *et al.*, 2008).

Uma favorável absorção de meio de cultivo celular em um curativo bioativo e um *scaffold* também é esperada, uma vez que possibilita a disponibilização dos nutrientes para as células neles cultivadas. As membranas analisadas apresentaram valores elevados de absorção de meio de cultivo celular, variando entre 6 e 12 g de meio de cultivo/g de membrana seca.

Uma vez implantados em organismos vivos os suportes poliméricos biodegradáveis podem sofrer intensa degradação. Esta perda de massa é iniciada assim que as moléculas atingem um tamanho que permita a sua difusão através da matriz polimérica (Liu *et al.*, 2007). Desta forma, a verificação da estabilidade do biomaterial frente a diferentes meios aquosos, bem como a meio de cultivo, é de extrema necessidade.

Os resultados obtidos nos estudos de estabilidade em água, soluções salinas e meio de cultura RPMI-1640 suplementado das amostras de proporções poliméricas de X:Q iguais a 1:1 e 1,2:0,8 preparadas na presença ou ausência dos tensoativos Tween 80 e Pluronic F68 (formulações 1A, 1D, 1E, 2A, 2D e 2E) com a xantana de grau analítico e também da amostra preparada com xantana produzida em escala piloto (1F) são apresentados, de forma comparativa, na Figura 5.3. As membranas mantiveram-se relativamente estáveis quando em contato com as soluções aquosas testadas, mas foram observadas variações de massa em todas as amostras.

As membranas preparadas na presença do tensoativo Pluronic F68, independentemente da proporção polimérica, apresentaram maior perda de massa quando expostas a soluções aquosas, atingindo valor superior a 50% para a proporção 1,2:0,8 (2E) em FCS. Segundo Bueno (2010) a perda de massa elevada em FCS resulta da variação do pH do sistema. Uma vez que o pH do FCS

é 7,4 e, sabendo que os valores médios de pKa da quitosana e da xantana são 6,3 e 2,87, respectivamente, é possível afirmar que, nestas condições, as membranas estão estruturalmente enfraquecidas. Em pH neutro os grupos amino residuais da quitosana permanecem majoritariamente desprotonados, não estando disponíveis, desta forma, para a interação com os grupos carboxila residuais da xantana, negativamente carregados, resultando em maior perda de massa da amostra.

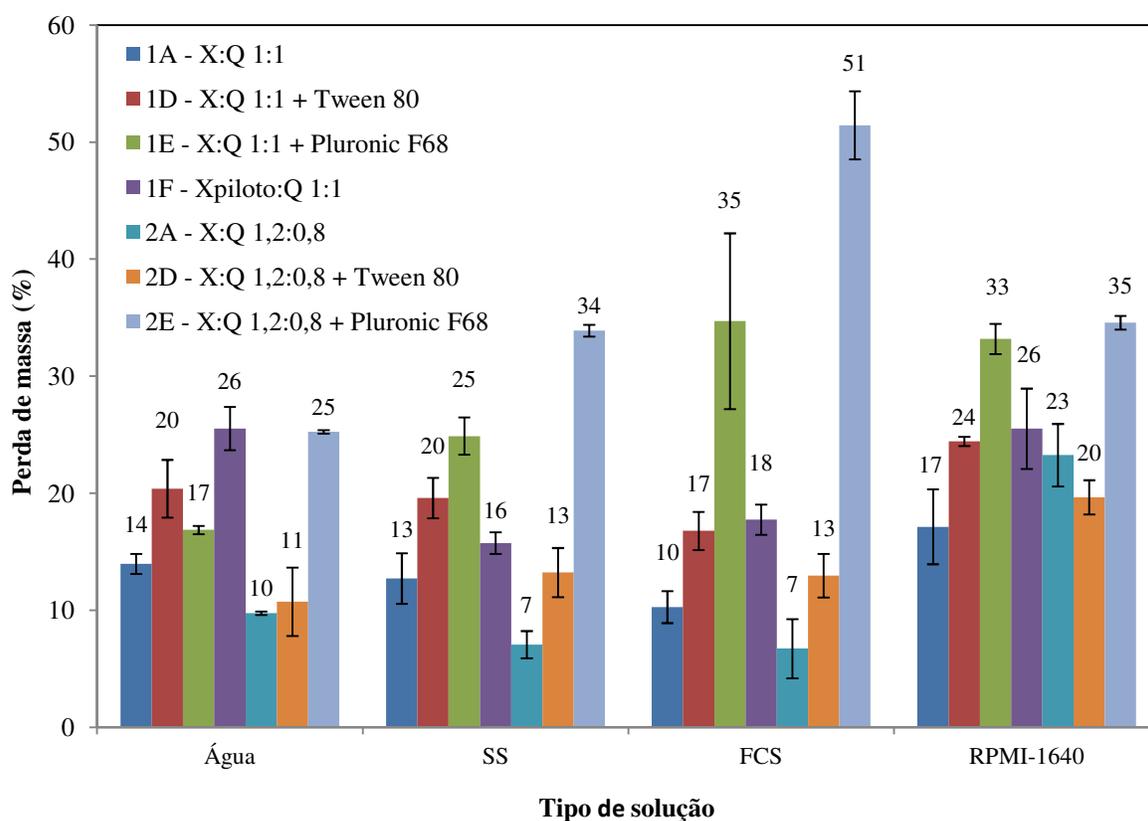


Figura 5.3 - Valores das variações de massa das membranas em água, solução salina NaCl 0,9% (SS) e fluido corpóreo simulado (FCS) e meio de cultura RPMI-1640 suplementado.

Amostras expostas ao meio de cultivo celular RPMI-1640 suplementado apresentaram perda de massa máxima de 25% para as formulações sem adição de tensoativos e de 35% para membranas preparadas na presença dos tensoativos em 6 dias de incubação. Desta forma, todas

as amostras analisadas podem ser consideradas como suficientemente estáveis para a aplicação como suporte absorvível em engenharia de tecidos.

Os valores de perda de massa observados são compatíveis com a finalidade proposta, visto que se estas taxas de degradação se mantivessem constantes, no período de cerca de 60 dias as membranas possivelmente estariam totalmente degradadas, tempo este suficiente para que ocorra o processo de regeneração tecidual, ou seja, a adaptação das células ao novo ambiente, a neovascularização seguida da biodegradação do material, levando à formação de um novo tecido no local da lesão.

Não foram observadas diferenças significativas na morfologia, espessura, capacidade de absorção de meio de cultivo, nem mesmo na perda de massa das membranas produzidas com as gomas xantanas de origem analítica, alimentícia ou produzidas em escala piloto. As membranas preparadas com goma xantana produzida em escala piloto absorveram menor quantidade de água e de SS. Diferentes valores de capacidade de absorção das soluções salinas SS e FCS foram observados, sendo que as membranas preparadas com  $X_{\text{Sigma}}$  nas proporções poliméricas de X:Q de 1:1 e 1,2:0,8 apresentaram maiores valores de capacidade de absorção destas soluções. Uma das diferenças entre os tipos de xantanas utilizados é a viscosidade. A xantana produzida em escala piloto apresenta viscosidade de 1600 cP para solução aquosa a 1%, a xantana do tipo Keltrol<sup>®</sup> F apresenta viscosidade de 1480 cP para solução de mesma concentração, enquanto que a do biopolímero da marca Sigma Chemical Co. varia entre 800 e 1200 cP para solução de mesma concentração (dados dos fornecedores). A menor viscosidade da  $X_{\text{Sigma}}$  sugere menor tamanho de cadeia e, conseqüentemente, maior mobilidade, favorecendo o deslocamento das moléculas de água na estrutura da membrana, o que justificaria a maior absorção das soluções pelas formulações que apresentam polissacarídeo desta procedência.

Adequadas propriedades mecânicas como elasticidade e resistência, compatíveis com as do tecido lesado, também são requisitos importantes e esperados para materiais destinados à regeneração tecidual.

Amostras preparadas na ausência de surfatantes e desaeradas a vácuo apresentaram maior resistência à ruptura, observando-se que o aumento da proporção de xantana em relação à de quitosana de 1:1 para 1,2:0,8 reduz tal propriedade (25,12 MPa e 8,73MPa, respectivamente). O

aumento da concentração de xantana e, por consequência a diminuição da quantidade de quitosana disponível para formar a matriz na qual os coacervados se dispersam, favoreceriam a formação de zonas amorfas, diminuindo, assim a resistência do material à tração.

Comparando os valores de tensão de ruptura obtidos com os da pele normal, que variam entre 2,1 e 16 MPa (Wang *et al.*, 2002), as amostras 1A, 1F e 2A mostram-se adequadas à aplicação como curativos. No entanto, estas membranas apresentam baixos índices de alongamento, entre 1 e 2%, enquanto que a pele possui valores por volta de 70% (Hansen e Jemec, 2002). Desta forma, a aplicação destes materiais em regiões do corpo com elevado requerimento mecânico, como joelhos e cotovelos, não seria recomendável. Como tais propriedades foram determinadas para amostras secas e na condição de uso as mesmas possivelmente estariam em contato com fluidos corpóreos, o alongamento das membranas durante sua utilização pode ser significativamente maior que o determinado devido à água exercer um efeito plastificante na estrutura, conforme observado por Rodrigues (2008) para membranas de quitosana e alginato. Curativos comerciais à base de celulose, como Membracel® destacam-se pela sua elevada elasticidade, porém não é comum a divulgação pelos fabricantes dos índices de alongamento na ruptura dos mesmos.

A adição dos surfatantes na formulação das membranas resultou na estabilização da espuma nos coacervados e, conseqüentemente, na formação de poros na estrutura do material. A presença desses poros acarretou em grande queda na resistência à ruptura. Bueno e Moraes (2011) também observaram baixa resistência mecânica em membranas de quitosana/alginato preparadas com a adição destes mesmos surfatantes. As autoras relataram que amostras com a presença de Tween 80 apresentaram resistência à ruptura de 1,54 MPa enquanto que as produzidas na presença do tensoativo Pluronic F68 sofreram ruptura na tensão de 0,98 MPa. Outros trabalhos descrevem a baixa resistência mecânica de materiais porosos usados na engenharia de tecidos. She e colaboradores (2008), por exemplo, reportaram valores entre 0,11 a 0,40 MPa para suportes à base de quitosana e fibra de seda.

Outro requisito muito importante para um material que se destina ao uso como suporte celular para aplicação na regeneração tecidual é a presença de espaços vazios em seu interior, o que possibilitaria o transporte dentro da matriz de nutrientes e metabólitos celulares. Estudos indicam que biomateriais destinados à aplicação na engenharia de tecidos devem apresentar

porosidade superior a 85% (Yang *et al.*, 2010; Kuo *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2003; Hutmacher, 2000). Para amostras destinadas ao uso como *scaffolds*, a análise do comportamento em meio de cultivo é, muitas vezes, mais relevante do que a verificação do seu desempenho em água. Uma adequada acomodação de meio de cultivo no interior do material facilitaria o acesso dos nutrientes até as células situadas nas porções mais internas do suporte e também a eliminação dos metabólitos produzidos.

Amostras preparadas sem adição de tensoativos apresentaram expansão volumétrica de 77 a 96%, com preenchimento correspondente a 78% do volume de meio de cultura total absorvido, enquanto que amostras preparadas adicionando-se Pluronic F68 apresentaram expansão tridimensional de 98 a 136%, preenchimento por meio de cultura correspondente a 34% do total absorvido pelo material, estando, em ambas as situações, o restante do meio de cultura mais fortemente ligado à estrutura das membranas. Destaca-se que a dimensão que mais foi alterada durante a hidratação das membranas em meio de cultivo foi a espessura. As amostras preparadas sem a adição dos tensoativos tiveram variações de, em média, 0,013 mm para 0,041 mm, enquanto aquelas obtidas na presença dos surfatantes variaram de, em média, 0,13 mm para 0,18 mm.

Estes resultados indicam que a adição do tensoativo Pluronic F68 tende a favorecer a absorção de meio de cultivo, indicando que o uso desse surfatante pode melhorar o acesso dos nutrientes presentes no meio de cultivo até os poros onde, idealmente, estarão alojadas as células durante a multiplicação celular na matriz. Uma análise similar é aplicável às matrizes preparadas na presença de Tween 80.

Além da caracterização físico-química de um curativo ou *scaffold* se faz necessária a avaliação de sua atividade citotóxica, uma vez que este material estará em contato direto inicialmente com as células neles inoculadas e, posteriormente, com o próprio organismo no qual o mesmo será implantado.

Os extratos das amostras preparadas com proporção polimérica 1:1 na ausência de surfatantes mostraram-se não citotóxicos para células L929, resultando em atividade metabólica similar à observada em presença do meio RPMI-1640 suplementado, usado como controle negativo. Já a adição do tensoativo Tween 80 na etapa de formulação das membranas causou

citotoxicidade elevada, próxima de 100%. No entanto, amostras preparadas utilizando-se Pluronic F68 apresentaram citotoxicidade baixa, em especial a formulação de proporção polimérica 1:1.

Uma vez que o caráter inócuo de materiais destinados ao uso como *scaffold* ou curativo dérmico é esperado, foi realizado um teste qualitativo de avaliação da resposta celular quando de sua exposição direta ao material. Os resultados obtidos neste ensaio corroboram os observados anteriormente para o ensaio MTT de toxicidade indireta. Amostras preparadas com adição de Tween 80 mostraram efeitos citotóxicos mais acentuados, notando-se zonas de lise sob as amostras superiores a 80%, estendendo-se para áreas adjacentes.

A elevada citotoxicidade das amostras preparadas com adição de Tween 80 pode estar relacionada a altas quantidades remanescentes deste surfatante nas amostras após a lavagem. O balanço hidrofílico-lipofílico (HBL) do Pluronic F68 é maior que o do Tween 80, 29 e 15, respectivamente (Sigma-Aldrich, 2011a e b), o que facilita a sua remoção na estrutura da membrana. Bueno e Moraes (2011b) testando diferentes concentrações de Tween 80 em membranas de quitosana/alginato observaram uma diminuição da citotoxicidade com a redução da quantidade do surfatante. As autoras relataram diminuição de 7,91% em membranas com 0,1% de tensoativo para 5,63% em membranas com 0,05% de Tween 80. A qualidade analítica do Tween 80 utilizado também pode ser uma das causas alta citotoxicidade observada, uma vez que este tensoativo não foi atestado pelo fornecedor como seguro para o cultivo de células animais, enquanto o Pluronic F68 o foi. Futuros testes poderão ser realizados diminuindo a proporção de Tween 80 durante a produção das membranas e também fazendo uso de um reagente mais específico para o cultivo celular.

Sakai e colaboradores (2001) testaram a adição destes mesmos surfatantes em meio de cultivo celular livre de soro suplementado com ácido fosfatídico (PA) para crescimento de células CHO (Chinese Hamster Ovary). Os resultados mostram que o Tween 80 causou uma baixa atividade promotora do crescimento quando usado acima da proporção Tween 80:PA de 0,5:1, enquanto que a adição do Pluronic F68 manteve esta atividade elevada mesmo na proporção 5:1 de Pluronic F68:PA.

Membranas de proporção polimérica X:Q igual a 1:1 preparadas na presença ou não do surfatante Pluronic F68 apresentaram baixa toxicidade direta, com zonas de lise inferiores a 20%,

limitando-se à região abaixo das amostras. Estes resultados comprovam não somente a não citotoxicidade do biomaterial, mas também o baixo impacto na cultura da degradação do mesmo quando imerso no meio, uma vez que estas membranas apresentaram elevados valores de perda de massa em meio de cultivo celular (33 e 17% respectivamente).

Vários estudos comprovam a ação benéfica do Pluronic F68 em culturas celulares. Kerleta *et al.* (2010), concluíram que além de ser um valioso complemento citoprotetor para meios de cultura, este tensoativo ainda aumenta a viabilidade e proliferação celular após procedimentos de congelamento/descongelamento. Clincke *et al.* (2011) adicionaram Pluronic F68 em cultivos de células CHO e comprovaram o estímulo do crescimento, o aumento da viabilidade e a redução da lise celular, além do aumento da produção de  $\gamma$ -interferon.

A análise dos resultados dos testes de citotoxicidade mostrou ainda que membranas com maior proporção da goma xantana em sua formulação apresentaram maiores índices de citotoxicidade, quando comparados às amostras com proporção polimérica equivalente. Possivelmente os tensoativos estariam mais fortemente aderidos à estrutura das matrizes poliméricas contendo mais xantana que quitosana, dificultando sua retirada nas sucessivas lavagens.

Testes de proliferação das células L929 inoculadas sobre as membranas de proporção polimérica X:Q igual a 1:1 com e sem adição de Pluronic F68 também foram realizados. As células inoculadas sobre as amostras cresceram e se multiplicaram. Porém, os valores obtidos para o grupo controle mostraram-se discretamente superiores aos resultados alcançados para ambos os materiais testados. A comparação das taxas específicas de crescimento celular dos três grupos mostra que o comportamento das células cultivadas somente sobre as membranas preparadas na presença de Pluronic F68 é estatisticamente diferente das do grupo controle em um nível de confiança de 95%. Enquanto as células cultivadas em placas de poliestireno apresentaram uma taxa de crescimento específico de  $0,0487 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ , as células cultivadas em membranas preparadas na ausência do surfatante alcançaram um valor de  $0,0464 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$  e as culturas desenvolvidas nas amostras obtidas na presença de Pluronic F68 chegaram a  $0,0404 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ . A recuperação de células a partir de dispositivos porosos não é um procedimento simples, assim, deve ser considerada a possibilidade de que a população celular nas membranas

pode ter sido subestimada em função da dificuldade de coleta das células que se desenvolveram no interior da estrutura da matriz.

Foram realizados testes suplementares utilizando o reagente MTT visando à quantificação da atividade celular. No entanto, este agente indicador do metabolismo celular também não é facilmente extraído das membranas, levando a leituras espectrofotométricas incorretas. Uma possível alternativa para aumentar a eficiência de remoção das células da membrana seria a substituição da tripsina/EDTA pela tripLE<sup>TM</sup>, um tipo de tripsina recombinante que pode permanecer em contato com as células por um período de tempo maior sem comprometer sua viabilidade. O uso de corantes fluorescentes como Hoescht que coram os núcleos celulares poderia ser uma alternativa viável para a quantificação das células aderidas no biomaterial. Outra opção para a quantificação da concentração e da viabilidade celular seria a realização de testes indiretos. Uma vez que as CTMs produzem colágeno durante o seu metabolismo, a quantificação deste composto através do uso de colagenase poderia fornecer dados suficientes para a determinação da atividade celular. Visto que não se dispunha dos reagentes citados ou das técnicas mencionadas para realizar tais análises, supôs-se, somente com base nos indícios já discutidos, que as membranas preparadas na proporção em massa de X:Q de 1:1 na presença ou ausência de Pluronic F68 poderiam ser consideradas promissoras para as aplicações propostas, dando-se então sequência ao estudo com a avaliação do comportamento de células-tronco mesenquimais sobre suas superfícies.

As micrografias das membranas com as células inoculadas indicaram que as CTMs aderiram satisfatoriamente em ambas as formulações de membranas. Observou-se a produção de matriz extracelular, mas notou-se também a presença de células arredondadas, com diâmetro variando entre 10 e 15  $\mu\text{m}$ . Este tipo de morfologia pode ser encarado como um indicativo de uma possível adesão e posterior desadesão, ou então de sofrimento celular, ou ainda de que o tratamento realizado para a fixação celular possa ter alterado a forma das células aderidas no material. Outra possível explicação para a presença destes tipos celulares seria a diferenciação condrogênica. Segundo Malafaya e colaboradores (2010), CTMs diferenciadas em condrócitos apresentam forma típica arredondada, com tamanho variável entre 10 e 15  $\mu\text{m}$  e apresentam como característica importante a liberação de matriz extracelular. Ao meio de cultivo utilizado neste ensaio não foi acrescentado qualquer tipo de indutor para este tipo de diferenciação, como

TGF- $\beta$  I e II ou insulina, porém, o soro fetal bovino, suplementado em 15% ao meio, pode conter um alto nível de TGF- $\beta$  (Oida e Weiner, 2010), podendo, então, atuar como fornecedor deste indutor de diferenciação. A realização de testes mais específicos para a comprovação da diferenciação celular se faz necessária, como o uso do método *real-time* PCR, que quantifica o colágeno tipo II, molécula característica produzida pelos condrócitos. Uma vez comprovada esta diferenciação, novas perspectivas se abrem para a aplicação deste biomaterial, como o uso na engenharia de tecido óssea e de cartilagem.

*Scaffolds* à base de quitosana aliados a compostos estimuladores de diferenciação presentes no meio de cultura têm se mostrado adequados para a cultura de CTMs diferenciadas em condrócitos, servindo de apoio para a diferenciação condrogênica tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008). Yang (2011) sugere ainda que suportes celulares contendo quitosana estimulam a produção de matriz extracelular e concentram, por adsorção, fatores que estimulam a diferenciação de CTMs.

Vários outros trabalhos descrevem o uso de matrizes à base de quitosana como suportes de adesão, proliferação e diferenciação de CTMs e relatam a influência da estrutura dos *scaffolds* na diferenciação condrogênica. Ragetly *et al.* (2010a) produziram matrizes fibrosas e esponjosas à base de quitosana e constataram que CTMs, cultivadas com meio condrogênico contendo TGF- $\beta$ 1, aderiram e se proliferaram em ambos os tipos, porém a condrogênese foi maior nas matrizes fibrosas. Em outro estudo Ragetly e colaboradores (2010b) produziram *scaffolds* fibrosos de quitosana revestidos ou não por colágeno tipo II e testaram a adesão e a diferenciação condrogênica de CTMs murinas em meio condrogênico. Os autores concluíram que as células aderiram e se diferenciaram em ambas as matrizes testadas, sendo mais satisfatório o crescimento nas matrizes revestidas com colágeno.

Os resultados observados nos ensaios de adesão e proliferação de CTMs para ambas as formulações (1A e 1E) demonstraram que estas membranas são adequadas para a aplicação na engenharia de tecidos. Porém, a formulação 1A, devido à sua transparência antes e após a inoculação celular, à sua menor espessura e à adequada integridade superficial mostrou-se mais apropriada para a aplicação como curativo dérmico bioativo, sendo esta membrana escolhida para ser utilizada no ensaio piloto *in vivo*.

Tal ensaio mostrou que o grupo tratado com as matrizes inoculadas com CTMs (GR03) de ratos foi o que apresentou resultados mais satisfatórios quanto à cicatrização de feridas cirúrgicas. Quando a área das feridas em pixels fornecida pelo programa *Image J* foi usada para o cálculo da porcentagem de cicatrização, pôde-se verificar que o processo de reepitelização do grupo GR03 foi significativamente maior que o do grupo tratado com membranas sem células aderidas (GR02) e o do grupo controle (GR01) que não recebeu nenhum tratamento.

A membrana isolada, no entanto, não apresentou resultados satisfatórios de cicatrização, uma vez que o grupo tratado com esta formulação não se diferenciou de maneira significativa do grupo controle. É provável que, em um ambiente laboratorial, a função de proteção exercida pelas membranas não seja fundamental, já que se trata de um ambiente protegido e higienizado, menos sujeito a contaminações. Outro ponto a ser levantado é que a utilização da membrana para a cobertura da lesão implica na adição de uma barreira adicional à permeação de gases de e para a ferida. Membranas de quitosana isolada e de quitosana complexada com alginato têm baixa permeabilidade a oxigênio (Dallan, 2005; Rodrigues, 2008), o que pode ser também o caso das membranas de quitosana e xantana testadas. A baixa disponibilidade de oxigênio combinada à ausência de células-tronco para propiciar a mais rápida recuperação do tecido podem ter contribuído para retardar a cicatrização no caso da formulação testada. Além disso, supõe-se que o crescimento celular favoreça a degradação da membrana, facilitando a troca gasosa à medida que o novo tecido é formado.

Diante do exposto, membranas preparadas na proporção polimérica X:Q igual a 1:1, produzidas na ausência de surfatantes e desaeradas a vácuo, mostram-se viáveis para a aplicação na engenharia de tecidos, sendo indicadas para a utilização como curativo dérmico bioativo contendo CTMs. No entanto, novos ensaios *in vivo*, analisando-se tempos de tratamento mais curtos e mais longos, além do uso de um maior número de animais e a aplicação de células-tronco mesenquimais diretamente na lesão sem o uso de membranas, devem ser realizados para que se comprove a eficácia deste biomaterial.

A formulação 1E, preparada na presença do surfatante Pluronic F68, também se mostrou viável para a aplicação na engenharia de tecidos, porém estudos *in vitro* e *in vivo* mais aprofundados ainda deverão ser realizados para que se possa especificar sua aplicação.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para as membranas de xantana e quitosana complexada indicam que a procedência da xantana não interferiu de maneira significativa nas propriedades dos materiais obtidos. Membranas preparadas com goma xantana produzida em escala piloto com tecnologia nacional, mostraram-se promissoras, com propriedades favoráveis para a aplicação na engenharia tecidual.

A proporção polimérica e a adição ou não de tensoativos interferem na espessura, na capacidade de absorção de soluções aquosas, na estabilidade frente à exposição a estas soluções e na citotoxicidade destes materiais. Membranas preparadas sem a adição de tensoativos diferiram na espessura e na transparência, sendo obtidas amostras mais espessas e opacas quando não realizada a desaeração.

Membranas com maior proporção de xantana (X:Q igual a 1,5:0,5) não se mantêm estáveis frente a exposições por longos períodos em meio de cultura para crescimento de células animais, não se recomendando, assim, o uso desta formulação como suporte para o crescimento celular visando a aplicações na engenharia de tecidos.

A adição do tensoativo Pluronic F68 na formulação preparada na razão X:Q igual a 1:1 implicou na obtenção de membranas espessas, com poros intercomunicantes e de tamanhos adequados para a aplicação na engenharia tecidual, apresentando citotoxicidade *in vitro* desprezível, caráter não mutagênico e adequada estrutura para a adesão e desenvolvimento de CTMs.

Membranas com proporção polimérica X:Q igual a 1:1 preparadas sem adição de tensoativos e incluindo-se a etapa de desaeração a vácuo (formulação 1A) revelaram-se ideais para a aplicação como curativos dérmicos bioativos, apresentando adequada espessura, transparência e integridade superficial, elevada absorção de fluidos corpóreos e resistência à tração, além de não se mostrarem citotóxicas ou mutagênicas e de permitirem a adesão e proliferação de CTMs. Tal formulação apresentou ação aceleradora do processo de cicatrização de lesões cutâneas ulceradas em ensaios realizados *in vivo* em ratos submetidos a lesões cirúrgicas.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade aos estudos nesta linha de atuação, recomenda-se:

- a realização de testes de adesão e diferenciação *in vitro* de CTMs nas membranas de formulação 1A e 1E utilizando meios condrogênicos contendo TGF- $\beta$  e insulina;
- a avaliação do comportamento *in vivo* das membranas preparadas na presença de Pluronic F68.
- a expansão da análise *in vivo* do desempenho dos dispositivos desenvolvidos neste trabalho, fazendo uso de maior número de animais, usando células indiferenciadas e diferenciadas em condrócitos;
- a realização de testes clínicos em humanos.

## 8. BIBLIOGRAFIA

ABDI, R.; FIORINA, P.; ADRA, C.N.; ATKINSON, M.; SAYEGH, M.H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells A Potential Therapeutic Strategy for Type 1 Diabetes. *Diabetes*, v. 57, p. 1759-1767, 2008.

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

ADEKOGBE, I.; GHANEM, A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, p. 7241–7250, 2005.

ALVES DA SILVA, M. L.; CRAWFORD, A.; MUNDY, J. M.; CORRELO, V. M.; SOL, P.; BHATTACHARYA, M.; HATTON, P. V.; REIS, R. L.; NEVES, N. M. Chitosan/polyester-based scaffolds for cartilage tissue engineering: assessment of extracellular matrix formation. *Acta Biomaterialia*, v.6, p.1149-1157, 2010.

American Society for Testing and Materials ASTM F813-83: . Standart practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices, 1983.

American Society for Testing and Materials ASTM F895-84: Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity, 1984.

American Society for Testing and Materials ASTM D882–95a: Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, 1995.

AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.70, p. 782-786, 1973.

ARGIN-SOYSAL, S.; KOFINAS, P.; LO, Y. L. Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 202–209, 2009.

ARTURSSON, P.; LINDMARK, T.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells. *Pharmaceutical Research*, v.11, p.1358-1361, 1994

ASTI, A. L.; BARBANTI, S. H.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis como suporte para cultura de células na engenharia de tecidos: estudo da degradação in vitro. *XIII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP*, 2005.

ATALA, A. Advances in tissue and organ replacement. *Current Stem Cell Research & Therapy*. v.3, p.21-31, 2008.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.15, n.1, p.13-21, 2005.

BARRY, F.; BOYNTON, R. E.; LIU, B.; MURPHY, J. M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Experimental Cell Research*, v.268, p.189-200, 2001.

BAOYONG, L.; JIAN, Z.; DENGLONG, C.; MIN, L. Evaluation of a new type of wound dressing made from recombinant spider silk protein using rat models. *Burns*, v.36. p.891-896, 2010.

BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.50, p.145-152, 1998.

BEJENARIU, A.; POPA, M.; CERF, D. L.; PICTON, L. Stiffness xanthan hydrogels: synthesis, swelling characteristics and controlled release properties. *Polymer Bulletin*, v. 61, p. 631–641, 2008.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.19–34, 2004.

BHAT, S. V. Overview of Biomaterials. In: BHAT, S. V. *Biomaterials*. New Delhi, India: Narosa Publishing House, 2nd, p.279, 2005.

BOSNARDO, C.A.F. *Análise clínica prospectiva randomizada aberta, para o tratamento das úlceras de venosas, através da terapia celular com o enxerto de queratinócitos autólogos; comparada em dois grupos, associado ou não, a Diosmina Hesperidina Micronizada*. Tese (Doutorado em Cirurgia). Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

BRADBURY, J. F. Xanthomonas dowson. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Willians & Wilkins, v.1, p.199-210, 1984.

BUENO, C.; MORAES, A.M. Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: effect of different surfactants on biomaterial properties. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 122, p.624-631, 2011.

BUENO, C.; MORAES, A.M. Membranas porosas de quitosana-alginato preparadas com diferentes surfatantes não-iônicos. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011.

BUENO, C. Z. *Influência do tipo de estratégia de reforço das propriedades mecânicas nas características de membranas de quitosana e alginato projetadas para o recobrimento de lesões de pele*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

CALIL, J. A; FERREIRA, L. M.; NETO, M. S.; DE CASTILHO, H. T., GARCIA, E. B. Aplicação clínica do retalho fásquio-cutâneo da região posterior da coxa em V-Y. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.47, p.311-319, 2001.

CAMPOS, M. G. N.; RAWLS, H. R.; INNOCENTINI-MEI, L. H.; SATSANGI, N. *In vitro* gentamicin sustained and controlled release from chitosan cross-linked films. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.20, p.537–542, 2009.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. v. 22, p. 261-268, 2001.

CHELLAT, F.; TABRIZIAN, M.; DUMITRIU, S.; CHORNET, E.; MAGNY, P.; RIVARD, C. H.; YAHIA, L. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of chitosan-xanthan polyonic complex. *Journal Biomedical Material Research*, v. 51, p. 107-116, 2000.

CHEN, K. Y.; LIAO, W. J.; KUO, S. M.; TSAI, F. J.; CHEN, Y. S.; HUANG, C. Y.; YAO, C. H. Asymmetric chitosan membrane containing collagen I nanospheres for skin tissue engineering. *Biomacromolecules*, v.10, p.1642-1649, 2009.

CHEONG, H. I.; JOHNSON, J.; CORMIER, M.; HOSSEINI, K. *In vitro* cytotoxicity of eight beta-blockers in human corneal epithelial and retinal pigment epithelial cell lines: comparison with epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. *Toxicology In Vitro*, v.22, p.1070-1076, 2008.

CHESNUTT, B. M.; VIANO, A.M.; YUAN, Y.; YANG, Y.; GUDA, T.; APPLEFORD, M. R.; ONG, J. L.; HAGGARD, W. O.; BUMGARDNER, J. D. Design and characterization of a novel chitosan/nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v.88, p.491-502, 2009.

CHIOU, C. J.; TSENG, L. P.; DENG, M. C.; JIANG, P. R.; TASI, S. L.; CHUNG, T. W.; HUANG, Y. Y.; LIU, D. Z. Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in chickens. *Biomaterials*, v.30, p.5862-5868, 2009.

CLINCKE, M.; GUEDON, E.; YEN, F. T.; OGIER, V.; ROITEL, O.; GOERGEN, J. Effect of surfactant Pluronic F-68 on CHO cell growth, metabolism, production, and glycosylation of human recombinant IFN- $\gamma$  in mild operating conditions. *Biotechnology Progress*, v. 27, n. 1, 2011.

COSTA-JÚNIOR, E. S.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.20, p. 553-561, 2009.

COVAS, D.T.; PANEPUCCI, R.A.; FONTES, A.M.; SILVA JR., W.A.; ORELLANAA, M.D.; FREITAS, M.C.C.; NEDER, L.; SANTOS, A.R.D.; PERES, L.C.; MARIA C. JAMUR, M.C.; ZAGO, M.A. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share

functional properties and gene-expression profile with CD146<sup>+</sup> perivascular cells and fibroblasts. *Experimental Hematology*, v. 36, p. 642–654, 2008.

COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; MARIANECCI, C.; ALHAIQUE, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release*, v. 119, p. 5-24, 2007.

CRISAN, M.; YAP, S.; CASTEILLA, L.; CHEN, C.W.; PARK, T.S.; ANDRIOLO, G.; SUN, B.; ZHENG, B.; ZHANG, L.; NOROTTE, C.; TENG, P.N.; TRAAS, J.; SCHUGAR, R.; DEASY, B.M.; BADYLAK, S.; BUHRING, H.J.; GIACOBINO, J.O.; LAZZARI, L.; HUARD, J.; PÉAULT, B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, v. 3, p. 301–313, 2008.

CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química Nova*, v.32, p.649-660, 2009.

DALLAN, P. R. M. *Síntese e Caracterização de Membranas de Quitosana para Aplicação na Regeneração de Pele*. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

DALLAN, P. R. M.; MOREIRA, P. L.; PETINARI, L.; MALMONGE, S. M.; BEPPU, M. M.; GENARI, S. C.; MORAES, A. M. Effects of chitosan solution concentration and incorporation of chitin and glycerol on dense chitosan membrane properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 80, p.394-405, 2007.

DEMING, T. J. Synthetic polypeptides for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v.32, p858-875, 2007.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K. MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J. HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n.4, p.315-317, 2006.

DUMITRIU, S. Polysaccharides as biomaterials. In: DUMITRIU, S. *Polymeric Biomaterials*. 2<sup>a</sup> Edição, University of Sherbrooke, Quebec, Canada. Marcel Dekker, New York, p.1-61, 2002.

EFTAIHA, A.F.; EL-BARGHOUTHY, M.I.; RASHID, I.S.; AL-REMAWI, M.M. Compressibility and compactibility studies of chitosan, xanthan gum, and their mixtures. *Journal of Materials Science*, v.44, p. 1054-1062, 2009.

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

FLORCZYK, S. J.; KIM, D.; WOOD, D. L.; ZHANG, M. Influence of processing parameters on pore structure of 3D porous chitosan–alginate polyelectrolyte complex scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 98A, p. 614-620, 2011.

FOSTER, L.J.R.; BUTT, J. Chitosan films are NOT antimicrobial. *Biomedical and Life Sciences*, v. 33, n.2, p. 417-421, 2011.

FRESHNEY, R. I. *Animal cell culture – A Practical Approach*, IRL Press, p.329, 1989.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, v.16, p.381-390, 1966.

FUKUDA H, KIKUCHI Y. Polyelectrolyte complexes of chitosan with carboxymethyl dextran. *Bull Chemical Soc Japan*, v.51, p.1142-1144, 1978.

- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, v.18, p.549-579, 2000.
- GHAZIZADEH, S.; TAICHMAN, L.B. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *The European molecular biology organization journal*, v.20, n.6, p.1215-1222, 2001.
- GEORGE, J.; ONODERA, J.; MIYATA, T. Biodegradable honeycomb collagen scaffold for dermal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, v.87, p. 1103-1111, 2008.
- GEORGE M.; ABRAHAM T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14, 2006.
- GIGOUT, A.; BUSCHMANN, M. D.; JOLICOEUR, M. The Fate of Pluronic F-68 in chondrocytes and CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 100, n. 5, 2008.
- GRAGNANI, A.; MORGAN, J. R.; FERREIRA, L. M. Experimental model of cultured keratinocytes. *Acta Cirurgica Brasileira* [online], v. 18, p. 4-14, 2003.
- GUENOU, H.; NISSAN, X.; LARCHER, F.; FETEIRA, J.; LEMAITRE, G.; SAIDANI, M.; DEL RIO, M.; BARRAULT, C. C.; BERNARD, F. X.; PESCHANSKI, M.; BALDESCHI, C.; WAKSMAN, G. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *The Lancet*, v.374, p.1745-1753, 2009.
- HANSEN, B. & JEMEC, G.B. The mechanical properties of skin in osteogenesis imperfecta. *Archives of dermatology*, v. 138, n. 7, p. 909-10011, 2002.
- HILLGREN, A.; EVERTSSON, H.; ALDÉN, M. Interaction between lactate dehydrogenase and Tween 80 in aqueous solution. *Pharmaceutical Research*, v. 19, n. 4, p. 504-510, 2002.
- HON, D. N. S. Chitin and chitosan: medical applications. In: DUMITRIU, S. (Ed) *Polysaccharides in Medical Applications*. University of Sherbrooke, Quebec, Canada. Marcel Dekker, New York, p.631-649, 1996.

HOU, Y.; SCHOENER, C. A.; REGAN, K. R.; MUNOZ-PINTO, D.; HAHN, M. S.; GRUNLAN, M. A. Photo-cross-linked PDMSstar-PEG hydrogels: synthesis, characterization, and potential application for tissue engineering scaffolds. *Biomacromolecules*, v.11, p.648-656, 2010.

HUSS, F. R. M.; NYMAN, E.; GUSTAFSON, C.; GISSELFÄLT, K.; LILJENSTEN, E.; KRATZ, G. Characterization of a new degradable polymer scaffold for regeneration of the dermis: *In vitro* and *in vivo* human studies. *Organogenesis*, v. 4, n. 3, p. 195-200, 2008.

HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterial*, v.21, p.2529-2543, 2000.

IKADA, Y. Membranes as biomaterials. In: DUMITRIU, S. *Polysaccharides in Medical Applications*. Marcel Dekker, New York, p.663, 1996.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface*, v. 3, p. 589–601, abril 2006.

ISO10993-1: Biological evaluation of medical devices – Evaluation and testing, 2003.

ISO10993-3: Biological evaluation of medical devices – Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity, 1992.

ISO10993-5: Biological evaluation of medical devices – Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 1992.

ISO10993-12: Sample Preparation and Reference Materials, 2007.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, v.45, p.275-282, 1975.

JIANG, T.; NUKAVARAPU, S. P.; DENG, M.; JABBARZADEH, E.; KOFRON, M. D.; DOTY, S. B.; ABDEL-FATTAH, W. I.; LAURENCIN, C. T. Chitosan-poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering: *In vitro* degradation and *in vivo* bone regeneration studies. *Acta Biomaterialia*, v.6, p.3457-3470, 2010.

JUANG, R. S.; JU, C. Y. Equilibrium sorption of copper(II) – ethylenediaminetetraacetic acid chelates onto cross-linked, polyaminated chitosan beads. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.36, p.5403-5409, 1997.

KANG, S.K.; PUTNAM, L.A.; YLOSTALO, J.; POPESCU, I.R.; DUFOUR, J.; BELOUSOV, A.; BUNNELL, B.A. Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. *Journal of Cell Science*, v. 117, p. 4289-4299, 2004.

KARAKECILI, A. G.; DEMIRTAS, T. T.; SATRIANO, C.; GÜMÜSDERELIOGLU, M.; MARLETTA, G. J. Evaluation of L929 fibroblast attachment and proliferation on Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)-immobilized chitosan in serum-containing/serum-free cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v.104, p.69-77, 2007.

KENNEDY, J. F.; BRADSHAW, I, J. Production, properties and applications of xanthan, In BUSHELL, M.E. *Progress in industrial microbiology*, Elsevier, p.495-498, 1984.

KEONG, L. C.; HALIM, A. S. *In vitro* models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan derivatives in wound management. *International Journal of Molecular Sciences*, v.10, p.1300-1313, 2009.

KERLETA, V.; ANDRLIK, I.; BRAUNMÜLLER, S.; FRANKE, T.; WIRTH, M.; GABOR, F. Poloxamer 188 supplemented culture medium increases the vitality of caco-2 cells after subcultivation and freeze/thaw cycles. *Altex*, n. 27, p. 191-197, 2010.

KIKUCHI Y, FUKUDA H. Polyelectrolyte complexes of sodium dextran sulfate with chitosan. *Makromol Chemical*, v.175, p.3593-3596, 1974.

KIKUCHI Y, NODA A. Polyelectrolyte complexes of heparin with chitosan *Journal of Applied Polymer Science*, v.20, p.2561-2563, 1976.

KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 24, p. 721-734, 1990.

KONG, L.; AO, Q.; WANG, A.; GONG, K.; WANG, X.; LU, G.; GONG., Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 22, p. 223-239, 2007.

KUCHARSKA, M.; NIEKRASZEWICZ, A.; WIŚNIEWSKA-WRONA, M.; BRZOZAMALCZEWSKA, K. Dressing sponges made of chitosan and chitosan-alginate fibrils. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, v. 16, n.3, p. 109-113, 2008.

KUO, Y.C.; LIN, C.Y. Effect of genipin-crosslinked chitin–chitosan scaffolds with hydroxyapatite modifications on the cultivation of bovine knee chondrocytes. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 95, p. 132–144, 2006.

KUO, Y.; YEH, C.; YANG, J. Differentiation of bone marrow stromal cells in poly(lactide-co-glycolide)/chitosan scaffolds. *Biomaterials*, v. 30, p. 6604–6613, 2009.

KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, v.59, p.17- 20, 1998.

LAI, H. L.; ABU'KHALIL, A.; CRAIG, D. Q. M. The preparation and characterization of drugloaded alginate and chitosan sponges. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 251, p. 175-181, 2003.

LAMB, J. F.; MACKINNON, M. G. A. Effect of ouabain and metabolic inhibitors of the Na and K movements and nucleotide contents of L-cells. *The Journal of Physiology*, v.213, p.665, 1971.

LEVENBERG, S.; HUANG, N. F.; LAVIK, E.; ROGERS, A. B.; ELDOR, J. I.; LANGER, R. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, n.22, p.12741-12746, 2003.

LIANG, R.; PENG, H.; QIU, J. Fabrication, characterization, and application of potentiometric immunosensor based on biocompatible and controllable three-dimensional porous chitosan membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.320, p.125-131, 2008.

- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Ed. Edgard Blucher, Brasil, v.3, 2001.
- LI, L. H.; DENG, J. C.; DENG, H. R.; LIU, Z. L.; XIN, L. Synthesis and characterization of chitosan/ZnO particle composite membranes. *Carbohydrate Research*, v.345, p. 994-998, 2010.
- LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSKA, J. T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chemical Engineering Research and Design*, v.85, p.1051-1064, 2007.
- LIU, T. L.; MIAO, J. C.; SHENG, W. H.; XIE, Y. F.; HUANG, Q.; SHAN, Y. B.; YANG, J. C. Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing. *Journal of Zhejiang University Science B*, v.11, p.10-16, 2010.
- MA, J.; WANG, H.; HE, B.; CHEN, J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials*, v. 22, p. 331-336, 2001.
- MACHADO, J. L. M.; BENDEROVICS, G.; SANTOS, L. A. Obtenção de suporte para engenharia de tecidos utilizando-se cimento de  $\alpha$ -trifosfato de cálcio ( $\alpha$ -TCP). 17<sup>o</sup> CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2006.
- MACLEOD, G. S.; COLLETT, J. H.; FELL, J. T. The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *Journal of Controlled Release*, v. 58, p. 303–310, 1999.
- MALAFAYA, P.B.; OLIVEIRA, J.T.; REIS, R.L. The Effect of Insulin-Loaded Chitosan Particle Aggregated Scaffolds in Chondrogenic Differentiation. *Tissue Engineering: Part A*, v. 16, n. 2, p.735-747, 2010.
- MAO, J.S.; ZHAO, L.G.; YIN, Y.J.; YAO, K.D. Structure and properties of bilayer chitosan–gelatin scaffolds. *Biomaterials*. v. 24, p. 1067–1074, 2003.
- MARRECO, P. R.; MOREIRA, P. L.; GENARI, C. S.; MORAES, A. M.. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan

membranes used as wound dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 71B, p. 268-277, 2004.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.78, p.7634-7638, 1981.

MEIRELLES, L. S.; CAPLAN, L.; NARDI, N. B. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v. 26, p. 2287–2299, 2008.

MELTON, D. A.; COWAN, C. *Stemness: Definitions, criteria and standards*. In: LANZA, R. *Handbook of Stem Cells*, New York; Elsevier/Academic Press, v.1, p.25-31, 2004.

MENG, X.; TIAN, F.; YANG, J.; CHUN-NIAN, H.; XING, N.; LI, F. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, n. 5, p. 1751-1759, 2010.

METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. Skin stem and progenitor cells: using regeneration as a tissue-engineering strategy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.65, p.24-32, 2008.

MI, F. L.; SHYU, S. S.; WU, Y. B.; LEE, S. T.; SHYONG, J. Y.; HUANG, R. N. Fabrication and characterization of sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*, v. 22, p. 165-173, 2001.

MI, F. L.; WU, Y. B.; SHYU, S. S.; CHAO, A. C.; LAI, J. Y.; SU, C. C. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. *Journal of Membrane Science*, v. 212, p.237-254, 2003.

MIYAGUTI, R. M. *Remoção de Fenol de Soluções Aquosas através da Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada em Quitosana*. Monografia apresentada para conclusão do curso de Bacharelado em Biotecnologia – Universidade Estadual Paulista - UNESP, 2008.

MOHAN, N.; NAIR, P. A synthetic scaffold favoring chondrogenic phenotype over a natural scaffold. *Tissue Engineering: Part A*, v.16, n.2, p. 373-384, 2010.

- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, v.455, p.29-60, 2000.
- MORTAZAVI, V.; NAHRKHALAJI, M. M.; FATHI, M. H.; MOUSAVI, S. B.; ESFAHANI, B. N. Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v.94,p.160-168, 2010.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, v.65, p. 55-63, 1983.
- NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para produção de goma xantana por *X.campestris* C7L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.21, p.82-85, 2001.
- NORTHUP, S. J. Mammalian cell culture models in handbook of biomaterials evaluation. In: RENUN, A. F. (Ed) *Scientific, technical and clinical testing of implant material*. p.209-225, 1986.
- OECD Guideline for testing of chemicals. Bacterial Reverse Mutation Test. 471, 11p., 1997.
- OIDA, T.; WEINER, H.L. Depletion of TGF- $\beta$  from fetal bovine serum. *Journal of Immunological Methods*, v. 362(1-2), p. 195-198, 2010.
- OLIVEIRA, C.G. *Avaliação do Potencial Terapêutico das Células-Tronco Mesenquimais em Feridas Ocasionadas por Queimaduras em Ratos*. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- OSORIO, R.M.; HEFTI, A.; VERTUCCI,F.J.; SHAWLEY, A.L. Cytotoxicity of endodontic materials. *Journal of Endodontic*, v. 24, p. 91-96, 1998.
- ÖZTÜRK, E.; AĞALAR, C.; KEÇECI, K.; DENKBAŞ, E.B. Preparation and characterization of ciprofloxacin-loaded alginate/chitosan sponge as a wound dressing material. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 101, p. 1602-1609, 2006.

PAULO, N.M.; SILVA, M.S.B.; MORAES, A.M.; RODRIGUES, A.P.; MENEZES, L.B.; MIGUEL, M.P.; LIMA, F.G.; FARIA, A.M.; LIMA, M.L. Use of Chitosan Membrane Associated With Polypropylene Mesh to Prevent Peritoneal Adhesion in Rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 91B, p.221-227, 2009.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v.284, p. 143-147, 1999.

POPA, N.; NOVAC, O.; PROFIRE, L.; LUPUSORU, C. E.; POPA, M. I. Hydrogels based on chitosan-xanthan for controlled release of theophylline. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.21, p.1241-1248, 2010.

PRETÉ, P.S.C. *Solubilização de Membranas de Eritrócitos por Surfatantes da Série Tween*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

QUINN, F. X.; Xanthan Gum. In: SALAMONE, J.C. *Concise Polymeric Materials Encyclopedia*, Boca Raton, p.1652-1653, 1999.

RAGETLY, G. R.; GRIFFON, D. J.; LEE, H. B.; FREDERICKS, L. P.; GORDON-EVANS, W.; CHUNG, Y. S. Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Acta Biomaterialia*, v.6, p.1430-1436, 2010a.

RAGETLY, G. R.; GRIFFON, D. J.; CHUNG, Y. S. The effect of type II collagen coating of chitosan fibrous scaffolds on mesenchymal stem cell adhesion and chondrogenesis. *Acta Biomaterialia*, v.6, p.3988-3997, 2010b.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. *Biomaterials science, an introduction to materials in medicine*. San Diego, Estados Unidos: Academic Press, 1996

REHDER, J.; SOUTO, L. R. M.; ISSA, C. M. B. M.; PUZZI, M. B. Model of human epiderms reconstructed in vitro with keratinocytes and melanocytes on dead d-epidermized human dermis. *São Paulo Medical Journal*, v.122, p.22-25, 2004.

REYES, M.A.; DUDEK, B.; JAHAGIRDAR, B.; KOODIE, L.; MARKER, P.H.; VERFAILLE. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *Journal of Clinical Investigation*, v. 109, p. 337-346, 2002.

RHEIN, L.D.; SCHLOSSMAN, M.; O'LENICK, A.; SOMASUNDARAN, P. Surfactants in personal care products and decorative cosmetics. 3<sup>a</sup> ed. Surfactant series v. 135. New York, Estados Unidos: CRC Press, Taylor and Francis, 2007.

RIBEIRO-PAES, J. T.; BILAQUI, A.; GRECO, O. T.; RUIZ, M. A.; ALVES-DE-MORAES, L. B.; FARIA, C. A.; STESSUK, T. Cell therapy in pulmonary diseases: are there perspectives? *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.31, p.140-148, 2009.

RODRIGUES, A. P.; SANCHEZ, E. M. S.; COSTA, A. C.; MORAES, A. M. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science*, v.109, p. 2703-2710, 2008.

RODRIGUES, A. P. *Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões*. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, julho de 2008.

SAKAI, K.; HAYASHI, C.; HIDEKI, Y., FUKUDA, H. Use of nonionic surfactants for effective supply of phosphatidic acid in serum-free culture of Chinese hamster ovary cells. *Journal of Bioscience and bioengineering*, v.92, p.256-261, 2001.

SALGADO, C. L. *Avaliação da Biocompatibilidade de Biovidro Ativo Poroso – BG60S*. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

SANFORD, K. K.; EARLE, W. R.; LIKELY, G. D. The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. *Journal of the National Cancer Institute*, v.9, p.229-246, 1948.

SANTANDER-ORTEGA, M.J.; JÓDAR-REYES, A.B.; CSABA, N.; BASTOS-GONZÁLES, D. Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 302, p. 522–529, 2006.

SANTOS Jr., A. Cultura de Células Vero sobre polímeros bioabsorvíveis à base de poli-L-ácido láctico. Campinas: Instituto de Biologia, UNICAMP, 2001. Tese (Doutorado), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

SASAKI, M.; ABE, R.; FUJITA, Y.; ANDO, S.; INOKUMA, D.; SHIMIZU, H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of Immunology*, v.180, p.2581-2587, 2008.

SATO, Y.; ARAKI, H.; KATO, J.; NAKAMURA, K.; KAWANO, Y.; KOBUNE, M.; SATO, T.; MIYANISHI, K.; TAKAYAMA, T.; TAKAHASHI, M.; TAKIMOTO, R.; IYAMA, S.; MATSUNAGA, T.; OHTANI, S.; AKIHIRO MATSUURA, A.; HAMADA, H.; NIITSU, Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, v. 106, n. 2, p. 756-763, 2005.

SERRANO, M. C.; PAGANI, R.; PEÑA, J.; PORTOLÉS, M. T. Transitory oxidative stress in L929 fibroblasts cultured on poly(epsilon-caprolactone) films. *Biomaterials*, v.26, p.5827-34, 2005.

SHE, Z.; JIN, C.; HUANG, Z.; ZHANG, B.; FENG, Q.; XU, V. Silk fibroin/chitosan scaffold: preparation, characterization, and culture with HepG2 cell. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.19, p.3545-3553, 2008.

SHOICHET, M. S. Polymer scaffolds for biomaterials applications. *Macromolecules*, v.43, p.581-591, 2010.

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

SILVA JUNIOR, H.; BOROJEVIC, R. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, J. R.(Eds) *Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica*. Editora Roca, São Paulo, 2007.

SILVA, S. S. *Processing and Surface Modification of Novel Naturalorigin Architectures Aimed for Biomedical Applications*. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Materiais), Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.

SILVA, M. L. A.; CRAWFORD, A.; MUNDY, J. M.; CORRELO, V. M.; SOL, P.; BHATTACHARYA, M.; HATTON, P. V.; REIS, R. L.; NEVES, N. M. Chitosan/polyester-based scaffolds for cartilage tissue engineering: assessment of extracellular matrix formation. *Acta Biomaterialia*, v. 6, p. 1149-1157, 2010.

SIGMA-ALDRICH. Tween®80 P1754. Disponível em: <[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=P1754|SIAL&N5=ProductNo.|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=P1754|SIAL&N5=ProductNo.|BRAND_KEY&F=SPEC)>. Acesso em Setembro/2011a.

SIGMA-ALDRICH. Pluronic®F-68 P1300. Disponível em: <[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=P1300|SIGMA&N5=ProductNo.|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=P1300|SIGMA&N5=ProductNo.|BRAND_KEY&F=SPEC)>. Acesso em Setembro/2011b.

SMITH, I. O.; LIU, X. H.; MA, P.X. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 1, p. 226-236, 2009.

SOUTO, L. R. M.; REHDER, J.; VASSALO, J.; CINTRA, M. L.; KRAEMER, M. H. S.; PUZZI, M. B. Model for human skin reconstructed *in vitro* composed of associated dermis and epidermis. *Sao Paulo Medical Journal*, v.124, p.71-76, 2006.

SOUTO, L. R. M.; VASSALLO, J.; REHDER, J.; PINTO, G. A.; PUZZI, M. B. Immunoarchitectural characterization of a human skin model reconstructed *in vitro*. *Sao Paulo Medical Journal*, v.127, p.28-33, 2009.

STANKOWSKI, J. D.; MUELLER, B. E.; ZELLER, S. G. Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. *Carbohydrate Research*, v.241, p.321-326, 1993.

STERN-STRAETER, J.; RIEDEL, F.; BRAN, G.; HÖRMANN, K.; GOESSLER, U.R. Advances in skeletal muscle tissue engineering. *In vivo*, v.21, p. 435-444, 2007.

SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L.(Eds), *Xanthomonas*. Chapman & Hall, Londres, p.363-388, 1993.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 6, p. 311-324, 2009.

TAKEUCHI, A.; KAMIRYOU, Y.; YAMADA, H.; ETO, M.; SHIBATA, K.; HARUNA, K.; NAITO, S.; YOSHIKAI, Y. Oral administration of xanthan gum enhances antitumor activity through toll-like receptor 4. *International Immunopharmacology*, v.9, p.1562-1567, 2009.

UYGUN, B. E.; BOU-AKL, T.; ALBANNA, M.; MATTHEW, H. W. Membrane thickness in an important variable in membrane scaffolds: influence of chitosan membrane structure on the behavior of cells. *Acta Biomaterialia*, v. 6, p. 2126-2131, 2010.

VACANTI, C. A. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Engineering*, v.12, p.1137-1142, 2006.

VARGHESE, V. M.; RAJ, V.; SREENIVASAN, K.; KUMARY, T. V. *In vitro* cytocompatibility evaluation of a thermoresponsive NIPAAm-MMA copolymeric surface using L929 cells. *Journal of Materials Sciences: Materials in Medicine*, v.21,p.1631-1639, 2010.

VEIGA, I. G. e MORAES A.M. Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, no prelo. DOI:10.1002/app.35526

VENDRUSCOLO, C. W.; ANDREAZZA, I. F.; GANTER, J. L.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T. M. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. *International Journal of Pharmaceutics*, v.296, p.1-11, 2005.

VERFAILLE, C. M. Adult stem cells: tissue specific or not? In: *Handbook of stem cells. Adult and fetal stem cells*. Londres, Elsevier/Academic Press, v.2, p.1-20, 2004.

WAN, Y.; WU, Q.; WANG, S.; ZHANG, S.; HU, Z. Mechanical properties of porous polylactide/chitosan blend membranes. *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 292, p. 598-607, 2007.

- WANG, L.; KHOR, E.; LIM, L.Y. Chitosan-alginate-CaCl<sub>2</sub> system for membrane coat application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.90, p.1134-1142, 2001.
- WANG, L.; KHOR, E.; WEE, A.; LIM, L.Y. Chitosan-alginate PEC membrane as wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 63, p. 610-618, 2002.
- WANG, G.; AO, Q.; GONG, K.; WANG, A.; ZHENG, L.; GONG, Y.; ZHANG, X. The effect of topology of chitosan biomaterials on the differentiation and proliferation of neural stem cells. *Acta Biomaterialia*, v.6, p.3630-3639, 2010.
- WANG, Y.; YIN, S.; REN, L.; ZHAO, L. Surface characterization of the chitosan membrane after oxygen plasma treatment and its aging effect. *Biomedical Materials*, v.4, p.1-7, 2009.
- WEIR, M. D.; XU, H. H. Culture human mesenchymal stem cells with calcium phosphate cement scaffolds for bone repair. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*, v.93, p.93-105, 2010.
- WILLERTH, S.M.; SAKIYAMA-ELBERT, S.E. Combining stem cells and delivery. StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, Stembook, 2008.
- WITTAYA-AREEKUL, S.; PRAHSARN, C. Development and in vitro evaluation of chitosan-polysaccharides composite wound dressings. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 313, p. 123-128, 2006.
- YAN, X.; KHOR, E.; LIM, L.Y. PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 48(7), p. 941-946, 2000.
- YANG, T. Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ. *International Journal of Molecular Sciences*, v.12, p. 1936-1963, 2011.
- YANG, B.; YIN, Z.; CAO, J.; SHI, Z.; ZHANG, Z.; SONG, H.; LIU, F.; CATERSON, B. *In vitro* cartilage tissue engineering using cancellous bone matrix gelatin as a biodegradable scaffold. *Biomedical Materials*, v. 5, p. 1-8, 2010.

YIN, Y.; LI, Z.; SUN, Y.; YAO, K. A preliminary study on chitosan/gelatin polyelectrolyte complex formation. *Journal of Materials Science*, 2005.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. *Células-tronco, a nova fronteira da medicina*. Editora Atheneu - São Paulo, 2006.

ZENG, X. & RUCKENSTEIN, E. Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 35, p. 4169-4175, 1996.

ZHANG, H.; YAO, M.; MORRISON, R. A.; CHONG, S. Commonly used surfactant, tween 80, improves absorption of p-glycoprotein substrate, digoxin, in rats. *Archives of Pharmacal Research*, v. 26, n. 9, p. 768-772, 2003.

ZHAO, F.; YIN, Y.; LU, W. W.; LEONG, J. C.; ZHANG, W.; ZHANG, J.; ZHANG, M.; YAO, K. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials*, v. 23, p. 3227-3234, 2002.

## ANEXO I



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
Faculdade de Ciências e Letras de Assis  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

## CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Projeto "**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE XANTANA E QUITOSANA VISANDO O USO COMO SUPORTE PARA A ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**", Registro nº 011/2010, sob responsabilidade do(a) Pesquisador(a) **MÁRCIA ZILIOI BELLINI**, conforme registrado, atende à legislação vigente, no que tange o respeito aos princípios éticos na experimentação animal.

CERTIFICAMOS, ainda, que o referido projeto será desenvolvido no período de 01/01/2011 a 30/06/2012, sendo que os relatórios Parcial e Final deverão ser entregues em setembro/2011 e em junho/2012, respectivamente.

Assis, 17 de dezembro de 2010.

**Dr.ª. Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade**  
Presidente da CEUA

## ANEXO II



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

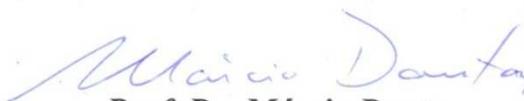
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

## INFORMAÇÃO

Informamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 158/2010, sobre o projeto intitulado “*Comparação entre os potenciais terapêuticos das células-tronco mesenquimais alogênicas e xenogênicas na regeneração de úlceras ocasionadas por queimaduras graves em ratos – Desenvolvimento de substituto de pele*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Júlio César Voltarelli** foi aprovado em reunião de 22 de novembro de 2010.

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal sugerem a utilização de Morfina para um efeito mais prolongado, bem como, hidratação intensiva.

Ribeirão Preto, 22 de novembro de 2010.

  
**Prof. Dr. Márcio Dantas**  
Presidente da Comissão de Ética em  
Experimentação Animal

## ANEXO III

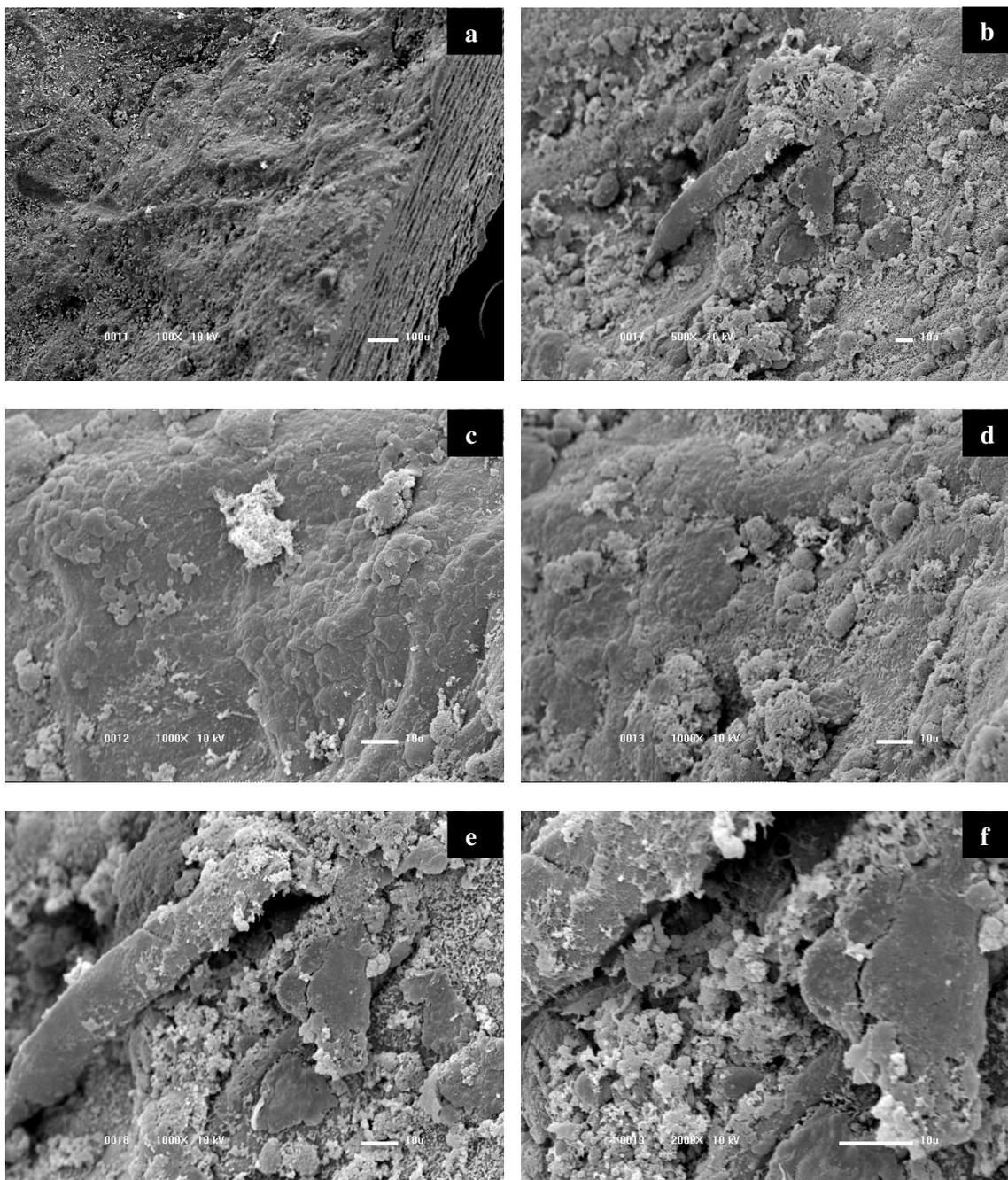


Figura AIII.1 - Micrografias eletrônicas de varredura da membrana de proporção X:Q de 1:1 (formulação 1A) após 7 dias de inoculação de CTMs de camundongo: aumento de 100x (a); aumento de 500x (b); aumento de 1000x (c, d, e); aumento de 2000x (f).

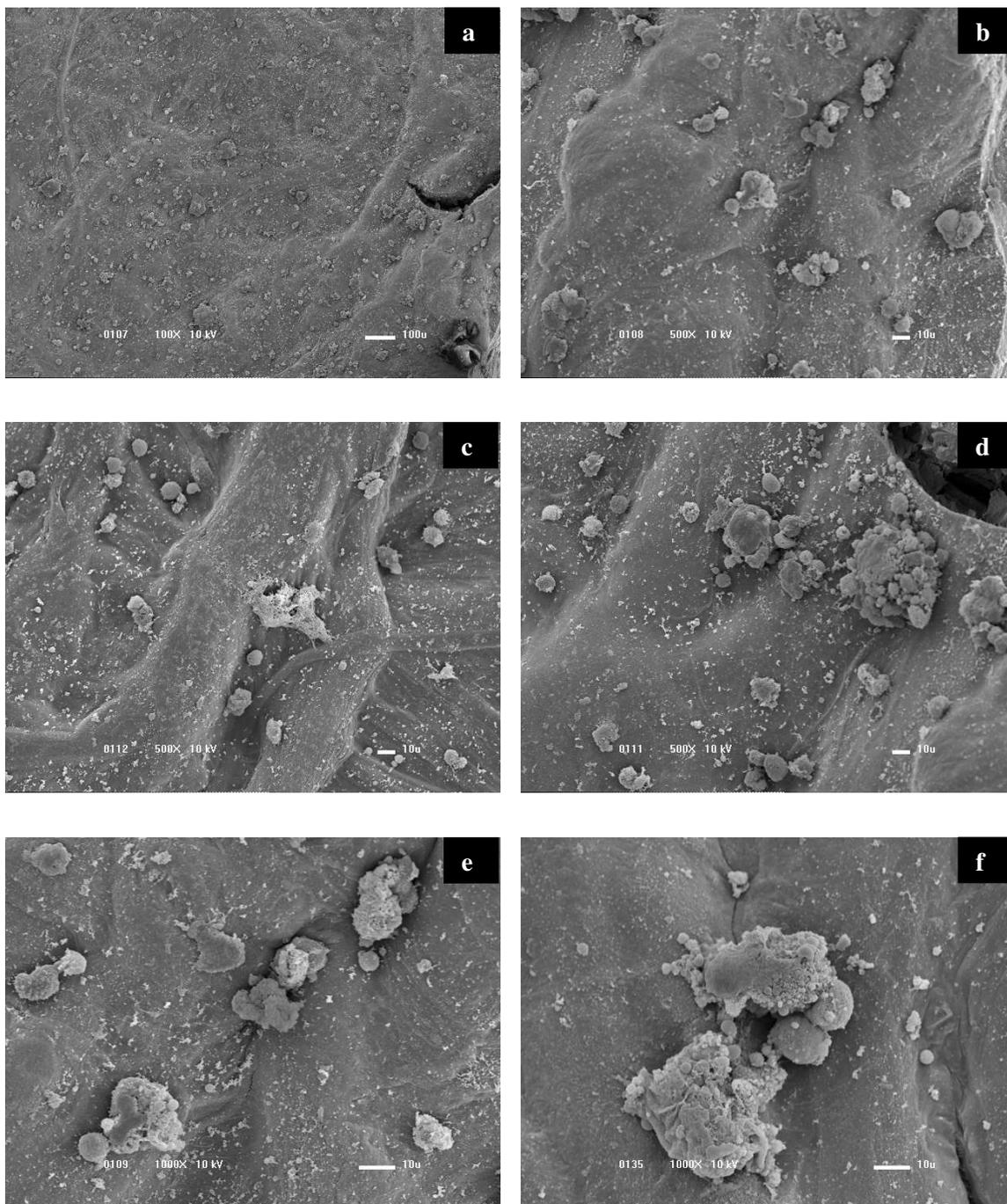


Figura AIII.2 - Micrografias eletrônicas de varredura da membrana de proporção X:Q de 1:1 (formulação 1A) após 7 dias de inoculação de CTMs de rato: aumento de 100x (a); aumento de 500x (b, e, d); aumento de 1000x (e, f).

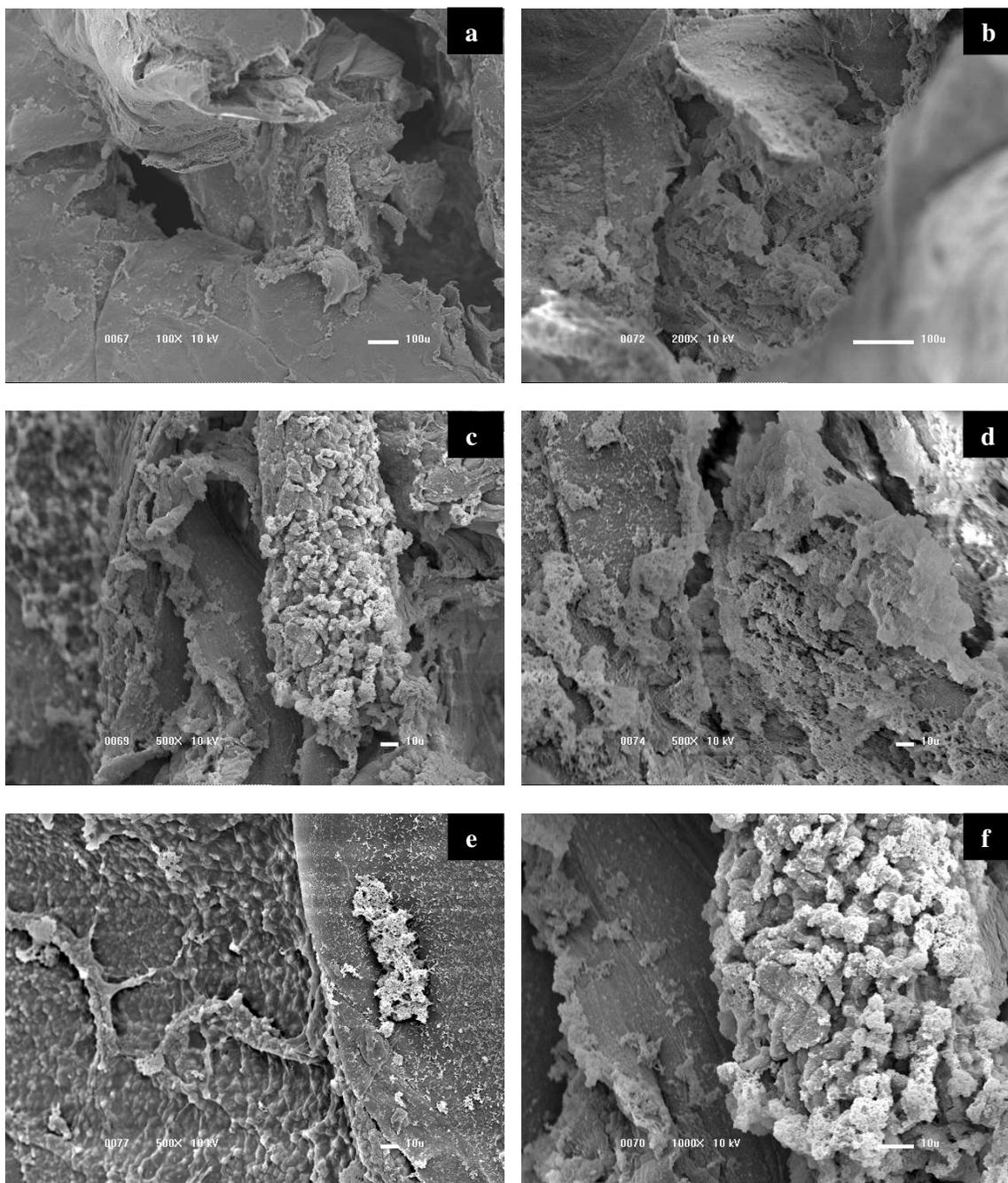


Figura AIII.3 - Micrografias eletrônicas de varredura da membrana de proporção X:Q de 1:1 + Pluronic F68 (formulação 1E) após 7 dias de inoculação de CTMs de camundongo: aumento de 100x (a); aumento de 200x (b); aumento de 500x (c,d,e); aumento de 1000x (f).

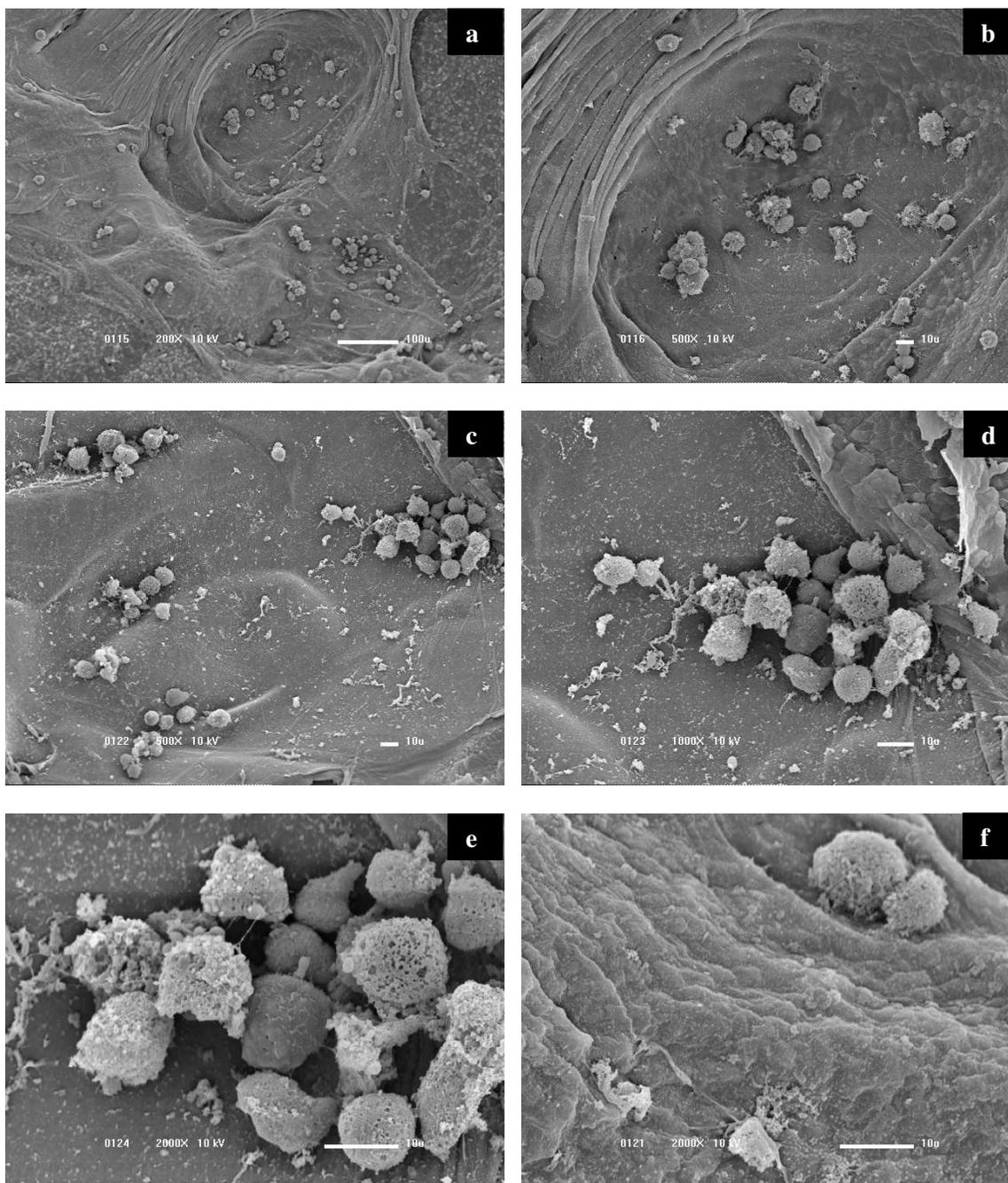


Figura AIII.4 - Micrografias eletrônicas de varredura da membrana de proporção X:Q de 1:1 + Pluronic F68 (formulação 1E) após 7 dias de inoculação de CTMs de rato: aumento de 200x (a); aumento de 500x (b, c); aumento de 1000x (d); aumento de 2000x (e, f).

## ANEXO IV



Figura AIV.1 – Aspecto das lesões do grupo GR01 (controle) após 20dias.

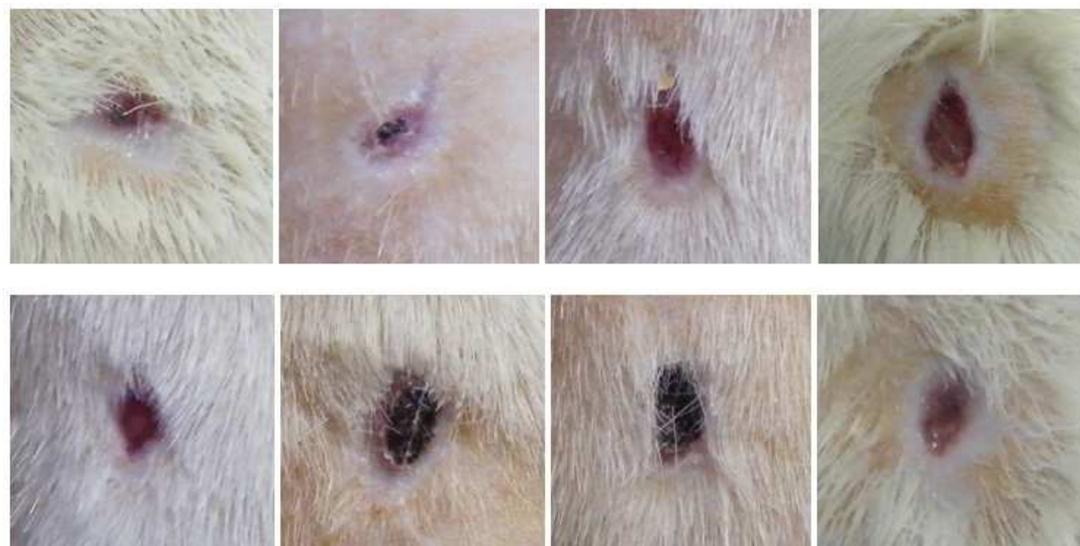


Figura AIV.2 – Aspecto das lesões do grupo GR02 após 20 dias de tratamento com membrana de formulação 1A sem células.



Figura AIV.3 – Aspecto das lesões do grupo GR03 após 20 dias de tratamento com membrana de formulação 1A com CTMs de rato.