

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Bárbara Ferreira Lovato

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* A BASE DE
POLÍMEROS NATURAIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Santa Maria, RS
2018

Bárbara Ferreira Lovato

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS A BASE DE
POLÍMEROS NATURAIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Poliana Pollizello Lopes
Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Bertuol

**Santa Maria, RS
2018**

Bárbara Ferreira Lovato

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS A BASE DE
POLÍMEROS NATURAIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

Aprovado em 03 de Abril de 2018:

Poliana Pollizello Lopes, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Daniel Assumpção Bertuol, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)

Sérgio Roberto Mortari, Dr. (UNIFRA)

Eduardo Hiromitsu Tanabe, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, por oportunizar o acesso ao curso de pós-graduação.

À Prof^a. Dr^a. Poliana Lopes, pela orientação, ensinamentos compartilhados, confiança, amizade e pelas inúmeras conversas.

Ao Prof. Dr. Daniel Bertuol, meu co-orientador, por todas as palavras de incentivo, ajuda e conhecimento passados durante esses anos.

Ao Laboratório de Análises Químicas, Lachem, por permitir o uso dos equipamentos, não seria possível sem a ajuda de vocês.

Ao Dr. André Luiz Missio, aluno de pós-doutorado do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria, por disponibilizar as emulsões testadas neste trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos ensaios mecânicos.

À Alessandra, aluna de iniciação científica, pela ajuda na realização dos experimentos e pela amizade construída durante este processo.

A todos os colegas e amigos que fiz ao longo do mestrado, em especial a Joceane Azolim, Caroline Cunha, Marcela Soquetta e Guilherme Freitag, compartilhando conhecimentos e momentos de alegria.

Ao meu amigo Alex, que tive o prazer de conhecer durante a graduação e desde lá me acompanha. Obrigada por toda ajuda e conselhos.

Sobretudo, agradeço aos meus pais, Adriano Lovato (*in memoriam*) e Marize Ferreira, por todo amor, por sempre acreditarem em mim e me proporcionarem a oportunidade de estar estudando. E a minha irmã, Carla Lovato, por sempre se fazer presente nos momentos em que mais precisei.

Ao meu namorado, Gustavo Finamor, pelo apoio incondicional, amor e carinho. Obrigada por me dar equilíbrio e força durante esta etapa e por sempre me incentivar a seguir em busca dos meus sonhos.

Enfim, a todos que, de alguma maneira, contribuíram na elaboração deste trabalho.

Muito obrigada.

RESUMO

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS A BASE DE POLÍMEROS NATURAIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

AUTOR: Bárbara Ferreira Lovato

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Poliana Pollizello Lopes

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Daniel Bertuol

O presente estudo teve como objetivo a preparação de estruturas porosas tridimensionais, conhecidas como *scaffolds*, que possibilitam a regeneração do tecido ósseo em simultâneo com a degradação desse material. Produziram-se *scaffolds* a base de quitosana tendo como aditivos emulsões de nanocelulose e nanocelulose/tanino, atuando como carga de reforço. O método de obtenção dessa estrutura foi por congelamento e liofilização. Para otimizar o processo, testaram-se diversas concentrações de quitosana (1,5, 2, 3, 4, 5, 6 e 8%), dois tempos de dissolução: 24h e 48h. Também avaliou-se a influência dos métodos de congelamento, como o nitrogênio líquido ($N_{2(liq)}$), *ultrafreezer*, e *freezer*, e os tratamentos de neutralização, etanol e hidróxido de sódio (NaOH) na estrutura e morfologia dos *scaffolds*. Realizou-se a caracterização da quitosana natural, através de análises como o grau de desacetilação (GD), índice de cristalinidade (IC), massa molar (MM) e propriedades térmicas. Caracterizaram-se os *scaffolds* por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), análises térmicas (DSC e TGA) e ensaios mecânicos. Os materiais que apresentaram estruturas mais regulares quanto a porosidade, tamanho de poro, interconectividade e demais características foram os de concentração 4 e 6%(m/v) de quitosana. Os tempos escolhidos para a dissolução da quitosana em ácido acético não mostrou influenciar na estrutura, sendo assim, escolheu-se 24h, pois é o menor tempo para a dissolução desse material. O processo mais eficiente de congelamento foi utilizando o *freezer*, indicando assim que a técnica de congelamento utilizada gera alterações na morfologia e porosidade. Entre os métodos de neutralização testados o que melhor desempenhou seu papel foi o etanol, pois manteve de maneira mais eficaz a estrutura. Fez-se necessária a reticulação do material obtido, utilizando o glutaraldeído como agente reticulante.

Palavras-chave: Scaffolds. Quitosana. Nanocelulose. Regeneração Óssea

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SCAFFOLDS BY NATURAL POLYMERS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

AUTHOR: Bárbara Ferreira Lovato

ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Poliana Pollizello Lopes

CO-ADVISOR: Prof. Dr. Daniel Bertuol

The present study aims at preparing three-dimensional porous structures, chitosan based scaffolds, that allow the regeneration of the bone tissue simultaneously with the degradation of this material. The scaffolds were produced with nanocellulose and nanocellulose/tannin emulsions, acting as reinforcing fillers. A method based on freezing and lyophilization was used to obtain the scaffold. To optimize the process, several concentrations of chitosan (1.5, 2, 3, 4, 5, 6 and 8%) were tested and two dissolution times: 24h and 48h. The influence of freezing methods, such as liquid nitrogen ($N_{2(liq)}$), ultrafreezer and freezer on the structure and morphology of the materials were analyzed. Neutralization treatments (ethanol and sodium hydroxide) were also studied. The characterization of the natural chitosan was carried out through analyzes such as degree of deacetylation (DD), crystallinity index (CI), molar mass (MM) and thermal properties. The scaffolds were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermal Analysis (DSC and TGA) and mechanical tests. The materials that presented a more regular structure, considering its porosity, pore size, interconnectivity and other characteristics were those with 4 and 6%(m/v) of chitosan concentration. The dissolution time of chitosan in acetic acid did not show influence on the structure, so it a 24h time period was elected because it is the shortest time for the dissolution of this material. The freezer proved to be the most efficient freezing process, indicating that the technique used generates changes in morphology and porosity. The tested neutralization method that better played its role was ethanol, as it maintained the structure more effectively. Due to the its solubility in water, crosslinking the obtained scaffold with glutaraldehyde agent was required.

Keywords: Scaffolds. Chitosan. Nanocellulose. Regeneration Bone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura óssea, representação do osso cortical e trabecular.	17
Figura 2 - Estrutura da celulose (a), da quitina (b) e da quitosana (c).....	25
Figura 3 - Estrutura química de uma unidade de repetição de proantocianidina de tanino condensado.	28
Figura 4 - Processo de reticulação de quitosana tratada com glutaraldeído.....	31
Figura 5 - Procedimento experimental utilizado na preparação dos <i>scaffolds</i>	32
Figura 6 - <i>Scaffolds</i> obtidos (a) a partir da quitosana (CH), (b) com adição de nanocelulose (CHC) e (c) nanocelulose/tanino (CHCT).	35
Figura 7 - Espectro de infravermelho obtido a partir da quitosana natural	43
Figura 8 - Difratoograma de raios x da quitosana natural.	44
Figura 9 - Análises térmicas para quitosana natural (a) curvas de DSC e (b) curvas de termogravimetria (TGA).....	45
Figura 10 - <i>Scaffolds</i> obtidos por diferentes métodos de congelamento.....	47
Figura 11 - Micrografias dos <i>scaffolds</i> obtidos a partir de quitosana em diferentes concentrações e ampliações.	49
Figura 12 - Espectros de infravermelho de quitosana natural, e dos <i>scaffolds</i> de CH4 e CH6.	50
Figura 13 - Análises térmicas de quitosana natural (CH Natural), e dos <i>scaffolds</i> de (CH4) e (CH6) (a) curvas de TGA e (b) curvas de DSC.....	51
Figura 14 - Curva tensão-deformação de um <i>scaffold</i> de quitosana.	52
Figura 15 - Micrografias obtidas dos <i>scaffolds</i> de quitosana 4% (m/v) (CH4) e com adição da emulsão de nanocelulose (CHC4) ou nanocelulose/tanino (CHCT4), em diferentes ampliações.	54
Figura 16 - Micrografias obtidas dos <i>scaffolds</i> de quitosana 6% (m/v) (CH6) e com adição da emulsão de nanocelulose (CHC6) ou nanocelulose/tanino (CHCT6), em diferentes ampliações.	55
Figura 17 - Micrografias obtidas dos <i>scaffolds</i> reticulados com glutaraldeído e em uma concentração de quitosana 4% (m/v) (RCH4) e com adição da emulsão de nanocelulose (RCHC4) ou nanocelulose/tanino (RCHCT4), em diferentes ampliações.	57

Figura 18 - Espectros de Infravermelho obtido das diferentes amostras após reticulação.....	58
Figura 19 - Análises térmicas das diferentes amostras após reticulação (a) curvas de TGA e (b) curvas de DSC.....	59
Figura 20 - Valores médios obtidos na análise de absorção de água.	61
Figura 21 - Valores médios obtidos na análise de degradação.....	62
Figura 22 - Micrografias obtidas dos scaffolds reticulados com glutaraldeído e em uma concentração de quitosana 4% (m/v) (RCH4) e com adição da emulsão de nanocelulose (RCHC4) ou nanocelulose/tanino (RCHCT4), em diferentes ampliações, após o ensaio de bioatividade em SBF, decorrido 21 dias.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Polímeros naturais e sintéticos utilizados para aplicações de engenharia de tecido ósseo.	20
Tabela 2 - Composição e parâmetros utilizados na fabricação dos <i>scaffolds</i>	34
Tabela 3 - Definições de tipos de viscosidade e suas respectivas relações.	37
Tabela 4 - Concentração iônica no SBF em comparação com o plasma sanguíneo humano.	40
Tabela 5 - Reagentes e quantidades usados na preparação de 1000 mL de SBF. ...	40
Tabela 6 - Tamanho médio dos poros em diferentes concentrações de quitosana. .	48
Tabela 7- Tensão de escoamento, tensão máxima e módulo de elasticidade dos <i>scaffolds</i> de quitosana em diferentes concentrações.	53
Tabela 8- Tamanho médio dos poros em diferentes concentrações de quitosana natural e com adição de emulsão de nanocelulose ou nanocelulose/tanino.	56
Tabela 9 - Tamanho médio dos poros nas amostras reticuladas.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH	Quitosana
CHC	Quitosana com adição de emulsão de Nanocelulose
CHCT	Quitosana com adição de emulsão de Nanocelulose/tanino
Da	Dalton
DRX	Difração de Raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EDS	Energia Dispersiva de Raios-X
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GA	Glutaraldeído
GD	Grau de Desacetilação
IC	Índice de Cristalinidade
KBr	Brometo de Potássio
m/v	Massa de Amostra por Volume de Solução
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MM	Massa Molar
N ₂ (liq)	Nitrogênio Líquido
NaOH	Hidróxido de Sódio
PA	Padrão Analítico
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLLA	Ácido Poli L Láctico
RCH	Quitosana reticulada
RCHC	Quitosana reticulada adição de emulsão de Nanocelulose
RCHCT	Quitosana reticulada adição de emulsão de Nanocelulose/tanino
SBF	<i>Simuleted Body Fluid</i>
TGA	Análise Termogravimétrica
Tris	Tris-hidroxi-metil-aminometano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS	14
2.2 TECIDO ÓSSEO	15
2.3 BIOMATERIAIS	18
2.4 SCAFFOLDS.....	21
2.5 QUITOSANA.....	24
2.6 CELULOSE.....	27
2.7 TANINO	28
2.8 RETICULAÇÃO	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 MATERIAIS	31
3.2 PREPARAÇÕES DOS SCAFFOLDS.....	32
3.2.1 Dissolução.....	32
3.2.2 Congelamento e liofilização	33
3.2.3 Tratamento.....	33
3.3 CARACTERIZAÇÃO.....	35
3.3.1 Espectroscopia de Infravermelho	35
3.3.2 Difração de Raios-X	36
3.3.3 Massa Molar.....	36
3.3.4 Análise Térmica.....	37
3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura	38
3.3.6 Porosidade	38
3.3.7 Propriedades Mecânicas.....	39
3.4 ENSAIO DE ABSORÇÃO, DEGRADAÇÃO E BIOATIVIDADE	39

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA NATURAL	42
4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i>	45
4.3 ENSAIO DE ABSORÇÃO, DEGRADAÇÃO E BIOATIVIDADE	60
4.3.1 Análise de Água Absorvida	60
4.3.1 Análise de Degradação	62
4.3.3 Análise de Bioatividade	63
5 CONCLUSÃO.....	65
TRABALHOS FUTUROS	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO - ARTIGO SUBMETIDO.....	77

1 INTRODUÇÃO

O ser humano pode apresentar diversos problemas relacionados ao desenvolvimento de lesões ou de defeitos ósseos, em geral causados pelo envelhecimento. O osso tem uma notável capacidade de se autorregenerar quando apresenta pequenos defeitos, uma vez que o local da fratura for imobilizado, ocorre a cicatrização natural ao longo do tempo. No entanto, se os defeitos ósseos forem muito graves, não ocorrerá a cicatrização através de processos fisiológicos normais, sendo necessário fazer o uso de enxertos ósseos biocompatíveis para a completa regeneração desse tecido (LEVENGGOOD; ZHANG, 2015; PIRES, 2011).

Cerca de meio milhão de enxertos são colocados anualmente nos Estados Unidos, movimentando uma indústria bilionária. É previsto que o número de casos de doenças ósseas dobre até 2020, essa estimativa está relacionada com o aumento da expectativa de vida nos próximos anos (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012).

A perda óssea pode ser gerada por doenças como a osteoporose, a qual verifica-se quando o corpo deixa de formar material ósseo novo suficiente, ou quando muito material dos ossos antigos é reabsorvido pelo corpo, podendo ocorrer os dois processos simultaneamente. Caso o osso não se regenere como esperado, torna-se cada vez mais debilitado e estreito, suscetível a fraturas (AN et al., 2016).

A ausência de cálcio no organismo, causada pela má alimentação, favorece o surgimento de doenças ósseas. O cálcio é um mineral essencial à formação regular dos ossos, sendo este o principal reservatório deste elemento no corpo humano, é ele quem fornece esse nutriente para outras funções do nosso organismo. A estrutura óssea não é comprometida ou danificada quando o metabolismo do osso está em equilíbrio. Porém, se a ingestão de cálcio for insuficiente ou se o organismo não absorver o cálcio ingerido afetará na formação de tecidos ósseos não possuindo assim nutrientes suficientes para produzir o esqueleto e abastecer toda a demanda de cálcio no restante do corpo, provocando doenças (MAFI GOLCHIN et al., 2016).

O emprego de enxerto ósseo, considerado por muitos como o melhor tratamento, traz alguns problemas relacionados com a disponibilidade limitada do material, ausência de doador, transmissão de infecções, fraca integração e potencial

de rejeição do implante, lesão ou enfraquecimento das estruturas ósseas doadoras e riscos inerentes a esse tipo de intervenção (JÚNIOR, 2005).

Os *scaffolds*, estruturas tridimensionais temporárias e biodegradáveis, garantem a fixação e proliferação celular, além de servirem como suporte mecânico durante o processo de regeneração do osso (ALVAREZ; NAKAJIMA, 2009). Esses materiais devem apresentar certas propriedades para serem usados na recuperação dos tecidos, como a formação de uma estrutura tridimensional semelhante ao substituído; ser biodegradável, servindo como um esqueleto temporário, dando suporte para a regeneração do tecido, o produto de degradação dessa estrutura não pode ser tóxico; ser biocompatível, ou seja, deve auxiliar na atividade celular promovendo a adesão e proliferação das células ósseas; ter boas propriedades mecânicas, oferecendo suporte e sustentação durante todo o processo de regeneração, elevada porosidade, com tamanhos de poros adequados, para que haja o crescimento celular uniforme e esses poros devem ser interconectados para haver uma boa distribuição das células e difusão dos nutrientes dentro da matriz polimérica (BARROCA, 2008; COLLINS; BIRKINSHAW, 2013).

A obtenção de *scaffolds* que combinem todas as propriedades adequadas à sua utilização na regeneração dos tecidos é um desafio. Assim é de fundamental importância encontrar substitutos ósseos mais adequados do que os já existentes.

A finalidade deste estudo é realizar a preparação de um suporte biológico. Para tal propósito optou-se pela quitosana, um polímero obtido a partir da quitina que é encontrada em abundância na natureza, sendo um produto de fácil obtenção, economicamente viável e podendo ser facilmente convertido em estruturas macroporosas por um simples método de liofilização (ZHANG; ZHANG, 2001).

A quitosana tem muitas características adequadas para a formação da matriz polimérica, como a biocompatibilidade, boa interação com os tecidos e possuindo ainda propriedades osteocondutoras, mas há certa limitação como a baixa resistência mecânica. Para controlar esse problema devem ser feitas mudanças em sua estrutura, como adição de outras substâncias, para obtenção de um material mais resistente garantindo assim maior estabilidade quando estiver em contato com o plasma humano e uma maior interação com o tecido ósseo (CUI et al., 2003; ZHANG; MA, 1999; ZHAO; CHANG, 2004). Além disso, a quitosana apresenta propriedades intrínsecas como antibactericidas, antifúngicas e também propriedades hemostáticas, agregando assim ao *scaffold* maior viabilidade para aplicação no

tecido ósseo (ARANAZ et al., 2009; ONG et al., 2008; YANG et al., 2008).

1.1 OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho consiste na preparação de estruturas porosas tridimensionais, *scaffolds*, a base de quitosana com adição de nanocelulose e nanocelulose/tanino, que possibilitem a regeneração do tecido ósseo em simultâneo com a degradação desse material.

Para cumprir o objetivo determinado, foram propostas as seguintes etapas:

- Otimizar a preparação dos *scaffolds* de quitosana testando concentrações diferentes deste polímero.
- Comparar a influência dos diferentes meios de congelamento na estrutura e morfologia dos *scaffolds* preparados à base de quitosana.
- Verificar a eficiência dos diferentes métodos de neutralização e tratamento dos *scaffolds*.
- Caracterizar a morfologia e analisar as propriedades mecânicas.
- Realizar ensaios de bioatividade, analisando assim os processos de absorção de água e degradação do material investigado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS

A engenharia de tecidos tem como objetivo fornecer alternativas para a reparação de defeitos ósseos que sejam difíceis ou mesmo impossíveis de tratar por métodos habituais. Todos os dias milhares de procedimentos cirúrgicos são realizados para reparar ou substituir tecidos ósseos que tenham sido danificados por doenças ou acidentes. Os tratamentos baseiam-se principalmente no transplante de tecido ósseo saudável do próprio paciente, conhecido como enxerto autólogo ou proveniente de outro indivíduo, um doador, conhecido como enxerto homólogo.

Existe também o enxerto xenólogo, este utiliza tecidos obtidos de espécies diferentes. Porém, esses procedimentos apresentam certos problemas e limitações (ANITHA et al., 2014; KUBASIEWICZ-ROSS et al., 2017; O'BRIEN, 2011a; ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2000).

O enxerto ósseo autólogo, que se refere ao osso retirado do próprio paciente, é considerado o melhor tratamento, entretanto, é caro, doloroso e somente uma pequena quantidade pode ser retirada, pois leva a morbidade e infecções no local da remoção (BARROCA, 2008; O'BRIEN, 2011a). O enxerto ósseo homólogo, referente ao osso retirado de outra pessoa, pode apresentar maior risco de rejeição, assim como a possibilidade de aquisições de infecções e doenças. Outro fator que limita esta técnica é a falta de material disponível para transplante, gerando longos períodos de espera e, dependendo do caso, pode ser incompatível com a urgência médica. O enxerto xenólogo passa por indagações relacionadas às possibilidades de rejeição e transferência de doenças de outras espécies para os seres humanos (BARROCA, 2008; O'BRIEN, 2011a; SCHLICKWEI; SCHLICKWEI, 2007).

Tendo em vista as dificuldades das diferentes estratégias citadas anteriormente, é preciso encontrar substituintes ósseos mais adequados, visando regenerar esses tecidos danificados e apresentar soluções aos problemas existentes. A engenharia de tecido oferece alternativas promissoras a esses enxertos utilizando biomateriais preparados artificialmente que substituem e reparam de forma permanente ou temporária um tecido, órgão ou função do organismo e são capazes de regenerar, manter ou melhorar os tecidos danificados. As possibilidades quase ilimitadas de manipulação da estrutura e propriedades dos biomateriais e das suas interações com os sistemas vivos oferecem grandes oportunidades de concretização, com sucesso, de várias das metas associadas à reconstrução de tecidos e órgãos afetados por patologias ou outros tipos de falhas (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2000; SMITH; HASHEMI, 2013).

2.2 TECIDO ÓSSEO

O osso é responsável pela estrutura do corpo humano e tem como finalidade garantir suporte estrutural do corpo e permitindo a locomoção, protege os órgãos vitais e a medula óssea, formadora das células sanguíneas. Além dessas funções,

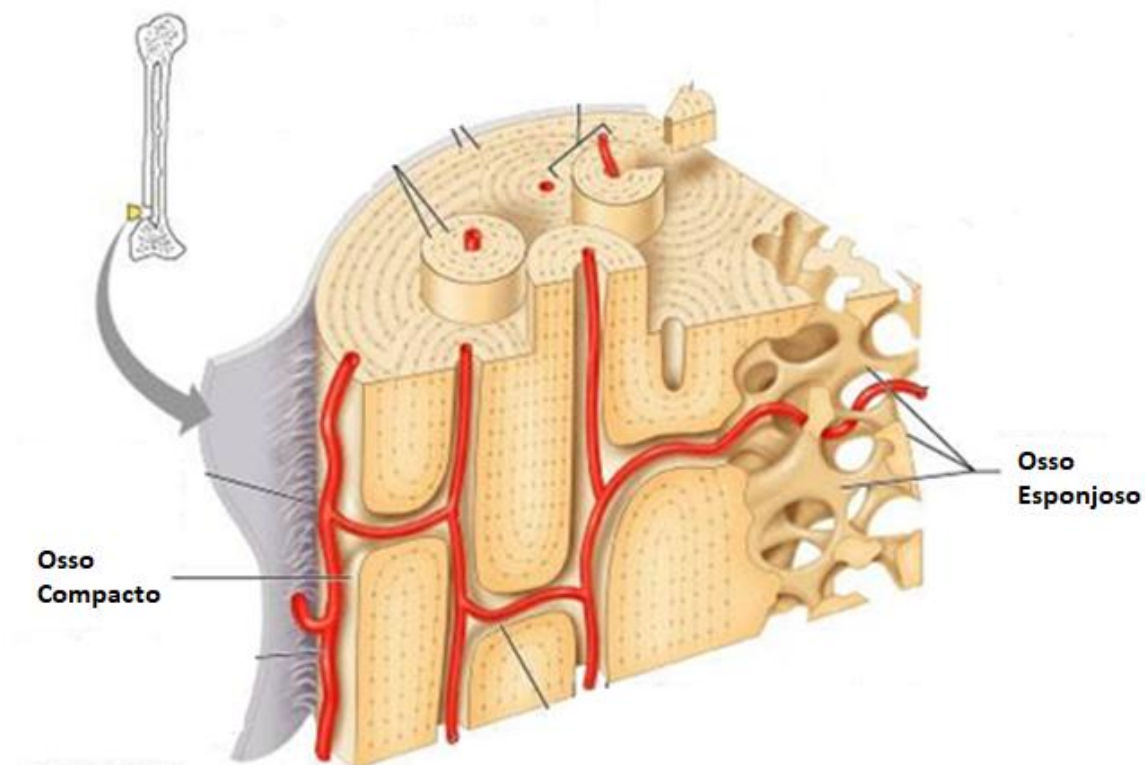
os ossos armazenam vários minerais, especialmente cálcio e fósforo, essenciais em várias funções metabólicas, conforme a demanda ele é capaz de liberar esses íons no sangue para manter e distribuir esses elementos por todo o organismo. Apesar de sua aparência simples, o osso é um tecido vivo dinâmico e complexo sendo remodelado continuamente, isto é, um novo osso é formado enquanto o osso velho se degenera (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012; FATTORE; TETI; RUCCI, 2012; TORTORA; DERRICKSON, 2016).

O tecido biológico é formado por uma combinação de materiais orgânicos e inorgânicos. A parte inorgânica, que dá a característica sólida e dura ao osso, é constituída por íons de cálcio e fosfato em um arranjo similar aos cristais sintéticos de hidroxiapatita, e corresponde a cerca de 60 - 70% do peso do osso seco. A parcela orgânica é formada principalmente por colágeno, sendo este uma proteína, e uma pequena parte de lipídeos. O colágeno é fibroso, resistente e flexível proporcionando ao osso flexibilidade e resistência. Cerca de 25-30% do peso do osso seco é devido a presença de colágeno e 5% é referente a água. A mistura desses componentes orgânicos e inorgânicos gera um composto com características diferentes, produzindo um novo material com propriedades originais e únicas (ALVAREZ; NAKAJIMA, 2009; SEEMAN; DELMAS, 2006).

Três principais tipos celulares estão presentes no osso: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. As células formadoras do osso são chamadas de osteoblastos, apresentam longas projeções citoplasmáticas, que tocam os osteoblastos vizinhos. São responsáveis por concentrar fosfato de cálcio, por isso participam da mineralização, elas são capazes também de sintetizar a parte orgânica da matriz (colágeno e glicoproteínas). Uma vez aprisionado pela matriz recém-sintetizada, tornam-se achatados e seus prolongamentos citoplasmáticos se retraem e com isso, passam a ser conhecidos como osteócitos. Essas são as células ósseas maduras, as principais células do tecido ósseo. Encontram-se no interior da matriz, atuam na manutenção diária do osso, como troca de nutrientes e de resíduos com o sangue, sua morte é seguida por reabsorção na matriz. Os osteoclastos são células móveis e ramificadas que promovem a decomposição do tecido, ou seja, atuam na destruição de áreas lesadas ou envelhecidas do osso, abrindo caminho para a regeneração do tecido pelos osteoblastos (FATTORE; TETI; RUCCI, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; TORTORA; DERRICKSON, 2016).

A composição e organização da matriz óssea conferem propriedades mecânicas especiais, tais como a rigidez, resistência à tração, e uma leveza extraordinária (FATTORE; TETI; RUCCI, 2012). A estrutura óssea é um fator muito importante, pois é ela quem define as propriedades mecânicas dos ossos e como são afetadas. A nível macroscópico essa estrutura pode ser dividida em dois tipos de tecidos ósseos, o cortical e o trabecular, com base na densidade (LEVENGGOOD; ZHANG, 2015). A parte externa ou córtex é o tecido cortical, a fração densa do osso, sendo mais resistente e dura. Já a região trabecular, localizada no interior dos ossos, é esponjosa, constituída de placas finas, uma rede frouxa e porosa, como mostrado na Figura 1 (SMITH; HASHEMI, 2013).

Figura 1 - Estrutura óssea, representação do osso cortical e trabecular.



Fonte: Adaptado de Bao et al (2013).

Os diversos ossos do corpo humano, de acordo com suas necessidades funcionais, apresentam propriedades diferentes devido às alterações na proporção

de estruturas corticais e esponjosas. O osso cortical, por exemplo, apresenta uma resistência à tração de 50 a 151 MPa, uma resistência à compressão de 100 a 150 MPa e a porosidade varia entre 5-10%. Porém, o osso trabecular apresenta uma resistência à tração de 1 a 5 MPa, uma resistência a compressão de 2 a 12 MPa e uma porosidade maior, cerca de 50-90%. Por apresentarem propriedades diferentes, deve se ter cuidado para que o substituinte ósseo apresente as mesmas propriedades mecânicas do osso que está sendo substituído (FU et al., 2011; SMITH; HASHEMI, 2013; WU, S., LIU; YEUNG, K. W. K. LIU, C., YANG, 2014).

O osso se forma antes do nascimento e durante toda a vida do organismo, está em permanente remodelação. A remodelação óssea consiste em um mecanismo contínuo de substituição do tecido ósseo velho ao mesmo tempo em que ocorre a formação do novo tecido. Isso ocorre para preservar a integridade óssea, otimizar suas funções e prevenir a degradação. Acontece em proporções distintas nas diferentes regiões do corpo, podendo ser desencadeada por alguns fatores como o exercício, estilo de vida e alimentação. Porém, com o envelhecimento ocorre a perda excessiva de cálcio ou de tecido ósseo, causando seu enfraquecimento, assim surgem algumas doenças como a osteoporose, que enfraquece os ossos, podendo ocorrer fraturas e defeitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; TORTORA; DERRICKSON, 2016).

2.3 BIOMATERIAIS

O termo "biomateriais" foi utilizado para descrever materiais derivados de fontes biológicas ou materiais utilizados em terapias intracorpórea (BANORIYA; PUROHIT; DWIVEDI, 2017). Atualmente são associados a materiais colocados em contato com o corpo humano com o objetivo de restaurar alguma parte danificada. Esses materiais se diferenciam dos demais, pois devem apresentar uma combinação de propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas tornando-se aptos para cumprir a função do tecido. A função que eles irão desenvolver no nosso organismo dependerá de suas propriedades (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2000).

Um dos critérios essenciais para a aplicação dos biomateriais é a biocompatibilidade, devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis

com o ambiente fisiológico onde é inserido, sem afetar negativamente esse local, ou seja, o produto de degradação desse material não pode gerar toxicidade nem provocar rejeição. Também é preciso ter uma arquitetura adequada para apoiar a migração, proliferação e regeneração celular (GAJENDIRAN et al., 2017). Foram relatados muitos tipos de materiais usados no desenvolvimento de *scaffolds* na engenharia de tecidos, porém a classe polimérica, empregada na fabricação dessas estruturas pode ser classificada quanto à ocorrência em naturais ou sintéticas (GAJENDIRAN et al., 2017; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2011).

Os polímeros naturais ou biopolímeros são de origem natural, animal ou vegetal, e apresentam estruturas mais complexas que os polímeros sintéticos (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2011). Geralmente são biodegradáveis permitindo que as células hospedeiras, ao longo do tempo, produzam sua própria matriz extracelular e substituam o suporte degradado, além disso, oferecem excelente biocompatibilidade (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2016). Adicionalmente, eles promovem uma boa adesão e crescimento celular, sendo considerados biologicamente ativos (O'BRIEN, 2011a). Contudo são, normalmente, mais escassos e sofrem suscetíveis variações nas suas propriedades em cada lote do produto (KHANG; KIM; LEE, 2007).

A fabricação de *scaffolds* a partir de materiais biológicos que apresentem estruturas homogêneas e reprodutíveis é um desafio, pois nem sempre eles possuem propriedades mecânicas favoráveis, limitando sua utilização. Alguns exemplos são o colágeno, alginato, celulose, amido, quitosana, ácido hialurônico, entre outros (DRURY; MOONEY, 2003; KHANG; KIM; LEE, 2007; O'BRIEN, 2011a).

Diferente dos polímeros naturais, os sintéticos são aqueles obtidos industrialmente, em geral, a partir de moléculas de baixo peso molecular, por isso, apresentam uma grande variedade de composições e propriedades que são facilmente modificáveis e controladas (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2016; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2011). Eles também podem ser processados em grandes quantidades e por diferentes técnicas. Há um maior domínio das características físicas e mecânicas, da estrutura molecular e da massa molar durante a fabricação desses polímeros (KHANG; KIM; LEE, 2007).

Numerosos polímeros sintéticos foram utilizados na tentativa de produzir *scaffolds* usados como substituintes ósseos, incluindo poliestireno, policaprolactona, policarbonatos e ácido poli-L-láctico (PLLA) (BARROCA, 2008; O'BRIEN, 2011a).

Embora esses materiais tenham se mostrado muito eficientes, pois podem ser fabricados com uma arquitetura adequada e terem suas características de degradação controladas, eles apresentam alguns inconvenientes, incluindo o risco de rejeição, devido à bioatividade reduzida. Além do mais, existem preocupações sobre o processo de degradação desses polímeros, como, por exemplo, o PLLA, que, por hidrólise, produz dióxido de carbono e reduz o pH de onde o material é aplicado resultando assim na necrose celular e dos tecidos (O'BRIEN, 2011a).

A aplicação dos polímeros, no campo biomédico, está em constante crescimento, podendo ser empregados na engenharia de tecidos, implantação de dispositivos médicos, órgãos artificiais, próteses, reparação óssea, entre outros (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2016). Uma nova possibilidade de uso desse material é o sistema de libertação de fármacos. Os sistemas de entrega baseados em polímeros permitem a liberação lenta e controlada de drogas no organismo (BANORIYA; PUROHIT; DWIVEDI, 2017). Mais exemplos, detalhes sobre a origem e características dos materiais poliméricos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Polímeros naturais e sintéticos utilizados para aplicações de engenharia de tecido ósseo.

Material	Origem	Características
Ácido Hialurônico	Natural	- Pequena imunogenicidade. - Quimiostático quando combinado com agentes apropriados. - Apresenta baixas propriedades mecânicas.
Amido	Natural	- Comportamento termoplástico, bom substrato para adesão celular, não citotóxico e biocompatível. - Forma ligação ao osso quando reforçado com hidroxiapatita. - Apresenta boas propriedades mecânicas.
Colágeno	Natural	- Promove a adesão celular. - Baixo potencial imunogénico. - Quimiostático - Apresentam baixas propriedades mecânicas.
Fibrina	Natural	- Promove migração celular, vascularização e osteocondução.
Quitosana	Natural	- Hemostático. - Promove osteocondução e regeneração

		do tecido.
Poli (hidroxibutirato)	Natural	- Substrato adequado para crescimento ósseo, porém, possui uso limitado devido à sua natureza frágil.
Poli (anidridos)	Sintética	- É desenvolvido principalmente para transporte de medicamentos. - Biocompatível. - Suportam a regeneração do osso cortical e do osso trabecular.
Poli (α-hidroxiácidos)	Sintética	- Poliésteres alifáticos extensivamente estudados. - Degradados por hidrólise. - Podem apresentar problemas relativamente à biocompatibilidade e citotoxicidade na área envolvente ao local da implantação.
Poli (ϵ-caprolactona)	Sintética	- Poliéster alifático. - Degradado por hidrólise ou erosão. - Degradação lenta. - Baixa versatilidade química. - Alguns problemas relacionados com a resistência mecânica a cargas.

Fonte: Salgado, Coutinho, & Reis, 2004 com modificações.

2.4 SCAFFOLDS

A estrutura tridimensional que suporta, direciona e promove a proliferação celular é conhecida como *scaffold* (ROSETI et al., 2017; SMITH; HASHEMI, 2013). Porém, para a inserção desta estrutura no corpo humano, é necessário que ela possua algumas condições (PIRES, 2011). É de extrema importância que este suporte seja biodegradável e apoie a proliferação celular além de ser biocompatível com o corpo humano (SMITH; HASHEMI, 2013).

A estrutura óssea é tão complexa que para um *scaffold* ser considerado ideal, na engenharia de tecidos, deve apresentar certas características (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012a). Nesses fatores está incluso a composição química dos materiais, sua estrutura, as propriedades mecânicas, porosidade, bem como a taxa de degradação (DUTTA et al., 2017). Primeiramente um *scaffold* deve ser biocompatível, seu produto de degradação não pode apresentar-se tóxico para o organismo e deve auxiliar as atividades celulares. A sua estrutura química específica

permite a adesão e proliferação das células por todo material. Ser bioreabsorvível, ou seja, deve se degradar ao mesmo tempo em que o osso esteja se regenerando. Assim, deseja-se um material tridimensional e que possua uma rede altamente porosa e com esses poros interconectados para obtenção de um crescimento celular uniforme, fluxo e transporte de nutrientes, e resíduos metabólicos adequados (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012a; BUTSCHER et al., 2011; PIRES, 2011).

As propriedades mecânicas ideais do *scaffold* devem ser equivalentes ao osso onde ele está sendo implantado. A porosidade e interconectividade dos poros precisam ser adequadas para o crescimento e distribuição homogênea das células e nutrientes por todo o material, auxiliando assim a fixação e regeneração do tecido ósseo danificado. Para o crescimento do tecido ósseo, por exemplo, os poros necessitam ter um diâmetro de 100 a 350 μm e a porosidade cerca de 50-90%, garantindo assim a difusão dos nutrientes e distribuição uniforme das células e a eliminação dos produtos da degradação do *scaffold* (BARROCA, 2008; BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012a; BUTSCHER et al., 2011).

Há diversas formas de fabricação para obtenção dessas estruturas porosas, porém apenas as mais conhecidas e utilizadas serão descritas aqui.

A técnica de separação de fases e liofilização é o método mais utilizado na fabricação de *scaffolds* de quitosana. Este procedimento inicia com a dissolução de quitosana em ácido acético diluído, depois esta é vertida em um molde e encaminhada para o congelamento em temperatura conhecida. Os cristais de gelo se formam quando esta solução é congelada. Na etapa de remoção do solvente, usando um liofilizador, os cristais sublimam e é obtida uma estrutura tridimensional sólida e porosa do material. O *scaffold*, recém-formado, é neutralizado utilizando hidróxido de sódio ou etanol (GHANBAR et al., 2013; SACHLOS; CZERNUSZKA, 2003).

A temperatura de congelamento, concentração do polímero e sublimação dos cristais de gelo influenciam na estrutura do *scaffold* em termos de diâmetro do poro, interconexão, porosidade uniforme e propriedades mecânicas. Em *scaffolds* com concentrações mais elevadas de quitosana, os diâmetros dos poros podem ser menores devido a maior massa de quitosana por unidade de volume. A técnica de separação de fases e liofilização é um método simples, porém apresenta como desvantagem a formação, em sua superfície, de uma pele não porosa obstruindo os

poros, dificultando a troca de nutrientes e oxigênio, prejudicando assim a formação e crescimento do tecido ósseo (LEVENGOOD; ZHANG, 2015).

Juntamente com o método de separação de fases e liofilização pode ser usado um agente indutor de poros. Nessa metodologia ocorre à dispersão de partículas, tais como o cloreto de sódio, açúcares, parafinas ou gelatinas, na solução polimérica. As substâncias usadas para a indução do poro não devem ser solúveis na solução polimérica, mas devem ser solúveis em solvente conhecido para posterior lixiviação e formação do corpo poroso (LOH; CHOONG, 2013).

O grau de porosidade, formato e tamanho dos poros é influenciado pelo tipo de porogênio artificial que está sendo misturado na solução polimérica. O cloreto de sódio, por exemplo, apresenta uma forma cúbica, gera uma maior porosidade e confere uma eficiente interconectividade dos poros (BARROCA, 2008; LEVENGOOD; ZHANG, 2015). Esta técnica possui como vantagem a simplicidade, pois não precisa de equipamentos especiais e pode ser usada para qualquer polímero desde que seja escolhido um solvente adequado. Porém a lixiviação dessas partículas pode ser ineficiente e demorada (BARROCA, 2008; REZWAN et al., 2006).

A eletrofiação ou *eletrospinning* é um procedimento usado na engenharia de tecidos por ter a capacidade de fabricar *scaffolds* porosos e com poros interconectados (ANNABI et al., 2010). Esse método consiste na extrusão de fibras poliméricas por meio de alta voltagem. Podem-se produzir fibras muito finas, porém apresenta pouco controle na porosidade e uma resistência mecânica baixa. Basicamente aplica-se uma alta voltagem entre o tubo capilar metálico, ligado a uma seringa, que contém a solução polimérica carregada e o coletor, de carga oposta a solução (BUTTAFOCO et al., 2006). Quando o campo elétrico vence a tensão superficial da solução polimérica um jato é formado, dando origem as fibras. À medida que este jato polimérico percorre o ar até o coletor o solvente é evaporado, ocorrendo à diminuição do diâmetro das fibras (BRAGHIROLI; STEFFENS; PRANKE, 2014).

As propriedades físico-químicas das soluções poliméricas, como viscosidade, concentração das soluções, tensão superficial, vazão da solução e distância entre a ponta da agulha e o coletor, influenciam na estrutura e morfologia das fibras obtidas por *eletrospinning* (BAKER et al., 2006; BEACHLEY; WEN, 2008; BUTTAFOCO et al., 2006).

A obtenção de *scaffolds* na engenharia de tecidos utilizando o *eletrospinning* apresenta várias vantagens, uma delas é o aumento da área superficial e porosidade, facilitando assim a difusão das células no interior do material. Há também o maior controle da composição das fibras possibilitando a mistura de uma grande variedade de polímeros e materiais bioativos, melhorando suas propriedades e funcionalidade (BEACHLEY; WEN, 2008; BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

A técnica de prototipagem rápida consiste na deposição de material camada por camada por meio de um software, podendo ser usados diferentes tipos e combinações de materiais. A estrutura é bem definida, apresentando uma ótima porosidade, o que facilita a incorporação de células e moléculas bioativas. Esta técnica foi desenvolvida principalmente para a reparação de lesões mais complicadas, possibilitando, através de exames de ressonância magnética, a fabricação de implantes personalizados e com geometrias mais complexas (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012a; LEVENGOOD; ZHANG, 2015; ROSETI et al., 2017).

Através desta metodologia há um maior controle sobre a porosidade, tamanho, forma e interconectividade dos poros do *scaffold*, melhorando a eficiência do cultivo de células em 35-70%. Como a porosidade do suporte determina a resistência mecânica, a otimização dessas propriedades é fundamental, permitindo mudanças precisas em sua arquitetura. Porém, devem-se utilizar somente produtos e reagentes que sejam biocompatíveis com polímeros derivados da natureza (DUTTA et al., 2017). Em geral, a tecnologia de prototipagem rápida ainda não é totalmente acessível e, portanto, não é tão versátil quanto os métodos mais tradicionais (LEVENGOOD; ZHANG, 2015).

2.5 QUITOSANA

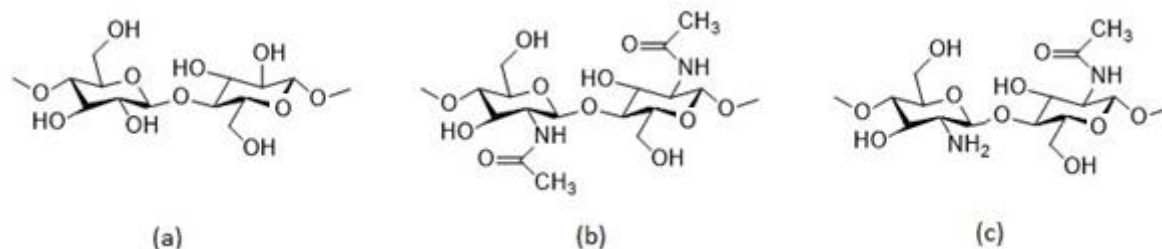
A quitosana foi descoberta em 1859 por Rouget, quando do contato da quitina com uma solução de hidróxido de potássio em ebulição (FERNANDES, 2009). A produção da quitosana ocorre, industrialmente, pela desacetilação parcial da quitina que se encontra no exoesqueleto de muitos crustáceos, como camarões, caranguejos e lagostas, e tem muitas propriedades desejáveis para usar como

biomaterial na engenharia de tecidos e medicina regenerativa (SIVASHANKARI; PRABAHARAN, 2016).

O termo quitosana é geralmente atribuído a produtos de quitina com mais de 60% de grau de desacetilação alcalina e teor de nitrogênio superior a 7%. É um polissacarídeo linear, composto de unidades de glicosamina e N-acetilglicosamina, ligadas por ligações glicosídicas β (1-4) (ELSABEE; ABDU, 2013; MATI-BAOUCHE et al., 2014).

A quitina é o segundo polímero natural mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose, e é encontrado principalmente em esqueletos de muitos crustáceos aquáticos, podendo estar presente também, em pequenas quantidades, em alguns insetos e fungos (SIVASHANKARI; PRABAHARAN, 2016). Quimicamente, a quitina é formada por unidades repetidas de N-acetilglicosamina, estrutura esta quase idêntica à da celulose, a comparação desses três polímeros pode ser vista na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura da celulose (a), da quitina (b) e da quitosana (c).



Fonte: Adaptado de O'Sullivan (1996) e Abreu et al (2013).

A quitosana é solúvel em solução ácida, mas é insolúvel a valores de pH naturais e alcalinos. A solubilidade da quitosana é significativamente dependente do grau de desacetilação (GD), pois é conferida pelos grupos amino livres protonados. Além disso, a massa molar (MM) e a força iônica da solução influenciam a solubilidade da quitosana (CHOI; NAM; NAH, 2016; KEONG; HALIM, 2010).

Possui atividade antimicrobiana, impossibilitando o desenvolvimento de microorganismos. Essa característica está atribuída à carga positiva dos grupos aminos livres, presente em sua estrutura, os quais interagem com as membranas das células microbianas carregadas negativamente, levando à liberação de

componentes intracelulares dos microrganismos e inibição do crescimento (BATISTA et al., 2011; KIM et al., 2011).

Além disso, a quitosana tem propriedades mucoadesivas que são reveladas pela capacidade de espalhamento da quitosana sobre uma camada de muco e também através de suas interações iônicas positivas com as cargas negativas do muco ou das membranas da superfície celular. A ação adesiva se relaciona diretamente com o grau de desacetilação desse polímero, quanto maior o grau de desacetilação, maior o número de cargas positivas, conseqüentemente, maior será a mucoadesão (CROISIER; JÉRÔME, 2013a; KIM et al., 2011; LEHR et al., 1992).

A quitosana é metabolizada por determinadas enzimas humanas, como a lizozima, sendo assim biodegradável. Os produtos formados pela sua degradação são a glicosamina e a N-acetilglicosamina, estes produtos são derivados da glicose, ou seja, açúcares encontrados no próprio organismo humano. A N-acetilglicosamina atua como um anti-inflamatório (KEONG; HALIM, 2010; SPINDOLA et al., 2009).

É um polímero catiônico, e por essa característica, possui muitas aplicações. Pode ser utilizada no tratamento de água e na indústria de cosméticos. Na indústria de alimentos é empregada como conservante e revestimento de origem natural para os alimentos, pois possui atividade antimicrobiana. É amplamente utilizada em aplicações biomédicas, principalmente em sistemas de administração de fármacos, engenharia de tecidos e implantes dentários, apresentando-se na forma de bandagens, curativos, enxertos e pele artificial (FURUYA, 2015; GOY; MORAIS; ASSIS, 2016; PIRES, 2011).

Apresenta propriedades bioativas, biodegradáveis, antibacterianas e biocompatíveis, e possui superfície hidrofílica, que está ausente em muitos polímeros sintéticos. Foi relatado um aumento da adesão celular, proliferação, diferenciação e mineralização de osteoblastos quando se fez o uso da quitosana. Na regeneração do tecido ósseo, os *scaffolds* de quitosana exibiram comportamento osteocondutivos, propriedades que acelera a formação óssea. (LEE et al., 2014; SARAVANAN; LEENA; SELVAMURUGAN, 2016).

Por todas as características acima mencionadas, esse polímero tem um ótimo potencial para ser aplicado como um biomaterial, especialmente para engenharia de tecidos, auxiliando na cicatrização de feridas, podendo ser utilizado como excipientes para a administração de drogas e crescimento celular. Oferece a vantagem de ser facilmente processada em hidrogéis, membranas, nanofibras,

filmes, micropartículas, nanopartículas e *scaffolds* (ANITHA et al., 2014; CROISIER; JÉRÔME, 2013a).

2.6 CELULOSE

É o material orgânico mais abundante na terra, sendo o principal composto existente nas plantas, servindo para manter sua estrutura, e também está presente em bactérias, fungos, algas e até mesmo em animais (O'SULLIVAN, 1997). Por terem forma alongada e pequeno diâmetro (finas), são frequentemente chamadas "fibras". Os outros componentes encontrados nas plantas, entre os principais, são a lignina e hemicelulose (PIOTTO, 2003).

A celulose é uma substância fibrosa, resistente, insolúvel em água, que se encontra nas paredes celulares promovendo a sustentação das plantas, particularmente em talos, hastes, troncos e todas as porções lenhosas de tecidos vegetais. É um β -1,4 glicano linear, não ramificado, cujo monômero é a celobiose (O'SULLIVAN, 1997). De um modo geral, 60 a 70% da celulose é cristalina e 30 a 40% se encontra sob a forma amorfa (SILVA et al., 2009).

A produção de fibras de celulose e a sua aplicação em materiais compósitos ganharam atenção crescente devido à sua alta resistência e rigidez, servindo como a principal fase de reforço nas estruturas das plantas. É estável quimicamente e mecanicamente, bem como completamente insolúvel em condições fisiológicas, o que torna a celulose uma forte candidata para modificações médicas e para usos na engenharia de tecidos. Esse polímero é conhecido por ter uma boa biocompatibilidade e característica de cicatrização de feridas. Essa substância provou ter uma excelente biodegradabilidade e a baixa citotoxicidade para vários tipos de células animais e humanas (DOMINGUES; GOMES; REIS, 2014; EO et al., 2016; SIRÓ; PLACKETT, 2010).

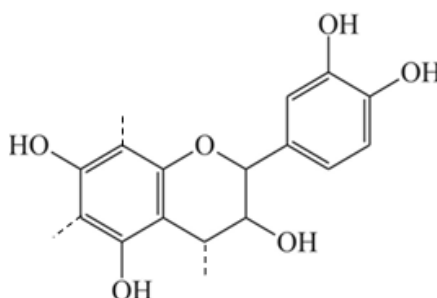
A celulose e seus derivados são utilizados, entre outras coisas, como materiais de revestimento para medicamentos, aditivos de produtos farmacêuticos, coagulantes de sangue, suportes para enzimas imobilizadas, membranas renais artificiais, tratamento de feridas e material de implante e suportes em engenharia de tecidos (TOMMILA et al., 2013). A estrutura da celulose encontra-se na Figura 2a.

2.7 TANINO

Os taninos são constituintes de um importante grupo de metabólitos secundários das plantas e foram originalmente utilizados na indústria de produção de couro para o curtimento das peles dos animais. A palavra tanino é derivada do termo "tanante" e refere-se a substâncias capazes de bronzear o couro. São substâncias polifenólicas complexas e desempenham um papel proeminente nas estratégias gerais de defesa química das plantas contra invasão. Eles são muito reativos quimicamente, formando pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares (BADAL MCCREATH; DELGODA, 2016; CABALLERO; TRUGO; FINGLAS, 2003; MONTEIRO et al., 2005).

Considerados o segundo recurso fenólico mais abundante na natureza perdendo apenas para a lignina. Podem ser classificados, de acordo com sua estrutura química e estabilidade, em hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de açúcares simples com ácido gálico ou ellágico, enquanto os condensados são compostos de moléculas de flavonoides não tóxicas de origem vegetal, proantocianidinas, Figura 3. Estes constituem mais de 90% da produção mundial total de taninos comerciais (200.000 toneladas/ano) e, portanto, os taninos condensados são as substâncias naturais mais abundantemente extraídas na Terra (ARBENZ; AVÉROUS, 2015; BADAL MCCREATH; DELGODA, 2016; MISSIO et al., 2017).

Figura 3 - Estrutura química de uma unidade de repetição de proantocianidina de tanino condensado.



Fonte: Adaptado de Szczurek et al (2014).

É relatado o emprego desses polifenóis no curtimento do couro, mas também, são conhecidos em outros campos industriais, como na indústria de alimentos nas embalagens, na produção de adesivos e vinhos, atuando, ainda, no tratamento de água como floculantes. Demonstraram ainda serem excelentes precursores de novos materiais de carbono e também podem ser usados para produzir espumas rígidas isolantes. Estudos mais recentes mostram que esta substância apresenta atividades antioxidantes, antiparasitárias, antifúngicas, anti-inflamatórias e antivirais. As atividades biológicas dos taninos variam muito dependendo da composição química e de sua estrutura, por exemplo, os taninos com mais grupos hidroxilo são mais facilmente oxidados e, portanto, possuem a maior atividade antioxidante (CARVALHO et al., 2014; HUANG et al., 2017; MISSIO et al., 2017; RINALDI et al., 2016; SZCZUREKA et al., 2014)

2.8 RETICULAÇÃO

Os reticulantes promovem modificações na estrutura química dos materiais, com o intuito de conferir-lhes propriedades funcionais adicionais ou simplesmente melhorar atributos já característicos dos mesmos. No processo de reticulação, os grupos funcionais ativos das cadeias de polímeros reagem quimicamente ou fisicamente com os agentes de reticulação e formam uma rede tridimensional firme através das ligações cruzadas em pontos específicos das moléculas, alterando as propriedades físico-químicas, biológicas e mecânicas do material desenvolvido. Um reticulador ideal precisa melhorar as características e estabilidade estrutural da rede polimérica e não deve ter efeitos tóxicos no organismo (GONSALVES et al., 2011; MENDES et al., 2011; ORYAN et al., 2017).

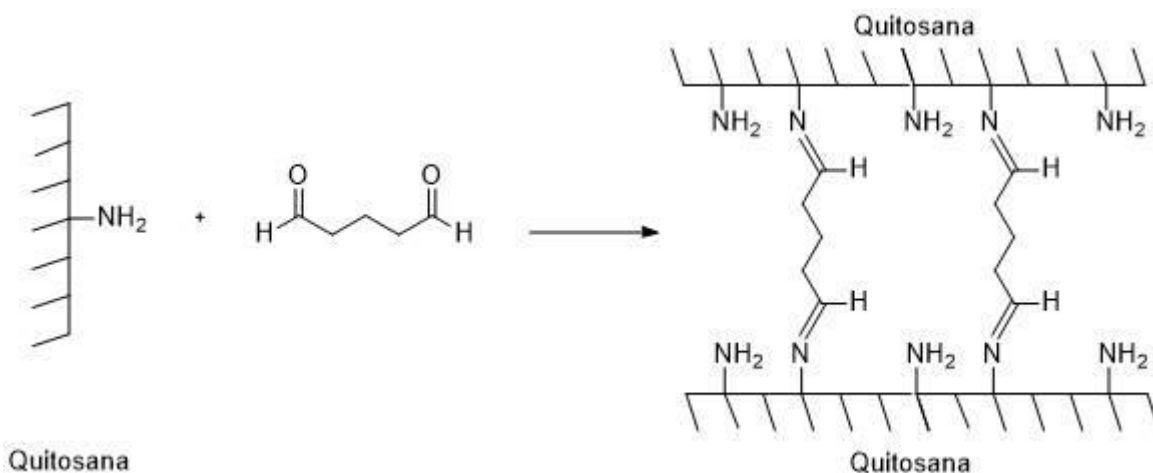
Os *scaffolds*, usados na engenharia de tecidos, precisam apresentar uma resistência mecânica igual ou superior ao tecido em que está sendo inserido. No entanto, nos materiais constituídos por quitosana há uma baixa resistência dificultando seu uso. Por isso, se faz necessário o empenho de pesquisadores para melhorar essa propriedade. Estudos estão sendo realizados combinando esse material com outros polímeros, formando compósitos, e/ou utilizando também agentes de reforço e reticulantes. Notou-se que ocorreram mudanças significativas em sua força mecânica. Porém, os reticulantes e os aditivos podem potencialmente

alterar as propriedades biológicas dos *scaffolds* de quitosana causando efeitos tóxicos desfavoráveis (BEPPU et al., 2007; COSTA; MANSUR, 2008; XU et al., 2017).

Na engenharia de tecidos os agentes químicos de reticulação são os mais utilizados, podendo ser sintéticos ou naturais. Apresentam como vantagem a formação de ligações fortes entre as diferentes cadeias de carbono através de ligações covalentes ou interações moleculares, tais como ligação iônica ou ligação secundária através de ponte de hidrogênio. A desvantagem desse método é que a maioria dos reagentes são tóxicos para as células, necessitando de uma lavagem eficiente para remoção do resíduo do reticulador e é mais caro que o reticulador físico. Os agentes reticulantes devem apresentar bifuncionalidade, ou seja, possuir grupos funcionais reativos que permitem o inter cruzamento entre as cadeias poliméricas (ORYAN et al., 2017).

Um agente comumente utilizado na reticulação química é o glutaraldeído (GA) ou 1,5 pentanodial. O tratamento com esse reagente é observado em diversos produtos, como *scaffolds*, hidrogéis, filmes, microesferas e adsorventes. Fazendo o uso do GA, notou-se um aumento significativo nas propriedades mecânicas dos materiais, assim como sua estabilidade. O glutaraldeído é uma molécula bifuncional que interage fortemente com compostos que possuem grupos amino na sua estrutura, como a quitosana, sendo o mecanismo para essa ligação a interação que ocorre entre os grupos aldeído e os grupos amino livres dos compostos, originando a formação de uma base de Schiff (C=N), Figura 4. Através dela ocorre a conexão das cadeias poliméricas, pelas interações intra ou intermoleculares, sendo formada uma rede polimérica mais forte e reticulada com menor mobilidade das cadeias (BEPPU et al., 2007; MONTEIRO; AIROLDI, 1999a; TORRES et al., 2005; YAO et al., 2012).

Figura 4 - Processo de reticulação de quitosana tratada com glutaraldeído.



Fonte: Adaptado de Gonçalves (2005).

Embora este reagente seja um excelente reticulante, os grupos aldeídos, presente em sua estrutura, são tóxicos para as células e causam inflamações no organismo. Porém, estudos relatam que em concentrações de até 8% de GA, quando submetidas a uma desintoxicação adequada, não mostraram citotoxicidade. Sendo assim, para aumentar a biocompatibilidade dos materiais reticulados com GA é preciso remover, através de lavagens, os grupos aldeídos livres. Quando comparado com outros aldeídos, tais como formaldeído e gliceraldeído, com o uso do GA obteve-se materiais mais estáveis (ORYAN et al., 2017; REDDY; REDDY; JIANG, 2015; UMASHANKAR; MOHANAN; KUMARI, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

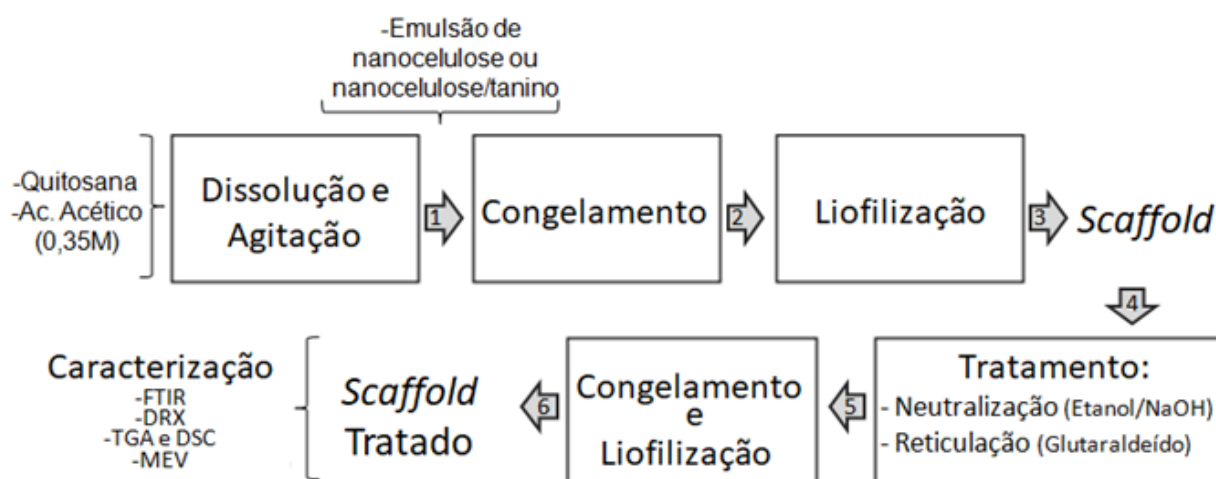
A quitosana utilizada foi adquirida a partir da Polymar Indústria Comércio Importação Exportação Ltda (87,4% desacetilada). As emulsões de nanocelulose e nanocelulose/tanino foram desenvolvidas em outro projeto na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) no Departamento de Engenharia Florestal, maiores detalhes sobre o processo de obtenção desses materiais estão disponíveis em KUMODE et al. 2017 e MISSIO et al., 2018. O reagente glutaraldeído é da empresa Sigma

Aldrich, tipo Grau II, 25% em H₂O. Os demais reagentes e solventes empregados nos procedimentos de dissolução e tratamento foram obtidos comercialmente a partir das empresas Dinâmica Química e Impex com grau de pureza P.A., de modo que todos os materiais empregados foram utilizados conforme recebidos, sem qualquer tratamento prévio.

3.2 PREPARAÇÕES DOS SCAFFOLDS

O fluxograma da Figura 5 ilustra a sequência dos passos experimentais envolvidos na preparação dos *scaffolds*, seguido de um detalhamento dos mesmos. O método de preparação do *scaffold* de quitosana envolve, fundamentalmente, as seguintes etapas: (i) dissolução da quitosana em ácido acético 0,35M seguida de agitação para completa dissolução da mesma (ii) congelamento e liofilização das referidas suspensões (iii) neutralização e/ou reticulação (iv) liofilização e caracterização.

Figura 5 - Procedimento experimental utilizado na preparação dos *scaffolds*.



3.2.1 Dissolução

A dissolução de quitosana foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Júnior (2005). Prepararam-se as soluções de quitosana dissolvendo-a

em ácido acético 0,35M de forma que se obtenham soluções do polímero com concentrações de 1,5; 2; 3; 4; 5; 6 e 8% (massa do polímero/volume da solução). Mantiveram-se as soluções em agitação magnética para completa dissolução do polímero por 24 ou 48h. Depois, filtra-se e adiciona-se 0,15% (m/v) de emulsão de nanocelulose ou nanocelulose/tanino a esta solução.

3.2.2 Congelamento e liofilização

Logo após a dissolução, transferiu-se a solução para moldes cilíndricos de polipropileno, que foram colocados em um *freezer* a uma temperatura de -20°C (48h). A etapa de congelamento foi testada também no *ultrafreezer* (12h), temperatura aproximadamente -50°C e Nitrogênio líquido (30min), -180°C . Após este período transferiu-se os moldes, contendo a mistura de polímeros solidificados, para um liofilizador (Terroni) a -45°C e 15×10^{-3} mBar durante 3 dias.

3.2.3 Tratamento

As amostras, depois de removidas do liofilizador, apresentam um comportamento higroscópico, ou seja, elas adsorvem a umidade do ambiente causando alterações na sua estrutura e morfologia. Com isso a porosidade é afetada, pois ocorre um leve fechamento dos poros dos *scaffolds* alterando a estrutura para uma forma mais compacta.

Este problema é solucionado através de um tratamento de neutralização, realizado logo após as amostras serem retiradas do liofilizador. Este tratamento pode ser feito de diferentes maneiras. Uma delas, utiliza uma solução diluída de NaOH (NWE; FURUIKE; TAMURA, 2009). Testaram-se concentrações de NaOH de 0,05M, 1M e 1,5M. Outro modo de realizar esse tratamento é fazendo o uso de etanol (THEIN-HAN; KITIYANANT, 2007).

No tratamento com NaOH, as amostras foram submersas nas diferentes soluções de NaOH, durante cerca de 4h, e posteriormente lavadas com água destilada. No tratamento com etanol, realizou-se à imersão dos *scaffolds* em etanol

absoluto durante 3h, posteriormente em etanol 70% (v/v) durante 20 min e etanol a 50% (v/v) durante 15 min (MADIHALLY; MATTHEW, 1999).

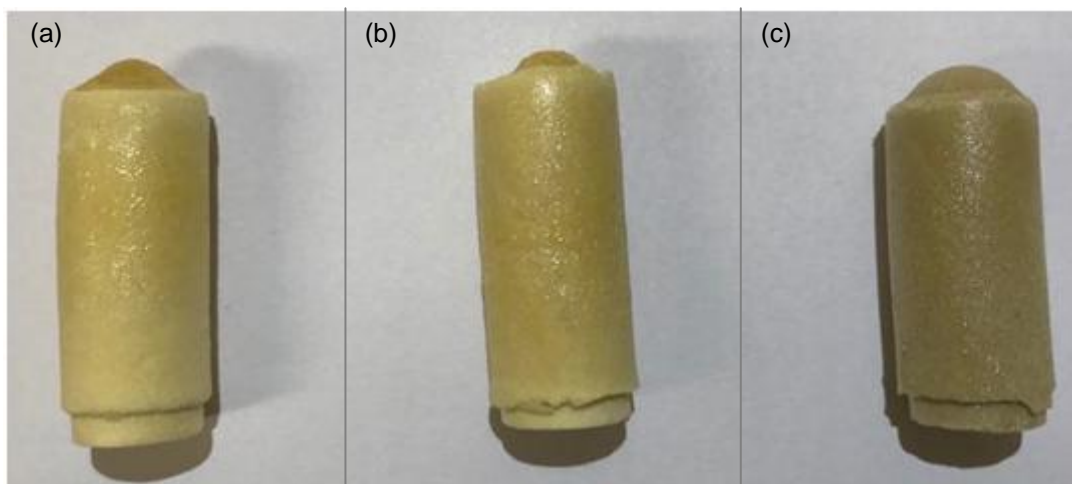
Quando se faz necessário reticular as amostras, esse processo é realizado inserindo-as em uma solução alcoólica de glutaraldeído 1,25% durante 4h até que elas fiquem completamente imersas. Passado o tempo de imersão, as amostras são lavadas com água ultrapura. Após o término da etapa de tratamento das amostras, estas seguiram para o congelamento, a -20°C , seguido de liofilização a -45°C e 15×10^{-3} mBar por 24h para fazer a remoção dos reagentes.

Utilizaram-se diferentes condições de processamento, assim como proporções mássicas de quitosana e emulsão, podendo ser visualizadas na Tabela 2. As imagens dos *scaffolds* obtidos encontram-se na Figura 6.

Tabela 2 - Composição e parâmetros utilizados na fabricação dos *scaffolds*.

Quitosana (%m/v)	Tempo de dissolução (h)	Método de congelamento	Nanocelulose (%m/v)	Nanocelulose/tanino (%m/v)
1,5	24	<i>Freezer</i>	-	-
2	24	<i>Freezer</i>	-	-
3	24	<i>Freezer</i>	-	-
4	24 e 48	<i>Freezer</i>	-	-
5	24 e 48	<i>Freezer</i>	-	-
6	24 e 48	<i>Freezer</i>	-	-
8	24 e 48	<i>Freezer</i>	-	-
4	24 e 48	<i>Ultrafreezer</i>	-	-
5	24 e 48	<i>Ultrafreezer</i>	-	-
6	24 e 48	<i>Ultrafreezer</i>	-	-
8	24 e 48	<i>Ultrafreezer</i>	-	-
4	24 e 48	Nitrogênio Líq.	-	-
5	24 e 48	Nitrogênio Líq.	-	-
6	24 e 48	Nitrogênio Líq.	-	-
8	24 e 48	Nitrogênio Líq.	-	-
4	24	<i>Freezer</i>	0,15	-
6	24	<i>Freezer</i>	0,15	-
4	24	<i>Freezer</i>	-	0,15
6	24	<i>Freezer</i>	-	0,15

Figura 6 - *Scaffolds* obtidos (a) a partir da quitosana (CH), (b) com adição de nanocelulose (CHC) e (c) nanocelulose/tanino (CHCT).



3.3 CARACTERIZAÇÃO

3.3.1 Espectroscopia de Infravermelho

A caracterização dos grupos funcionais existentes nos *scaffolds* foi realizada por espectroscopia de infravermelho (Shimadzu - IR Prestige 21). As amostras foram dispostas na forma de pastilha com KBr, com varredura de 45 scans e faixa de leitura entre 500 e 4500 cm^{-1} .

O grau de desacetilação (GD) foi determinado utilizando a razão de absorvância do espectro infravermelho de quitosana. Adotou-se o método proposto por Sabnis & Block, 1997, na qual a Equação 1 é utilizada juntamente com os espectros de absorção de infravermelho para obtenção de grau de desacetilação. Esse procedimento envolve a utilização de uma curva padrão de amostras com o GD conhecido e relaciona à razão das absorvâncias em 1655 e 3450 cm^{-1} com o GD, e assim, pode-se encontrar o valor em amostras desconhecidas.

$$GD = 97,67 - [26,486 \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right)] \quad (1)$$

Onde A_{1655} e A_{3450} representam as absorções principais no espectro de infravermelho nas frequências 1655 e 3450 cm^{-1} respectivamente, oriundas do espectro de quitosana.

3.3.2 Difração de Raios-X

A caracterização da quitosana e do seu caráter cristalino foi realizada através da análise de difração de raios-X, utilizando um difratômetro (Rigaku -miniflex 300), com radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,54051 \text{ \AA}$) e fonte de energia com 30 kV e 10 mA.

Determinou-se o índice de cristalinidade (IC) através da Equação 2 (ARANAZ et al., 2016).

$$IC = \frac{(I_{110} - I_{am})}{I_{110}} \times 100 \quad (2)$$

Onde I_{110} corresponde à intensidade máxima dos picos de difração no plano (110) e I_{am} a intensidade da região de difração amorfa em $2\theta \approx 16^\circ$.

3.3.3 Massa Molar

A massa molar (MM) do polímero foi determinada a partir da viscosidade onde mediu-se o tempo de escoamento, em triplicata, de soluções poliméricas de quitosana em diferentes concentrações usando ácido acético 0,35M como solvente, em um viscosímetro de Ostwald em banho termostático a 25°C (ABREU et al., 2013).

A relação entre a viscosidade da solução e a do solvente puro é denominada viscosidade relativa. Para estabelecer seu valor, usa-se o tempo de escoamento do solvente, t_0 , e o da solução, t , medidos através do viscosímetro. As viscosidades específica, reduzida, inerente e intrínseca também foram determinadas segundo suas respectivas equações, visualizadas na Tabela 3 (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2011).

Tabela 3 - Definições de tipos de viscosidade e suas respectivas relações.

Nome	Equação que define	Unidade
Viscosidade relativa	$\eta_r = \frac{t}{t_0}$	Adimensional
Viscosidade específica	$\eta_{sp} = \eta_r - 1$	Adimensional
Viscosidade reduzida	$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C}$	dL/g
Viscosidade inerente	$\eta_{ine} = \frac{\ln \eta_r}{C}$	dL/g
Viscosidade intrínseca	$\eta_{intrínseca} = [\eta]$ $= \lim (\eta_{red}) \quad C \rightarrow 0$	dL/g

Onde C é a concentração em gramas de polímero em 100 mL, ou seja, gramas por decilitros de solução.

A massa molar de um polímero pode ser relacionada com a viscosidade intrínseca de uma solução deste polímero de concentração conhecida num determinado solvente utilizando a equação de Mark-Houwink, descrita abaixo como Equação 3 (GUPTA; JABRAIL, 2006b):

$$[\eta] = K * M_w^\alpha \quad (3)$$

Onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca (dL.g⁻¹), M_w é o massa molar (g.mol⁻¹), K é uma constante característica do polímero e depende da temperatura e do solvente e α é a constante característica da geometria da molécula do polímero.

3.3.4 Análise Térmica

O comportamento térmico do material obtido foi verificado através da Análise Térmica Diferencial (DSC) usando um equipamento Shimadzu (modelo DSC - 60 plus) em uma taxa de aquecimento de 10⁰ C/min, atmosfera de nitrogênio e Análise Termogravimétrica (TGA), usando um Shimadzu (modelo TGA - 50) na mesma taxa de aquecimento e atmosfera.

3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia dos *scaffolds* foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV TESCAN - VEGA3). As amostras utilizadas no MEV foram preparadas cortando os *scaffolds* em pedaços menores, sendo estes fixados com fita de carbono no porta-amostra de alumínio usado no MEV e metalizadas através da deposição de íons de ouro e, finalmente, observadas no equipamento a 10kV usando diferentes ampliações.

O tamanho médio de poro dos materiais obtidos foi calculado através do programa ImageJ, usando a média de 10 poros em uma micrografia do MEV, ampliação de 200x, de cada amostra para obter um valor representativo do diâmetro do poro. A largura e o comprimento dos poros foram medidas e o diâmetro médio do poro foi determinado pela equação $d = \sqrt{l \cdot h}$, onde l é o comprimento e h é a largura do poro.

3.3.6 Porosidade

Determinaram-se a porosidade e a densidade aparente dos *scaffolds* usando o princípio de Arquimedes. O etanol foi escolhido como líquido de imersão, pois os materiais utilizados na fabricação dos *scaffolds* não são solúveis neste reagente, e também, há uma facilidade de penetração do etanol nos poros da amostra.

Em uma proveta adicionou-se o etanol e introduziu-se uma amostra de massa conhecida (m_i), deixou-se em repouso até que o *scaffold* tenha imergido totalmente garantindo que todos os seus poros sejam preenchidos completamente pelo etanol e anotou-se o volume que este ocupava na proveta, denominando-se como V_1 . Retira-se o *scaffold* do etanol e registra-se sua massa impregnada com o líquido (m_f) e o volume de etanol restante na proveta (V_2).

Através dos dados obtidos é possível calcular para uma amostra a densidade aparente, pela Equação 4 (BARROCA, 2008; LOH; CHOONG, 2013).

$$\rho = \frac{m_i}{(V_1 - V_2)} \quad (4)$$

O volume dos poros (V_p) é dado pela Equação 5, sendo $\rho = 0,789 \text{ g.cm}^{-3}$.

$$V_p = \frac{(m_f - m_i)}{\rho_{etanol}} \quad (5)$$

Por último, a porosidade (ε) é calculada pela Equação 6, descrita abaixo.

$$\varepsilon = \frac{(m_f - m_i) / \rho_{etanol}}{(V_1 - V_2)} \quad (6)$$

3.3.7 Propriedades Mecânicas

Para a caracterização do comportamento mecânico dos *scaffolds* ($D=10 \text{ mm}$ e $h=10 \text{ mm}$) adotou-se ensaios de compressão. Os ensaios foram realizados na central de análises no departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e o equipamento utilizado foi o Texturômetro, marca Stable Micro Systems, modelo TA.HD.plus, com célula de carga de 500N. A velocidade de compressão foi ajustada em 2 mm/min, aplicando-se a carga até que as amostras deformassem mais que 50% de sua altura inicial. Sete amostras foram testadas para cada composição e os dados obtidos foram usados para a construção das curvas de tensão-deformação (HAYASHI et al., 2012; SUBRAMANIAN; LIN, 2005).

3.4 ENSAIO DE ABSORÇÃO, DEGRADAÇÃO E BIOATIVIDADE

A capacidade de degradação das amostras foi investigada usando o ensaio *in vitro* em uma solução que simula o fluido corporal, *Simulated Body Fluid* (SBF). O SBF é uma solução acelular similar ao plasma humano, ou seja, contém as mesmas espécies iônicas em concentrações iguais ou muito semelhantes ao encontrado no plasma sanguíneo humano (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). As concentrações de íons do SBF são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentração iônica no SBF em comparação com o plasma sanguíneo humano.

Íons	Concentração iônica (mmol.L ⁻¹)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ³⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma Sanguíneo	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5

Fonte: Kokubo & Takadama, 2006

Preparou-se a solução de SBF seguindo o procedimento proposto por Kokubo (2006) e descrito na norma ISO/FDIS 23317:2007 ("ISO/FDIS 23317 - Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials, 2007). A sequência de adição, quantidade e as especificações dos reagentes utilizados na preparação do SBF estão representadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Reagentes e quantidades usados na preparação de 1000 mL de SBF.

Ordem	Reagente	Quantidade	Pureza
1	NaCl	8,035 g	99,5
2	NaHCO ₃	0,355 g	99,5
3	KCl	0,225 g	99,5
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,231 g	99
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311 g	98
6	HCl 1M	39 mL	-
7	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,229 g	95
8	Na ₂ SO ₄	0,072 g	99
9	CNH ₂ (CH ₂ OH) ₃	6,118 g	99
10	HCl 1M	0-5 mL	-

Fonte: Kokubo & Takadama, 2006

Para a preparação de 1000 mL de solução de SBF adiciona-se primeiramente 700 mL de água ultrapura (Milli Q[®]) a 36,5 ± 0,5°C e, sob agitação, os reagentes de 1 a 8. Cada reagente foi adicionado lentamente e somente após a completa dissolução do anterior para evitar possíveis precipitações. A solução deve manter-se transparente e a temperatura deve ser aproximadamente 36,5 ± 0,5°C. Os reagentes 9 e 10 permitem ajustar o pH. Assim, o reagente 9, o tris-hidroxi-metil-aminometano (Tris), foi adicionado muito lentamente à solução, pois um aumento rápido do pH

causado pela sua adição em excesso poderia propiciar a formação de um precipitado. Após cada adição de Tris, esperou-se que o pH estabilizasse. Finalmente, adicionou-se ácido clorídrico, gota a gota lentamente, até que o pH atingisse 7,4. Durante o ajustamento do pH com o Tris e o HCl, adicionou-se água ultrapura até completar 1000 mL (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

As amostras, utilizadas neste ensaio, possuíam aproximadamente 80 mm² de área superficial. Segundo Kokubo, o volume mínimo de SBF recomendado para amostras porosas deve ser superior ao volume calculado (V_s), Equação 7.

$$V_s = \frac{S_a}{10} \quad (7)$$

Onde S_a corresponde a área superficial aparente (mm²).

Portanto, as amostras foram imersas em 10 mL de solução de SBF utilizando tubos de poliestireno. Os recipientes foram fechados e mantidos à temperatura de 37°C. No decorrer de 3, 7, 14 e 21 dias, as amostras foram retiradas do SBF, transferidas para um papel filtro para remover da superfície a solução e imediatamente pesado. Seguidamente, congeladas, liofilizadas e guardadas em dessecador para posterior caracterização (KOKUBO; TAKADAMA, 2006; LOPES et al., 2013).

A absorção de água (AA) foi calculada pela Equação 8, mostrada abaixo.

$$AA = \frac{(m_t - m_i)}{m_i} \quad (8)$$

A porcentagem perda de massa (PM) calculou-se pela Equação 9, como segue.

$$PM = \frac{(m_{f,t} - m_i)}{m_i} \times 100 \quad (9)$$

Onde m_t representa a massa de amostra molhada após a imersão em SBF em um tempo (dias) determinado, $m_{f,t}$ é a massa final da amostra após passar pelo processo de liofilização e m_i é a massa inicial antes da imersão na solução de SBF (LOPES et al., 2013). As alterações morfológicas ocorridas na superfície dos materiais foram investigadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA NATURAL

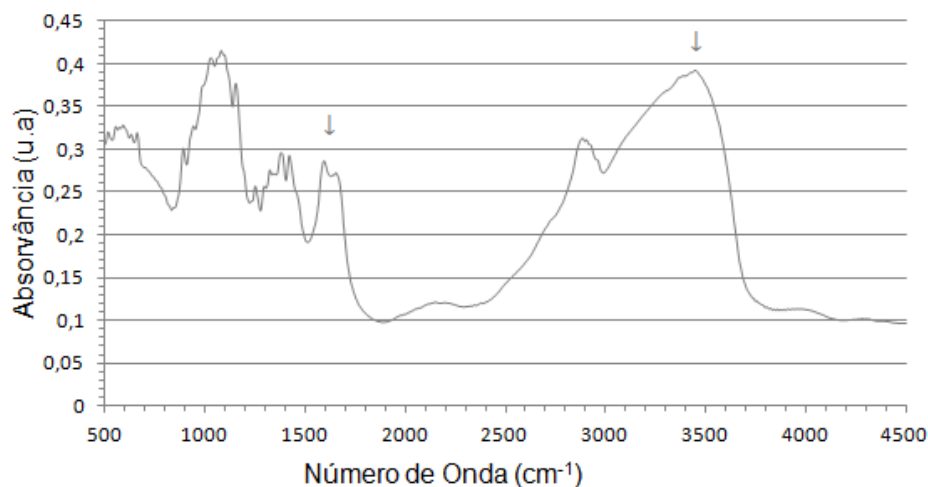
Realizou-se a caracterização da quitosana, conforme recebida pela empresa fabricante, a fim de assegurar que as especificações do material comprado eram confiáveis, e também, para quantificar dados que não estavam determinados.

A quitosana é obtida a partir da desacetilação da quitina através da transformação dos grupos acetamida presentes em aminas, por meio de um ataque alcalino forte. O grau de desacetilação (GD) é definido como a fração de grupos aminos na cadeia polimérica. Este parâmetro, juntamente com a massa molar, é determinante das características deste polissacarídeo em solução, exercendo grande influência nas propriedades desse material. Quando o GD da quitina é superior a 70%, a quitosana torna-se solúvel em soluções ácidas fracas e se comporta como um polieletrólito catiônico, onde se classifica como uma quitosana adequada para diversas aplicações. A quitosana comercial possui um GD com variação média 70 a 95% e massa molar na faixa de 10^4 - 10^6 g.mol⁻¹ (ABREU et al., 2013; AZEVEDO et al., 2007).

Determinou-se o GD por espectroscopia de infravermelho. Embora possa ser realizada também por titulometria potenciométrica e ressonância magnética nuclear. Entretanto, o infravermelho tem sido a técnica mais empregada devido à facilidade em determinar a desacetilação no estado sólido (BISPO; MANSUR; MANSUR, 2009; LIMA; AIROLDI, 2004; MONTEIRO; AIROLDI, 1999b, 2005; SABNIS; BLOCK, 1997a).

Por meio de cálculos pode-se determinar o GD, utilizando a razão de absorvância do espectro infravermelho de quitosana para as bandas de 1655 e 3450 cm⁻¹, respectivamente, como mostrado na Figura 7.

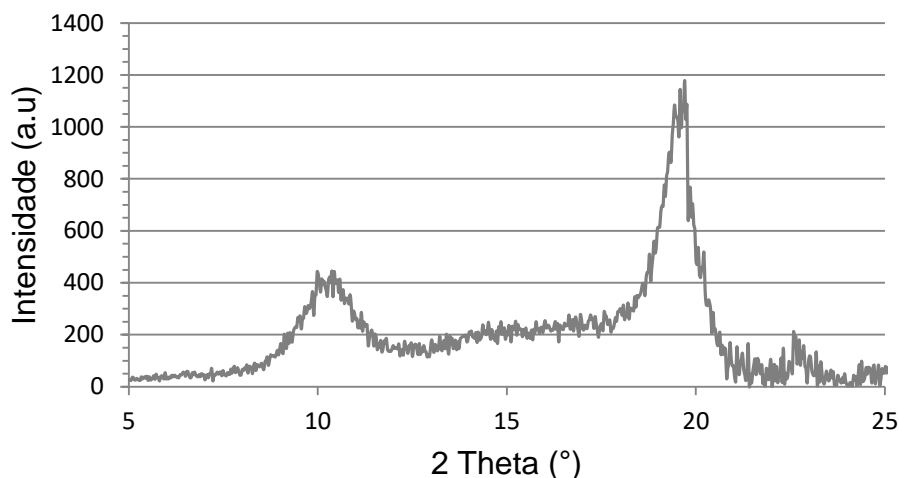
Figura 7 - Espectro de infravermelho obtido a partir da quitosana natural



Através das intensidades das bandas nas frequências 1655 cm^{-1} , atribuída à presença do grupo amida, e 3450 cm^{-1} , sendo associada ao grupo hidroxila do polímero, calculou-se o grau de desacetilação médio desse polímero (LIMA; AIROLDI, 2004; SABNIS; BLOCK, 1997a). Ao aplicar esses dados, $A_{1655}=0,14$ e $A_{3450}=0,29$, na Equação 1 o valor encontrado para o GD foi de 85%, o que corresponde a uma medida aceitável para este polímero e muito próxima ao fornecido pelo fabricante (87,4%).

Na Figura 8, referente ao difratograma da quitosana pura, observam-se dois picos cristalinos característicos desse material. Verifica-se um pico de maior intensidade em $19,7^\circ$ e um de menor intensidade em $10,3^\circ$, que correspondem aos planos (110), atribuído às sequências N-glucosamina na cadeia de polímeros, e (020), sequências de N-acetil-D-glucosamina, respectivamente, evidenciando a parte cristalina e uma faixa entre os picos, background, que representa a fase amorfa do material, caracterizando esse polímero como semicristalino (MOUSSOUT et al., 2016).

Figura 8 - Difratoograma de raios x da quitosana natural.



Através da Equação 2 calculou-se a cristalinidade do polímero e o valor determinado foi de aproximadamente 78%.

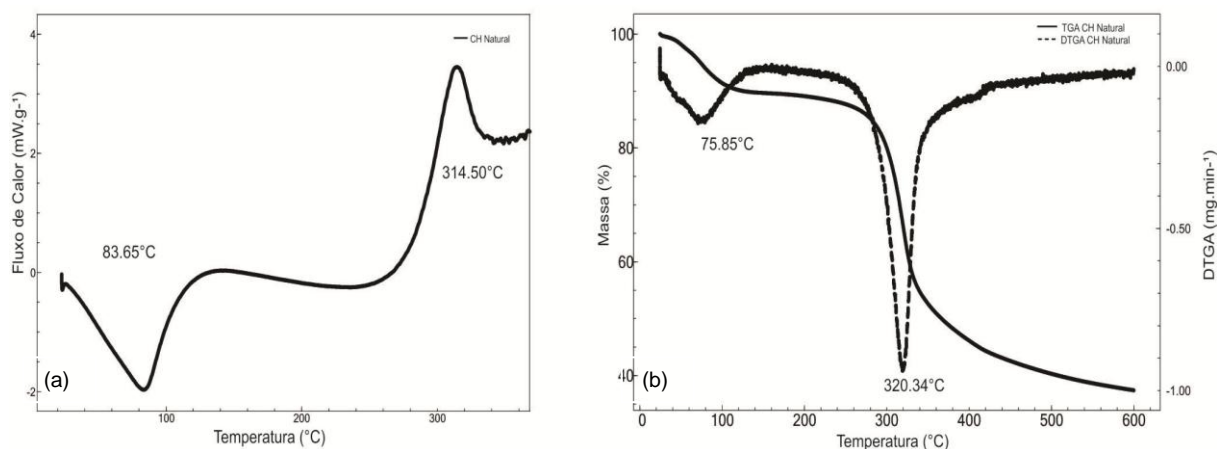
No presente trabalho, usou-se a equação de Mark-Houwink, Equação 3, para ter uma estimativa da MM de quitosana. Os valores de K e α são abordados para este polímero em solução de ácido acético como $1,81 \times 10^{-3} \text{ mL.g}^{-1}$ e 0,93 respectivamente (GUPTA; JABRAIL, 2006b), sendo assim:

$$[\eta] = 1,81 \times 10^{-5} \text{ dL.g}^{-1} * M_w^{0,93}$$

Assim, como $[\eta]$ encontrado foi de $1,5 \text{ dL.g}^{-1}$, substituindo na Equação 9 a MM é de aproximadamente 190 kDa, a unidade que representa a MM é dalton, sendo esse valor característico de um polímero de baixa massa molar.

O comportamento térmico foi analisado e apresentado na Figura 9. A Figura 9a mostra as curvas de DSC da quitosana natural. O aparecimento de um pico endotérmico em aproximadamente 84°C é atribuído à evaporação de substâncias voláteis, como água ligada por pontes de hidrogênio com grupos hidroxila da quitosana, e a formação de um pico exotérmico próximo a 315°C , correspondente à degradação da quitosana. Não é observada a transição vítrea do polímero, pois há uma grande quantidade de água interagindo com as moléculas de quitosana, afetando sua organização e tornando difícil essa medida (CORAZZARI et al., 2015).

Figura 9 - Análises térmicas para quitosana natural (a) curvas de DSC e (b) curvas de termogravimetria (TGA).



As curvas TGA apresentadas na Figura 9b mostram a termodecomposição da quitosana natural. Observa-se a perda de massa em dois estágios. O primeiro, no intervalo entre 45°C a 132°C, corresponde à eliminação de voláteis, com perda de massa de aproximadamente 10%, revelando a perda de água que estava contida na amostra. Alguns autores estudaram os gases emitidos, como produtos de degradação, durante a análise de TGA acoplado em linha com FTIR e CGMS e não detectaram outros voláteis presentes, atribuíram essa perda de massa somente a água fracamente ligada (CORAZZARI et al., 2015; MOUSSOUT et al., 2016).

O segundo estágio, com início em 278°C até a completa degradação, em 600°C, apresenta uma perda de massa maior, 51%, atribuída à decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do biopolímero. Nota-se também que a temperatura de degradação da quitosana é aproximadamente 320°C. De acordo com a literatura, a degradação térmica nesta etapa indica a formação de uma mistura gasosa complexa, composta principalmente por H₂O, NH₃, CO, CO₂, CH₃COOH liberados durante a degradação da quitosana (CORAZZARI et al., 2015; MOUSSOUT et al., 2016).

4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS

Primeiramente fez-se um ensaio para avaliar qual a concentração de quitosana seria a mais adequada para o *scaffold* ser usado na regeneração do

tecido ósseo. Para isso, testaram-se amostras de 1,5, 2, 3, 4, 5, 6 e 8% (m/v) de quitosana. As amostras de 1,5 e 2% (m/v) não foram satisfatórias, pois não ocorreu à formação de uma estrutura tridimensional, formou-se um filme nas paredes do molde. As amostras de quitosana 3% (m/v) mostraram-se frágeis e quebradiças, características estas indesejadas para o uso na engenharia de tecidos. Obtiveram-se estruturas tridimensionais mais resistentes para as amostras de quitosana de 4 a 8% (m/v), satisfazendo aparentemente as expectativas.

Após serem retirados do liofilizador, os *scaffolds* são esponjosos, e ainda estão presentes alguns íons de acetato, provenientes do ácido acético usado na dissolução, interagindo com os grupos amina da quitosana. Por isso, é preciso realizar a neutralização desse material, removendo os grupos acetato, para que os *scaffolds* não sejam solúveis em água e nem absorvam a umidade presente no ambiente, causando modificações em suas estruturas e instabilidade.

A neutralização pode ser realizada, como já mencionada, através da imersão em solução diluída de NaOH e etanol. Observou-se que as amostras lavadas com a solução de NaOH, em todas as concentrações estudadas, inchavam e se degradaram em pouco tempo de contato com a solução. Acredita-se que antes de ocorrer a troca dos íons, acetato pelo OH⁻, o material absorve muita água, que age como um solvente afastando as cadeias poliméricas até completa dissolução. No entanto, não se teve o mesmo resultado com etanol. Os *scaffolds* mantiveram sua estrutura e morfologia durante todo o tempo de imersão, não havendo variação no volume do material. Portanto, o tratamento com etanol demonstrou ser mais eficiente e foi escolhido como o método padrão de neutralização.

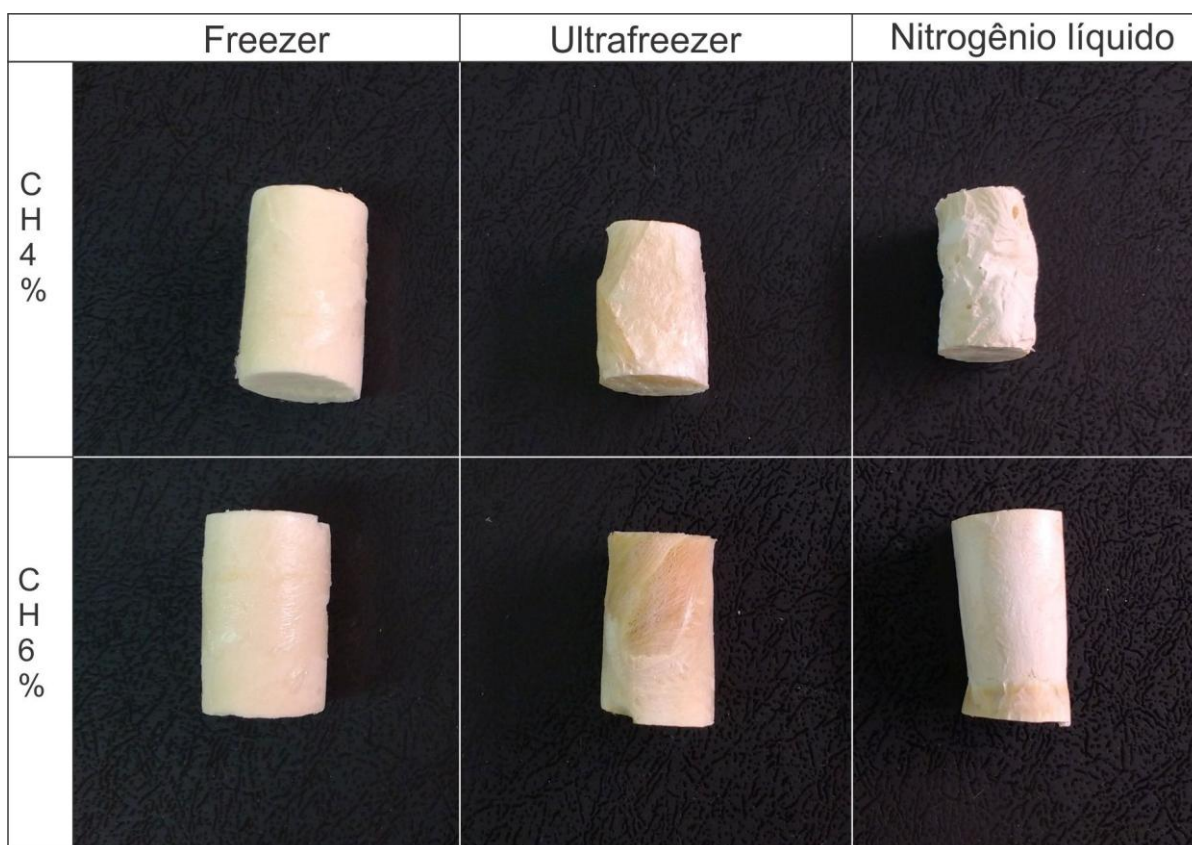
Realizaram-se testes para avaliar a interferência dos diferentes meios de congelamento na estrutura e morfologia dos *scaffolds* preparados à base de quitosana. Preparou-se a dissolução de quitosana nas concentrações de 4, 5, 6 e 8% (m/v) em ácido acético, conforme descrito na metodologia do trabalho. Na etapa de congelamento as amostras são levadas para congelarem em três métodos diferentes: *freezer*, atingindo temperaturas de -20°C, *ultrafreezer*, -50°C e nitrogênio líquido, -180°C.

Depois de ser realizado todo o processo para obtenção dos *scaffolds*, as amostras CH4 e CH5 apresentaram estruturas parecidas. O mesmo foi observado em CH6 e CH8, por isso foi escolhido as amostras de quitosana 4 e 6% (m/v) como

melhores, pois apresentam as mesmas características, porém com concentrações menores do produto de partida, diminuindo assim o custo do material.

As amostras congeladas no *ultrafreezer* e em nitrogênio líquido tiveram grande contração em sua estrutura, assim como uma distribuição heterogênea dos poros ao longo do seu corpo poroso. O *scaffold* que apresentou uma melhor morfologia, com uma estrutura porosa homogênea, poros interconectados e um diâmetro de poro adequado foi obtido pela técnica de congelamento em *freezer*. Indicando que com uma taxa de congelamento menor os *scaffolds* apresentaram uma estrutura mais homogênea. Portanto, a temperatura utilizada na preparação do material gera alterações na morfologia e na porosidade, conforme Figura 10.

Figura 10 - *Scaffolds* obtidos por diferentes métodos de congelamento.



O tempo de agitação do polímero na solução de ácido acético também foi analisado. Pois, notava-se, que decorrido 24h de dissolução ainda ficavam grumos de quitosana dispersos no meio. Então foi decidido deixar o dobro do tempo, 48h, e observar se o mesmo acontecia. Percebeu-se que não teve diferença no aspecto

das soluções em ambos os tempos, sendo assim, elegeu-se 24h como o período padrão para as dissoluções.

As amostras com melhor comportamento, isto é, preparadas em *freezer*, com o tempo de dissolução de 24h, foram caracterizadas por MEV. As imagens revelam que os suportes de quitosana possuem morfologias semelhantes apresentando uma estrutura tridimensional porosa e com interconectividade. Porém nos *scaffolds* com concentração de quitosana 4 e 6% (m/v) os poros se mostraram mais abertos e uma maior interconectividade que os de concentração 5 e 8% (m/v), como pode ser visto na Figura 11.

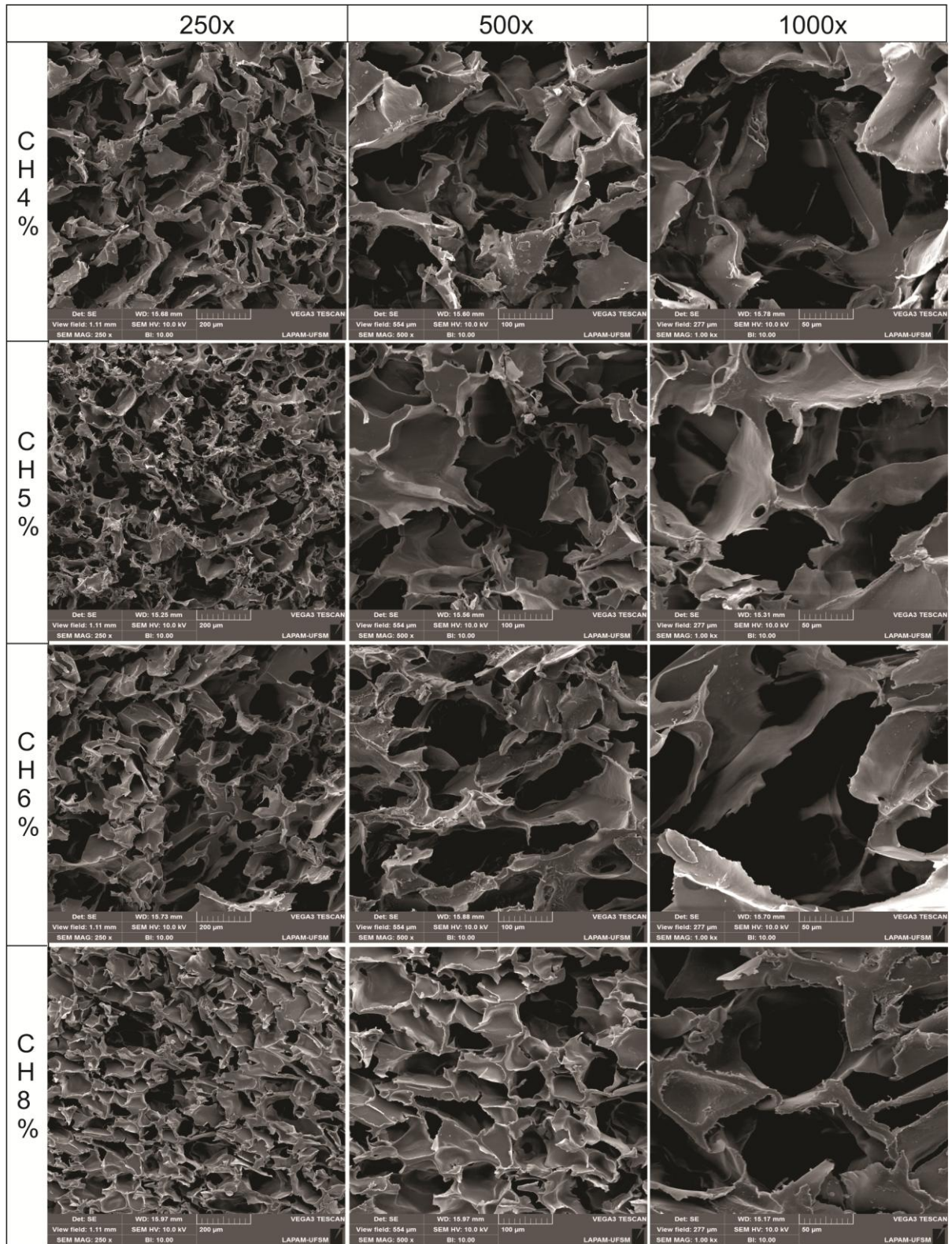
O valor do tamanho de poro diminui à medida que a concentração de quitosana aumenta no material, como pode ser observado através da Tabela 6. A formação dos poros acontece quando as moléculas do solvente são sublimadas no processo de liofilização. Quando há uma concentração maior do polímero, no caso, quitosana, ocorre uma diminuição dos espaços vazios entre as cadeias poliméricas, lugar ocupado pelo solvente, ocasionando a formação de poros menores.

Tabela 6 - Tamanho médio dos poros em diferentes concentrações de quitosana.

Amostra (%m/v)	Tamanho médio do poro (μm)	Volume dos Poros (cm^3)
CH4	191 \pm 20,3	1,51
CH5	146 \pm 23,8	1,22
CH6	159 \pm 23,6	1,46
CH8	104 \pm 7,3	0,86

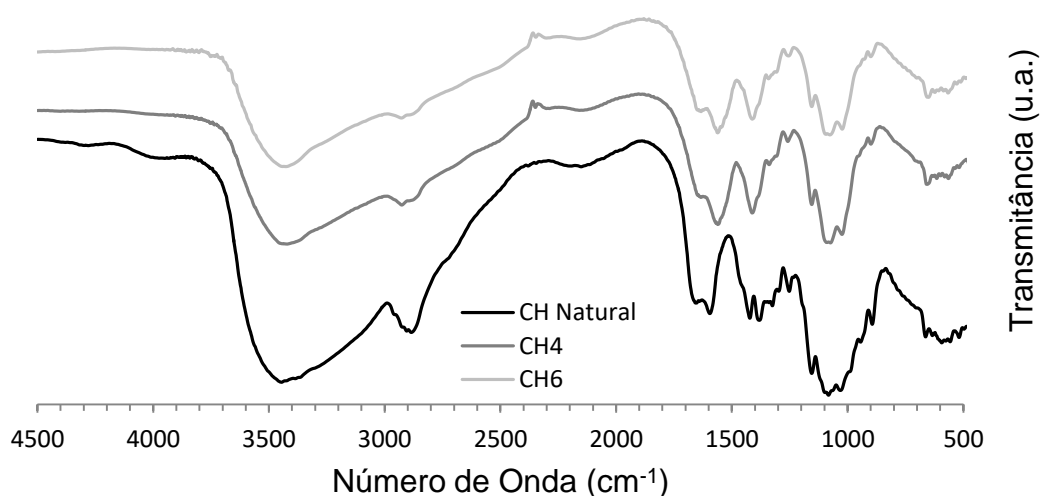
Obtiveram-se poros com o diâmetro superior ao tamanho mínimo necessário para a utilização desse material em aplicações que empregam células ósseas, ou seja, 100 μm . A estrutura de concentração 5% (m/v) apresentou dimensões inferiores de tamanho de poro em relação às amostras CH4 e CH6, bem como, a amostra com 8% (m/v) de quitosana, estando quase no limite do valor recomendado para crescimento ósseo. Por isso, escolheu-se as concentrações de 4 e 6% (m/v) de quitosana para continuar os testes.

Figura 11 - Micrografias dos *scaffolds* obtidos a partir de quitosana em diferentes concentrações e ampliações.



O espectro de infravermelho obtido de quitosana (CH) natural e dos *scaffolds* nas concentrações de 4 e 6% (m/v) são mostrados na Figura 12. Pode-se notar a presença de bandas em 3442 cm^{-1} que correspondem à ligação de hidrogênio e ao estiramento O-H e N-H (NEVES, 2013). Na banda do estiramento do C-H o pico de 2879 cm^{-1} corresponde à vibração simétrica. Além disso, na banda característica da deformação angular do CH_2 aparece o pico de 1423 cm^{-1} . Devido ao grau de desacetilação da quitosana, aparece o pico da ligação amida e o estiramento da ligação C=O em 1658 cm^{-1} , conhecida como banda de amida I; 1561 cm^{-1} é a deformação N-H, denominada como banda de amida II e 1315 cm^{-1} , atribuída à deformação CO-NH e ao grupo CH_2 , que acontecem à mesma frequência. Essa última banda tem sido denominada banda de amida III, devido à deformação do grupo CO-NH. A banda aguda a 1377 cm^{-1} é atribuída à deformação simétrica do CH_3 (CANELLA; GARCIA, 2001; JÚNIOR et al., 2009). As vibrações da ligação C-H correspondentes à estrutura sacarídea em 1154 cm^{-1} e 896 cm^{-1} são também encontradas neste espectro. A banda em 1064 cm^{-1} é resultante do estiramento C-O. A vibração na faixa de 1540 cm^{-1} a 1560 cm^{-1} é devida aos grupos amina protonados e ao grupo ácido carboxílico da molécula de ácido acético (BISPO; MANSUR; MANSUR, 2009).

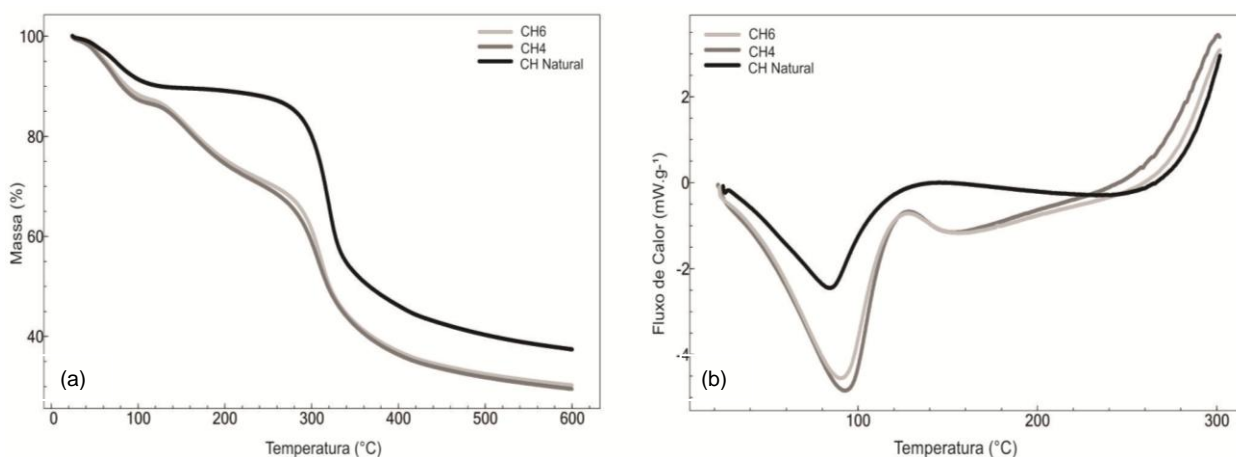
Figura 12 - Espectros de infravermelho de quitosana natural, e dos *scaffolds* de CH4 e CH6.



O comportamento térmico foi analisado por TGA e DSC conforme mostrado na Figura 13. Na análise termogravimétrica ao comparar as temperaturas de decomposição da CH Natural com as amostras CH4 e CH6, constatou-se uma diminuição na estabilidade térmica do material após o processamento, Figura 13a. Os materiais que passaram pela etapa de dissolução perderam mais água que a matéria-prima.

Observaram-se três estágios de perda de massa nos materiais processados. O primeiro ($\approx 70^\circ\text{C}$) é atribuído a evaporação da água adsorvida fisicamente ou fracamente ligada as moléculas de quitosana, sendo esta perda de 10% em CH Natural e 13% em CH4 e CH6. Nesses materiais, percebe-se uma variação que inicia em 105°C e atinge a taxa máxima em 160°C , estágio 2. Possivelmente nesta etapa ocorre a liberação da água que está fortemente ligada na estrutura polimérica e que não foi removida no processo de liofilização (ZAWADZKI; KACZMAREK, 2010).

Figura 13 - Análises térmicas de quitosana natural (CH Natural), e dos *scaffolds* de (CH4) e (CH6) (a) curvas de TGA e (b) curvas de DSC.



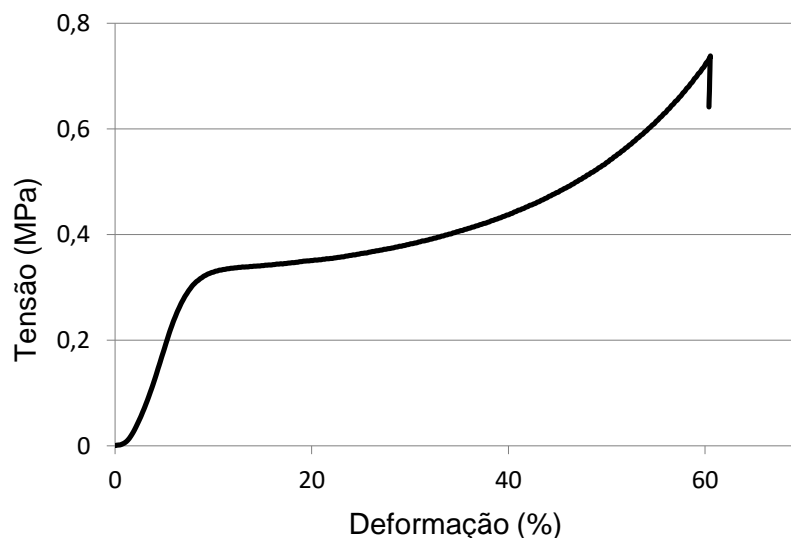
A maior eliminação de massa, estágio 3, ocorre na faixa de $260 - 400^\circ\text{C}$, durante o qual é observado 51% de degradação na quitosana natural e 39% nas demais amostras. É causado pela despolimerização das cadeias de quitosana, bem como, a decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do biopolímero, citadas anteriormente. Os valores de temperatura que representam os pontos de máxima perda de massa, ponto de inflexão, dos materiais foram obtidos através de curvas de DTGA.

Através do DSC, Figura 13b, confirma-se a perda de água nas amostras processadas, conforme observado no TGA. O início da degradação, medido na temperatura T_{onset} , na amostra CH Natural é de 278°C e em CH4 e CH6 é de 264°C e 273°C, respectivamente. Verificou-se que a estabilidade térmica da matéria-prima é ligeiramente maior que após o processamento, pois esses materiais passaram pela etapa de dissolução, afetando sua cristalinidade. Posteriormente a solubilização da quitosana em ácido acético, os polímeros adquirem forma de novelo, impedindo as cadeias poliméricas de se aproximarem e organizarem, assim, as moléculas se tornam mais desordenadas, influenciando nas propriedades térmicas (GOCHO et al., 2000).

A propriedade mecânica do *scaffold* é um fator muito importante. Deve ter força mecânica suficiente para manter sua integridade durante a regeneração do tecido. Também deve haver espaço adequado para proliferação de células, fornecimento de nutrientes e remoção de resíduos. As propriedades mecânicas são afetadas pela porosidade e o tamanho dos poros, devido à quantidade de volume vazio presente na estrutura (LOH; CHOONG, 2013).

Realizou-se o teste de compressão para determinar o comportamento mecânico do material sob carga de esmagamento. O comportamento mecânico de todos os corpos de provas durante o ensaio de compressão apresentou o mesmo padrão e pode ser ilustrado pela curva de tensão-deformação, Figura 14.

Figura 14 - Curva tensão-deformação de um *scaffold* de quitosana.



Calculou-se o módulo de elasticidade (E), segundo a lei de Hooke, a partir da inclinação da parte linear do gráfico. A tensão de escoamento (σ_E), é determinada pela intersecção da tangente da região linear com a tangente do *plateau*, é o valor de tensão a partir da qual a deformação dos *scaffolds* passa a ser permanente. A tensão máxima (σ_{max}) é o ponto que o material suporta a maior carga. Os valores encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7- Tensão de escoamento, tensão máxima e módulo de elasticidade dos *scaffolds* de quitosana em diferentes concentrações.

Amostra	Tensão de escoamento (MPa)	Tensão máxima (MPa)	Módulo de elasticidade (MPa)
CH4	0,1*	0,2293*	$7,23 \times 10^{-3}$ *
CH6	$0,28 \pm 0,07$	$0,6501 \pm 0,1$	$0,04926 \pm 0,06$

* Valores médios obtidos

Percebe-se que os *scaffolds* com maior teor de quitosana apresentam propriedades mecânicas melhores. Esse aumento pode estar relacionado com a diminuição dos espaços vazios presente na estrutura, ou seja, menor porosidade. Os valores do módulo de elasticidade e tensão de escoamento encontram-se entre 0,0072 - 0,0493 MPa e 0,1 - 0,28 MPa, respectivamente. Para o osso trabecular, os valores considerados adequados para o módulo de elasticidade são de 20 - 500 MPa e entre 4 - 12 MPa para a tensão de escoamento (BARROCA, 2008; SERRA et al., 2015).

Os *scaffolds* produzidos apresentaram valores de resistência mecânica inferiores ao osso trabecular, no entanto, são superiores aos relatados na literatura. Materiais preparados sob condições semelhantes as do presente trabalho encontraram valores de módulo de elasticidade de 0,0387 MPa e uma resistência a compressão de 0,007 - 0,027 MPa (KIM et al., 2015; SERRA et al., 2015; SUBRAMANIAN; LIN, 2005; YAO et al., 2012).

Em uma tentativa de aumentar a resistência mecânica dos *scaffolds*, acrescentou-se uma emulsão de nanocelulose ou nanocelulose/tanino no material depois de finalizada a etapa de dissolução de quitosana. Estudaram-se a adição de 0,15% (m/v) dessa emulsão em soluções de 4 e 6% (m/v) de quitosana. Este

material foi submetido à análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com a finalidade de observar sua morfologia, indicando se a adição desses compostos influencia na estrutura dos *scaffolds*.

As Figuras 15 e 16 indicam uma boa interconectividade e homogeneidade dos poros em ambas as amostras. Porém, verifica-se um pequeno fechamento dos poros com a adição da emulsão de nanocelulose e obtiveram-se diâmetros ainda menores com a incorporação de nanocelulose/tanino.

Figura 15 - Micrografias obtidas dos *scaffolds* de quitosana 4% (m/v) (CH4) e com adição da emulsão de nanocelulose (CHC4) ou nanocelulose/tanino (CHCT4), em diferentes ampliações.

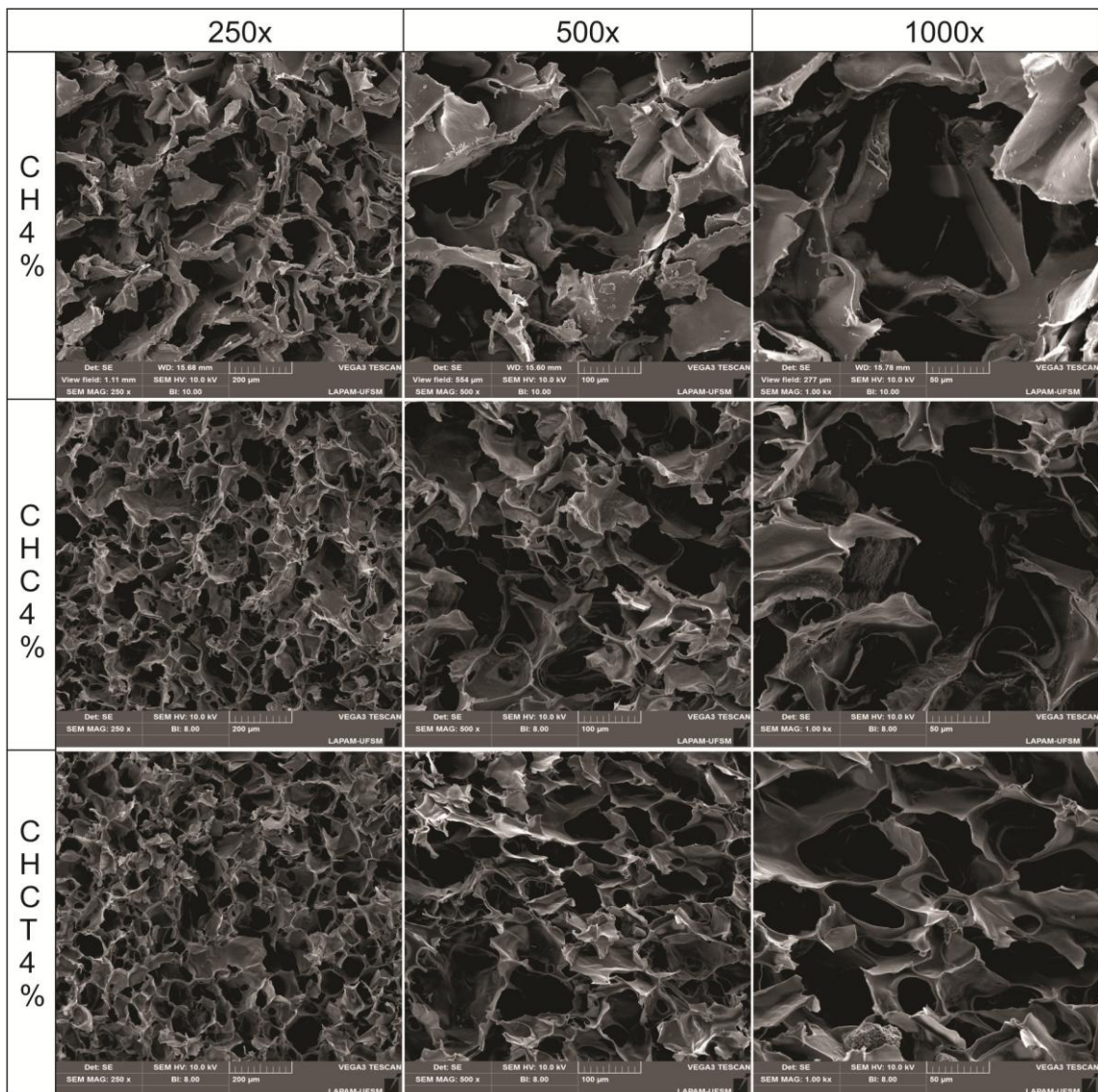
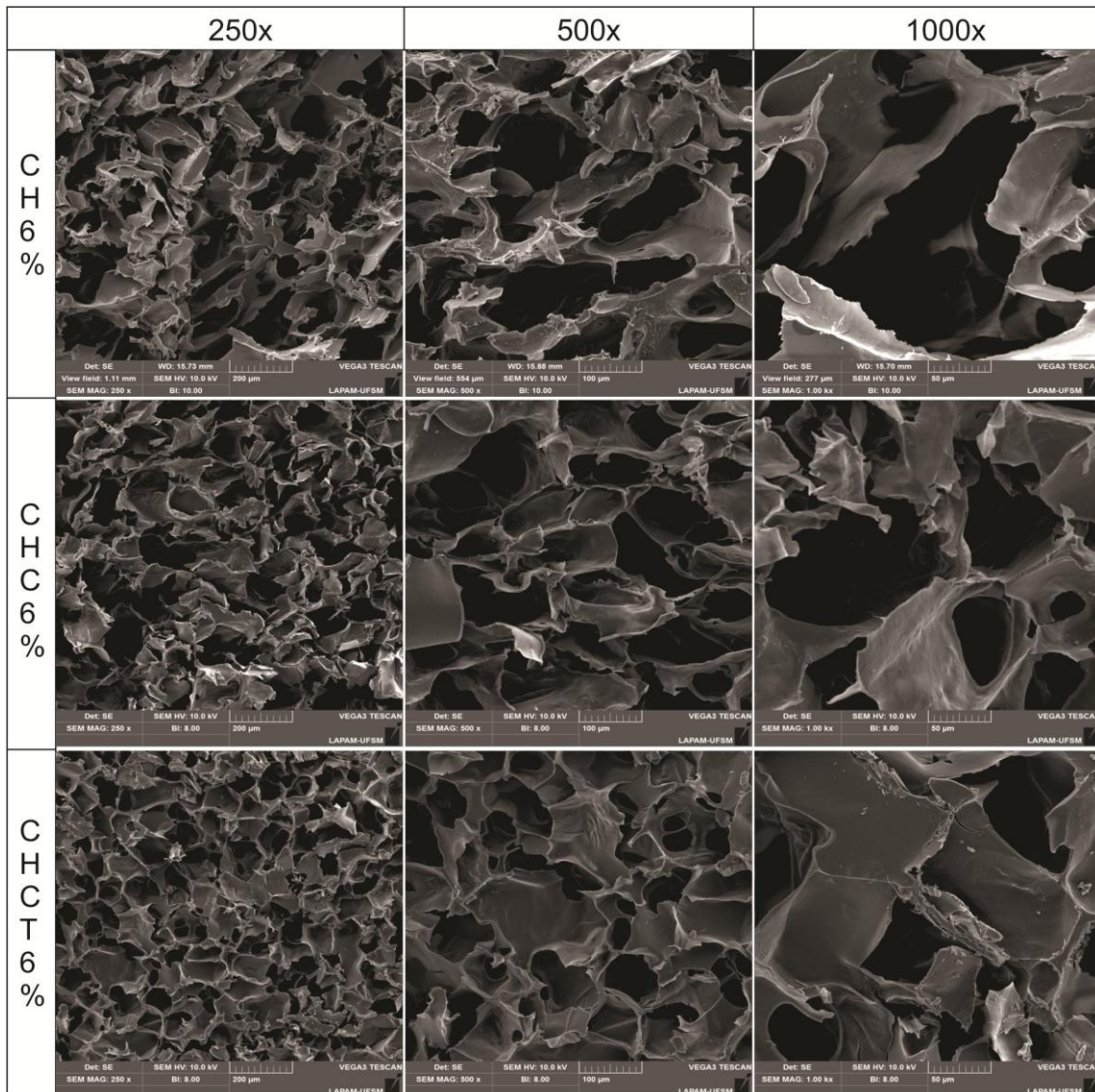


Figura 16 - Micrografias obtidas dos *scaffolds* de quitosana 6% (m/v) (CH6) e com adição da emulsão de nanocelulose (CHC6) ou nanocelulose/tanino (CHCT6), em diferentes ampliações.



Considerando a Tabela 8, percebe-se que a medida do poro é diminuída com a adição do reforço mecânico. O acréscimo de emulsão aumenta a quantidade de material polimérico dissolvido no meio, ocupando um maior volume e causando a diminuição no tamanho dos poros. Contudo, nas amostras CH6, a concentração de quitosana presente é superior, assim o volume ocupado pelas cadeias poliméricas é maior e os espaços vazios também são preenchidos pela emulsão de nanocelulose ou nanocelulose/tanino, tornando o tamanho dos poros menores.

No entanto, quando submeteu-se os *scaffolds* com adição de nanocelulose e nanocelulose/tanino, juntamente com o de quitosana, ao ensaio de bioatividade e

absorção de água em solução de SBF, constatou-se que os materiais se degradavam rapidamente, pois os íons acetato residuais passam a acidificar a solução, ocorrendo novamente à dissolução da quitosana, sendo inviável a realização desses testes. Assim, decidiu-se reticular essas amostras e estudar a alteração estrutural após esse processo nos *scaffolds* com concentração de 4% (m/v).

Tabela 8- Tamanho médio dos poros em diferentes concentrações de quitosana natural e com adição de emulsão de nanocelulose ou nanocelulose/tanino.

Amostra (%m/v)	Tamanho médio do poro (μm)	Porosidade (%)	Densidade Aparente (g.mL^{-1})	Volume dos Poros (cm^3)
CH4	191 \pm 20,3	81	0,070	1,51
CHC4	120 \pm 21,6	77	0,086	1,46
CHCT4	116 \pm 17,6	86	0,075	1,18
CH6	159 \pm 23,6	79	0,086	1,46
CHC6	116 \pm 19,4	79	0,088	1,23
CHCT6	110 \pm 22,6	92	0,141	1,02

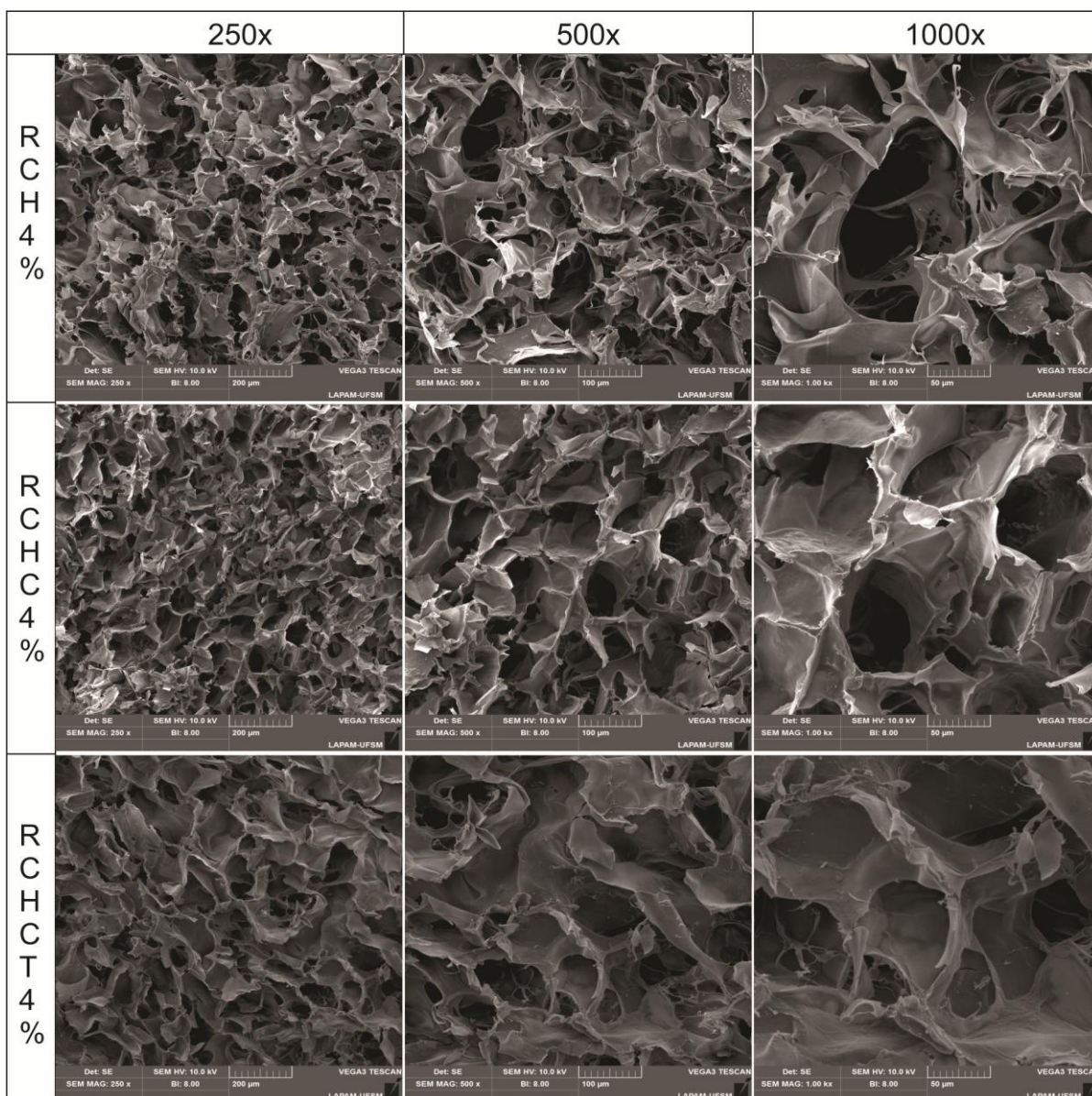
Fez-se necessária a reticulação dos *scaffolds* para gerar uma rede tridimensional polimérica mais rígida e com menor mobilidade das cadeias, tornando esse material mais resistente e menos solúvel em água. Após esse processo, as amostras foram submetidas à análise morfológicas no MEV, conforme Figura 17.

A distribuição dos poros abertos e interconectados é visível. Apresentam estruturas homogêneas com poros em formatos esféricos, mantendo a morfologia obtida anteriormente, sem a presença de um agente reticulante. Porém, houve uma pequena redução no tamanho dos poros, observado na Tabela 9.

Tabela 9 - Tamanho médio dos poros nas amostras reticuladas.

Amostra (%m/v)	Tamanho médio do poro (μm)
RCH4	111 \pm 31
RCHC4	94 \pm 10
CHCT4	105 \pm 15

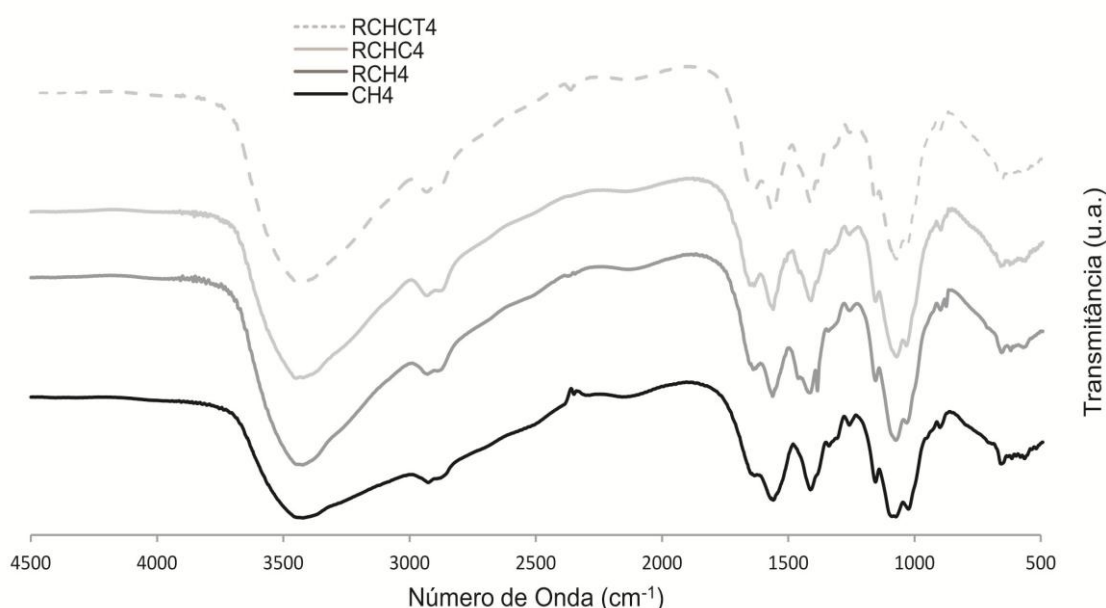
Figura 17 - Micrografias obtidas dos *scaffolds* reticulados com glutaraldeído e em uma concentração de quitosana 4% (m/v) (RCH4) e com adição da emulsão de nanocelulose (RHC4) ou nanocelulose/tanino (RCHCT4), em diferentes ampliações.



A espectroscopia de infravermelho foi usada para avaliar os grupos químicos dos polímeros, bem como a reticulação dos *scaffolds* com glutaraldeído, Figura 18. Observam-se bandas características, como de $3200 - 3600 \text{ cm}^{-1}$, normalmente atribuída ao estiramento do OH e do NH_2 . Os picos a 2800 a 2900 cm^{-1} são as vibrações típicas do estiramento C-H. Apesar de vários picos se aglomerarem no intervalo máximo de amida II ($1515 - 1570 \text{ cm}^{-1}$), são observados picos de absorção

a 1650 e 1322 cm^{-1} , característicos da quitina e quitosana, foram relatados como picos da amida I e III, respectivamente. Os picos agudos em 1383 e 1420 cm^{-1} foram designados para o CH_3 , deformação simétrica e em 1083 cm^{-1} indica a vibração de alongamento C-O na quitosana (ARANAZ et al., 2016; WANG; TURHAN; GUNASEKARAN, 2004).

Figura 18 - Espectros de Infravermelho obtido das diferentes amostras após reticulação.

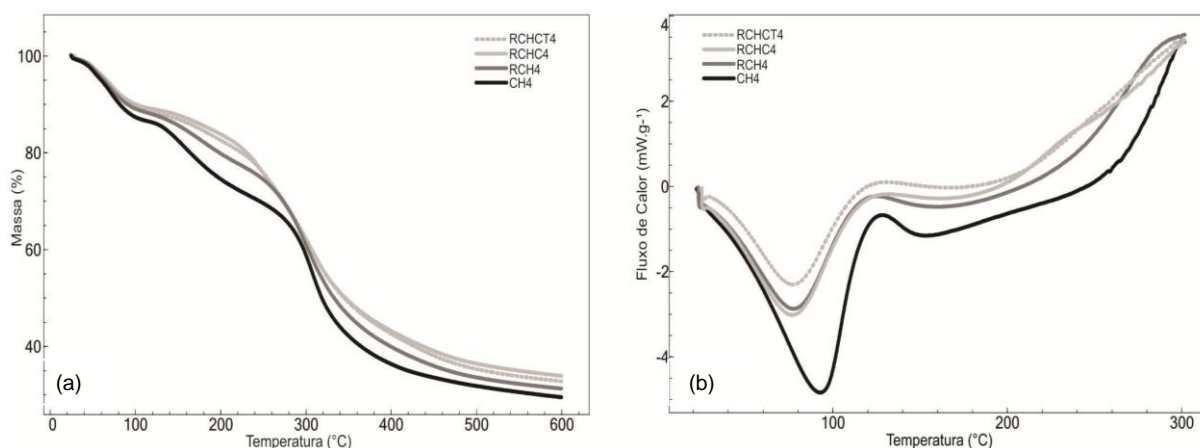


A reticulação química da quitosana com o GA ocorre a partir do nitrogênio nucleofílico do grupo amina ($-\text{NH}_2$) que reage com o carbono do aldeído, o qual desloca o oxigênio do aldeído e resulta na perda da molécula de água formando assim a ligação $\text{C}=\text{N}$ ($\sim 1648\text{ cm}^{-1}$), base de Schiff (COSTA; MANSUR, 2008).

Nas amostras reticuladas pode-se observar que há modificações na intensidade da banda em 1100 cm^{-1} , correspondente à amina alifática, denotando que esses grupos sofreram mudanças, podendo ser atribuído a ligações com as moléculas de GA, formando uma nova estrutura denominada imina ($\text{C}=\text{N}$). Nota-se um leve aumento na intensidade do pico correspondente a essa ligação, aproximadamente 1648 cm^{-1} . O pico em 2360 cm^{-1} , observado na amostra RCHCT, corresponde ao estiramento O-H de ácidos carboxílicos (RAJESHKUMAR; HARIHARAN; SATHISHKUMAR, 2016; TORRES et al., 2005).

Analisou-se o comportamento térmico do material após a reticulação, Figura 19. Quando é feita a comparação da curva termogravimétrica do material sem reticulação (CH4) com os reticulados, Figura 19a, verifica-se que há um aumento na estabilidade térmica do *scaffold* após este processo. Observa-se também, que as amostras contendo emulsão em sua composição apresentam uma menor taxa de perda de massa no estágio 2, que ocorre na faixa de 120 - 270°C, correspondente a evaporação de água ligada mais fortemente a estrutura, indicando que o material reticulado absorve menos água que os demais, que não passaram por esse tratamento. Fato também comprovado a seguir no teste de absorção de água. Da mesma forma, pode ser indício de que frações menores da macromolécula começaram a se degradar em temperaturas mais baixas nas amostras CH4, porém quando o agente reticulante é adicionado essas pequenas cadeias se ligam as moléculas maiores e a temperatura de início de degradação acontece em faixas mais altas. No estágio 3 (280 - 400 °C) ocorre a maior perda de massa e corresponde a degradação do material polimérico.

Figura 19 - Análises térmicas das diferentes amostras após reticulação (a) curvas de TGA e (b) curvas de DSC.



Através do DSC, Figura 19b, também se observa a perda de água nas amostras reticuladas, conforme observado no TGA. A temperatura de início de degradação dessas amostras, medido na temperatura T_{onset} , ocorre antes, apresentando um comportamento contrário ao visto no TGA. Na amostra RCHC4 é de 190°C, em RCHCT4 e RCH4 é aproximadamente 200°C e 230°C, respectivamente, diferente da amostra CH4 que é de 260°C. Isso pode ser explicado

devido a modificações na cristalinidade do polímero, onde se obtém materiais mais amorfos ou também há resíduos de glutaraldeído, que podem estar presentes nos *scaffolds*, funcionando como um plastificante, separando as cadeias poliméricas e não as ligando covalentemente, alterando a estabilidade térmica desses materiais.

4.3 ENSAIO DE ABSORÇÃO, DEGRADAÇÃO E BIOATIVIDADE

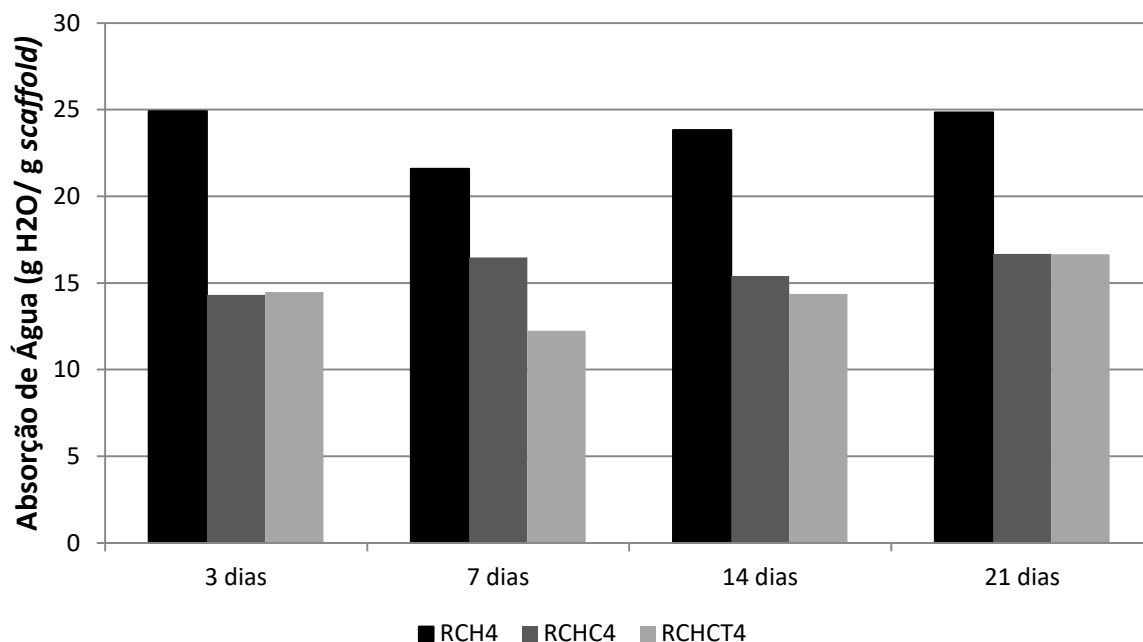
4.3.1 Análise de Água Absorvida

A capacidade de absorção e retenção de água é um aspecto interessante na engenharia de tecidos, pois permite a absorção de fluídos corporais e a transferência de nutrientes e metabólitos em sua estrutura. Pode-se também, proporcionar características indesejáveis, como a redução das propriedades mecânicas devido ao intumescimento da matriz polimérica e consequente dissolução do material. A quitosana possui um alto grau de afinidade e retenção de água devido a predominância de grupos aminos (N-H), onde a eletronegatividade das ligações gera sítios de alta polaridade, favorecendo o rearranjo das moléculas e água em torno desses sítios (FERNANDES, 2009). A absorção de água é responsável pela expansão da matriz polimérica, modificando a morfologia dos *scaffolds* (KAVYA et al., 2013).

Por essa razão, submeteu-se aos ensaios de absorção e degradação os *scaffolds* reticulados e com teor de 4% (m/v) de quitosana, e também, os que possuem nanocelulose e nanoceulose/tanino em sua constituição, a fim de verificar o efeito dessas substâncias sobre essas propriedades. Os resultados de absorção de água estão apresentados na Figura 20.

Obteve-se maior absorção de água no *scaffold* só de quitosana, sem adição do reforço. O material contendo nanocelulose e nanocelulose/tanino não demonstrou grande diferença nos valores entre os três primeiros dias e ao final do ensaio. Ao analisar os resultados durante todo o processo, verifica-se que não há um aumento considerável dos valores entre o 3º e o 21º dia, podendo ser um indicativo de que o processo de absorção atingiu o equilíbrio.

Figura 20 - Valores médios obtidos na análise de absorção de água.



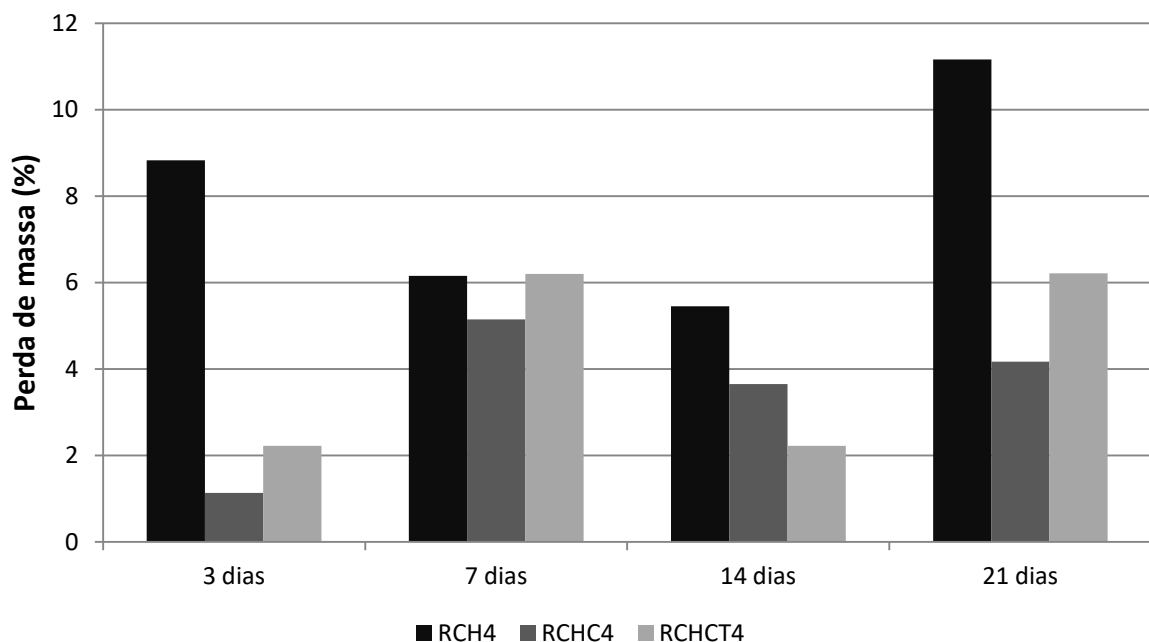
A água retida devido a hidrofiliabilidade da quitosana é influenciada pela quantidade de agrupamentos desacetilados, e que, juntamente com os grupos hidroxilas, caracterizam esta forte afinidade por moléculas polares. Quanto maior a quantidade de quitosana presente no meio maior será a hidrofiliabilidade desse composto, por isso, na presença da emulsão de nanocelulose e nanocelulose/tanino ocorre a diminuição da absorção de água, pois esses polímeros interagem com os mesmos grupamentos que a água, havendo assim uma espécie de competição no meio e reduzindo os sítios para a formação de ligações de hidrogênio com a água.

A diferença nos valores para uma dada amostra no decorrer dos dias pode ocorrer, pois o material utilizado para se fazer essa análise foi obtido em lotes diferentes, sendo assim, pode apresentar variabilidade no processo de reticulação e este afeta a hidrofiliabilidade das amostras. O reticulante disputa os grupos amino livres e provoca redução no espaçamento das cadeias poliméricas diminuindo a quantidade de água retida em sua estrutura.

4.3.1 Análise de Degradação

O processo de remodelação é realizado em equilíbrio entre a reabsorção do osso antigo pelos osteoclastos e deposição do osso novo pelos osteoblastos. Embora esse seja iniciado tão cedo, aproximadamente 3 a 4 semanas, a remodelação pode demorar anos até alcançar uma estrutura óssea totalmente regenerada. Caso a degradação ocorra muito rapidamente, a região não apresentará força mecânica suficiente para apoiar a região danificada. Inversamente, se for muito demorada, a regeneração não ocorrerá (BAYRAMOGLU et al., 2015; MARSELL; EINHORN, 2012). Portanto estudos de biodegradação se fazem necessários para simular o tempo de degradação do material em determinado período. A Figura 21 mostra os valores médios obtidos de perda de massa.

Figura 21 - Valores médios obtidos na análise de degradação.



A amostra RCH4 apresentou maior taxa de degradação, isso pode ser atribuído a um aumento na hidrofiliabilidade do composto, fato comprovado no ensaio anterior. Observa-se também, com a incorporação da emulsão de nanocelulose e nanocelulose/tanino (RHC4 e RCHCT4), reduziu substancialmente a perda de massa, cerca de 55%. Acredita-se que os produtos de degradação, basicamente

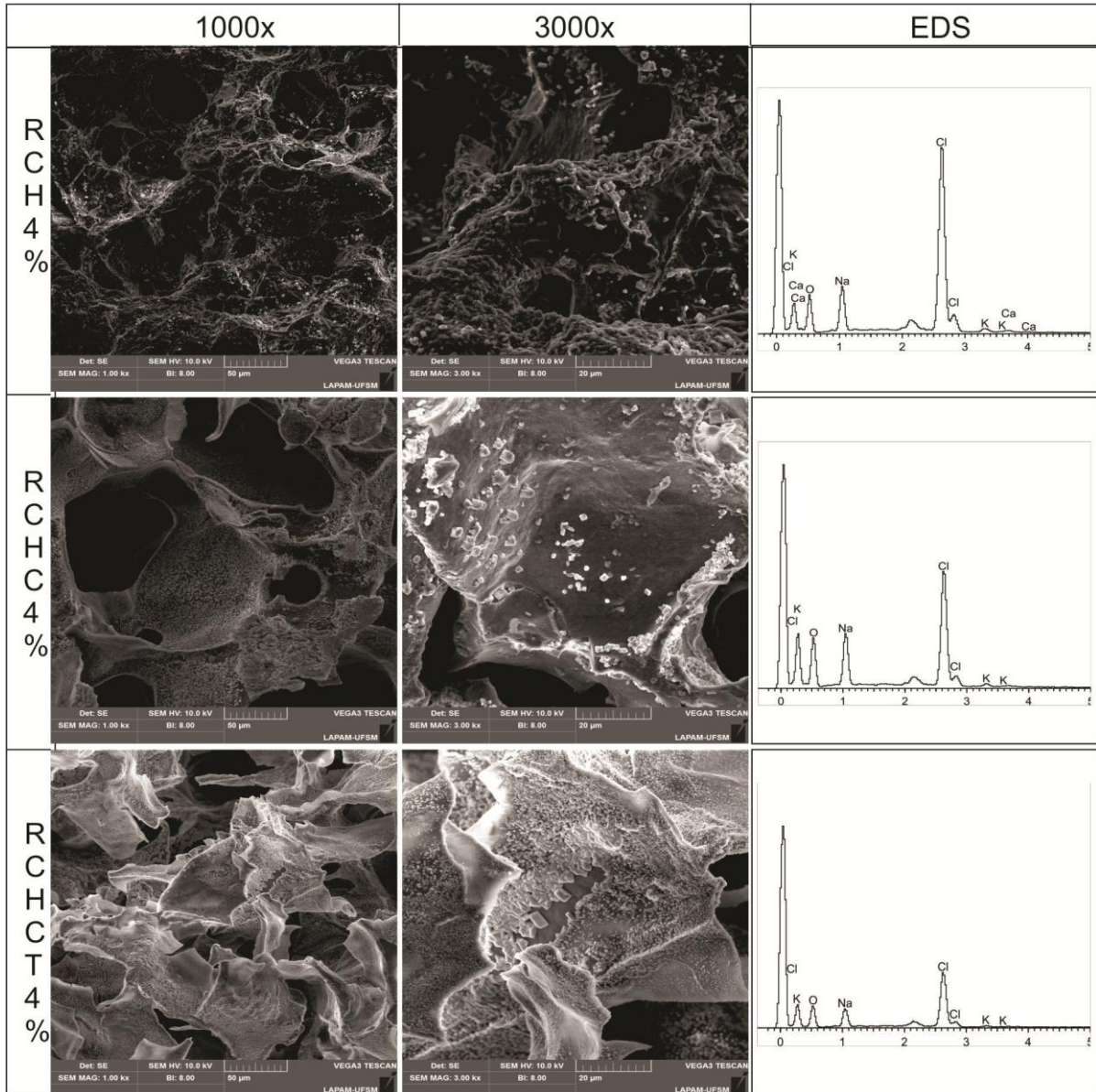
açúcares encontrados no nosso próprio corpo, não sejam tóxicos para o organismo, sendo considerados biocompatíveis (KEONG; HALIM, 2010).

4.3.3 Análise de Bioatividade

O estudo do potencial bioativo dos *scaffolds* em diferentes composições foi realizado por imersão no SBF, método descrito por Kokubo. Testaram-se apenas os materiais reticulados, pois os que não passaram por esse processo absorviam muita água e se degradavam em poucas horas, tornando impossível a realização do ensaio (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

A Figura 22 exibe as micrografias dos *scaffolds* após a imersão de 21 dias, tempo de maior contato com a solução. Percebeu-se a nível macroscópico, que os *scaffolds* mantiveram a mesma estrutura anterior a inserção no SBF, com a formação apenas de pequenos cristais em sua superfície, porém essa camada não era uniforme, estava distribuída em alguns pontos, dificultando sua localização e caracterização. A amostra RCH4, composta apenas de quitosana, apresentou maior quantidade dessa camada em sua superfície, indicando a precipitação de cloreto de sódio e potássio com a incorporação de cálcio e detectados após a realização do MEV/EDS, detectaram-se picos de Ca, sugerindo o caráter bioativo deste polímero.

Figura 22 - Micrografias obtidas dos scaffolds reticulados com glutaraldeído e em uma concentração de quitosana 4% (m/v) (RCH4) e com adição da emulsão de nanocelulose (RCHC4) ou nanocelulose/tanino (RCHCT4), em diferentes ampliações, após o ensaio de bioatividade em SBF, decorrido 21 dias.



Na imagem podemos observar a presença de pequenos cubos, amostra RCHC4, que foram identificados como sendo cristais de NaCl por análise de dispersão de energia de raios-x (EDS). Nos *scaffolds*, que continham emulsão em sua composição, apresentaram apenas picos de cloreto, sódio e potássio, não foi observada a formação de cálcio nem fósforo. Acredita-se que o tempo de imersão na solução tenha sido curto. É preciso mais dias para haver formação de fosfato de cálcio no material.

5 CONCLUSÃO

Uma estrutura tridimensional porosa a base de quitosana e emulsão de nanocelulose e nanocelulose/tanino, com diâmetro de poro aceitável e uma boa interconectividade foi desenvolvida, visando aplicações na engenharia de tecidos. Através da caracterização dos *scaffolds* obtidos foi possível constatar que a concentração de quitosana influencia na estrutura e morfologia do material.

O tratamento de neutralização com etanol demonstrou ser mais eficiente, mantendo a estrutura original dos *scaffolds*. O tempo de dissolução da quitosana não afetou na morfologia do material, porém observou-se que nesta etapa ocorreu a diminuição da cristalinidade do polímero, pois as cadeias adquirem formato de novelo, dificultando sua organização, alterando algumas propriedades.

Constatou-se que a porosidade e distribuição uniforme dos poros são influenciadas pela etapa de congelamento da amostra. Quando usados métodos de congelamento que apresentam taxas de resfriamentos mais lentas, como o *freezer*, obtiveram-se estruturas mais adequadas para o uso como substituinte ósseo. A presença das emulsões de nanocelulose e nanocelulose/tanino causou diminuição no tamanho dos poros, pois aumentou-se a quantidade de polímeros dissolvidos no meio, no entanto, ainda assim são obtidos valores dentro do esperado, ou seja, próximo aos 100 μm . A porosidade variou entre 77 a 92%.

Após a reticulação gerou-se uma rede tridimensional polimérica mais rígida, devido à formação de ligações cruzadas, tornando esse material mais resistente e aumentando suas propriedades térmicas e mecânicas. No estudo da bioatividade dos *scaffolds*, após 21 dias, observou-se a formação de pequenos cristais espalhados na superfície, a análise de EDS realizada constatou a presença de íons de cálcio na amostra RCH4, indicando uma potencial bioatividade para este material.

TRABALHOS FUTUROS

Embora tenhamos obtido características adequadas para aplicações biomédicas dos *scaffolds* preparados, é preciso otimizar e investigar mais profundamente alguns aspectos. Propõem-se algumas estratégias:

- Investigar a concentração mais adequada a ser adicionada no material como reforço mecânico (emulsões de nanocelulose e nanocelulose/tanino).
- Otimizar o processo de reticulação, determinando o melhor tempo de contato entre o agente reticulante e as amostras.
- Analisar a porosidade dos materiais reticulados.
- Estudar a bioatividade dos *scaffolds* em maiores tempos de imersão na solução de SBF.
- Examinar o comportamento mecânico nas amostras com adição das emulsões e também nas reticuladas.
- Realizar testes de citotoxicidade do material obtido.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. M. DA S. et al. Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Microondas. **Polímeros**, v. 23, n. 5, p. 630–635, 2013.
- ALMEIDA, H. A.; BÁRTOLO, P. J. Topological Optimisation of Scaffolds for Tissue Engineering. **Procedia Engineering**, v. 59, p. 298–306, jan. 2013.
- ALVAREZ, K.; NAKAJIMA, H. Metallic Scaffolds for Bone Regeneration. **Materials**, v. 2, p. 790–832, 2009.
- AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Critical reviews in biomedical engineering**, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.
- AN, J. et al. Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation. **Life Sciences**, v. 147, p. 46–58, 2016.
- ANITHA, A. et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 1644–1667, 2014.
- ANNABI, N. et al. Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 16, n. 4, p. 371–383, 2010.
- ARANAZ, I. et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 203–230, 1 maio 2009.
- ARANAZ, I. et al. Chitosan based films as supports for dual antimicrobial release. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 402–410, 1 ago. 2016.
- ARBENZ, A.; AVÉROUS, L. Chemical modification of tannins to elaborate aromatic biobased macromolecular architectures. **Green Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 2626–2646, 12 maio 2015.
- ASGHARI, F. et al. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 185–192, fev. 2017.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 23, p. 27–34, 2007.
- BADAL MCCREATH, S.; DELGODA, R. **Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies**. [s.l.] Academic Press, 2016.
- BAKER, S. C. et al. Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies. **Biomaterials**, v. 27, p. 3136–3146, 2006.
- BALDRICK, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 290–299, 2010.
- BANORIYA, D.; PUROHIT, R.; DWIVEDI, R. K. Advanced Application of Polymer based Biomaterials. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, n. 2, p. 3534–3541, 2017.
- BARROCA, N. et al. Tailoring the morphology of high molecular weight PLLA scaffolds through bioglass addition. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 9, p. 3611–3620, set. 2010.

- BARROCA, N. B. **Scaffolds à base de polímeros piezoelétricos para regeneração óssea**. 2008. 128f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica).- Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.
- BASKAR, D.; SAMPATH KUMAR, T. S. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 767–772, 17 nov. 2009.
- BATISTA, A. et al. Antimicrobial effects of native chitosan against opportunistic Gram-negative bacteria. **Microbiology Journal**, v. 1, p. 105–112, 2011.
- BAYRAMOGLU, G. et al. Fibrous polymer grafted magnetic chitosan beads with strong poly(cation-exchange) groups for single step purification of lysozyme. **Journal of Chromatography B**, v. 990, p. 84–95, 15 maio 2015.
- BEACHLEY, V.; WEN, X. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. **Materials Science & Engineering C**, v. 29, p. 663–668, 2008.
- BEPPU, M. M. et al. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of Membrane Science**, v. 301, p. 126–130, 2007.
- BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 325–347, maio 2010.
- BISPO, V. M.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S. **Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho de Filmes de Quitosana com Diferentes Quantidades de Agente Reticulante**. Belo Horizonte - MG. Disponível em: <<https://www.ipen.br/biblioteca/cd/cbpol/2009/PDF/297.pdf>>. Acesso em: 29 jun. 2017.
- BOF, M. J. et al. Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 281–294, out. 2015.
- BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in biotechnology**, 2012a.
- BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 546–554, out. 2012b.
- BRAGHIROLI, D. I.; STEFFENS, D.; PRANKE, P. Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 6, p. 743–753, jun. 2014.
- BUTSCHER, A. et al. Acta Biomaterialia Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 3, p. 907–920, 2011.
- BUTTAFOCO, L. et al. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 27, n. 5, p. 724–734, fev. 2006.
- CABALLERO, B.; TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. M. **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2^a ed. [s.l.] Academic Press, 2003.
- CANELLA, K. M. N. DE C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13–17, 2001.

- CARVALHO, A. G. et al. Adesivos tânicos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville na produção de painéis aglomerados. **Revista Árvore**, v. 38, n. 1, p. 195–202, fev. 2014.
- CHEN, F.-M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. 86–168, fev. 2016.
- CHOI, C.; NAM, J.; NAH, J. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 33, p. 1–10, 2016.
- COLLINS, M. N.; BIRKINSHAW, C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering — A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1262–1279, 2013.
- CORAZZARI, I. et al. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. **Polymer Degradation and Stability**, v. 112, p. 1–9, 1 fev. 2015.
- COSTA, E. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, 2008.
- CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 780–792, 2013a.
- CUI, Y. et al. Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes in vitro. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3859–3868, sep 2003.
- DABROWSKI, B. et al. Highly porous titanium scaffolds for orthopaedic applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 95B, n. 1, p. 53–61, out. 2010.
- DASH, M. et al. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.
- DECLERCQ, H. A. et al. The role of scaffold architecture and composition on the bone formation by adipose-derived stem cells. **Tissue engineering. Part A**, v. 20, n. 1–2, p. 434–444, jan. 2014.
- DELIORMANL, A. M. Synthesis and characterization of cerium- and gallium-containing borate bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 2, p. 1–13, 2015.
- DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering application : a review. **International Journal of Polymer Science**, p. 1–19, 2011.
- DOMINGUES, R. M. A.; GOMES, M. E.; REIS, R. L. The Potential of Cellulose Nanocrystals in Tissue Engineering Strategies. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 7, p. 2327–2346, 2014.
- DONG, C.; LV, Y. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. **Polymers**, v. 8, n. 12, p. 42, fev. 2016.
- DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: *Scaffold* design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337–4351, 2003.

DUTTA, R. C. et al. Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 2, p. 240–250, 2017.

ELSABEE, M. Z.; ABDU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 4, p. 1819–1841, 2013.

ENDOĞAN TANIR, T.; HASIRCI, V.; HASIRCI, N. Preparation and characterization of Chitosan and PLGA-based scaffolds for tissue engineering applications. **Polymer Composites**, v. 36, n. 10, p. 1917–1930, out. 2015.

EO, M. Y. et al. Cellulose membrane as a biomaterial: From hydrolysis to depolymerization with electron beam. **Biomaterials Research**, v. 20, n. 1, p. 1–13, 2016.

FATTORE, A. DEL; TETI, A.; RUCCI, N. Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 2302–2321, 2012.

FERNANDES, L. L. Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas. 2009. 57 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2009.

FERNANDES QUEIROZ, M. et al. Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation? **Marine Drugs**, v. 13, n. 12, p. 141–158, dez. 2014.

FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M. An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 1349–1362, 2016.

FU, Q. et al. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 7, p. 1245–1256, out. 2011.

FULGÊNCIO, G. D. O. et al. New mucoadhesive chitosan film for ophthalmic drug delivery of Timolol Maleate: In vivo evaluation. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 4, p. 350–358, 2012.

FURUYA, D. C. **Desenvolvimento e caracterização de scaffolds à base de fibras de alginato e quitosana para aplicações médicas**. 2015. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade De São Paulo, São Paulo, 2015.

GAJENDIRAN, M. et al. Conductive biomaterials for tissue engineering applications. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 51, p. 12–26, 2017.

GHANBAR, H. et al. Preparation of porous microsphere-scaffolds by electrohydrodynamic forming and thermally induced phase separation. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 5, p. 2488–2498, 2013.

GOCHO, H. et al. Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 1, p. 87–90, 1 jan. 2000.

GONSALVES, A. DE A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.

GOY, R. C.; MORAIS, S. T. B.; ASSIS, O. B. G. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 122–127, jan. 2016.

GUPTA, K. C.; JABRAIL, H. F. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 1, p. 43–54, 2006b.

HAYASHI, Y. et al. Chitosan and Fish Collagen as Biomaterials for Regenerative Medicine. In: **Advances in Food and Nutrition Research**. v. 65: 107-20. p. 107–120, 2012.

HERMANS, K. et al. Development and characterization of mucoadhesive chitosan films for ophthalmic delivery of cyclosporine A. **International journal of pharmaceutics**, v. 472, n. 1–2, p. 10–9, set. 2014.

HOLLISTER, S. J. **Porous scaffold design for tissue engineering**. ed. Nature Materials: Ed 4, 2005. 518 p.

HUANG, Q. et al. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. **Animal Nutrition Journal**, v. xxx, p. 1-14, 2017.

ISO/FDIS 23317 - Implants for surgery —In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials. , 2007.

JIANG, T. et al. Biologically active chitosan systems for tissue engineering and regenerative medicine. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 8, p. 354–364, 2008.

JIANG, T. et al. Chitosan-based biopharmaceutical scaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. In: SARMENTO, B. AND; NEVES, J. DAS (Eds.). . **Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2012. p. 393–427.

JÚNIOR, E. DE S. C. et al. **Constructos de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticulados quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido**. Belo Horizonte - MG. Disponível em: <<https://www.ipen.br/biblioteca/cd/cbpol/2009/PDF/295.pdf>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

JÚNIOR, J. V. DE A. **Compósitos polímero/fosfato de cálcio para aplicações biomédicas**. 2005. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAVYA, K. C. et al. Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nSiO₂ composite scaffold for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 255–263, 2013.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3–11, 2010.

KEONG, L. C.; HALIM, A. S. Biomedical-Grade Chitosan in Wound Management and Its Biocompatibility In Vitro. InTech. **Biopolymers**. Edited by Elnashar, M. 1. ed., 2010. cap 2, p. 19–36.

KHANG, G.; KIM, M.; LEE, H. **A manual for biomaterials/scaffold fabrication technology**. Ed. World Scientific, 2007. 288 p.

- KIM, H. L. et al. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 54, p. 20–25, 2015.
- KIM, K. W. et al. Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. **LWT - Food Science and Technology**. v. 44, n. 2, p. 565-569, mar 2011.
- KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, p. 2907–2915, 2006.
- KUBASIEWICZ-ROSS, P. et al. New nano-hydroxyapatite in bone defect regeneration: A histological study in rats. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 213, p. 83–90, set. 2017.
- KUMAR, A.; VIMAL, A.; KUMAR, A. Why Chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 615–622, out. 2016.
- LEE, K. et al. Functionalized alginate/chitosan biocomposites consisted of cylindrical struts and biologically designed for chitosan release. **Current Applied Physics**, v. 14, n. 8, p. 1105–1115, ago. 2014.
- LEHR, C.-M. et al. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 78, p. 43–48, 1992.
- LEVENGOOD, S. L.; ZHANG, M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of materials chemistry. B, Materials for biology and medicine**, v. 2, n. 21, p. 3161–3184, 2015.
- LIANG, C. Y.; MARCHESSAULT, R. H. Infrared spectra of crystalline polysaccharides. I. Hydrogen bonds in native celluloses. **Journal of Polymer Science**, v. 37, n. 132, p. 385–395, jun. 1959.
- LICHTE, P. et al. Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. *Injury*, v. 42, p. 569–573, 2011.
- LIMA, I. S.; AIROLDI, C. A thermodynamic investigation on chitosan–divalent cation interactions. **Thermochimica Acta**, v. 421, p. 133–139, 2004.
- LOH, Q. L.; CHOONG, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 19, n. 6, p. 485–502, dez. 2013.
- LOPES, P. P. et al. Acrylic formulations containing bioactive and biodegradable fillers to be used as bone cements: Properties and biocompatibility assessment. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1289–1299, 2013.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros**. Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica. 1 ed. Rio de Janeiro, e-Papers. 2001
- MADIHALLY, S. V; MATTHEW, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 20, n. November 1998, p. 1133–1142, 1999.
- MAFI GOLCHIN, M. et al. Osteoporosis: A Silent Disease with Complex Genetic Contribution. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 43, n. 2, p. 49–61, 2016.

- MARSELL, R.; EINHORN, T. The Biology of Fracture Healing. **National Institutes of Health**, v. 42, n. 6, p. 551–555, 2012.
- MATI-BAOUCHE, N. et al. Chitosan as an adhesive. **European Polymer Journal**, v. 60, p. 198–212, 2014.
- MENDES, A. A. et al. Aplicação de Quitosana como Suporte para a Imobilização de Enzimas de Interesse Industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.
- MISSIO, A. L. et al. Analytical characterization of purified mimosa (*Acacia mearnsii*) industrial tannin extract: Single and sequential fractionation. **Separation and Purification Technology**, v. 186, p. 218–225, 2017.
- MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892–896, 2005.
- MONTEIRO, O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 119–128, 1999a.
- MONTEIRO, O. A. C.; AIROLDI, C. The influence of chitosans with defined degrees of acetylation on the thermodynamic data for copper coordination. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 282, p. 32–37, 2005.
- MOUSSOUT, H. et al. Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. **Polymer Degradation and Stability**, v. 130, p. 1–9, 1 ago. 2016.
- MURA, S.; NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. **Nature materials**, v. 12, n. 11, p. 991–1003, 2013.
- NEVES, A. L. DE P. **Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana**. 2013. 150f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2013.
- NEWMAN, P. et al. Porous and strong three-dimensional carbon nanotube coated ceramic scaffolds for tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 42, p. 8337–8347, out. 2015.
- NUERNBERGER, S. et al. The influence of scaffold architecture on chondrocyte distribution and behavior in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts. **Biomaterials**, v. 32, n. 4, p. 1032–1040, fev. 2011.
- NWE, N.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. The Mechanical and Biological Properties of Chitosan Scaffolds for Tissue Regeneration Templates Are Significantly Enhanced by Chitosan from *Gongronella butleri*. **Materials**, v. 2, n. 2, p. 374–398, 20 abr. 2009.
- O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, mar. 2011b.
- O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p. 173–207, 1997.
- OGAWA, K.; YUI, T.; OKUYAMA, K. Three D structures of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, n. 1–2, p. 1–8, abr. 2004.

ONG, S.-Y. et al. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. **Biomaterials**, v. 29, n. 32, p. 4323–4332, nov. 2008.

ORÉFICE, R.; PEREIRA, M. DE M.; MANSUR, H. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2006. 538 p.

ORYAN, A. et al. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

PIOTTO, Z. C. **Eco-eficiência na Indústria de Celulose e Papel - Estudo de Caso**. 2003. 379 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.

PIRES, L. S. O. **Biocerâmicos e Biovidros para prototipagem 3D: propriedades e formulações**. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2011.

POLIANA P. LOPES, NATHALIE B. BARROCA, A. L. D.-S. AND B. J. L. F. Application of chitosan based materials for drug delivery. In: GUILHERME LUIZ DOTTO, SERGIO PAULO CAMPANA-FILHO, L. A. DE A. P. (Ed.). **Chitosan Based Materials and its Applications**. Sharjah, U.A.E.: Bentham Science, 2017. p. 181–248.

QAZI, T. H. et al. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: Existing technologies and future trends. **Biomaterials**, v 53, p 502-521 jun. 2015.

RAJESHKUMAR, G.; HARIHARAN, V.; SATHISHKUMAR, T. Characterization of Phoenix sp. natural fiber as potential reinforcement of polymer composites. **Journal of Industrial Textiles**, v. 46, n. 3, p. 667–683, 28 set. 2016.

REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. **Trends in Biotechnology**. v. 33, n 6, p. 362-369, jun. 2015.

REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413–3431, 2006.

RINALDI, A. et al. Effect of yeast strain and some nutritional factors on tannin composition and potential astringency of model wines. **Food Microbiology**, v. 53, p. 128–134, 2016.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Physical and Chemical Treatments on Chitosan Matrix to Modify Film Properties and Kinetics of Biodegradation. **Journal of Materials Physics and Chemistry**, v. 1, n. 3, p. 51–57, 2013.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, M. et al. Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine. **BioMedicine Research International**, p. 1–15, 2015.

ROSETI, L. et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering : State of the art and new perspectives. **Materials Science & Engineering C**, v. 78, p. 1246–1262, 2017.

SABNIS, S.; BLOCK, L. Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N -deacetylation of chitosan. **Polymer Bulletin**, v. 39, n. 1, p. 67–71, 1997.

SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J. T. Making tissue engineering scaffolds work.

Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European cells & materials**, v. 5, p. 29–40, 2003.

SARAVANAN, S.; LEENA, R. S.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1354–1365, 2016.

SCHLICKWEI, W.; SCHLICKWEI, C. The use of bone substitutes in the treatment of bone defects - The clinical view and history. **Macromolecular Symposia**, v. 253, p. 10–23, 2007.

SEEMAN, E.; DELMAS, P. D. Bone Quality? The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 21, p. 2250–2261, 25 maio 2006.

SEOL, Y.-J. et al. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 13, p. 1037–1041, jul. 2004.

SERRA, I. R. et al. Production and characterization of chitosan/gelatin/ β -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 55, p. 592–604, 2015.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661–671, 2009.

SIRÓ, I.; PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: A review. **Cellulose**, v. 17, n. 3, p. 459–494, 2010.

SIVASHANKARI, P. R.; PRABAHARAN, M. Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1382–1389, 2016.

SMITH, W.; HASHEMI, J. **Fundamentos de engenharia e ciência dos materiais**. ed. 5. McGrawHill: Porto Alegre, 2012. 734 p.

SPINDOLA, H. et al. Anti-inflammatory effect of chitosan oligomers. **New Biotechnology**, v. 25, p. S9, set. 2009.

STRATTON, S. et al. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. **Bioactive materials**, v. 1, n. 2, p. 93–108, dez. 2016.

SUBRAMANIAN, A.; LIN, H.-Y. Crosslinked chitosan: Its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 75A, n. 3, p. 742–753, 1 dez. 2005.

SUN, J. et al. An approach to architecture 3D scaffold with interconnective microchannel networks inducing angiogenesis for tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 11, p. 2565–2571, nov. 2011.

SZCZUREKA, A. et al. A new method for preparing tannin-based foams. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 40–53, 2014.

THEIN-HAN, W. W.; KITIYANANT, Y. Chitosan scaffolds for in vitro buffalo embryonic stem-like cell culture: An approach to tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 80B, n. 1, p. 92–101, 1 jan. 2007.

- TOMMILA, M. et al. Cellulose - A Biomaterial with Cell-Guiding Property. In: S Liu, X Luo, J Zhou. - Edited by van de Ven, Theo GM: InTech. **Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications**, 2013. cap. 5, p. 83 - 104.
- TORRES, M. A. et al. Produção e Caracterização de Microesferas de Quitosana Modificadas Quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 306–312, 2005.
- TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia**. 10. ed. Artmed Editora, 2016.
- UMASHANKAR, P. R.; MOHANAN, P. V; KUMARI, T. V. Glutaraldehyde treatment elicits toxic response compared to decellularization in bovine pericardium. **Toxicology international**, v. 19, n. 1, p. 51–8, jan. 2012.
- WANG, T.; TURHAN, M.; GUNASEKARAN, S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v. 53, n. 7, p. 911–918, 1 jul. 2004.
- WU, S., LIU, X.; YEUNG, K. W. K. LIU, C., YANG, X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering R**, v. 80, p. 1–36, 2014.
- XU, Y. et al. Design and fabrication of porous chitosan scaffolds with tunable structures and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 177, p. 210-216, 2017.
- YANG, J. et al. Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 84B, n. 1, p. 131–137, jan. 2008.
- YAO, C. K. et al. Porous chitosan scaffold cross-linked by chemical and natural procedure applied to investigate cell regeneration. **Applied Surface Science**, v. 262, p. 218–221, 1 dez. 2012.
- YEN, M.-T.; YANG, J.-H.; MAU, J.-L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 15–21, jan. 2009.
- ZAWADZKI, J.; KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 394–400, abr. 2010.
- ZHANG, R.; MA, P. Poly (α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *Journal of Biomedical Materials Research*. v. 44, n. 4, p. 446-455, 1999.
- ZHANG, Y. et al. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 11, p. 1914–1917, 15 ago. 2005.
- ZHANG, Y.; ZHANG, M. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. **Journal of biomedical materials research**, 2001.
- ZHAO, L.; CHANG, J. Preparation and characterization of macroporous chitosan/wollastonite composite scaffolds for tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 2004.

ANEXO - ARTIGO SUBMETIDO

Preparation and optimization of chitosan based scaffolds for biomedical applications

Bárbara Lovato; Alessandra Cenci; Daniel Bertuol and Poliana Lopes

Chemical Engineering Department, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, 97105900, RS, Brazil.

Correspondence to: Poliana Lopes (Email: poliana.lopes@ufsm.br)

ABSTRACT

Scaffolding for tissue regeneration has drawn a lot of interest, which should offer a 3D interconnected porous structure behaving as a template to promote cells adhesion, proliferation and new tissue ingrowth. In the present work, chitosan based scaffolds were produced by freeze-drying solutions. The effect produced by different freezing technique and polymer concentration in the morphology of the material was investigated. The freezing rate strongly impacts the structures, a slower freezing rate was found to be the most favorable condition for ice crystal growth which resulted in larger pores creating a more uniform and regular internal structure. The scaffolds were also characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Thermal Analysis (DSC and TGA). This study clearly confirmed that the selection of a suitable polymer concentration and appropriate preparative conditions allows the modulation of topological architecture of the material, suggesting that these formulations could be used as scaffolds for biomedical application.

Keywords: Scaffolds. Biomedical Engineering. Chitosan.

INTRODUCTION

Over the last decades the number of studies that report development of a biodegradable scaffold that mimics the natural extracellular matrix and provides a spatial and temporal environment for cellular activity and tissue regeneration has significantly increased¹. The idea is to restore or replace damaged body parts or lost organs by transplanting supportive scaffolds with suitable cells that in combination with biomolecules generate new tissue. This idea represents an important breakthrough in the regenerative medicine, which is currently one of the most rapidly growing fields in the life sciences²⁻⁵

With the longer life expectancy of the population and the increasing number of people with bone disorder, the use of bone grafts is expected to rise substantially. Bone defects requiring grafts to promote healing are among the most frequent and costly problems in health care^{6,7}. Thus there is necessity to propose suitable alternatives to overcome the limitations and restrictions imposed by the use of autograft and allograft tissues.

It is not easy to define an ideal scaffold since each tissue needs a particular matrix design with well-defined material properties⁸. Ideally, it can be said that scaffolds should possess certain requirements so they can successfully performed their functions, such as biocompatibility, porosity, mechanical strength, water retention, protein adsorption and biodegradability^{7,9,10}.

Considering the scaffold like a temporary matrix, it should degrade in a controlled way such that it is completely resorbed by the time the tissue is regenerated. Therefore, its success in biomedical applications is largely dependent on its nature, composition, and associated properties¹¹⁻¹³. Besides, design and architecture of the scaffold are also important parameters for tissue engineering and regenerative medicine research^{12,14,15}. It is known that an open-pore geometry (interconnectivity) and suitable pore size plays a critical role in regulating cell spatial distribution and nutrient transfer, affecting the cellular signal expression and consequently tissue formation^{16,17}.

Various materials have been used to produce scaffolds that meet the requirements mentioned previously¹⁸⁻²¹. However, the biodegradable polymers are dominant scaffolding materials in tissue engineering field^{5,12,22,23}. Chitosan, a versatile hydrophilic polysaccharide derived from chitin, is a non-toxic, biocompatible and biodegradable polymer which has drawn much of the attention in recent years for its use as graft material²⁴⁻²⁶. Some remarkable properties of chitosan as biomaterial are based on its cationic character such as mucoadhesion, stimuli response, haemostatic capability and versatile biological activities as antimicrobial activity and low immunogenicity²⁷⁻³³. This natural biopolymer has inspired the development of safe and effective medical devices due to its unique physicochemical and biological characteristics^{24,30}. Additionally, chitosan is especially attractive as a bone scaffold material because it supports the attachment and proliferation of osteoblast cells as well as formation of mineralized bone matrix^{6,34}.

In this context, the work intends to be a contribution towards the development of chitosan-based scaffolds with improved properties, investigating the effect produced by different freezing technique and polymer concentration in the topological architecture of the material, thus allowing the selection of the best condition for further studies.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of chitosan-based scaffold

Commercial chitosan from crab shells with a deacetylation degree of 85% was purchased from Polymar Ind. Ltda (Ceará, Brazil). The calculated molecular weight (M_v) was 190 kDa, being determined by viscosity measurements and using the Mark–Houwink relationship^{35,36}.

The others reagents and solvents are of analytical grade and they have been used without any further purification.

For scaffold preparation we used the phase separation and freeze-drying (lyophilization) technique. In this procedure, chitosan solutions with different concentrations (4, 5, 6 and 8 wt%) were prepared in 0.35M acetic acid, introduced into a mold and subjected to control freezing. Upon freezing, ice crystals form in the chitosan solution, and are phase-separated from the chitosan salt. During the subsequent freeze-drying step, the ice crystals sublimate to yield a porous architecture of the material. Therefore, three freezing techniques, freezer (-20°C), ultrafreezer (-50°C) and liquid nitrogen (-180°C), were tested to assess the formed porous structure inside scaffold. The process by freezer and ultrafreezer was carried out during 24h. Quenching in liquid nitrogen occurred very rapidly, being the container directly immersed in liquid for some minutes. Finally, after that, the scaffold is neutralized and dehydrated using a series of ethanol solutions (100, 70 and 50%) in order to avoid moisture uptake and to preserve the shape (porosity) of the scaffold. The samples were lyophilized at -50 °C and under a vacuum of 15×10^{-3} mbar.

Characterization techniques

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) was used to evaluate the degree of deacetylation and to identify the functional groups of the scaffolds. The samples were made in form of disks with KBr, being analysed between 500 and 4500 cm^{-1} , in an IR spectrometer (Shimadzu, Prestige 21, Japan).

The X-ray diffraction patterns were recorded on a diffractometer (Rigaku, Miniflex 300, Japan) using Cu K α radiation ($\lambda = 1.54051 \text{ \AA}$) generated at 30 kV and 10 mA, with 2 theta ranging from 5° to 30° . The crystallinity index (CI) was calculated by the following equation:

$$CI = \frac{(I_{110} - I_{am})}{I_{110}} \times 100 \quad (1)$$

where I_{110} = crystallinity diffraction pattern intensity at $2\theta = 20^\circ$ and I_{am} = amorphous diffraction pattern intensity at $2\theta = 16^\circ$ ²⁸.

The thermal properties were determined by differential scanning calorimetry (Shimadzu, DSC 60 Plus) and thermogravimetric analysis (Shimadzu, TGA-50). DSC studies were carried out at a heating rate of 10°C/min from room temperature up to 600°C under constant nitrogen flow. The sample mass was kept at about 10 mg in an aluminum hermetic pan. The successive repetition of the same heating cycle allows evidencing the presence of some irreversible phenomena. For TGA measurements, samples (about 5 mg) were heated at 600°C under the same operating condition described above. The results were plotted as both percentage of weight loss and first derivative of weight loss as a function of temperature. TA-60WS Software was used to analyze the obtained curves.

The morphology of the scaffolds was examined by scanning electron microscopy (SEM, Hitachi S-4100, Japan) at an accelerating voltage of 10 kV. The samples were mounted vertically on aluminum stubs with the help of double-sided adhesive carbon-tape, then coated with a conductive layer of gold and finally observed in SEM using different magnifications. The average pore size was determined from SEM pictures by selecting arbitrary fracture areas and measuring 20 pores through ImageReady software.

Porosity is a measure of the void fraction in a material, being defined by the ratio of the volume of pore to the total, or bulk volume of the material, Equation 2. It was measured using a liquid displacement method (Archimedes' principle), with ethanol (absolute alcohol) as the displacement liquid due to its ease of penetration into the pores and non-induction of damage in the material.

$$\text{Porosity (\%)} = \frac{(V_1 - V_3)}{(V_2 - V_3)} \times 100 \quad (2)$$

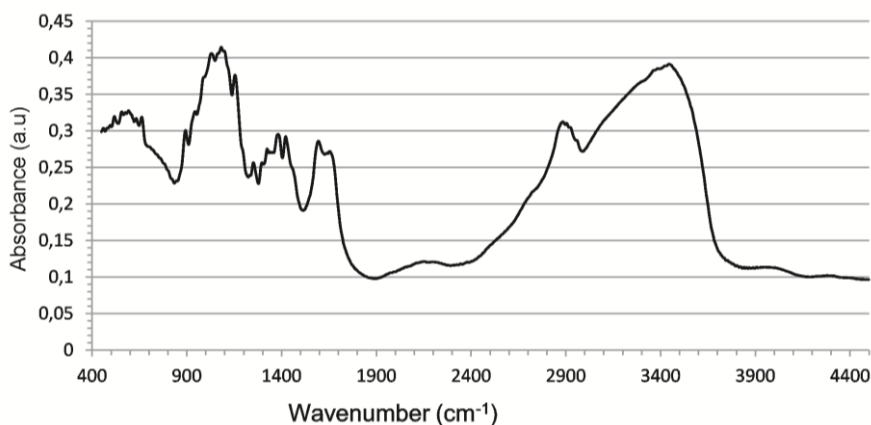
where V_1 = known volume of ethanol, V_2 = Volume sum of ethanol and submerged scaffold and V_3 = Volume of ethanol after scaffold removal³⁷.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of chitosan

Chitosan is obtained by alkaline N-deacetylation of chitin, this reaction rarely is 100% complete, resulting in a copolymer of glucosamine with N-acetylglucosamine¹³. During deacetylation, acetyl groups are removed from the molecular chain of chitin leaving behind an amino group. The presence of reactive amino (NH₂) group in the chitosan structure is one of the most important parameter as it influences the properties of polymer in many of its applications^{1,38}. Therefore the characterization of commercial chitosan was done by determining its degree of deacetylation (DD) prior to further utilization. Figure 1 depicts the FTIR spectra of polymer.

Figure 1: FTIR spectra of natural chitosan.



The DD represents the content of amino in polymer chain, which was calculated by the absorbance ratios of amide-I band and hydroxyl band, at 1655 cm⁻¹ and 3450 cm⁻¹ respectively, using the Equation 3 according to method proposed by Sabnis³⁹.

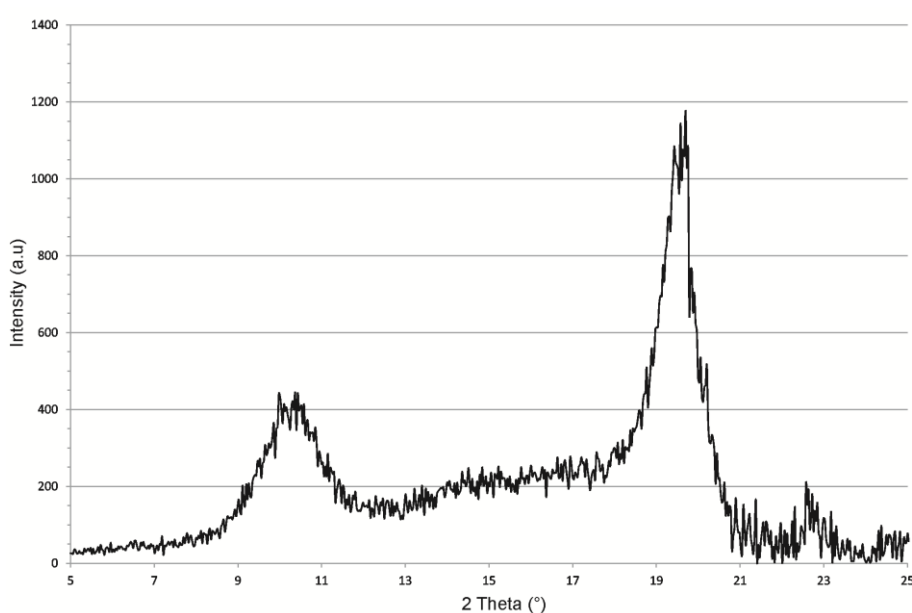
$$DD (\%) = 97,67 - \left[26,486 \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \right] \quad (3)$$

where, A corresponds to the absorbance of respective bands.

The calculated value was 85%, which is a suitable measure for this polymer, exhibiting degree of deacetylation that lie within the required range for commercial chitosan and similar to the information provided by the manufacturer (DD provided 87.4%).

X-ray diffraction was used to provide information about the crystallinity of chitosan, Figure 2.

Figure 2: X-ray powder diffractogram of chitosan.



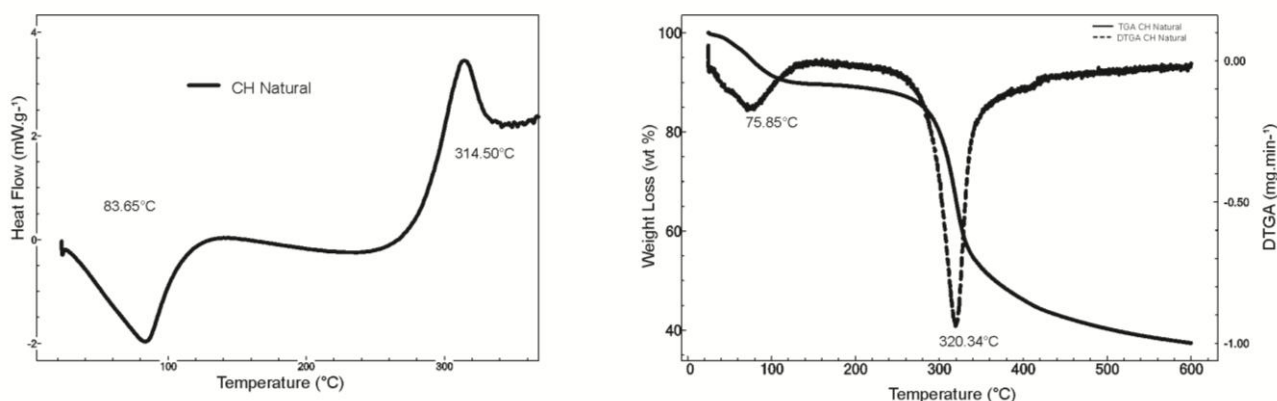
As shown in the figure, there are two prominent peaks in the diffraction pattern, at 10.3° and 19.7° , which they were indexed as (020) and (110) respectively and confirm the semi-crystalline nature of this polymer^{38,40}. It is known that chitosan chains are packed in an antiparallel arrangement and bonded by hydrogen bonds to make a sheet structure. Like chitosan is a hydrophilic polymer, water molecules are present between these sheets, forming a hydrated crystal called as tendon polymorph⁴¹. In this case, the peaks are broad due to small crystallites, and can be assigned with a crystal structure. The obtained XRD pattern is similar to other recently reported for chitosan^{28,38,42}. The CI was calculated from the maximum

intensity of the peak corresponding to the plane (110) at 19.7° , according to the Equation 1.

The crystallinity of the chitosan powder was 78%, using this method.

The thermal properties of chitosan were evaluated by DSC and TGA. Figure 3 shows two well defined thermal events, the first was observed in the temperature range less than 100°C being identified by DSC as a endothermic peak, whereas the second one occurred in temperature above 300°C , corresponding to an exothermic peak. The first signal is commonly associated to the evaporation of physisorbed water, loosely bound at the chitosan surface, causing a weight loss of 10%. The exothermic event, at a higher temperature can be related to the degradation of polymer exhibiting a weight loss of 51%. It was suggested in the literature that the volatile compounds formed from the thermal degradation of chitosan evidenced a complex gaseous mixture mainly composed by H_2O , NH_3 , CO , CO_2 , CH_3COOH and CH_4 , which can be attributed to further dehydration, to deacetylation and depolymerization of polymer^{43,44}.

Figure 3: Thermal characterization of chitosan (a) DSC thermogram and (b) TGA/DTG curve.



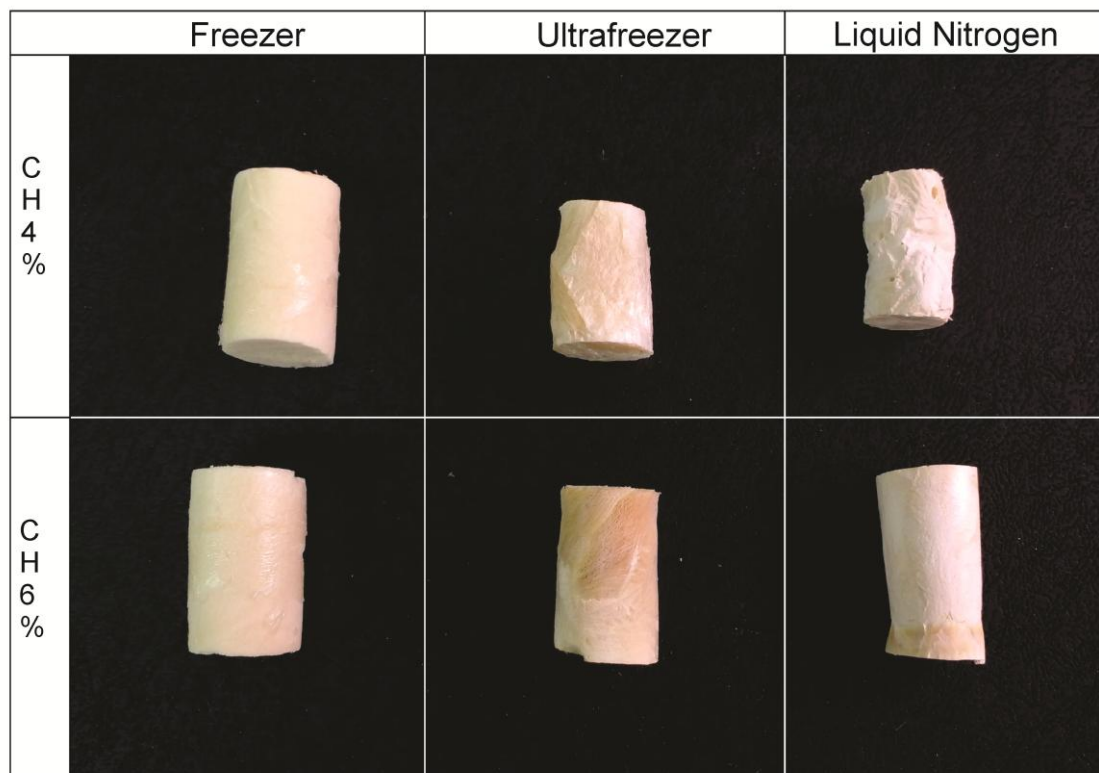
Morphological investigation of the scaffold

The scaffolds of chitosan at the concentrations of 4, 5, 6 and 8% in acetic acid were prepared as described in the methodology. To evaluate the interference of the different freezing

technique on their structure and morphology the cooling of samples was carried out by three different methods: freezer, reaching temperatures of $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ultrafreezer, $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and liquid nitrogen, $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$.

The samples obtained for 4 and 5% presented similar structures. The same was observed in the scaffold for 6 and 8%. Hence, the concentration of 4 and 6% were chosen since they use less amount of polymer. The freezing rate strongly impacts the structures, as can be seen in Figure 4.

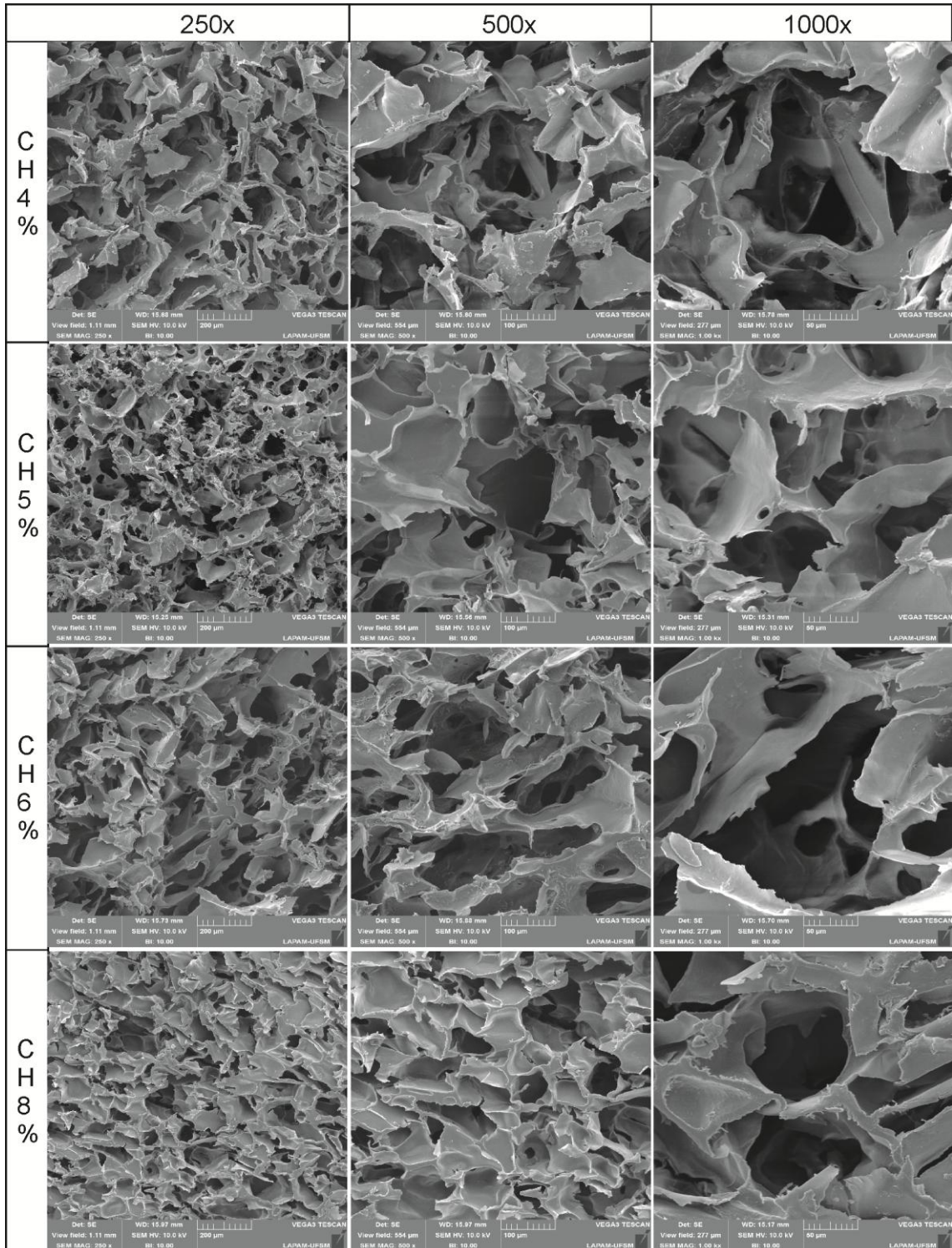
Figure 4: Chitosan based scaffolds prepared by different freezing techniques.



Scaffolds processed in liquid nitrogen and ultrafreezer exhibited a heterogeneous, compact and almost non porous structure, due to higher contraction of material, which can be associated to a fast freezing and solidification promoting elongated and irregular shape of pore. While the samples prepared in freezer presented a suitable structure, indicating that a

slower freezing rate create a more uniform and regular internal structure. Thus the samples obtained at -20°C , with better behavior, were also characterized by MEV, Figure 5.

Figura 5: SEM micrographs of the investigated scaffolds.



The micrographs show the morphology and cross-section of scaffolds obtained with different concentrations. It is observed that all materials exhibited a porous structure and adequate interconnectivity. However, CH4% and CH6% samples revealed an interconnective microchannel network and higher pore size, Table 1, providing space for cellular infiltration and potential new tissue ingrowth.

Table 1: The porosity and pore size of the chitosan scaffolds

Samples (%w/v)	Pore size (μm)	Pore volume (cm^3)	Porosity (%)
CH4	$191 \pm 20,3$	1,51	81
CH5	$146 \pm 23,8$	1,22	-
CH6	$159 \pm 23,6$	1,46	79
CH8	$104 \pm 7,3$	0,86	-

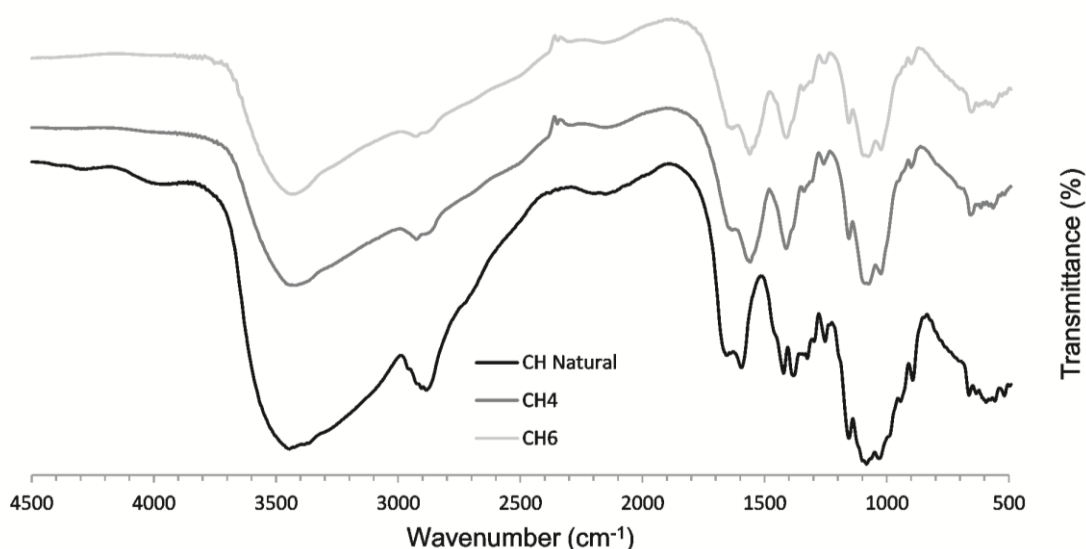
Besides pore size, Table 1 also shows porosity measures calculated by liquid displacement method, being one of the important features that determine the success of the scaffold. Various studies highlighted that pore sizes greater than 100 μm enable cell seeding, tissue ingrowths and vascularization^{7,34,45}. Thus scaffolds prepared in this work had the appropriate pore size for osteoblast proliferation.

The infrared spectroscopic characterization was used to assess the functional groups present in the natural chitosan and scaffold developed at different concentration (CH4% and CH6%). All the presented spectra were collected in transmission mode, Figure 6. A strong and broad band centered at 3440 cm^{-1} corresponds to N-H and O-H stretching, as well as the intramolecular hydrogen bonds. This band is generally large due to the macromolecular character of the polymer and because of the amount bindings of hydrogen^{46,47}. The stretching vibrations of C-H were found at 2880 cm^{-1} , furthermore the CH_2 bending and CH_3 symmetrical deformations were confirmed by the presence of bands at around 1423 and 1375 cm^{-1} , respectively. Residue of chitin attributed to N-acetyl groups was confirmed by the bands

at around 1645 cm^{-1} (axial C=O stretching of amide I), 1325 cm^{-1} (C-N stretching of amide III), and also at 1550 cm^{-1} that corresponds to N-H bending of amide II. This last band can be observed in scaffolds and it was probably overlapped by other band at 1580 cm^{-1} assigned to the angular deformation of N-H bonds of the amino groups. Vibrations of glycosidic bonds, C-O and C-O-C stretching, between 1150 cm^{-1} and 900 cm^{-1} have also been detected^{36,43,48,49}.

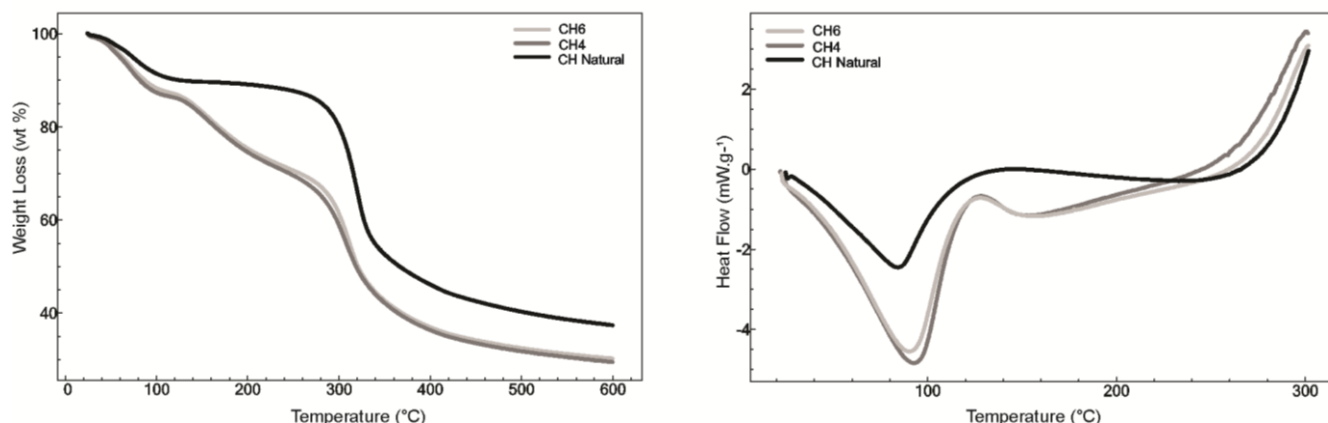
Figure 6: Comparison of FTIR spectra of chitosan and scaffolds developed.

Figure 6: Comparison of FTIR spectra of chitosan and scaffolds developed.



The study of thermal behavior of these materials was investigated by using TGA and DSC, Figure 7. An interesting fact is that the scaffolds fabrication method can affect their thermal degradation mechanism. The mentioned temperatures were provided as the inflection points, through first order derivatives (DTG), depicting the peak maximum to evaluate the degradation characteristics. It is observed that the thermogram of natural chitosan presented the highest decomposition temperature and more stable structure. For prepared scaffold the TGA pattern is rather similar and three thermal events can be identified.

Figure 7: Thermal analysis by DSC and TGA for the different formulations investigated



The first event at 70°C is assigned to the loss of water molecules weakly bound to the chitosan network. The second at 160°C showed release of water bounded to the functional groups of polymer, which was not completely removed in the first step of dehydration. The third and predominant event, in the temperature range between 260-400 °C, corresponds to the decomposition reactions being characteristic for deacetylation and partial depolymerization of the chitosan chain^{43,44}. As can be seen, the shift to a lower temperature in the thermal degradation indicated that the scaffold formulation process changed the physico-chemical properties of the original compounds due to the interaction between the large amount of water and the polymer causing a reduction of the crystallinity and also a potential decrease of the chitosan chains length⁵⁰.

DSC confirms the earlier observations, where the first peak (endothermic) is higher for scaffolds representing water volatilization and reduction in the degradation temperature (exothermic) with respect to the onset temperature that denotes the temperature at which the weight loss begins.

The total weight loss of the scaffolds (CH4% and CH6%) and natural chitosan was about 70% and 60%, respectively. The degradation effects of the scaffolds were more pronounced than of the natural polymer, which can be explained by weakened the intra and intermolecular hydrogen bonds resulting in more fragile three dimensional networks.

CONCLUSIONS

Scaffold has emerged as one important biomaterial in tissue engineering being an effective alternative to conventional grafting methods. The strategy approached in this study was to produce chitosan based scaffolds prepared with different composition and under different conditions. These variables showed to play an important role in defining the material microstructure. A slower freezing rate was found as the most favorable condition, resulting in highly interconnected macroporous scaffolds with a pore size ranging from of 80 to 190 μm and porosity higher than 80%. However, the solvent–polymer interaction, due to the scaffolds preparation, leading to interfere with inter and intramolecular bonds of the polymer causing a decrease in degradation temperature. The results obtained are encouraging and suggest that this scaffold could be used for the intended applications, although it would be beneficial to concentrate on further research demonstrating the development of a more stable structure.

REFERENCES

1. Rodríguez-vázquez, M.; Vega-ruiz, B.; Ramos-zúñiga, R.; Saldaña-koppel, D.A.; Quiñones olvera, L. F. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1.
2. Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, 36, 981.
3. Dong, C.; Lv, Y. *Polymers (Basel)*. **2016**, 8, 42.
4. Stratton, S.; Shelke, N. B.; Hoshino, K.; Rudraiah, S.; Kumbar, S. G. *Bioact. Mater.* **2016**, 1, 93.
5. Asghari, F.; Samiei, M.; Adibkia, K.; Akbarzadeh, A.; Davaran, S. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **2017**, 45, 185.
6. Levengood, S. L.; Zhang, M. *J. Mater. Chem. B. Mater. Biol. Med.* **2014**, 2, 3161.
7. Saravanan, S.; Leena, R. S.; Selvamurugan, N. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, 93, 1354.
8. Endogan Tanir, T.; Hasirci, V.; Hasirci, N. *Polym. Compos.* **2015**, 36, 1917.
9. Barroca, N.; Daniel-da-Silva, A. L.; Vilarinho, P. M.; Fernandes, M. H. V. *Acta Biomater.* **2010**, 6, 3611.
10. O'Brien, F. J. *Mater. Today* **2011**, 14, 88.
11. Jiang, T.; Deng, M.; Fattah, W. I. A.-; Laurencin, C. T. In *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*; Sarmiento, B. and Neves, J. das, Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2012**; pp 393.
12. Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D. S. *Int. J. Polym. Sci.* **2011**, 1.
13. Poliana P. Lopes, Nathalie B. Barroca, A. L. D.-S. and B. J. L. F. In *Chitosan Based Materials and its Applications*; Guilherme Luiz Dotto, Sergio Paulo Campana-Filho, L. A. de A. P., Ed.; Bentham Science: Sharjah, U.A.E., **2017**; pp 181.
14. Hollister, S. J. .

15. Almeida, H. A.; Bártolo, P. J. *Procedia Eng.* **2013**, *59*, 298.
16. Declercq, H. A.; Desmet, T.; Dubruel, P.; Cornelissen, M. J. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20*, 434.
17. Nuernberger, S.; Cyran, N.; Albrecht, C.; Redl, H.; Vécsei, V.; Marlovits, S. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1032.
18. Bose, S.; Roy, M.; Bandyopadhyay, A. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 546.
19. Lichte, P.; Pape, H. C.; Pufe, T.; Kobbe, P.; Fischer, H. *Injury* **2011**, *42*, 569.
20. Newman, P.; Lu, Z.; Roohani-Esfahani, S. I.; Church, T. L.; Biro, M.; Davies, B.; King, A.; Mackenzie, K.; Minett, A. I.; Zreiqat, H. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 8337.
21. Dabrowski, B.; Swieszkowski, W.; Godlinski, D.; Kurzydowski, K. J. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2010**, *95B*, 53.
22. Qazi, T. H.; Mooney, D. J.; Pumberger, M.; Geißler, S.; Duda, G. N. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: Existing technologies and future trends. *Biomaterials* **2015**, *53*, 502–521.
23. Chen, F.-M.; Liu, X. *Prog. Polym. Sci.* **2016**, *53*, 86.
24. Baldrick, P. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *56*, 290.
25. Kean, T.; Thanou, M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 3.
26. Aranaz, I.; Mengíbar, M.; Harris, R.; Paños, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G.; Heras, Á. *Curr. Chem. Biol.* **2009**, *3*, 203.
27. Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991.
28. Aranaz, I.; Harris, R.; Navarro-García, F.; Heras, A.; Acosta, N. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *146*, 402.
29. Jiang, T.; Kumbar, S. G.; Nair, L. S.; Laurencin, C. T. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 354.
30. Croisier, F.; Jérôme, C. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 780.
31. Yang, J.; Tian, F.; Wang, Z.; Wang, Q.; Zeng, Y.; Chen, S. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2008**, *84*, 131.
32. Hermans, K.; Van den Plas, D.; Kerimova, S.; Carleer, R.; Adriaensens, P.; Weyenberg, W.; Ludwig, A. *Int. J. Pharm.* **2014**, *472*, 10.
33. Kumar, A.; Vimal, A.; Kumar, A. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *91*, 615.
34. Seol, Y.-J.; Lee, J.-Y.; Park, Y.-J.; Lee, Y.-M.; -Ku, Y.; Rhyu, I.-C.; Lee, S.-J.; Han, S.-B.; Chung, C.-P. *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26*, 1037.
35. Gupta, K. C.; Jabrail, F. H. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *66*, 43.
36. Bof, M. J.; Bordagaray, V. C.; Locaso, D. E.; García, M. A. *Food Hydrocoll.* **2015**, *51*, 281.
37. Sun, J.; Wang, Y.; Qian, Z.; Hu, C. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, *22*, 2565.
38. Baskar, D.; Sampath Kumar, T. S. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *78*, 767.
39. Sabnis, S.; Block, L. H. *Polym. Bull.* **1997**, *39*, 67.
40. Zhang, Y.; Xue, C.; Xue, Y.; Gao, R.; Zhang, X. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1914.
41. Ogawa, K.; Yui, T.; Okuyama, K. *Int. J. Biol. Macromol.* **2004**, *34*, 1.
42. Yen, M.-T.; Yang, J.-H.; Mau, J.-L. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *75*, 15.
43. Corazzari, I.; Nisticò, R.; Turci, F.; Faga, M. G.; Franzoso, F.; Tabasso, S.; Magnacca, G. *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *112*, 1.
44. Zawadzki, J.; Kaczmarek, H. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80*, 394.
45. Deliormanl, A. M. **2015**.
46. Fernandes Queiroz, M.; Melo, K.; Sabry, D.; Sasaki, G.; Rocha, H. *Mar. Drugs* **2014**, *13*, 141.
47. Liang, C. Y.; Marchessault, R. H. *J. Polym. Sci.* **1959**, *37*, 385.
48. Rivero, S.; García, M. A.; Pinotti, A. *J. Mater. Phys. Chem.* **2013**, *1*, 51.
49. Fulgêncio, G. D. O.; Viana, F. A. B.; Ribeiro, R. R.; Yoshida, M. I.; Faraco, A. G.; Cunha-Júnior, A. D. S. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2012**, *28*, 350.
50. Gocho, H.; Shimizu, H.; Tanioka, A.; Chou, T.-J.; Nakajima, T. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *41*, 87.