



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

RENATA FRANCIELLE BOMBALDI DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS DE QUITOSANA COMPLEXADA COM
XANTANA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO DE
TECIDOS ÓSSEOS GUIADA PELO PERIÓSTEO**

***DEVELOPMENT OF CHITOSAN-XANTHAN SCAFFOLDS FOR POTENTIAL
APPLICATION IN PERIOSTEUM-GUIDED BONE TISSUE REGENERATION***

CAMPINAS

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

RENATA FRANCIELLE BOMBALDI DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS DE QUITOSANA COMPLEXADA COM
XANTANA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO DE
TECIDOS ÓSSEOS GUIADA PELO PERIÓSTEO**

***DEVELOPMENT OF CHITOSAN-XANTHAN SCAFFOLDS FOR POTENTIAL
APPLICATION IN PERIOSTEUM-GUIDED BONE TISSUE REGENERATION***

*Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.*

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Maria Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Diego Mantovani (Université Laval, Canadá)

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA RENATA FRANCIELLE BOMBALDI DE
SOUZA E ORIENTADA PELA PROF. DRa. ÂNGELA MARIA MORAES

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

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 33003017034P8

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

So89d Souza, Renata Francielle Bombaldi de, 1989-
Desenvolvimento de *scaffolds* de quitosana complexada com xantana para potencial aplicação na regeneração de tecidos ósseos guiada pelo perióstio / Renata Francielle Bombaldi de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Ângela Maria Moraes.

Coorientador: Diego Mantovani.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Engenharia tecidual. 2. Perióstio. 3. Xantana. 4. Quitosana - Biotecnologia. 5. Fosforilação. I. Moraes, Ângela Maria, 1966-. II. Mantovani, Diego. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of chitosan-xanthan scaffolds for potential application in periosteum-guided bone tissue regeneration

Palavras-chave em inglês:

Tissue engineering

Periosteum

Xanthan gum

Chitosan

Phosphorylation

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Ângela Maria Moraes [Orientador]

Ibsen Bellini Coimbra

Ana Rita Morales

Rafael Bergamo Trinca

José Ricardo Muniz Ferreira

Data de defesa: 27-03-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese de doutorado defendida por Renata Francielle Bombaldi de Souza e aprovada em 27 de março de 2018 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dra. Ângela Maria Moraes – Orientadora
FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra
FCM/UNICAMP

Prof. Dra. Ana Rita Morales
FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. Rafael Bergamo Trinca
Fundação Indaiatubana de Educação e Cultura (FIEC)

Dr. José Ricardo Muniz Ferreira
R-Crio Criogenia S.A.

Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

À minha querida e amada família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, pela força e proteção concedidas para o desenvolvimento deste trabalho e também pelas oportunidades maravilhosas que colocou em minha vida, me permitindo chegar até aqui e obter este título tão importante para mim.

Aos meus queridos pais, Sueli e Ivonir, que me deram apoio incondicional para realização desse trabalho. A grande distância entre nós durante todos esses anos foi difícil, mas tenho certeza que todo o esforço é agora recompensado. Assim como eu, sei vocês estão felizes pois atingi meu objetivo, o que se deve, com certeza, ao seu suporte, carinho e confiança ao longo dessa jornada. Vocês são meu exemplo e inspiração.

A minha irmã Fernanda, que considero parte essencial deste trabalho. Agradeço profundamente pelo seu carinho, compreensão e o companheirismo de sempre. Agradeço ainda pelo suporte, tanto emocional quanto intelectual, que me proporcionou durante a realização do trabalho. Você não mediu esforços para ver meu sucesso e agora tenho o prazer de dividi-lo com você.

A minha orientadora, Prof. Dra. Ângela Maria Moraes, por quem tenho muita admiração. Agradeço pelos anos de orientação, dedicada e atenciosa, pela confiança concedida e pela amizade. Seu entusiasmo, zelo e ética na pesquisa são inspiradores e servirão de exemplo em minha vida profissional.

Ao professor Diego Mantovani, meu coorientador, e colaboradores da Université Laval, Quebec (Canadá), em especial Lucie Levesque e Bernard Drouin, e ao professor Ketul C. Popat e colaboradores da CSU (Colorado State University), Fort Collins (EUA), pela oportunidade de realizar este trabalho conjunto, pelo uso de suas instalações e também pela orientação e auxílio no desenvolvimento de grande parte deste trabalho.

Ao meu querido Erik, sobretudo por me incentivar sempre a fazer o melhor e a dar o melhor de mim para alcançar meu objetivo. Agradeço pelo amor, compreensão e suporte concedidos, principalmente ao longo da reta final deste trabalho.

A minha família, avós, tios e primos, e também aos meus amigos do Paraná, especialmente André K., André A., Tamires, Thalita, Henrique e Andressa, que sempre torceram por mim com muito carinho.

Aos meus amigos do laboratório, da FEQ e todos aqueles com os quais tive o prazer

de conviver durante essa jornada, em Campinas, Quebec ou Fort Collins, em especial: Ciça, Luizinha, Karine, Sidi, Dani, André Alvim, Max Tsunada, André Delano, Lucas, Sérgio, Andrea Bierhalz, Monize, Omar Castillo, André Rangel, Gi, Luci, Gabi, Janis e Roberta. Agradeço pelos momentos alegres, pela leveza que deram a minha vida durante momentos mais difíceis e pela amizade.

Ao meu grupo de pesquisa, amigos do LEBC, pela ótima convivência e pelo auxílio concedido, crucial em muitas etapas deste trabalho, em especial: Fer, Luizinha, Ciça, Lucas, Sérgio, Trinca, Cecília Bueno, Andrea, Monize e Lola.

Aos professores Dr. Everson Alves Miranda e Dra. Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios, e seus alunos, colegas de laboratório, pela convivência tão agradável e pela ajuda na realização de alguns dos ensaios realizados neste trabalho.

Aos professores Dr. Ibsen Bellini Coimbra, Dra. Ana Rita Morales, Dr. Rafael Bergamo Trinca e ao Dr. José Ricardo Muniz Ferreira, membros da banca avaliadora da defesa de doutorado, pela grande contribuição oferecida a este trabalho.

À professora Dra. Glaucia M. Tech dos Santos (UNIARARAS - Fundação Herminio Hometto, Araras) e colaboradores, pelo trabalho conjunto e pela realização do ensaio *in vivo*.

Aos colegas Cristiano Rodrigues (UFCSPA, Porto Alegre) e Andrea Thorpe (CSU, Fort Collins), pela grande colaboração nos realização de ensaios biológicos e análises de microscopia.

Ao professor Dr. Gustavo Cabrera (Universidade de Concepción, Chile), por compartilhar seus conhecimentos referentes à fosforilação da quitosana e auxiliar na análise dos dados referentes a esta parte do trabalho.

À equipe do LRAC, em especial Adilson Brandão, Lucélia Silva e Celso Camargo, pelos ensaios realizados e esclarecimentos prestados.

À Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda pela esterilização dos materiais utilizando-se o óxido de etileno.

À UNICAMP, ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Química e a todos os funcionários da FEQ que, de maneira direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O periosteio é uma importante estrutura do tecido ósseo e se mostra fundamental no processo de cura de lesões ósseas, fornecendo compostos celulares e biológicos essenciais para sua regeneração. *Scaffolds*, capazes de mimetizar o periosteio são particularmente atraentes, pois podem melhorar significativamente a regeneração óssea em lesões graves. Estes dispositivos servem como suporte para a proliferação de células capazes de se diferenciar em linhagens ósseas e podem ser constituídos de polímeros naturais. A quitosana é um polímero biocompatível e biodegradável, que facilita a proliferação celular, e por isso é muito utilizada na produção de *scaffolds*. Para melhorar sua osteoindutividade, a introdução de grupos fosfato em sua estrutura, ou fosforilação, pode ser realizada. A xantana é um polissacarídeo capaz de interagir com a quitosana, resultando em complexos com propriedades superiores às dos polímeros isolados. Neste trabalho, *scaffolds* de quitosana (fosforilada ou não modificada) combinada com xantana foram produzidos, na presença ou ausência de um agente porogênico, o tensoativo Kolliphor® P188, e do gel de silicone Silpuran® 2130 A/B. A caracterização dos materiais produzidos foi realizada para validação de sua potencial aplicação como substitutos do periosteio. Materiais altamente porosos foram obtidos e a presença do silicone reforçou mecanicamente as matrizes, não impactando negativamente em suas propriedades físicas, físico-químicas e biológicas. A fosforilação da quitosana levou à obtenção de *scaffolds* com propriedades similares às dos materiais produzidos com o polímero não modificado, com potencial para concentrar proteínas morfogenéticas ósseas nativas *in vivo*, o que foi inferido pela maior adsorção de citocromo C apresentada por essas formulações. Além disso, não foram observados efeitos citotóxicos dos *scaffolds*, que mostraram, como vantagem adicional, cinética de degradação apropriada para a aplicação proposta. A análise do cultivo *in vitro* de células tronco derivadas do tecido adiposo nos *scaffolds* e de sua diferenciação em osteoblastos mostraram que modificações ou tratamentos adicionais na superfície dos materiais podem trazer benefícios quanto ao desempenho celular nos mesmos. Além disso, elevada deposição de minerais e formação de matriz extracelular foram observadas. Ensaio complementares são necessários para investigar de forma mais aprofundada a resposta gerada pelos materiais *in vivo*. Como conclusão geral, os resultados obtidos fornecem indícios de que as formulações propostas neste trabalho são promissoras para a aplicação na engenharia de tecido periosteal e reparo ósseo.

Palavras chave: engenharia tecidual, periosteio, xantana, quitosana, fosforilação

ABSTRACT

The periosteum is an important structure of the bone tissue and is fundamental in the healing process of bone lesions, providing cellular and biological compounds essential for tissue repair. Tissue engineered scaffolds able to mimic the periosteum are particularly attractive because they can significantly improve bone regeneration in severely injured tissues. These devices function as support for cells that are able to proliferate and differentiate into bone cells and can be constituted of natural polymers, such as xanthan gum and chitosan. Xanthan gum is a polysaccharide that may interact with chitosan, a biocompatible and biodegradable polymer, resulting in complexes with improved properties in comparison to those of matrices produced with each polysaccharide alone. Chemical modifications, such as the phosphorylation of chitosan, can be performed to enhance the osteoinductivity of the resulting scaffold. In this work, chitosan (phosphorylated or chemically unmodified) scaffolds combined with xanthan were produced, in the presence or not of a porogenic agent, the surfactant Kolliphor[®] P188, and the silicone rubber Silpuran[®] 2130 A/B. The scaffolds were characterized to validate their potential application as periosteum substitutes. Highly porous materials were obtained and the presence of silicon mechanically reinforced the matrices, not negatively impacting their physical, physicochemical and biological properties. Formulations produced using phosphorylated chitosan presented similar properties to formulations produced with the unmodified polymer, with potential to concentrate native bone morphogenetic proteins *in vivo*, which was inferred by the higher adsorption of cytochrome C presented by these formulations. In addition, no cytotoxic effects of the scaffolds were observed, and they presented, as an additional advantage, degradation kinetics appropriate for the proposed application. The analysis of adipose derived stem cells culture *in vitro* on the scaffolds produced and of cell differentiation into osteoblasts showed that additional scaffold surface treatment or modification procedures may contribute to improve cell performance on the materials. Moreover, high deposition of minerals and formation of extracellular matrix were observed. Complementary studies are required to further investigate the *in vivo* response generated by these materials. As a general conclusion, the obtained results indicate that the formulations proposed in this work are promising for the application in periosteal tissue engineering and bone repair.

Keywords: tissue engineering, periosteum, xanthan, chitosan, phosphorylation

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADSC	célula tronco do tecido adiposo (<i>adipose derived stem cell</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	método do ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic acid assay</i>)
BMP	proteína morfogenética óssea (<i>Bone Morphogenetic Protein</i>)
C	constante empírica (Equação 3, seção 3.1)
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
Ch	quitosana
Chp	quitosana fosforilada
Chp-X	<i>scaffold</i> produzido com quitosana e quitosana fosforilada (1:1) e xantana
Chp-X-K10	<i>scaffold</i> produzido com quitosana e quitosana fosforilada (1:1), xantana e Kolliphor [®] P188 na proporção de 10% (m/m)
Chp-X-S	<i>scaffold</i> produzido com quitosana e quitosana fosforilada (1:1), xantana e Silpuran [®] 2130A/B
Chp-X-S-K10	<i>scaffold</i> produzido com quitosana e quitosana fosforilada (1:1), xantana, Silpuran [®] 2130A/B e Kolliphor [®] P188 na proporção de 10% (m/m)
Ch-X	<i>scaffold</i> produzido com quitosana e xantana
Ch-X-K10	<i>scaffold</i> produzido com quitosana, xantana e Kolliphor [®] P188 na proporção de 10% (m/m)
Ch-X-K25	<i>scaffold</i> produzido com quitosana, xantana e Kolliphor [®] P188 na proporção de 25% (m/m)

Ch-X-S	<i>scaffold</i> produzido com quitosana, xantana e Silpuran [®] 2130A/B
Ch-X-S-K10	<i>scaffold</i> produzido com quitosana, xantana, Silpuran [®] 2130A/B e Kolliphor [®] P188 na proporção de 10% (m/m)
Ch-X-S-K25	<i>scaffold</i> produzido com quitosana, xantana, Silpuran [®] 2130A/B e Kolliphor [®] P188 na proporção de 25% (m/m)
CMC	concentração micelar crítica
CoCl ₂	cloreto de cobalto
CTM	células-tronco mesenquimais
D ₀	diâmetro inicial da amostra
DD	grau de desacetilação da quitosana (<i>Deacetylation Degree</i>)
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPSC	células tronco da polpa dentária (<i>Dental Pulp Stem Cell</i>)
DS	grau de substituição (<i>Degree of Substitution</i>)
E	expansão tridimensional
ECM	matriz extracelular (<i>extracellular matrix</i>)
EDS	espectroscopia de energia dispersiva (<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>)
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>EthyleneDiamine Tetraacetic Acid</i>)
EGF	fator de crescimento epidérmico
EO	óxido de etileno
Et ₃ PO ₄	trietil fosfato
FBS	soro fetal bovino (<i>fetal bovine serum</i>)

FGF	fator de crescimento dos fibroblastos
FTIR	espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (<i>Fourier Transform InfraRed spectroscopy</i>)
GAG	glicosaminoglicano
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico
HDF	fibroblastos (<i>primary Human Dermal Fibroblasts</i>)
HE	hematoxilina e eosina
HEPES	ácido 2-etanossulfônico (agente tamponante)
HLB	equilíbrio hidrófilo-lipófilo (<i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>)
HMDS	hexametildisilazano
ICP-OES	espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy)
IGF	fator de crescimento insulina
IL-1 ou 6	interleucina-1 ou interleucina-6
IOF	<i>International Osteoporosis Foundation</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
K	Kolliphor [®] P188
KBr	brometo de potássio
L	carga aplicada em função do tempo (Equação A.1, Apêndice A)
l	largura inicial da amostra
L ₀	carga residual ao fim de uma determinada rampa (Equação A.1, Apêndice A)
L ₁ , L ₂ e L ₃	constantes que se referem à contribuição do termo exponencial (Equação A.1,

Apêndice A)

LDH	lactato desidrogenase (<i>Lactate DeHydrogenase</i>)
MSC	célula mesenquimal estromal (<i>Mesenchymal Stromal Cell</i>)
NaCl	cloreto de sódio
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>)
OPG	osteoprotegerina
P	porosidade
P ₂ O ₅	pentóxido de fósforo
PBS	tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PDMS	polidimetilsiloxano
PEC	complexo polieletrólito (<i>Polyelectrolyte Complex</i>)
Pen/Strep	penicilina/streptomicina
PEO	polioxietileno
PPO	polioxipropileno
PVA	álcool polivinílico
Ra, Rq	parâmetro de rugosidade
RANKL	receptor ativador de fator nuclear kappa-B
RNA	ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura)
RT	temperatura ambiente (<i>Room Temperature</i>)
S	Silpuran [®] 2130A/B

s	espessura da amostra ao final de uma rampa
s_0	espessura inicial
Saos-2	osteoblastos (<i>Sarcoma osteogenic:human osteosarcoma osteoblast like cells</i>)
SEM	microscopia eletrônica de varredura (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
β	constante empírica (Equação 3, seção 3.1)
T_1, T_2 e T_3	constantes de tempo (Equação A.1, Apêndice A)
TGF- β	fator de crescimento transformador β
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
V_d	volume do material no estado seco
V_w	volume do material após imersão em água
VEC	célula vascular endotelial (<i>Vascular Endothelial Cell</i>)
X	xantana
γ	constante empírica (Equação 3, seção 3.1)
ε	deformação nominal
ρ_{apparent}	densidade aparente
ρ_{solid}	densidade real
σ	tensão nominal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	19
1.1. Colocação do problema	19
1.2. Objetivos.....	22
1.3. Forma de apresentação da tese	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1. Tecido ósseo	27
2.1.1. Perióstio	28
2.2. Lesões ósseas	29
2.3. Tratamentos convencionais para lesões ósseas.....	31
2.4. Engenharia de tecidos ósseos.....	32
2.4.1. Scaffolds na engenharia de tecidos ósseos	33
2.4.1.1. Engenharia do tecido periosteal.....	34
2.4.2. Células utilizadas na engenharia de tecidos ósseos	35
2.5. Polímeros utilizados na produção de <i>scaffolds</i>	36
2.5.1. Quitosana	38
2.5.1.1. Quitosana fosforilada.....	40
2.5.2. Xantana	41
2.5.3. Complexo quitosana-xantana	42
2.6. Estratégias para a obtenção de matrizes polissacarídicas porosas e com melhores propriedades mecânicas.....	43
3. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
3.1. MECHANICALLY ENHANCED POLYSACCHARIDE-BASED SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING OF SOFT TISSUES	51
3.1.1. Abstract.....	52
3.1.2. Introduction.....	52
3.1.3. Materials and Methods	55
3.1.3.1. Materials	55
3.1.3.2. Membranes preparation	55
3.1.3.3. Membranes characterization.....	56
3.1.3.3.1. Morphological aspects	56

3.1.3.3.2. Mechanical properties	57
3.1.3.3.3. Behavior in physiological environment	58
3.1.3.4. Statistical analysis	61
3.1.4. Results and discussion	61
3.1.4.1. Morphological aspects	61
3.1.4.2. Mechanical properties	66
3.1.4.3. Behavior of scaffolds in physiological environment	69
3.1.5. Conclusions	77
3.1.6. Acknowledgements	78
3.1.7. Appendix I: Curve fitting parameters	78
3.2. PHOSPHORYLATION OF CHITOSAN TO IMPROVE OSTEOINDUCTION OF CHITOSAN/XANTHAN-BASED SCAFFOLDS FOR PERIOSTEAL TISSUE ENGINEERING	79
3.2.1. Abstract	79
3.2.2. Introduction	80
3.2.3. Materials and Methods	82
3.2.3.1. Materials	82
3.2.3.2. Chitosan phosphorylation and product characterization	82
3.2.3.2.1. Synthesis of phosphorylated chitosan	82
3.2.3.2.2. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy	82
3.2.3.2.3. Degree of substitution	83
3.2.3.3. Scaffolds preparation	83
3.2.3.4. Scaffolds characterization	84
3.2.3.4.1. Morphological aspects, physicochemical and mechanical properties	84
3.2.3.4.2. Biological characterization	85
3.2.3.5. Statistical analysis	89
3.2.4. Results and discussion	89
3.2.4.1. Chitosan phosphorylation	89

3.2.4.2. Morphological aspects and physicochemical characterization.....	93
3.2.4.3. Mechanical properties	101
3.2.4.4. Biological characterization.....	102
3.2.5. Conclusions	111
3.2.6. Acknowledgements.....	112
3.3. ENSAIO PILOTO PARA A DETERMINAÇÃO DO DESEMPENHO DOS SCAFFOLDS IN VIVO	113
3.3.1. Metodologia utilizada	113
3.3.1.1. Obtenção dos animais.....	113
3.3.1.2. Protocolo experimental.....	113
3.3.1.3. Obtenção das amostras de tecidos	115
3.3.1.4. Análises histomorfológicas	115
3.3.1.5. Análise estatística	115
3.3.2. Resultados e discussão.....	115
3.3.3. Conclusão	120
4. ANÁLISE CONJUNTA DOS RESULTADOS.....	122
5. CONCLUSÕES	126
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	128
7. REFERÊNCIAS.....	131
APÊNDICE A.....	147
APÊNDICE B.....	155
APÊNDICE C	157

Capítulo 1:
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Colocação do problema

O tecido ósseo é considerado um dos principais tipos de tecido conjuntivo presentes no corpo humano. É uma estrutura complexa, altamente vascularizada, formada por células e uma matriz extracelular calcificada, composta principalmente por colágeno e hidroxiapatita, que lhe conferem dureza e resistência (Taichmann, 2005; Clarke, 2008). Uma importante estrutura constituinte do tecido ósseo é o periósteo, uma membrana vascularizada e densa que envolve a maioria dos ossos, composta de duas camadas. A camada celular interna é constituída de osteoblastos e células osteoprogenitoras dispersas em uma matriz de colágeno, enquanto a camada fibrosa externa é composta de colágeno, fibroblastos e vasos sanguíneos. Quando o tecido ósseo é lesado, esta estrutura é fundamental na cura da fratura, fornecendo compostos celulares e biológicos essenciais para sua regeneração (Seeman, 2003; Dwek, 2010).

Existem muitos tipos de doenças que afetam o tecido ósseo, podendo as mesmas estar relacionadas com o avanço de idade, obesidade, condições fisiológicas intrínsecas ou mesmo acidentes sofridos pelo indivíduo (Crha *et al.*, 2009; Rodan e Martin, 2000; Torres *et al.*, 2013). Em 2011, a incidência anual de fraturas ósseas, a nível global, já atingia a impressionante cifra de aproximadamente 15 milhões, implicando em dispêndios significativos no tratamento destes tipos de lesões (O’Keefe e Mao, 2011). Esta situação tende a se agravar com o aumento da expectativa de vida populacional, demandando imediata atenção.

Em geral, quando lesados, os ossos são capazes de se regenerar e cicatrizar. No entanto, existem muitos casos nos quais a regeneração natural é insuficiente para a cura e torna-se necessária uma intervenção cirúrgica (Crha *et al.*, 2009; Holzapfel *et al.*, 2013). Várias estratégias são utilizadas no tratamento dessas lesões, as quais englobam técnicas de transplantes de ossos e aplicação de enxertos (autólogos, alo- ou xenoenxertos) (Salgado *et al.*, 2004; Rao e Stegemann, 2013). No entanto, estas abordagens apresentam desvantagens, como morbidez da área doadora, disponibilidade limitada e possibilidade de infecção e dor no caso dos enxertos autólogos, e transmissão de doenças e rejeição imunológica no caso dos enxertos alogênicos ou xenogênicos, respectivamente (Khojasteh *et al.*, 2013; O’Keefe e Mao, 2011; Rao e Stegemann, 2013).

O uso de substitutos ósseos sintéticos, constituídos de metais, cerâmicas, polímeros

ou compósitos destes materiais surgiu como uma alternativa para superar as limitações impostas pelos enxertos mencionados anteriormente. No entanto, em comparação com os enxertos de origem biológica, estes biomateriais ainda possuem algumas deficiências associadas à sua biocompatibilidade e a atividade desempenhada, sendo geralmente atreladas à composição e resistência mecânica, além do tempo de degradação dos materiais (Wu *et al.*, 2014).

Apesar destas desvantagens, as técnicas mencionadas são utilizadas para tratamento de lesões ósseas pequenas, que ainda possuem tecidos circundantes saudáveis. Para lesões maiores, cuja recuperação é mais complicada, novas alternativas são requeridas e pesquisas recentes têm se dedicado ao desenvolvimento e estudo de diferentes tipos de biomateriais, especificamente produzidos para desempenhar a função desejada (Cuthbert *et al.*, 2013).

A engenharia de tecidos vem contribuir neste sentido, com o desenvolvimento de dispositivos que têm por objetivo a regeneração do tecido ósseo e a integração do mesmo com aquele já existente (Thein-Han e Misra, 2009; Fan *et al.*, 2010). Apesar dos avanços nessa área, muitos dos *scaffolds* desenvolvidos não se mostram totalmente adequados à aplicação e possuem limitações como: falta de vascularização nos enxertos produzidos, bem como falta de integração óssea com o tecido já existente, susceptibilidade a infecções, degradação e reabsorção numa taxa diferente daquela de formação do novo tecido ósseo, baixa resistência mecânica e porosidade inadequada para a proliferação celular (Liu *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2001).

A fim de se obter melhores resultados em termos de desempenho do dispositivo e recuperação da lesão, uma alternativa para o tratamento de fraturas ósseas refere-se ao desenvolvimento de dispositivos que mimetizam o periósteo (Tejeda-Montes *et al.*, 2014). Tais dispositivos são desenvolvidos na forma de membranas e possuem a capacidade de melhorar significativamente a regeneração óssea em lesões consideradas graves. Nestes casos, nos quais há defeitos críticos, ou seja, fraturas múltiplas ou lesões de tamanho grande que não são capazes de se regenerar naturalmente, o dispositivo deve ser utilizado em associação a outro substituto ósseo (enxertos biológicos ou sintéticos) (Zhang *et al.*, 2008; Tejeda-Montes *et al.*, 2014). A regeneração óssea induzida pelo periósteo apresenta algumas vantagens em relação àquela promovida por substitutos ósseos, tais como integridade e continuidade óssea ideais na área da lesão, vascularização adequada e minimização de calcificação ectópica (Fan *et al.*, 2010).

A proliferação eficiente de células animais aderentes para aplicações em processos de regeneração celular com frequência é dependente da utilização de suportes (ou *scaffolds*) que

apresentem características apropriadas para este fim, tais como biocompatibilidade, capacidade de mimetizar a matriz celular, resistência mecânica compatível com a do tecido lesado e adequadas taxa de biodegradação e porosidade (Hutmacher, 2000; Barbanti *et al.*, 2005). Matrizes com poros de formato e tamanhos adequados têm facilitado em seu interior não somente a acomodação e proliferação das células inoculadas, mas também o transporte de nutrientes, metabólitos, proteínas e gases, favorecendo também a vascularização geral da região (Adekogbe e Ghanem, 2005) e, em consequência, a integração do dispositivo como um todo na região lesada do tecido.

Diferentes materiais vêm sendo aplicados na engenharia de tecidos, sendo eles de origem sintética ou natural. Os polímeros naturais, particularmente polissacarídeos, têm atraído o interesse das comunidades médica e acadêmica nas últimas décadas pois são, em geral, facilmente obtidos de fontes renováveis, possuem baixa citotoxicidade e baixo custo de manufatura (Khan e Ahmad, 2013). Neste contexto, optou-se por utilizar neste trabalho fundamentalmente polissacarídeos para a produção dos *scaffolds*, sendo eles a quitosana e a goma xantana.

A xantana é um polissacarídeo ramificado, produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris*. Possui estrutura primária que consiste de unidades de pentassacarídeos formada por duas unidades de glicose, duas de manose e uma de ácido glicurônico (García-Ochoa *et al.*, 2000). A quitosana, por sua vez, é um polissacarídeo linear, composto de unidades de glicosamina e N-acetil-glicosamina, obtida da desacetilação da quitina, sendo geralmente extraída da carapaça de crustáceos. Em condições apropriadas de pH, a quitosana se comporta como um polícatión e interage com polímeros negativamente carregados, como é o caso da xantana, formando um complexo polieletrólito (Goycoolea *et al.*, 2000). Entretanto, se faz necessária a adição de compostos à mistura polimérica para conferir aos materiais obtidos características adequadas à aplicação como *scaffolds* na engenharia de tecidos. O uso do surfatante Kolliphor® P188 resulta em matrizes porosas (Bueno *et al.*, 2014), enquanto o gel de silicone Silpuran® 2130 A/B tem o potencial de melhorar as propriedades mecânicas de matrizes polissacarídicas (Pires e Moraes, 2015).

A modificação química da quitosana pela introdução de grupos fosfato desperta interesse devido à propriedade de troca catiônica dos grupos fosfato introduzidos na estrutura deste polímero. Estes grupos são capazes de se ligar a íons cálcio, o que pode induzir à formação

de uma camada de fosfato de cálcio, conhecida por promover a osteoindução em implantes à base de polímeros. Além disso, pode ocorrer a ligação de moléculas sinalizadoras à superfície do material, como os fatores de crescimento, estimulando sua osteoindutividade (Amaral *et al.*, 2005).

Neste contexto, o desenvolvimento de materiais que atuem como substitutos do periósteo e conseqüentemente favoreçam o reparo ósseo por meio de uma estimulação endógena eficaz, resultante de suas propriedades de bioatividade e osteoindutividade, é de extrema relevância, considerando o número crescente de pacientes buscando por tratamentos mais eficientes, especialmente no caso de defeitos críticos.

Neste trabalho, pretende-se desenvolver materiais capazes de atuar como substitutos do periósteo para aplicação no tratamento de lesões ósseas, principalmente defeitos críticos, de difícil recuperação, tendo em vista que o reparo ósseo guiado pelo periósteo é mais eficaz quando comparado àquele no qual este tecido está ausente. O material desenvolvido seria então utilizado, em procedimento cirúrgico, em conjunto com um enxerto de origem tanto sintética quanto biológica, no caso dos defeitos críticos, ou mesmo diretamente no recobrimento da lesão, no caso de defeitos não considerados críticos.

1.2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de *scaffolds* à base de quitosana (fosforilada ou não modificada) e xantana, capazes de atuarem como suporte para o crescimento de células relevantes para a reconstrução do tecido periosteal. Dessa forma, a pesquisa foi estruturada em três metas principais:

i) Obtenção de matrizes densas e porosas constituídas de quitosana e xantana mecanicamente reforçadas: o surfatante Kolliphor[®] P188 foi adicionado às matrizes de quitosana e xantana para obtenção de dispositivos porosos, e o gel de silicone Silpuran[®] 2130 A/B foi utilizado com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas dos *scaffolds*. Os materiais resultantes foram caracterizados quanto aos seus aspectos morfológicos, propriedades mecânicas e comportamento em meio fisiológico para averiguação do efeito dos aditivos em suas propriedades, bem como a validação de sua aplicação na engenharia de tecidos moles.

ii) Produção de *scaffolds* à base de quitosana fosforilada e xantana visando à melhoria da osteoindução do material em relação àquele contendo quitosana não modificada

quimicamente: A modificação química da quitosana pela introdução de grupos fosfato foi realizada e os *scaffolds* obtidos pela sua complexação com a xantana foram caracterizados quanto às suas propriedades físicas, físico-químicas e mecânicas, além da resposta gerada por diferentes tipos celulares relevantes para a engenharia do periósteo.

iii) Caracterização biológica dos materiais à base de quitosana e quitosana fosforilada *in vitro* e *in vivo*: Células-tronco do tecido adiposo foram inoculadas nos *scaffolds* e avaliou-se sua reposta quanto à sua capacidade de diferenciação e mineralização. Além disso, estudou-se o efeito dos *scaffolds* no reparo ósseo em calota craniana de ratos.

1.3. Forma de apresentação da tese

Este trabalho está estruturado na forma de capítulos, divididos de modo a representar as diferentes etapas e objetivos do estudo.

No **presente capítulo** apresentou-se uma introdução geral ao tema abordado, apontando-se a motivação e as justificativas, bem como os objetivos do trabalho.

No **Capítulo 2** encontra-se a revisão bibliográfica referente ao Estado da Arte no âmbito do tema do presente estudo. Em suma, são abordados no Capítulo 2 aspectos teóricos relevantes no que diz respeito ao tecido ósseo, periósteo, lesões ósseas e tratamentos convencionais para sua terapia, engenharia de tecidos ósseos como uma alternativa aos tratamentos convencionais e a vantajosa aplicação da engenharia do tecido periosteal, bem como materiais utilizados na produção de *scaffolds* para engenharia de tecidos e métodos utilizados para melhorar suas propriedades.

A metodologia experimental empregada, os resultados obtidos e sua discussão são apresentados no **Capítulo 3**, o qual está subdividido em três seções. Nas duas primeiras seções são apresentados dois artigos, tendo sido o primeiro deles publicado no veículo indexado Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications (fator de impacto de 4,959) e o segundo na revista International Journal of Biological Macromolecules (fator de impacto de 4,784). Os dados experimentais coletados para a elaboração de ambos os artigos foram obtidos em colaboração com as equipes dos professores Diego Mantovani da Université Laval (Quebec, Canadá) e Ketul C. Popat da Colorado State University (Fort Collins, Estados Unidos). Além disso, na última seção deste capítulo são mostrados os resultados de um ensaio piloto *in vivo* realizado no Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS (Araras, SP),

em parceria com o grupo de pesquisa da professora Dra. Gláucia Maria Tech dos Santos.

No primeiro artigo, intitulado *Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues*, os polissacarídeos quitosana e xantana foram combinados com o surfatante Kolliphor® P188 e o gel de silicone Silpuran® 2130 A/B para a obtenção de matrizes porosas e com maior resistência mecânica. A adição do surfatante em diferentes proporções à matriz resultou em materiais com alta porosidade e elevado tamanho de poro, enquanto os materiais com silicone apresentaram maior espessura e microrugosidade. A adição de Silpuran® 2130 A/B aumentou o módulo elástico dos materiais, tanto em condições de compressão quanto tensão, e não afetou negativamente suas propriedades no que diz respeito a aspectos importantes para sua aplicação como *scaffolds*, tais como estabilidade, trombogenicidade e citotoxicidade. Todas as formulações tiveram suas propriedades físico-químicas e biológicas consideradas adequadas para sua aplicação na engenharia de tecidos moles.

Já no segundo artigo, intitulado *Phosphorylation of chitosan to improve osteoinduction of chitosan/xanthan-based scaffolds for periosteal tissue engineering*, *scaffolds* à base de quitosana fosforilada e xantana foram produzidos com o objetivo de melhorar a osteoindução do material em relação àquela contendo quitosana não modificada quimicamente. As propriedades dos *scaffolds* obtidos, como elevado tamanho de poro, microrugosidade, baixa trombogenicidade comparada com materiais comumente usados como implante, bem como longo tempo de degradação e baixa citotoxicidade, possibilitam seu uso como substitutos do periósteo. Além disso, o material mostrou potencial para concentrar proteínas morfogenéticas ósseas nativas *in vivo*.

Na seção *Ensaio piloto para determinação do desempenho dos scaffolds in vivo* é mostrado o estudo do reparo ósseo em calota craniana de ratos após tratamento da lesão óssea com os biomateriais produzidos com quitosana (fosforilada ou não modificada) e xantana, contendo ou não os aditivos Kolliphor® P188 e Silpuran® 2130 A/B, onde foi demonstrada a capacidade dos *scaffolds* de atuarem na promoção da restauração das lesões e também a necessidade de uma investigação mais aprofundada a respeito da resposta gerada por esses materiais *in vivo* para que haja um melhor entendimento dos resultados observados.

No **Capítulo 4** é apresentada uma discussão geral para a interligação dos resultados abordados nos capítulos anteriores. Por fim, no **Capítulo 5**, são apontadas as conclusões referentes a todas as etapas envolvidas no trabalho e, no **Capítulo 6**, são apresentadas sugestões

para trabalhos futuros. Este trabalho se encerra então no **Capítulo 7**, com a apresentação das referências científicas utilizadas para a execução do estudo.

Capítulo 2:
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Tecido ósseo

O tecido ósseo é considerado um dos principais tipos de tecido conectivo presentes no corpo humano. É uma estrutura complexa, formada por células e uma matriz extracelular calcificada, composta principalmente por colágeno e hidroxiapatita, que lhe conferem dureza e resistência, além de diversas outras espécies, como magnésio, fósforo, potássio e carbonatos. Proteoglicanos (moléculas constituídas de uma proteína central ligada a glicosaminoglicanos) presentes no tecido ósseo incluem o sulfato de condroitina e sulfato de queratina. As proteínas osteocalcina, osteopontina e osteonectina também estão presentes neste tecido, e têm função regulatória na formação óssea e adesão celular. Além disso, também estão presentes fatores de crescimento e citocinas, incluindo o fator de crescimento insulina (IGF), o fator de crescimento transformador β (TGF- β) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), cujo papel está relacionado à proliferação e diferenciação celular. O tecido ósseo desempenha importantes funções no organismo, tais como proteção de tecidos e órgãos internos, sustentação, depósito de minerais e consequente participação em sua regulação homeostática e função metabólica (Taichmann, 2005; Clarke, 2008).

O tecido ósseo pode ser dividido em dois tipos: trabecular e cortical. O osso cortical é uma estrutura densa e resistente, e possui funções de suporte e proteção. Já o osso trabecular, ou esponjoso, é altamente poroso, e garante leveza ao tecido ósseo, possibilitando sua fácil movimentação pelos músculos. Além disso, nesta estrutura está localizada a medula óssea vermelha, responsável pela hematopoiese.

Diferentes tipos de células são encontrados no tecido ósseo, sendo denominadas osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células osteogênicas (ou osteoprogenitoras), desempenhando funções específicas. Os osteoblastos, responsáveis pela formação da matriz óssea, são encontrados na superfície, em porções do osso que estão em desenvolvimento, incluindo endóstio e perióstio. Os osteócitos são células maduras derivadas dos osteoblastos e se localizam nas lacunas da matriz óssea. Osteoclastos, por sua vez, são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo. Já as células osteoprogenitoras, presentes no perióstio e na medula óssea, possuem alta atividade mitótica, sendo as únicas células ósseas capazes de se dividir. As células osteoprogenitoras são fundamentais para a reparação óssea, pois são capazes de se

diferenciar em osteoblastos (Betts *et al.*, 2013).

2.1.1. Periosteio

Uma importante estrutura constituinte do tecido ósseo é o periosteio, uma membrana altamente vascularizada e densa que envolve a maioria dos ossos (Figura 2.1). Esta membrana é composta de duas camadas: a camada celular interna é constituída de osteoblastos, células osteoprogenitoras e células tronco mesequimais multipotentes, dispersas em uma matriz de colágeno, enquanto a camada fibrosa externa é composta de colágeno, fibroblastos e vasos sanguíneos. O periosteio está conectado ao tecido ósseo por meio de fibras colágenas denominadas fibras de Sharpey (Seeman, 2003).

Durante o crescimento e desenvolvimento de um indivíduo, o periosteio atua tanto no alongamento quanto na modelagem óssea. Quando o tecido ósseo é lesado, esta estrutura é fundamental na cura da fratura, fornecendo compostos celulares e biológicos essenciais para sua regeneração (Seeman, 2003; Dwek, 2010).

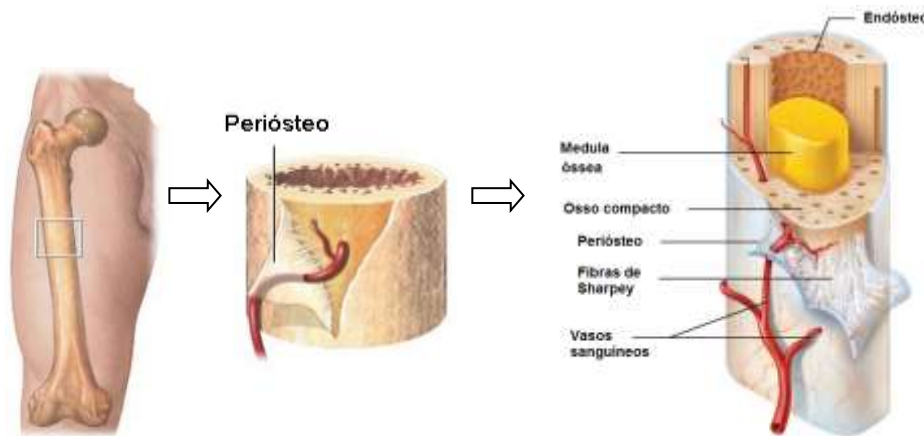


Figura 2.1: Esquema ilustrativo do tecido ósseo. Em detalhe é mostrado o periosteio (adaptado de A.D.A.M. Illustrated Medical Encyclopedia, 2018 e Outlander Anatomy[®], 2018).

A reparação óssea é comumente descrita como sendo dividida em quatro estágios (Figura 2.2). O estágio inicial é o inflamatório, nos qual forma-se um hematoma e sinais moleculares para o início do reparo são gerados. Em seguida, osso imaturo (ou não lamelar) é formado pelo periosteio, promovendo o preenchimento e estabilização da fratura por essa estrutura.

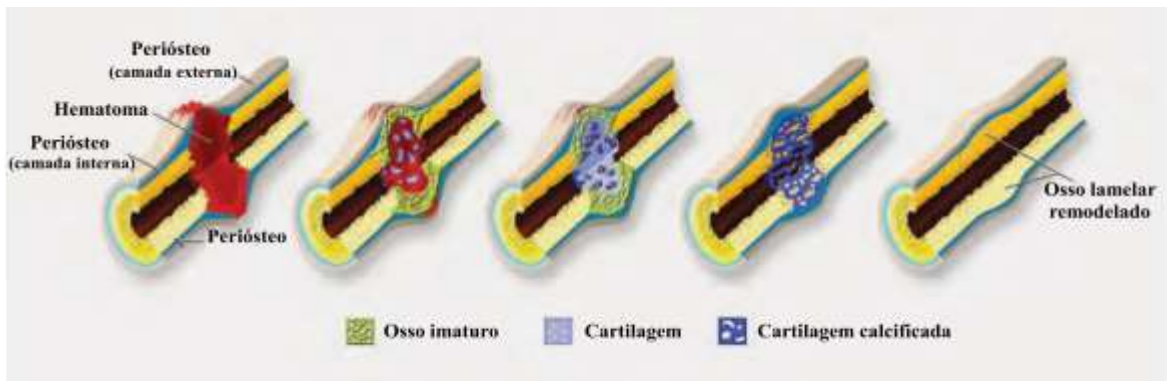


Figura 2.2: Esquema ilustrativo do processo de reparação óssea. O periosteio desempenha papel importante em todas as etapas envolvidas (adaptado de Burr e Guillot, 2012).

Em seguida ocorre a formação de cartilagem e a ossificação endocondral, na qual a matriz cartilaginosa é usada como suporte para deposição de tecido ósseo. A ossificação intramembranosa também pode ocorrer, na qual o tecido ósseo surge aos poucos em uma membrana de natureza conjuntiva, não cartilaginosa. Por fim, ocorre a remodelagem do osso e este adquire sua estrutura lamelar e formato originais. As células envolvidas neste processo de reparo são provenientes tanto da camada vascularizada do periosteio quando da camada interna altamente celularizada (Nakahara *et al.*, 1990; Tatsuyama *et al.*, 2000).

2.2. Lesões ósseas

Existem muitos tipos de doenças que afetam o tecido ósseo, podendo as mesmas estar relacionadas com o avanço de idade, obesidade, condições fisiológicas intrínsecas ou mesmo acidentes sofridos pelo indivíduo, como por exemplo: câncer, infecções, doenças degenerativas, doença de Paget, osteoporose e fraturas ocasionadas por traumas ou pelas condições anteriores (Rodan e Martin, 2000; Torres *et al.*, 2013). Em alguns casos, quando o indivíduo possui tumor ósseo, por exemplo, existe a necessidade de remoção cirúrgica do tecido afetado e dos tecidos circundantes, gerando assim um defeito ósseo grande, ou de tamanho crítico (Mankin *et al.*, 1976; Li *et al.*, 2015), de improvável reparo espontâneo ao longo da vida do paciente. Além disso, no universo da odontologia, por exemplo, a doença periodontal e a perda dentária são os fatores determinantes para a perda de volume ósseo nos maxilares (Page e Schroeder, 1976).

As doenças de Paget e osteoporose, mencionadas acima, estão relacionadas à distúrbios no processo de remodelação óssea. O tecido ósseo sofre constante remodelação

(*turnover*) por meio de dois mecanismos opostos, a formação e a reabsorção óssea. Estes processos envolvem a atividade de osteoclastos (reabsorção), osteoblastos (formação) e osteócitos (manutenção). Normalmente, estes processos estão coordenados, existindo um balanço entre eles, regulado pela ação de hormônios sistêmicos (paratireoideiano, vitamina D, além outros hormônios esteroides, por exemplo) e mediadores locais (como citocinas e fatores de crescimento) (Lian e Stein, 1999; Rizzoli e Bonjour, 1999) que alteram a expressão de osteoprotegerina (OPG) e do receptor ativador de fator nuclear kappa-B (RANKL), cuja função é regular a reabsorção óssea (Kostenuik, 2005). Algumas condições, como envelhecimento, doenças metabólicas, estados de elevada ou reduzida mobilidade ou intervenções terapêuticas, por exemplo, podem afetar esse balanço e comprometer o *turnover* ósseo, resultando em alterações na massa, resistência e estrutura do tecido ósseo (Lian e Stein, 1999; Rizzoli e Bonjour, 1999). A osteoporose, por exemplo, está relacionada à elevada reabsorção óssea, que resulta na perda de massa e deterioração do tecido ósseo, gerando fragilidade e aumento do risco de fraturas (Wheater *et al.*, 2013). Já na doença de Paget, ocorre elevada reabsorção e também elevada formação óssea, porém de forma desorganizada. Como resultado, o osso formado é mecanicamente inadequado e há elevado risco de deformidade e ocorrência de fraturas (Shaker, 2009).

Em 2011 já se relatava uma incidência anual de fraturas ósseas, a nível global, de aproximadamente 15 milhões, significando um elevado custo no tratamento destes tipos de lesões, sendo, aparentemente, a maior parte delas relacionada a problemas de osteoporose (O’Keefe e Mao, 2011). Este fato é preocupante, pois segundo a Fundação Internacional para Osteoporose (IOF), 10 milhões de brasileiros são afetados por esta doença. Além disso, há previsão de um aumento de fraturas no quadril decorrentes de problemas de osteoporose até o ano de 2050, chegando a aproximadamente 170 mil fraturas por ano, em função do aumento da expectativa de vida dos indivíduos, sendo que os custos atuais para o tratamento já são elevados. Durante o período entre 2008 e 2010, mais de 3,2 milhões de procedimentos relacionados a fraturas decorrentes dessa doença foram realizados no Brasil, e os custos relacionados chegaram a quase 92 milhões de dólares (International Osteoporosis Foundation, 2017).

Considerando o panorama apresentado, pode-se constatar a necessidade da existência de tratamentos eficazes e financeiramente acessíveis, que possibilitem a recuperação apropriada dos pacientes com lesões ósseas.

2.3. Tratamentos convencionais para lesões ósseas

Em geral, quando lesados, os ossos são capazes de se regenerar e cicatrizar. No entanto, existem muitos casos nos quais essa regeneração natural é insuficiente para a cura e torna-se necessária uma intervenção cirúrgica (Crha *et al.*, 2009; Holzapfel *et al.*, 2013). Este é o caso de defeitos ósseos críticos, que podem ter como prognóstico uma não união óssea devido ao seu próprio tamanho e propriedades biomecânicas instáveis, bem como fatores metabólicos, hormonais e nutricionais, além do ambiente da lesão desfavorável para cicatrização (Li *et al.*, 2015).

Várias estratégias são utilizadas no tratamento de lesões ósseas, as quais englobam técnicas de transplantes de ossos e aplicação de enxertos. O transplante ósseo é o segundo tipo mais comum de transplante e o número de procedimentos envolvendo a aplicação de enxertos atingiu cerca de 2,2 milhões, em 2006, no mundo todo (Kaveh *et al.*, 2010). As técnicas utilizadas incluem o uso de enxertos autólogos (retirados de uma região saudável do próprio indivíduo), aloenxertos (obtidos de tecidos de doadores) e xenoenxertos (obtidos de outras espécies) (Salgado *et al.*, 2004; Rao e Stegemann, 2013). No entanto, estas abordagens apresentam certas desvantagens, as quais estão sumarizadas na Tabela 2.1 (Khojasteh *et al.*, 2013; O'Keefe e Mao, 2011; Rao e Stegemann, 2013).

O uso de substitutos ósseos sintéticos surgiu como uma alternativa para superar as limitações impostas pelos enxertos mencionados anteriormente. Estes substitutos podem ser constituídos de metais, cerâmicas, polímeros ou compósitos destes materiais, sendo biocompatíveis e possuindo, em geral, propriedades mecânicas adequadas para a aplicação. No entanto, em comparação com os enxertos de origem biológica, ainda possuem algumas deficiências, como liberação de íons pelos dispositivos metálicos; baixa resistência mecânica apresentada pelos dispositivos poliméricos, o que os torna inadequados para uso em regiões de elevado estresse mecânico; fragilidade dos dispositivos cerâmicos e taxa de degradação não controlável em compósitos (Wu *et al.*, 2014).

Apesar das desvantagens apresentadas, as técnicas mencionadas são utilizadas com sucesso para tratamento de lesões ósseas pequenas, que apresentam tecidos circundantes saudáveis. Para lesões maiores, cuja regeneração é mais complicada, outras alternativas são requeridas e, nos últimos anos, pesquisas têm se dedicado ao desenvolvimento de novos tipos de biomateriais, especificamente produzidos para desempenhar a função desejada (Cuthbert *et*

al.,2013). A engenharia de tecidos vem contribuir neste sentido, com o desenvolvimento de dispositivos que têm por objetivo a regeneração do tecido ósseo e a integração do mesmo com aquele já existente (Thein-Han e Misra, 2009; Fan *et al.*, 2010).

Tabela 2.1: Tipos de enxertos biológicos e as desvantagens atreladas ao seu uso no tratamento de lesões ósseas.

Tipo de enxerto	Desvantagens relacionadas ao uso
Autólogo	morbidez da área doadora
	possibilidade de infecção e dor
	disponibilidade limitada
	capacidade limitada de acelerar eventos celulares que promovem a cura da lesão e remodelagem óssea
Alogênico	possibilidade de infecção e transmissão de doenças
	capacidade limitada de promover remodelagem óssea, tendendo ao acúmulo de stress mecânico na região da lesão e consequente ocorrência de fraturas
	alto custo
Xenogênico	possibilidade de infecção e transmissão de doenças
	rejeição imunológica

2.4. Engenharia de tecidos ósseos

O conceito básico da engenharia de tecidos diz respeito à combinação de três fatores: *scaffolds* (matrizes extracelulares artificiais que funcionam como molde e suporte para o crescimento celular), células e fatores de crescimento, que em conjunto promovem a reparação tecidual (Langer e Vacanti, 1993). O objetivo é que o suporte celular se degrade ao passo que ocorre sua substituição pelo novo tecido gerado (Yang *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2003). Esta abordagem é aplicável a uma variada gama de tecidos, incluindo os ósseos.

A reparação óssea deve ocorrer por meio de diferentes mecanismos, sendo eles osteogênese, osteoindução e osteocondução. O primeiro diz respeito ao suprimento de células capazes de se diferenciarem em linhagens ósseas. Já a osteoindução se refere à capacidade do enxerto de amplificar o crescimento celular por meio de moléculas específicas, tais como os

fatores de crescimento. A osteocondução é um complemento dos mecanismos anteriores, e diz respeito às características do próprio *scaffold*, como sua composição e estrutura, e como estas promovem a proliferação celular (Andrades *et al.*, 2011; Crha *et al.*, 2009). Os fatores que compõem a engenharia de tecidos e regem estes mecanismos serão discutidos a seguir.

2.4.1. Scaffolds na engenharia de tecidos ósseos

O sucesso do dispositivo desenvolvido para aplicação em processos de regeneração celular é dependente da utilização de suportes (ou *scaffolds*) que apresentem características apropriadas para a proliferação eficiente de células animais aderentes (Hutmacher, 2000; Barbanti *et al.*, 2005), tais como: (i) biocompatibilidade, sendo preferencialmente constituído por matérias-primas de fontes renováveis e de baixo custo; (ii) capacidade de mimetizar a matriz extracelular; (iii) composição química apropriada para permitir a adsorção de compostos importantes, apresentando estabilidade adequada no meio de cultura e no ambiente fisiológico e taxa de degradação apropriada *in vivo*; (iv) resistência mecânica compatível com a do tipo de tecido lesado; (v) estabilidade quando sujeito à esterilização e (vi) facilidade de processamento, principalmente quanto à obtenção de dispositivos com dimensões ajustadas às da região afetada.

Outras características relevantes na seleção do *scaffold* referem-se à rugosidade e porosidade (Langer e Vacanti, 1993; Mao *et al.*, 2003; Ikada, 2006). A rugosidade pode contribuir na orientação das células em crescimento e, no caso de aplicações que requeiram dispositivos espessos, as matrizes devem apresentar poros com arquitetura apropriada quanto ao formato e distribuição, ao tamanho (100 – 500 μm) e interconectividade (>85%, 100 μm). Matrizes com poros de formato e tamanhos adequados têm facilitado em seu interior não somente a acomodação e proliferação das células inoculadas, mas também o transporte de nutrientes, metabólitos, proteínas e gases, favorecendo também a vascularização geral da região (Adekogbe e Ghanem, 2005) e, em consequência, a integração do dispositivo como um todo na região lesada do tecido.

Apesar dos avanços na engenharia de tecidos ósseos, muitos dos *scaffolds* desenvolvidos não se mostram totalmente adequados à aplicação e muitos desafios ainda devem ser superados. Algumas das limitações encontradas podem ser exemplificadas como: falta de vascularização nos enxertos produzidos, bem como falta de integração óssea com o tecido já existente, susceptibilidade a infecções, degradação e reabsorção numa taxa diferente daquela de

formação do novo tecido ósseo, baixa resistência mecânica e porosidade inadequada para a proliferação celular (Liu *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2001).

A fim de se obter melhores resultados em termos de desempenho do dispositivo e recuperação da lesão, uma alternativa para o tratamento de fraturas ósseas refere-se ao desenvolvimento de dispositivos que mimetizam o perióstio (Tejeda-Montes *et al.*, 2014).

2.4.1.1. *Engenharia do tecido periosteal*

Scaffolds que mimetizam o perióstio são desenvolvidos na forma de filmes ou membranas e possuem a capacidade de melhorar significativamente a regeneração óssea em lesões consideradas graves. Estes dispositivos podem ser utilizados diretamente no recobrimento da fratura ou ainda como um componente ativo extra em casos onde a aplicação de um substituto ósseo também é realizada, sendo que, em ambos os casos, a membrana envolve completamente a lesão ou o enxerto aplicado, mimetizando dessa forma o tecido periosteal. É importante ressaltar que, em casos nos quais há defeitos críticos, ou seja, fraturas múltiplas ou lesões de tamanho grande que não são capazes de se regenerar naturalmente, o dispositivo deve ser obrigatoriamente utilizado em associação a outro substituto ósseo (enxertos biológicos ou sintéticos) (Zhang *et al.*, 2008; Tejeda-Montes *et al.*, 2014). A regeneração óssea induzida pelo perióstio apresenta algumas vantagens em relação àquela promovida por substitutos ósseos, tais como integridade e continuidade óssea ideais na área da lesão, vascularização adequada e minimização de calcificação ectópica (Fan *et al.*, 2010).

Alguns dos relatos existentes na literatura a respeito da engenharia do perióstio referem-se à obtenção de tecido periosteal artificial por meio da *cell sheet technology*, isto é, pela formação de uma camada confluyente de células (Syed-Picard *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017), ou ainda à utilização de perióstio de origem alo ou xenogênica, sua descelularização e uso dessa matriz para crescimento celular (Rapp *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013). Três dos poucos exemplos localizados na literatura enfocando o desenvolvimento de materiais que podem atuar como *scaffolds* que mimetizam o perióstio são discutidos a seguir.

Fan *et al.* (2010) desenvolveram *scaffolds* constituídos de colágeno que mimetizavam o tecido periosteal, sobre os quais cultivaram células mesenquimais estromais tratadas ou não com CoCl_2 . O uso de CoCl_2 foi justificado pelo fato de que este composto pode simular hipoxia, o que estimula a expressão de fatores pró-angiogênicos que, por sua vez, promovem maior

vascularização do *scaffold*. Os autores estudaram a osteogênese e a vascularização nos dispositivos após implante e constataram que os *scaffolds* contendo células tratadas com CoCl_2 apresentaram melhores resultados e se mostraram adequados para a aplicação desejada. Já Hoffman *et al.* (2013) desenvolveram hidrogéis a base de polietilenoglicol que mimetizavam o perióstio e estudaram o desempenho dos dispositivos no recobrimento de aloenxertos. Os autores observaram que a estratégia utilizada proporcionava melhor vascularização, ossificação endocondral (isto é, guiada por um molde de tecido cartilaginoso) e resistência mecânica na região tratada quando comparada ao uso de aloenxertos na ausência do perióstio artificial. Su *et al.* (2016) produziram *scaffolds* constituídos de nanofibras de PVA (álcool polivinílico) e fibroína da seda contendo dexametasona para aplicação como substituto de perióstio com propriedades de liberação controlada de composto ativo. Depois de 21 dias de cultura, células-tronco derivadas de dente decíduo foram capazes de se diferenciar em osteoblastos devido à indução pela dexametasona e o material desenvolvido foi considerado promissor para a aplicação desejada.

2.4.2. Células utilizadas na engenharia de tecidos ósseos

As células a serem utilizadas na engenharia de tecidos devem ser capazes de se expandir facilmente a altas passagens, ser não-imunogênicas e apresentar expressão de proteínas similares à do tecido a ser regenerado (Heath, 2000). Diferentes tipos de células com potencial osteogênico têm sido usados na engenharia de tecidos ósseos, como células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea e células-tronco derivadas do tecido adiposo, bem como osteoblastos maduros (Rao e Stegemann, 2013).

O uso de osteoblastos autógenos seria uma opção interessante, já que estes não apresentariam efeito imunogênico quando implantados. No entanto, algumas limitações estão relacionadas ao uso deste tipo celular como, por exemplo, sua limitada capacidade de proliferação *in vitro*, gerando dificuldade na obtenção de quantidade suficiente de células para que se alcance um efeito terapêutico (Salgado *et al.*, 2004; Rao e Stegemann, 2013).

O uso de células-tronco surge então como uma alternativa ao uso dos osteoblastos. Células-tronco mesenquimais (CTM) têm sido amplamente estudadas para utilização na engenharia de tecidos ósseos, uma vez que podem ser isoladas de forma confiável e manter seu potencial de crescimento por muitas divisões celulares (Niklason, 2000). Além disso, possuem a capacidade de secretar fatores solúveis que apresentam efeitos benéficos, tais como estímulo da

diferenciação e proliferação dos progenitores, inibição de apoptose, redução do estresse oxidativo e de reações imunológicas (Andrades *et al.*, 2011). As CTM podem ser obtidas de diversas fontes de tecidos adultos, sendo as principais a medula óssea, o tecido adiposo, o sangue periférico e o mesoderma, dentre outras (Andrades *et al.*, 2011; Krampera *et al.*, 2006).

Células-tronco derivadas do tecido adiposo são particularmente interessantes devido à sua facilidade de isolamento, com altas taxas de rendimento e mínima morbidade da região doadora. Além disso, sua taxa de crescimento quando em cultura é maior quando comparada à de células mesenquimais derivadas da medula óssea, por exemplo (Simonacci *et al.*, 2017). Estas células podem ser isoladas do tecido adiposo proveniente de cirurgias de lipoaspiração ou de outras biópsias e são capazes em se diferenciar em diversas linhagens celulares, tais como osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas e neurogênicas, quando submetidas a condições adequadas de cultivo (Simonacci *et al.*, 2017; Rao e Stegemann, 2013). A diferenciação osteogênica requer a presença de fatores indutores como a dexametasona, o ácido ascórbico e o β -glicerolfosfato (Bunnell *et al.*, 2008). As células diferenciadas em osteoblastos depositam uma matriz extracelular rica em colágeno e passam a expressar genes específicos associados a este tipo celular, como fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina (Beck *et al.*, 2000).

Conforme mencionado anteriormente, a proliferação celular é afetada tanto pela estrutura quanto pela composição do *scaffold*. Muitos polímeros têm sido estudados para a aplicação como suportes para crescimento celular na engenharia de tecidos. No item a seguir serão apresentados alguns polímeros que podem ser utilizados para a aplicação na engenharia de tecidos ósseos, destacando-se, no entanto, que materiais de outras categorias, como cerâmicas, metais, compósitos e híbridos, são também vastamente explorados na produção de *scaffolds*.

2.5. Polímeros utilizados na produção de *scaffolds*

Diferentes materiais vêm sendo aplicados na engenharia de tecidos, sendo eles de origem sintética ou natural. Os polímeros sintéticos são considerados versáteis, pois suas propriedades físico-químicas podem ser ajustadas e, além disso, podem ser obtidos em ampla escala. No entanto, ao contrário do que se observa para polímeros naturais, estes polímeros apresentam uma série de desvantagens, como a baixa hidrofiliabilidade, o que limita a adesão e proliferação celular; além do fato de que, quando implantados no organismo, a intensa degradação sofrida por vários deles pode ocasionar a liberação de subprodutos ácidos e a

ocorrência de reações inflamatórias quando há baixa vascularização e atividade metabólica na região tecidual adjacente (Li *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010).

Materiais de origem natural são capazes de mimetizar a matriz extracelular e, portanto, possuem melhor interação com células, o que leva a um desempenho mais eficaz no sistema biológico. Os polímeros naturais de interesse são classificados em proteínas (como colágeno, elastina e gelatina), polissacarídeos (celulose, quitosana, glicosaminoglicanos, entre outros) e polinucleotídeos (DNA e RNA) (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

O colágeno é o principal componente da maioria dos tecidos biológicos, sendo por isso muito utilizado na engenharia de tecidos. No entanto, muitas propriedades desta proteína limitam o seu uso, como por exemplo sua imunogenicidade moderada e baixas resistência mecânica e estabilidade em meio fisiológico, bem como o alto custo da proteína purificada, entre outros (Dong e Lv, 2016; Nair e Laurencin, 2007).

Os polissacarídeos têm atraído o interesse das comunidades médica e acadêmica nas últimas décadas pois são, em geral, facilmente obtidos de fontes renováveis, possuem baixa citotoxicidade e baixo custo de manufatura (Khan e Ahmad, 2013).

O uso de *scaffolds* à base de polissacarídeos para aplicações na recuperação de lesões ósseas já é relatado na literatura. Li *et al.* (2005) produziram *scaffolds* porosos constituídos de quitosana e alginato para aplicação em engenharia de tecido ósseo e obtiveram dispositivos com melhores propriedades biológicas e mecânicas em relação a suportes constituídos de quitosana apenas. Osteoblastos cultivados sobre o material obtido apresentaram adequada proliferação e a deposição de uma matriz calcificada pôde ser observada. Florczyk *et al.* (2013) também obtiveram *scaffolds* de quitosana e alginato, nos quais foram cultivadas células mesenquimais estromais. Proteínas morfogenéticas ósseas foram adicionadas e testes *in vivo* demonstraram que os sistemas obtidos são promissores para a aplicação na reconstrução óssea. Munarin *et al.* (2011) produziram microesferas de pectina e avaliaram o desempenho de células pré-osteoblásticas nelas cultivadas. As células foram capazes de se proliferar e se organizar em uma estrutura tridimensional, produzindo uma matriz extracelular mineralizada, mostrando, dessa forma, que as microesferas obtidas podem ser utilizadas na engenharia de tecidos para regeneração óssea. Fan *et al.* (2016) produziram um compósito à base de dois polissacarídeos (quitosana e sulfato de condroitina), combinados com hidroxiapatita, obtendo dispositivos com boas propriedades mecânicas e capazes promover a adesão e a proliferação de osteoblastos.

O grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Ângela Maria Moraes, no qual se insere este trabalho, possui vasta experiência na obtenção e caracterização de dispositivos de quitosana associados ou não a polímeros sintéticos (Salgado *et al.*, 2012) e a outros polissacarídeos (como alginato, goma guar, xantana e pectina) na forma de complexos polieletrólitos (Marreco *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2008; Bueno and Moraes, 2011; Veiga and Moraes, 2012; Bellini *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2014; Pires and Moraes, 2015; Souza *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2017; Bierhalz and Moraes, 2016; Bierhalz *et al.*, 2016; Westin *et al.*, 2017), assim como no uso de alguns destes tipos de suportes no cultivo de células mesenquimais estromais (Bellini *et al.*, 2015), mas visando a aplicação em lesões de pele, não do tipo ósseas. Neste contexto, optou-se por utilizar neste trabalho os polissacarídeos quitosana e xantana para a produção dos *scaffolds*, uma vez que possuem características atraentes para a aplicação proposta e não há relatos na literatura quanto ao uso da combinação destes polímeros para tal aplicação, como será discutido nos itens a seguir.

2.5.1. *Quitosana*

A quitosana é um polissacarídeo linear, com uma estrutura composta de unidades de glicosamina e N-acetil-glicosamina. Este biopolímero é obtido pela desacetilação da quitina, um composto geralmente extraído da carapaça de crustáceos, mas também encontrado em insetos, moluscos e na parede celular de alguns fungos (Goycoolea *et al.*, 2000; Rinaudo, 2006). As estruturas da quitosana e da quitina são apresentadas na Figura 2.3.

Dependendo de sua origem, a quitosana pode apresentar diferentes graus de desacetilação e massas molares. O grau de desacetilação corresponde à quantidade de grupos amino ao longo da cadeia e é determinado pela razão entre os grupos glicosamina e a soma de N-acetil-glicosamina e glicosamina. A molécula deve apresentar no mínimo 60% de desacetilação, sendo tipicamente usados os biopolímeros que contêm desacetilação na faixa de 70% a 95%. A massa molar destes polissacarídeos varia geralmente entre 10 e 1000 kDa (Berger *et al.*, 2004; Hamman, 2010; Croisier e Jérôme, 2013).

A presença de grupos amino na estrutura da quitosana a diferencia da quitina e confere a este polímero muitas propriedades particulares. Seu pKa é de 6,3, ou seja, em valores de pH menores que este, os grupos amino se encontram protonados e a quitosana adquire um caráter policatiônico. A presença dos grupos amino protonados determina a solubilidade da

quitosana em soluções ácidas diluídas e a torna capaz de interagir com espécies iônicas negativamente carregadas, formando complexos polieletrólitos (Dash *et al.*, 2011).

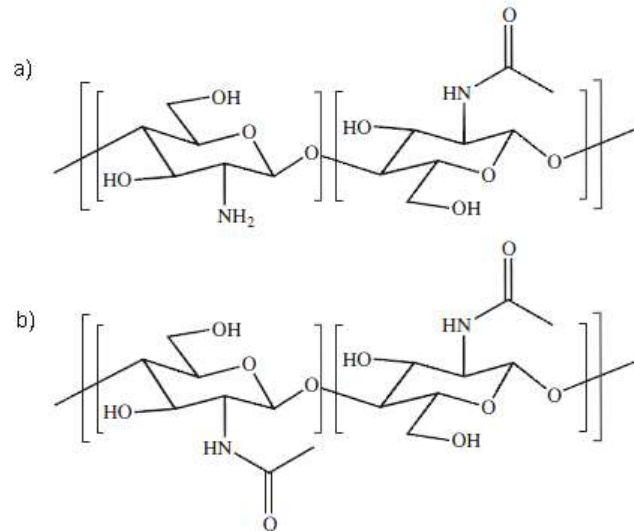


Figura 2.3: Representação das estruturas da (a) quitosana e (b) quitina (adaptado de Croisier e Jérôme, 2013).

A biodegradação da quitosana ocorre especialmente pela ação da enzima lisozima. Esta enzima está presente no corpo humano, e promove a hidrólise das ligações $\beta(1-4)$ entre os grupos N-acetil-glicosamina e glicosamina e depende, portanto, da distribuição dos grupos acetilados na cadeia polimérica. Como a enzima age nos resíduos N-acetil-glicosamina, quanto maior o grau de desacetilação da quitosana, menos ela será degradada pela lisozima (Han *et al.*, 2012).

A quitosana tem sido amplamente aplicada na área de engenharia de tecidos para obtenção de substitutos ósseos, uma vez que apresenta propriedades adequadas para esta finalidade, dentre elas: (i) hidrofiliabilidade; (ii) biocompatibilidade e biodegradabilidade; (iii) possibilidade de obtenção em diversos formatos; (iv) osteocondutividade; (v) promoção da osteogênese; (vi) capacidade de promover integração óssea com o tecido já existente; e (vii) se assemelha à matriz extracelular em termos estruturais e de composição (Li *et al.*, 2005; Martino *et al.*, 2005; Nassif e El Sabban, 2011). É importante ressaltar que as propriedades apresentadas pela quitosana são altamente dependentes de sua massa molar e de seu grau de desacetilação (Goycoolea *et al.*, 2000; Rinaudo, 2006).

2.5.1.1. *Quitosana fosforilada*

Modificações químicas na estrutura da quitosana podem conferir a este polímero diferentes propriedades, dependendo do grupo introduzido. A introdução de grupos fosfato tem sido amplamente reportada na literatura devido à possibilidade de obtenção de derivados com propriedades atrativas do ponto de vista químico e biológico como, por exemplo, atividade bactericida, biocompatibilidade, bioabsorção, osteoindutividade e efeito quelante (Jayakumar *et al.*, 2008a).

Diversos métodos de fosforilação da quitosana são relatados na literatura, sendo os mais utilizados baseados em três diferentes abordagens principais: modificação via ácido ortofosfórico/uréia/dimetilformamida; $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{Et}_3\text{PO}_4/\text{hexanol}$; ou $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ácido metanossulfônico}$ (Tachaboonyakiat *et al.*, 2010). A introdução dos grupos fosfato pode ocorrer tanto nos grupamentos amino quanto hidroxila da quitosana, sendo este um resultado dependente do tipo de método de fosforilação empregado (Zhao *et al.*, 2012; Tachaboonyakiat *et al.*, 2010).

O método $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{Et}_3\text{PO}_4/\text{hexanol}$ é vantajoso, pois a purificação do produto final é simples e este pode ser usado para a modificação de quitosana de qualquer grau de desacetilação. Ao utilizar este método, grupos fosfato são introduzidos tanto nos grupos amino quanto hidroxila da quitosana (conforme mostrado na Figura 2.4) (Jayakumar *et al.*, 2008b).

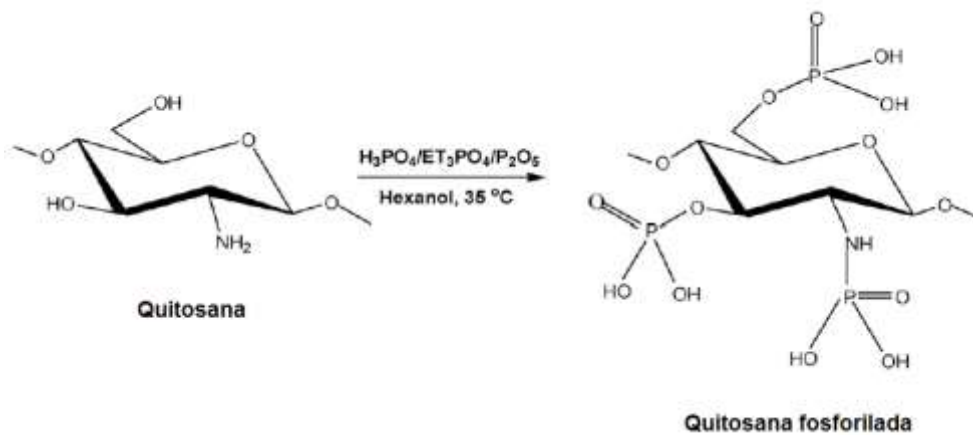


Figura 2.4: Esquema da reação de fosforilação da quitosana pelo método $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{Et}_3\text{PO}_4/\text{hexanol}$ (adaptado de Jayakumar *et al.*, 2008b)

A solubilidade do produto final em água depende da massa molar da quitosana utilizada, bem como de seu grau de desacetilação e do grau de substituição de grupos fosfato nos

grupos amino ou hidroxila da quitosana. Quanto maior o grau de desacetilação e o grau de substituição atingido, menor é a solubilidade do polímero modificado, o que está relacionado com reticulações intra e intercadeias que ocorrem devido à interação dos grupos amino e fosfato (Tachaboonyakiat *et al.*, 2010).

A quitosana fosforilada é particularmente interessante para aplicação ortopédica, uma vez que seus grupamentos fosfato têm potencial de troca de cátions. Estes grupos podem se ligar a íons cálcio e induzir a formação de uma camada de fosfato de cálcio na superfície do material constituído por este polímero, o que promove sua osteocondução. Além disso, a capacidade de recrutamento de biomoléculas relacionadas à sinalização celular, como fatores de crescimento, torna esse polímero quimicamente modificado atrativo para aplicação na engenharia de tecidos ósseos (Amaral *et al.*, 2005). As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são fatores de crescimento capazes de promover formação de tecido ósseo pela indução da diferenciação de células mesenquimais estromais em osteoblastos (Granjeiro *et al.*, 2005). Neste contexto, o desenvolvimento de materiais biocompatíveis capazes de atrair proteínas, tais como as BMPs, para sua superfície é de extrema importância (Mucalo *et al.*, 2009).

2.5.2. *Xantana*

A xantana é um polissacarídeo ramificado produzido industrialmente com a fermentação de glicose pela bactéria *Xanthomonas campestris*. Sua estrutura consiste de unidades de pentassacarídeos formadas por duas unidades de glicose, duas de manose e uma de ácido glicurônico. A cadeia principal é constituída de unidades de β -D-glicose unidas por ligações 1-4, sendo idêntica à da celulose. Na posição C3 de cada unidade de glicose alternada há uma cadeia lateral trissacarídica, contendo unidades de β -D-manose, 1,4- β -D-ácido glicurônico e 1,2- α -D-manose, podendo apresentar na posição C6 da α -D-manose interna grupos O-acetil e na β -D-manose terminal o substituinte 4,6-ácido pirúvico (García-Ochoa *et al.*, 2000; Coviello *et al.*, 2007). A estrutura química da xantana é ilustrada na Figura 2.5.

A xantana é solúvel em água, sua massa molar varia de 2000 a 20000 kDa e seu pKa é de 2,9. Logo, acima desse valor de pH, os grupos carboxila dos ácidos glicurônico e pirúvico da xantana se encontram desprotonados e ela adquire um caráter polianiónico. Assim, o conteúdo de ácido pirúvico substituinte nos grupos manose terminais da xantana é especialmente determinante

das propriedades deste polissacarídeo. (García-Ochoa et al., 2000; Coviello et al., 2007; Khouryieh et al., 2007).

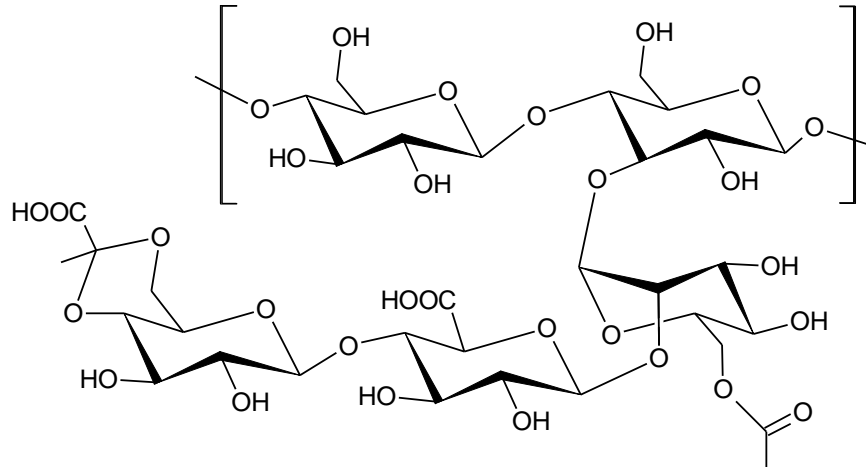


Figura 2.5: Estrutura química da xantana (adaptado de Hamman, 2010).

A xantana tem atraído atenção como um biomaterial para a preparação de *scaffolds* para a engenharia de tecidos por não ser citotóxica e apresentar excelente biocompatibilidade. No entanto, biomateriais constituídos do polímero isolado apresentam baixa resistência mecânica, logo, a combinação da xantana com outros materiais tem sido realizada a fim de reforçar suas propriedades mecânicas, bem como manipular outras propriedades relevantes para a aplicação na engenharia de tecidos (Kumar *et al.*, 2018).

O uso da xantana e de suas combinações com outros materiais não foi ainda totalmente explorado para a aplicação na engenharia de tecidos ósseos, havendo poucos trabalhos reportados na literatura sobre este tema (como por exemplo Pérez-Dosal *et al.*, 2010; Izawa *et al.*, 2014 e Dyondi *et al.*, 2013).

2.5.3. Complexo quitosana-xantana

A interação iônica entre grupos amino protonados da quitosana e grupos carboxila negativamente carregados da xantana leva à formação de um complexo polieletrólito (PEC) entre os dois polímeros (Luo e Wang, 2014). A formação do complexo é afetada pelas propriedades moleculares dos polímeros (massa molar, grau de desacetilação da quitosana e conteúdo de ácido pirúvico da xantana), bem como pelas condições de complexação (concentração e pH das

soluções poliméricas, proporção entre os polímeros e taxa de agitação, por exemplo) (Kim *et al.*, 2017).

Estudos recentes reportaram a aplicação de PECs de quitosana e xantana na engenharia de tecidos, como por exemplo para o tratamento de lesões na cartilagem (Westin *et al.*, 2017) e na pele (Bellini *et al.*, 2012; Bellini *et al.*, 2014; Bellini *et al.*, 2015). No que diz respeito à engenharia de tecidos ósseos, alguns estudos são encontrados na literatura (Pérez-Dosal *et al.*, 2010; Aguiar e Bertran, 2016), mas nenhum deles especificamente para a engenharia do tecido periosteal, o que confere caráter de ineditismo ao presente trabalho.

2.6. Estratégias para a obtenção de matrizes polissacarídicas porosas e com melhores propriedades mecânicas

Conforme já mencionado anteriormente, características essenciais para o bom desempenho de *scaffolds* dizem respeito à porosidade e propriedades mecânicas adequadas para a aplicação desejada. Um aumento na porosidade e no tamanho dos poros presentes na matriz facilita a acomodação e proliferação celular, bem como o transporte de substâncias, no entanto, diminui a resistência mecânica do dispositivo, o que não é desejável. *Scaffolds* que possuem ambas as características de porosidade e resistência mecânica ideais são de difícil obtenção (Kong *et al.*, 2007). Por este motivo, estratégias para a obtenção de *scaffolds* com porosidade adequada e para o reforço das propriedades mecânicas dos mesmos são abordadas neste item.

Vários métodos podem ser usados para a obtenção de matrizes com estrutura porosa, como, por exemplo, eletrofiação, liofiliação, separação de fases, lixiviação de partículas e evaporação do solvente, bem como formação de espuma (Yang *et al.*, 2001). A última abordagem refere-se à introdução de um tensoativo, ou surfatante, na matriz durante sua fabricação. A combinação de polímeros e surfatantes é frequentemente realizada para fins de emulsificação, controle reológico e estabilidade coloidal, por exemplo (Bueno e Moraes, 2011).

O Kolliphor[®] P188 (ou Poloxamer 188) é um exemplo de tensoativo não-iônico da classe dos Pluronic ou Poloxamers, sendo, portanto, um copolímero constituído de um bloco central de polioxipropileno (PPO), o qual é relativamente hidrofóbico, cercado por dois blocos de polioxietileno (PEO), o qual é relativamente hidrofílico (Figura 2.6). Sua massa molar média é de 8350 g/mol. O valor de HLB (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) deste surfatante é 29. O HLB mede a hidrofiliabilidade do surfatante com base na porcentagem relativa entre seus grupos hidrofílicos e

hidrofóbicos, o que indica alta capacidade de formar soluções aquosas límpidas e espumas (Kan *et al.*, 1999; Bueno, 2010; Bueno *et al.*, 2014).

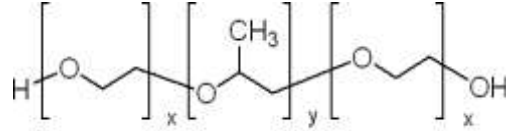


Figura 2.6: Estrutura química do Poloxamer 188[®], sendo: $x = 80$ e $y = 27$ (adaptado de Bueno, 2010).

A formação de micelas de Poloxamers em solução aquosa pode ser induzida de duas diferentes maneiras: a concentração do composto pode ser elevada até que a concentração micelar crítica (CMC) seja atingida, ou a temperatura pode ser elevada, ocasionando a redução da CMC (Figura 2.7). A CMC do Poloxamer 188 a 37 °C e pH 7,4, por exemplo, é de $4,8 \times 10^{-4}$ mol/L (Reintjes, 2011). A formação das micelas é associada à desidratação e agregação dos blocos PPO enquanto os blocos PEO permanecem hidratados e solúveis na solução (Park *et al.*, 2003). O aumento da temperatura causa redução da solubilidade da cadeia de PPO, favorecendo a formação da micela (Devi *et al.*, 2013).

Vale ressaltar ainda que o Poloxamer 188 possui capacidade de gelificação, a qual é termorreversível e depende de sua concentração em solução. Acima da concentração ou temperatura crítica de gelificação, a fluidez do sistema diminui drasticamente e ocorre a transição sol-gel. Este processo de gelificação ocorre devido ao entrelaçamento e empacotamento das micelas, conforme ilustrado na Figura 2.7(a) (Devi *et al.*, 2013). Já a transição gel-sol ocorre a temperaturas mais elevadas, e é resultado da desidratação e encolhimento das coroas micelares (Park *et al.*, 2003).

Além de possuir capacidade surfatante, o Poloxamer 188 também atua como estabilizante e solubilizante. Assim, este composto é de grande interesse das áreas biomédica e farmacêutica, uma vez que seu caráter anfifílico, sua termorreversibilidade, além de sua baixa toxicidade e imunogenicidade o tornam atrativo para o uso em diversas formulações (Bueno, 2010; Manoli e Avranas, 2013).

O fato deste tensoativo ser não-iônico é vantajoso do ponto de vista de sua utilização na fabricação de dispositivos nos quais os polímeros interagem ionicamente (Bueno e Moraes,

2011), como no caso deste trabalho (no qual quitosana e xantana formam complexos polieletrólitos), uma vez que a presença de cargas no tensoativo poderia afetar a complexação iônica.

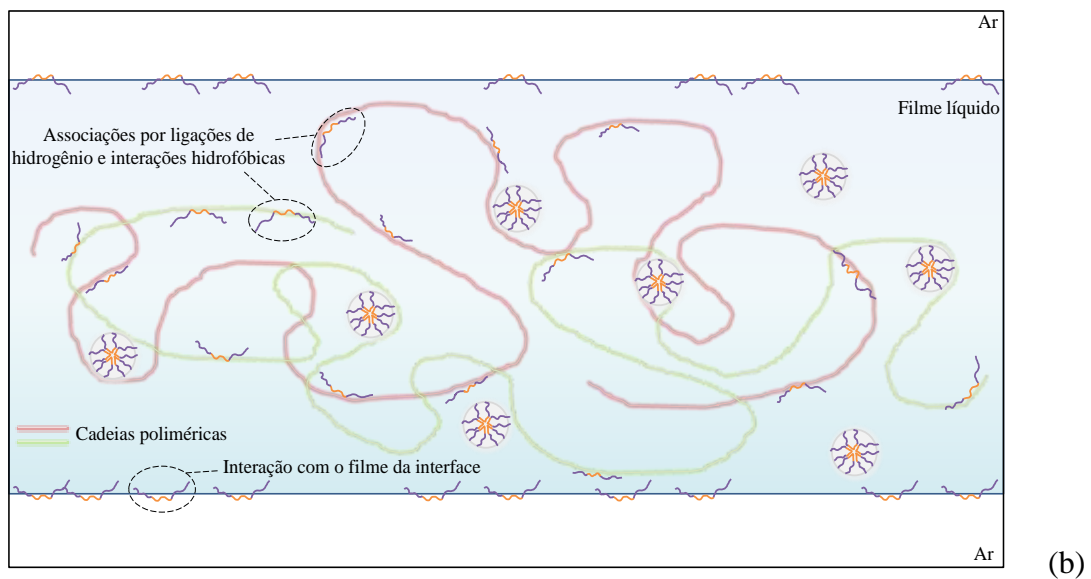
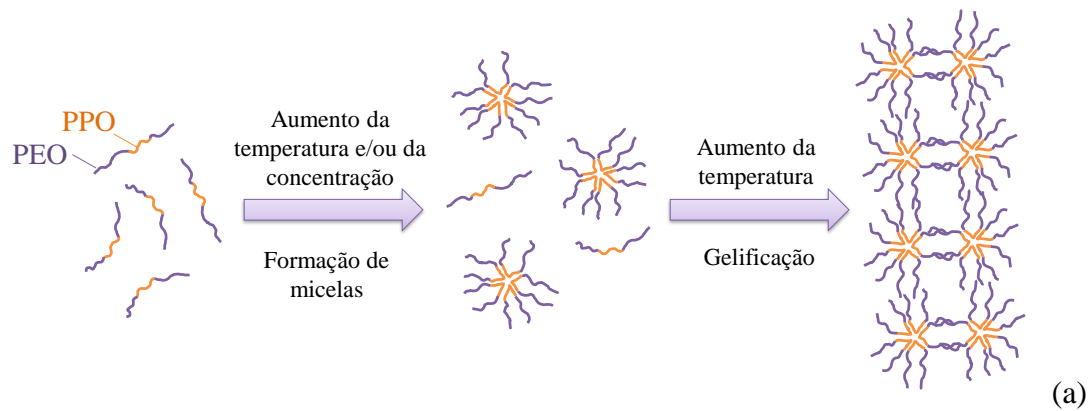


Figura 2.7: Ilustração do mecanismo de formação de micelas e de gelificação (adaptado de Devi *et al.*, 2013 e Reintjes, 2011) apresentado pelo Poloxamer 188 em solução aquosa (a) e esquema representando as possíveis interações presentes no filme líquido da espuma formada no sistema contendo polissacarídeos e surfatante não-iônico (adaptado de Bueno, 2010) (b).

Quando adicionado à mistura polimérica, o Kolliphor® P188 propicia a formação de uma espuma que dá origem a uma matriz estável. Na Figura 2.7(b) está representada a possível interação que ocorre entre o Poloxamer e as cadeias poliméricas quando em solução aquosa, apresentada por Bueno (2010), que utilizou em seu trabalho os polissacarídeos quitosana e

alginate (que também formam complexos polieletrólitos). De acordo com o esquema apresentado, Bueno (2010) descreveu a interação de cadeias poliméricas solubilizadas no filme líquido com o surfatante, presente tanto na forma de micelas quanto de moléculas isoladas. As moléculas de surfatante também permanecem distribuídas na interface do ar com o líquido, ficando sua fração polar voltada para o líquido e a fração apolar voltada para o ar. Como polissacarídeos estão presentes na solução e interagem com o tensoativo, a viscosidade do sistema aumenta, o que acarreta numa maior estabilidade da espuma. Além disso, a autora cita o impedimento do colapso do filme por impedimento estérico devido ao grande tamanho das moléculas de polissacarídeos. A espuma formada é estável o suficiente para manter a integridade da estrutura obtida, resultando em um material altamente poroso após a evaporação do solvente utilizado. Bueno (2010) destacou ainda que a forma de interação do Poloxamer com os polissacarídeos pode ser afetada pela mudança da composição da fase aquosa ao longo da etapa de secagem, uma vez que isso acarreta, por exemplo, na mudança da força iônica do meio e no aumento da concentração do tensoativo em solução, em decorrência da evaporação dos solventes.

Bueno *et al.* (2014) produziram membranas de quitosana e alginate contendo Pluronic F68[®] (equivalente ao Kolliphor[®] P188) e obtiveram dispositivos com baixa resistência mecânica e alongamento na ruptura. Apesar disso, os autores afirmaram que, por apresentarem aspecto poroso e lamelar, as membranas obtidas seriam interessantes para a aplicação como *scaffolds* para o cultivo de células animais, uma vez que apresentaram baixa citotoxicidade a células L929. Por esse motivo, o tensoativo Kolliphor[®] P188 foi escolhido como agente porogênico a ser utilizado para obtenção dos *scaffolds* desenvolvidos no presente trabalho.

De acordo com o trabalho de Chen *et al.* (2013), diferentes materiais elastoméricos podem ser utilizados na formulação de dispositivos desenvolvidos no âmbito da engenharia de tecidos, a fim de se obter matrizes flexíveis, com propriedades mecânicas melhoradas. Os autores citam diversos exemplos destes materiais, que incluem polímeros sintéticos e proteínas. Dentre os polímeros sintéticos mencionados pelos autores podem-se destacar os silicones, dentre os quais o mais comum é o polidimetilsiloxano (PDMS), cuja estrutura é representada na Figura 2.8.

O Silpuran[®] 2130 A/B é um PDMS e possui grupos funcionais e agentes auxiliares para reticulação aditiva nos dois componentes da mistura (A e B), mediada por um catalisador de platina. Possui baixa viscosidade, caráter hidrofóbico, alta adesividade e transparência, além de biocompatibilidade e estabilidade quando esterilizado e também na presença de diversos

solventes (Pires e Moraes, 2015; Wacker Chemie AG, 2018). Pires e Moraes (2015) estudaram o impacto da adição de Silpuran[®] 2130 A/B a membranas de quitosana-alginato em suas propriedades mecânicas. As autoras obtiveram resultados satisfatórios, uma vez que a tensão na ruptura das membranas se alterou significativamente, passando de aproximadamente 20 MPa em membranas sem Silpuran[®] 2130 A/B para 63 MPa em membranas contendo o silicone. O mesmo foi observado para o alongamento na ruptura dos filmes, que se alterou de aproximadamente 2,7% para 5,1% em membranas com Silpuran[®] 2130 A/B. Segundo as autoras, o fato de a platina presente na composição do silicone usado ser capaz de interagir com os grupos amino da quitosana contribuiu para a formação de uma matriz mais estável.

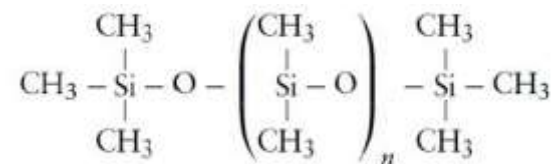


Figura 2.8: Estrutura química do Silpuran[®] 2130 A/B (n = 0,1,...) (adaptado de Pires, 2013).

No entanto, deve-se destacar que este agente siliconado apresenta certa limitação quanto à sua aplicação na engenharia de tecidos, uma vez que não é biodegradável. Por outro lado, o fato de ser não tóxico e biologicamente inerte (Chen *et al.*, 2013), além de ser utilizado em pequenas quantidades no caso da aplicação para reforço de propriedades mecânicas de membranas polissacarídicas (Pires e Moraes, 2015), o torna interessante para a aplicação proposta neste trabalho. Alguns trabalhos encontrados na literatura já relataram o uso de PDMS na composição de materiais utilizados na engenharia do tecido ósseo (Kai *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017) e, segundo Pedraza *et al.* (2013), por apresentar um elevado grau de biocompatibilidade e bioestabilidade após uso clínico como implantes, o PDMS é de fato um excelente candidato para implantes de longa permanência no organismo.

Tendo em vista o panorama apresentado, este trabalho foca na produção de matrizes polissacarídicas constituídas de quitosana (fosforilada ou não modificada) e xantana, combinadas ou não com o porogênico Kolliphor[®] P188 e o gel de silicone Silpuran[®] 2130 A/B e sua caracterização no âmbito de suas propriedades físicas, físico-químicas, mecânicas e biológicas, visando à sua aplicação como substituto do perióstio para promover o reparo ósseo.

Capítulo 3:
METODOLOGIA,
RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, dividido em três seções, são apresentados os métodos experimentais utilizados nas diferentes etapas de desenvolvimento deste trabalho, assim como os resultados obtidos e sua interpretação e comparação com a literatura. Nas duas primeiras seções são apresentados dois artigos, redigidos em inglês, tendo sido o primeiro deles publicado no veículo indexado Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications e o segundo na revista International Journal of Biological Macromolecules, enquanto na última seção são mostrados os resultados de um ensaio piloto realizado *in vivo*.

Para propiciar uma visão mais abrangente sobre a maneira com que o estudo foi realizado como um todo, apresenta-se na Figura 3.1 um fluxograma que sumariza a forma com que os artigos foram organizados, particularmente no que se refere às caracterizações realizadas em cada etapa do trabalho para os *scaffolds* produzidos. As metodologias utilizadas para cada caracterização estão descritas nas respectivas seções onde foram utilizadas. Algumas dessas metodologias estão mais detalhadamente descritas no Apêndice A, uma vez que sua descrição nos artigos foi feita de forma breve, sendo elas (A.1) fosforilação da quitosana; (A.2) fabricação dos *scaffolds*; e (A.3) avaliação das propriedades mecânicas dos *scaffolds*. Além disso, no Apêndice B, é mostrado o aspecto visual dos materiais obtidos, tanto em estado seco quanto em estado úmido, a fim de se esclarecer como se comportaria esse material ao manuseio após seu intumescimento, uma vez que detalhes acerca desse aspecto não foram incluídos nos artigos apresentados nas seções 3.1 e 3.2.

Na seção 3.1, o primeiro artigo, intitulado *Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues*, descreve a obtenção de *scaffolds* a partir dos polissacarídeos quitosana e xantana, combinados com o surfatante Kolliphor[®] P188 e o gel de silicone Silpuran[®] 2130 A/B, para a obtenção de matrizes porosas e com maior resistência mecânica. Todas as formulações tiveram suas propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas testadas para se avaliar sua potencial aplicação na engenharia de tecidos moles.

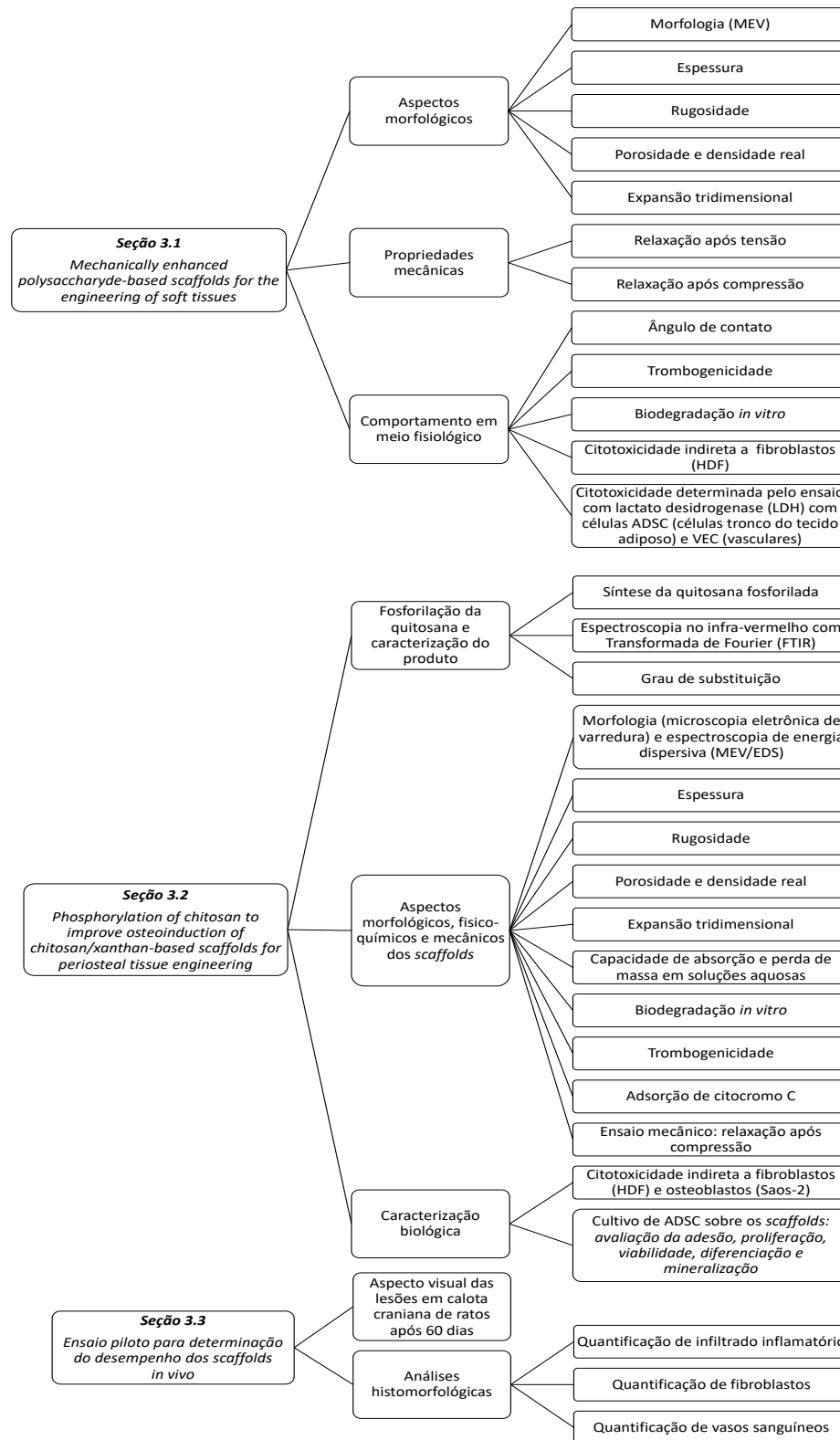


Figura 3.1: Fluxograma que sumariza a estrutura de organização dos dados resultantes do desenvolvimento deste trabalho na forma de três artigos científicos.

Na seção 3.2, onde se encontra o segundo artigo, intitulado *Phosphorylation of chitosan to improve osteoinduction of chitosan/xanthan-based scaffolds for periosteal tissue engineering*, descreve-se a produção de *scaffolds* à base de quitosana fosforilada e xantana com o objetivo de melhorar a osteoindução do material em relação àquele contendo quitosana não modificada quimicamente. As propriedades desses *scaffolds* são avaliadas, considerando-se sua aplicação como substitutos do periósteo e aplicação no reparo de tecidos ósseos.

Na seção 3.3, *Ensaio piloto para determinação do desempenho dos scaffolds in vivo*, é mostrado o estudo do reparo ósseo em calota craniana de ratos após tratamento de lesões ósseas com os biomateriais produzidos com quitosana (fosforilada ou não modificada) e xantana, contendo ou não os aditivos Kolliphor® P188 e Silpuran® 2130 A/B.

3.1. MECHANICALLY ENHANCED POLYSACCHARIDE-BASED SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING OF SOFT TISSUES §

Renata Francielle Bombaldi de Souza¹, Fernanda Carla Bombaldi de Souza¹, Cristiano Rodrigues², Bernard Drouin³, Ketul C. Popat⁴, Diego Mantovani³ and Ângela Maria Moraes^{1*}

¹ Department of Engineering of Materials and of Bioprocesses, School of Chemical Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

² Department of Basic Health Sciences, Laboratory of Cell Biology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre - UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Canada Research Chair I in Biomaterials and Bioengineering for the Innovation in Surgery, Department of Min-Met-Materials Engineering, Research Center of CHU de Quebec, Division of Regenerative Medicine, Laval University, Quebec, QC, Canada

⁴ Department of Mechanical Engineering, School of Biomedical Engineering, Colorado State University (CSU), Fort Collins, CO, USA

*Correspondence to: Â. M. Moraes (E-mail: ammoraes@feq.unicamp.br)

§ Este artigo foi publicado com modificações na revista internacional indexada *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications* e está sendo reproduzido com permissão da editora Elsevier / This paper was published with modifications in the journal *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications* and is herein reprinted with permission from Elsevier. Ref.: Souza, R.F.B.; Souza, F.C.B.; Rodrigues, C.; Drouin, B.; Popat, K.C.; Mantovani, D.; Moraes, A.M. Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues. *Materials Science and Engineering C*, v. 94, p. 364-375, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.045>

3.1.1. Abstract

Collagen-based materials are probably among the most used class of biomaterials in tissue engineering and regenerative medicine. Although collagen is often privileged for providing a suitable substrate on which cells can be cultured or a matrix in which cells can be dispersed, its mechanical properties represent a major limitation for clinical translation and even for handling of the obtained regenerated tissue. In this work, the combination of polysaccharides chitosan (Ch) and xanthan gum (X) was investigated as an alternative for scaffolds for soft tissue engineering. Moreover, in an attempt to reach a compromise between obtaining highly porous biomaterials while maintaining appropriate mechanical properties, a surfactant (Kolliphor[®] P188, K) was added to Ch-X matrices to generate pores, while silicone rubber (Silpuran[®] 2130A/B, S) was used to balance their mechanical properties. Addition of K (10 or 25% w/w) increased the porosity and pore-dimensions, while addition of S improved by up to 156% and 85% the elastic moduli and the elastic behavior of Ch-X-based scaffolds, under both compressive and tensile loads, respectively, at 50% strain. Relaxation tests confirmed that these materials do have a viscoelastic behavior. The presence of S increased thickness and microscale surface roughness and did not affect liquid uptake and stability, thrombogenicity, biodegradation and cytotoxicity of polysaccharide-based scaffolds. In conclusion, this work shows that Ch-X-S porous blends constitute suitable scaffolds for soft tissue engineering.

KEYWORDS: chitosan, xanthan, surfactant, silicone, mechanical properties, tissue engineering

3.1.2. Introduction

Tissue engineering combines three key elements to promote damaged tissue regeneration: scaffold, cells and growth factors (Ikada, 2006). The basic role of the scaffold is to provide support for cell growth and three-dimensional tissue formation. Ideally, its structure and composition should mimic the natural extracellular matrix (ECM), which is secreted by cells to provide physical support to tissues and organs as well as an appropriate bioactive microenvironment to promote their functions. Structural (e.g. collagen and elastin) and cell-adhesion proteins (e.g. fibronectin), as well as glycans (e.g. glycosaminoglycans [GAGs]), constitute the main components of the ECM (Keane and Badylak, 2014). Among other characteristics, scaffolds must be biocompatible and biodegradable, present mechanical

compatibility with native tissue, appropriate culture media absorption, as well as adequate roughness and porosity for cell accommodation and nutrient transport within the matrix (Ikada, 2006; Hutmacher, 2000).

Biological tissues may be distinguished between soft or hard tissues, being soft tissues complex fiber-reinforced composite structures, generally with high content of water. Examples of soft tissues include skin, cartilage, blood vessels, ligaments and tendons. Their mechanical behavior depends on the structural arrangement and concentration of the constituents (collagen, elastin and proteoglycans), and their specific physiological function in the body. Opposite to hard tissues, soft tissues present high flexibility and low mechanical, generally viscoelastic, properties (Lander *et al.*, 2002; Holzapfel, 2000). Viscoelastic materials present both elastic and viscous components, being able to recover energy during loading and unloading (elasticity) but dissipating some of that energy due to fluid shear (viscosity). In the case of soft tissues, viscoelasticity is related to the shear interaction of collagen fibrils with the matrix of proteoglycans (Lander *et al.*, 2002; Holzapfel, 2000). Considering this, the type of tissue to be engineered will determine the set of properties required in scaffold design.

Nature-derived polymers, such as proteins (collagen, gelatin, elastin, fibrinogen, etc.) and polysaccharides (cellulose, alginate, chitin, chitosan, dextran, etc.), are widely used in tissue engineering due to their biocompatibility, biodegradability and ability to mimic the ECM (Salerno and Pascual, 2015; Malafaya *et al.*, 2007). Collagen is a protein vastly used for the fabrication of scaffolds because it shows all these characteristics. This protein is the main component of most hard and soft tissues and plays an important role in maintaining the biological and structural function of ECM. Because of its importance, different collagen applications in tissue engineering and its denatured forms are largely described in the literature. However, certain properties of collagen scaffolds have limited their use to some extent, mainly their mild immunogenicity, lack of mechanical strength and stability upon hydration, as well as high cost of pure collagen, among others (Dong and Lv, 2016; Nair and Laurencin, 2007; Gorgieva and Kokol, 2011).

Polysaccharides have attracted the interest of medical and academic communities in the last decades due to the low toxicity, low manufacture and disposal costs, renewability and environmentally-friendly aspects of these biomolecules (Khan and Ahmad, 2013). Chitosan (Ch) and xanthan gum (X), particularly, have been extensively studied for tissue engineering

applications. Chitosan is especially interesting as it is able to provide a non-protein environment for tridimensional cell growth, structurally similar to extracellular proteoglycans (Nassif and El Saban, 2011), and it can combine with xanthan gum by electrostatic interaction, forming stable Ch-X polyelectrolyte complexes (PECs). PEC formation is affected by molecular properties of the polymers (molecular weight, chitosan degree of deacetylation and xanthan gum pyruvic acid content) as well as by the conditions of complex production (concentration and pH of polymers solutions, time, polymers proportion and mixing rate) (Kim *et al.*, 2017), and its porosity can be altered through the use of non-ionic surfactants such as Tween 80 and poloxamer 188 (often referred to as Pluronic[®] F-68 and Kolliphor[®] P188) (Bellini *et al.*, 2012).

Recent studies reported the fabrication of chitosan-xanthan scaffolds for tissue engineering applications (Horn *et al.*, 2015), for example for the treatment of cartilage (Westin *et al.*, 2017) or skin lesions (Bellini *et al.*, 2012; Bellini *et al.*, 2014; Bellini *et al.*, 2015). Westin *et al.* (2017), Bellini *et al.* (2014) and Bellini *et al.* (2015) produced porous Ch-X scaffolds by adding surfactants to the polymeric mixtures. Dental pulp stem cells (DPSC) (Westin *et al.*, 2017) and mesenchymal stromal cells (MSC) (Bellini *et al.*, 2014) were seeded onto the porous Ch-X scaffolds and efficient cell adhesion and proliferation was observed, as well as the differentiation of the DPSC into chondrocytes when chondrogenic culture medium was used (Westin *et al.*, 2017).

Frequently, the production of porous Ch-X scaffolds with adequate cell compatibility, physiological fluid uptake and stability for the application in tissue engineering is reported, but the mechanical properties of these scaffolds are generally limited. In fact, there is a compromise between scaffold porosity and mechanical properties, with increasing porosity frequently leading to a significant decrease in the mechanical resistance of the material (Salerno and Pascual, 2015; Loh and Choong, 2013).

This work aimed then at improving Ch-X porous scaffolds formulations through concomitant reduction of the amount of surfactant Kolliphor[®] P188 (K) and addition of the elastomer Silpuran[®] 2130 A/B (S). S has been previously used with success to improve the mechanical properties of chitosan-alginate scaffolds, increasing their tensile strength by 3 times (Pires and Moraes, 2015), but it has not yet been combined to dense or porous xanthan-containing matrices. Therefore, in the present work, specimen resulting properties were investigated through morphological analyses, mechanical tests and evaluation of their behavior under physiological

conditions to assess how the presence of the surfactant and silicone additives affects relevant properties of Ch-X matrices intended to be applied as scaffolds for soft tissue engineering. More specifically, the cross section and surface morphology as well as thickness, roughness, tridimensional expansion and porosity of scaffolds were studied, since these properties may influence in nutrient diffusion, cell growth and consequent tissue formation within the matrix. Stress relaxation tests were performed to assess the viscoelastic behavior and the influence of S on the mechanical resistance of Ch-X-based materials. Moreover, water contact angle, liquid uptake and mass loss in aqueous media, thrombogenicity, *in vitro* biodegradation and cytotoxicity tests can suggest what would be the behavior of these materials after implantation, regarding their stability and biocompatibility.

3.1.3. Materials and Methods

3.1.3.1. Materials

Chitosan-xanthan scaffolds were prepared using chitosan from shrimp shells (Sigma-Aldrich, C3646, lot number 061M0046V, with deacetylation degree of 88% and molar mass, MM, of 1.26×10^6 g/mol), xanthan gum (CP Kelco, Xantural[®]180, lot number 2J7007K, with pyruvic acid content higher than 1.5% and MM of 10.01×10^5 g/mol), Kolliphor[®] P188 (Sigma-Aldrich, P1300), Silpuran[®] 2130 A/B (Wacker Chemie AG) and glacial acetic acid (Synth). The water used was purified in a Milli-Q[®] system (Millipore). All other reagents used were of analytical grade.

3.1.3.2. Membranes preparation

Dense and porous Ch-X matrices were prepared according to adaptations of the procedures described by Bellini *et al.* (2012), at a mass ratio of Ch:X equal to 1:1.

The Ch-X polyelectrolyte complex was prepared using 1% (w/v) solutions of chitosan (in aqueous acetic acid solution, 1% v/v) and xanthan gum (aqueous solution). The addition of 200 mL of chitosan solution at a flow rate of 9 mL/min into a jacketed stainless steel reactor (internal diameter of 10 cm and height of 20 cm) containing 200 mL of xanthan gum solution was performed using a peristaltic pump (Minipuls 3, Gilson). The temperature was maintained at 25 °C (thermostatic bath, 214 M2, Quimis) throughout the process and stirring at 1000 rpm was performed with a mechanical stirrer equipped with a marine propeller (2.5 cm

radius) (251 D, Quimis). After the addition of chitosan solution, the system was kept under agitation at 1000 rpm for more 10 minutes. To obtain porous matrices, 0.4 g (10% w/w) or 1 g (25% w/w) of Kolliphor[®] P188 was added to the xanthan solution prior to the addition of chitosan. For formulations containing Silpuran[®] 2130 A/B, 0.4 g (10% w/w), i.e. 412 μ L, of this polymer was added to the polymeric mixture.

For dense formulations, the polymeric mixture was then degassed in a vacuum pump (Q-355b, Quimis) for two hours. Degassing was not performed for porous formulations. Afterwards, the mixture was transferred to two polystyrene Petri dishes of 15 cm diameter and the solvent was evaporated in an oven with air circulation (410D, New Ethics) at 37 °C for 24 or 48 hours, for dense or porous formulations, respectively. The scaffolds were then washed for 30 min with water (200 mL, twice), 10 mM HEPES buffer for 20 min (150 mL, twice) and water for more 15 min. Final drying was done at room temperature for dense formulations and at 37 °C for 24 hours for porous formulations.

For the biological tests, the scaffolds were sterilized with ethylene oxide (EO) by exposure to Oxyfume-30 (30% EO and 70% carbon dioxide) for 8 h at 40 °C and relative humidity of 30–80%.

3.1.3.3. *Membranes characterization*

3.1.3.3.1. *Morphological aspects*

Morphology: The morphology of surface and cross section of dry membranes was assessed by scanning electron microscope (SEM) (LEO 440i, Leica). Samples previously stored in desiccator were metalized with a thin layer of gold (92 Å) (SC 7620, Mini Sputter Coater). For the evaluation of cross sections, samples of dense formulations were fractured after immersion in liquid nitrogen at -196 °C, and porous samples were cut with scissors. The average pore size was obtained by analyzing SEM images of porous formulations with Image J software.

Thickness: Scaffold thickness was measured using a dial thickness gage (Mitutoyo). Measurements were taken at ten different positions of the film and the mean value was calculated. Thickness of wet samples was measured after exposure of scaffolds to water and DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) after 24 hours.

Roughness: The surface roughness of the scaffolds (expressed as the arithmetic average high, Ra, and the root mean square roughness, Rq) was evaluated using a portable

rugosimeter (SJ-210, Mitutoyo) with cutoff set in 0.8 mm and total length in 5 mm and is reported as an average of ten measurements.

Porosity and real density: The total porosity (P, %) of the porous formulations was calculated according to equation (1):

$$P = \left(1 - \frac{\rho_{\text{apparent}}}{\rho_{\text{solid}}}\right) \times 100 \quad (1)$$

where ρ_{apparent} (g/cm³) is the apparent density (calculated as the ratio between the mass and the volume of each sample), and ρ_{solid} (g/cm³) is the true density measured by helium pycnometry (Accupyc 1330 Micromeritics).

Volumetric expansion: Dry samples of 2 cm x 2 cm (nominal) were immersed in 3 mL of water at 37 °C for 24 h. The dimension of the samples were determined before and after immersion. Width and length were measured with a vernier caliper (Mitutoyo) and thickness was measured using a dial thickness gage (Mitutoyo). The volume of dry sample (V_d) or after its immersion in water (V_w) was calculated using the measured dimensions. The degree of volumetric expansion (E, expressed as percentage of the dry volume) was then calculated according to equation (2):

$$E = \frac{(V_w - V_d)}{V_d} \times 100 \quad (2)$$

3.1.3.3.2. *Mechanical properties*

Tensile stress relaxation test: Tensile stress relaxation tests were performed in an ElectroPuls E1000 tester (Instron Corporation). Samples of 2 cm x 1 cm were previously swollen in phosphate buffered saline (PBS) and then installed on grips immersed in PBS at room temperature. The initial distance between grips was set as 10 mm (0% strain value). The relaxation test consisted of 5% strain stretching cycles at a speed of 0.05 mm/s followed by 1200 s of relaxation under constant strain to take into account the viscoelastic behaviour of the material and obtain a steady value for the load (i.e. residual load, at equilibrium stress). This procedure was repeated 10 times (ramps) for a total of 50% (nominal) strain of the sample (5% deformation/ramp). Induced force was recorded as a function of time by using a 5 N load cell (Instron Corporation) and the stress (nominal) was calculated by taking into account the sample's (nominal) cross section and the residual load. Stress-strain curve fitting was performed using equation (3), which describes the typical concave-upward shape of stress-strain data from tensile

tests of soft tissues (Lee, 2006):

$$\sigma = \frac{1}{\beta} (C e^{\beta \varepsilon} - \gamma) \quad (3)$$

where σ is the stress value, ε is the strain, and C , β , and γ are empirical constants. The elastic moduli of the scaffolds were calculated using the first derivative of the stress-strain curve at 30% and 50% strain.

Unconfined compression stress relaxation test: The relaxation behavior of scaffolds in unconfined compression conditions was assessed by using a 1.47 N or 7 N load cell (Mach 1, Biomomentum), for porous or dense formulations, respectively, in a bath of PBS. Samples (nominal diameter of 10 mm) were previously swollen in PBS and their diameter was determined using a laser micrometer (Lasermike 183-04, Techmet). After determining the wet samples initial thickness, the samples were compressed up to 50% of the original thickness with a velocity of 0.05 mm/s. Five ramps of 10 % deformation were applied. The relaxation time at each ramp was 2000 s for non-porous samples and 5000 s for porous samples. Stress-strain curve fitting was performed using equation (3). Analogously to tensile relaxation test, elastic moduli were calculated using the first derivative of the stress-strain curve at 30% and 50% strain.

3.1.3.3.3. *Behavior in physiological environment*

Water contact angle: The wettability of the scaffolds was analyzed by depositing a 2 μ L drop of water on the surface of the biomaterials and measuring immediately the static contact angle using a VCA-2500 XE™ contact angle apparatus (AST products Inc.). Ten replicates were performed for each formulation.

Liquid uptake and mass loss: The behavior of the membranes in water and PBS regarding liquid uptake capacity and mass loss was analyzed by gravimetry, according to the procedures described by Souza *et al.* (2017). PBS presents pH similar to that of the human blood and better mimics physiological environment.

The performance of the scaffolds exposed to culture medium in the absence of cells was also analyzed regarding both solution uptake and matrix stability. The culture medium used was DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific). The procedure was also based on the protocol described by Souza *et al.* (2017). However, in this case, sterile samples of 15 mm diameter were immersed in 3 mL of culture medium in a 12-well

plate.

Thrombogenicity: The evaluation of the formation of thrombi when human blood is in contact with the surface of the scaffolds was based on the procedure described by Montaña-Machado *et al.* (2015), in which the free hemoglobin methodology was used. Initially, CaCl₂ (1.29% w/v) was added to citrated blood (20% in relation to the volume of donor blood) to start the coagulation process. Immediately after the addition of CaCl₂, 80 µL of blood were added to the center of the surface of each circular sample (14 mm diameter) in a 24-well plate. The surface of cell culture polystyrene plates was used as positive control for thrombus formation, whereas Teflon[®] and glass surfaces were used as negative controls. The samples were then incubated at 37 °C for 60 minutes. After that, 2 mL of distilled water were added to each surface. Red blood cells not entrapped in a thrombus were hemolyzed and free hemoglobin molecules in the water were colorimetrically measured by monitoring the absorbance at 540 nm using a spectrophotometer ELISA reader µQuantTM (BioTek Instruments Inc.). The assay was performed in quadruplicate and independent experiments were performed with blood from three different donors.

***In vitro* biodegradation:** The *in vitro* lysozyme degradation of scaffolds was analyzed following the procedure described by Freier *et al.* (2005) with slight modifications. The assay was performed with samples of 1 cm x 1 cm with known dry weights in 1.5 mL of lysozyme (chicken egg white, L3790, Sigma-Aldrich) solution in PBS (1.5 µg/mL). This concentration of lysozyme was chosen to correspond to the concentration in human serum. Briefly, sterile samples were incubated in the lysozyme solution in conditions that simulate physiological environment (pH 7.4, 37 °C) under mechanical agitation in a shaker plate (100 rpm). After 5, 10 and 25 days, the samples were removed from the medium, rinsed with distilled water, dried and weighed. Solutions were changed at day 5 and 10. *In vitro* biodegradation was calculated as percentage of weight loss of the dried films after lysozyme treatment. Discrimination between enzymatic degradation and dissolution was assessed by incubating control samples in PBS without lysozyme throughout the same period. The assay was performed in triplicate for each condition.

Indirect cytotoxicity assessed with HDF cells (fibroblasts): The indirect *in vitro* toxicity of the scaffolds was assessed by exposing primary human dermal fibroblasts (HDF cells, ATCC) to extracts of the materials and subsequently determining cell viability with resazurin

sodium salt. The HDF cells were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich), with 4500 mg/L glucose, in the presence of 10% FBS (Gibco), and 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich). To prepare the scaffold extracts, the samples were first soaked with culture medium for 24 h and then the medium was replaced at a proportion of 0.01 g of dry material per mL of medium and the scaffolds were incubated for further 24 h (37°C, 5% CO₂, humidified atmosphere).

The HDFs were seeded in a 96-well plate at a density of 31.2×10^3 cells/cm² and cultured for 24 h to allow cell adhesion. The cells were washed once with PBS and incubated with 100 µL of the extracts for 24 h (37°C, 5% CO₂, humidified atmosphere). After the incubation period, the cells were washed twice with PBS and 150 µL of resazurin (Sigma-Aldrich) solution (250 mg/L in PBS, diluted in standard culture medium at 10% v/v) was added. The cells were again incubated for 4 h. Cells exposed to the standard culture medium for 24 h were used as negative control and those exposed to 1% (v/v) Triton[®] X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS for 5 min were used as a positive control of toxicity. After the incubation, 100 µL samples of each well was collected and transferred to another 96-well plate. The fluorescence, resulting from the reduction of resazurin to resorufin by the cells, was determined at 544 nm excitation and 590 nm emission using a spectrophotometer (SpectraMax i3x, Molecular Probes). Results are expressed setting the fluorescence of the negative control as 100% viability. The cultures were also observed under phase-contrast microscope (BX-50, Olympus) and photographed for analysis of the morphology, adhesion and confluence.

In addition, cell proliferation was analyzed using the trypan blue (Bio-Rad, Hercules) exclusion method. After 24 h of exposure to the scaffolds extracts, the medium was collected and reserved to include the non-adherent cell fraction. The HDF cells were washed with PBS, trypsinized (0.25% trypsin/0.01% EDTA, Gibco, Waltham) and dissociated for counting. The concentrations of viable and dead cells were assessed by counting with a Neubauer chamber under a phase-contrast microscope (BX-50, Olympus). At least two independent experiments were performed for each scaffold formulation, with 8 replicates each.

ADSC culture on the scaffolds - LDH assay: Stem cells derived from adipose tissue (ADSC) were seeded on scaffolds of 8 mm diameter in a 48-well plate at an approximate density of 15000 cells/cm². High glucose-DMEM culture medium (HyClone[™], GE) supplemented with 10% (v/v) FBS and 1% (v/v) Pen/Strep (Sigma-Aldrich) was used. The lactate dehydrogenase (LDH) assay was performed after 1 day of culture to evaluate the toxicity of the scaffolds

towards the cells. LDH is a stable cytoplasmic enzyme present in all cells. It is rapidly released into the cell culture supernatant upon damage of the plasma membrane. Thus, the number of dead cells is proportional to the amount of enzyme detected in the cell culture supernatant (Weyermann *et al.*, 2005). After 24 h of culture incubation at 37 °C under 5% CO₂, 100 µL/well of media aliquots were collected. The LDH concentration in these aliquots was assayed using a commercial kit (item 601170, Cayman Chemical) based on the analysis at 490 nm of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) reduction in the presence of lactate by LDH according to the manufacturer's protocol, using a plate reader (BMG LabTechFluostar Omega). Positive controls were performed with Triton X-100 (10% in volume in relation to culture media in the wells) and set as the maximum LDH release. Negative controls corresponded to wells containing only cells (without scaffolds), being set as spontaneous LDH release. The normalized LDH release was calculated as the ratio between LDH release of samples and the spontaneous release.

3.1.3.4. *Statistical analysis*

The results obtained were analyzed using the Tukey test to determine statistically significant differences among averages at 95% confidence limits with the Software Statistica 7.0.

3.1.4. *Results and discussion*

3.1.4.1. *Morphological aspects*

The morphology of the scaffolds is shown in Figure 3.2. For all formulations, polymer fibers along the structure and lamellar cross sections and coherent matrices are observed. The fibers are formed during polymer complexation (Bueno and Moraes, 2011), while the lamellar structure results from the multiple organization steps of the polymer chains, probably as a consequence of the spacing between complexes resulting from the hydrophobic interactions (Souza *et al.*, 2016). The introduction of the surfactant Kolliphor[®] P188 substantially changed the morphological aspect of the scaffolds (Figure 3.2 - G-R), which turned spongy and opaque, with stable pores showing homogeneous spatial distribution. Foam formation is a consequence of the high hydrophilic-lipophilic balance value (HLB = 29) (Bueno and Moraes, 2011). The stability of the foam during the PEC drying step is attributed to interactions of the polar portion of the surfactant molecule with water and the polysaccharides and the non-polar chain interactions with the air trapped inside the structure, allowing maintenance of the integrity of the structure while

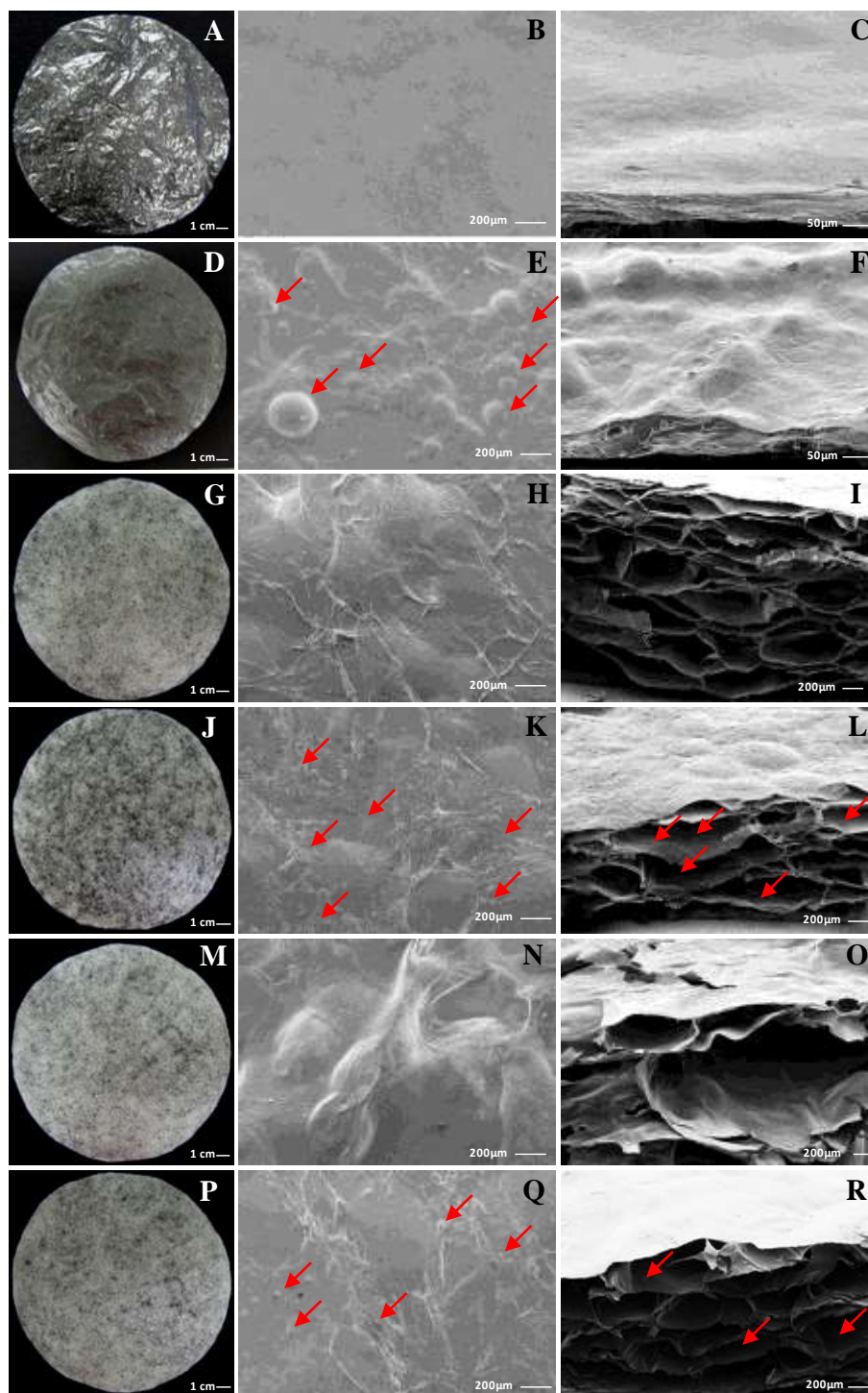


Figure 3.2: Typical visual aspect (first column), surface morphology (middle column) and cross section morphology (third column) of Ch-X (A-C), Ch-X-S (D-F), Ch-X-K10 (G-I), Ch-X-S-K10 (J-L), Ch-X-K25 (M-O) and Ch-X-S-K25 (P-R) formulations. Red arrows indicate the presence of silicone droplets in S-containing formulations.

water evaporates from the matrix (Bueno and Moraes, 2011). Bueno and Moraes (2011) and Bueno *et al.* (2014) obtained similar structures for chitosan-alginate matrices prepared in the presence of the same surfactant. Bellini *et al.* (2012) and Westin *et al.* (2017) produced chitosan-xanthan porous matrices using higher proportions of the same compound (75% and 37.5% w/w, respectively) and similar structures were also observed. The micrographs of porous formulations show the presence of alveolar structures, with pore sizes ranging from approximately 733 to 1050 μm , depending on the scaffold type. Formulations prepared with higher amount of surfactant (Ch-X-K25) presented larger pores when compared to the correspondent formulation with less amount of K (Table 3.1).

Table 3.1: Pore size, thickness of dry samples and samples swollen with water and DMEM, and roughness parameters for chitosan-xanthan (Ch-X) scaffolds produced in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K).

Formulation	Pore size (μm)	Thickness (mm)			Roughness (μm)	
		Dry	Water	DMEM	Ra	Rq
Ch-X	-	0.23 ± 0.02^a	2.77 ± 0.32^a	0.38 ± 0.05^a	$4.9 \pm 1.1^{a,c,d}$	$6.2 \pm 1.4^{a,c,d}$
Ch-X-S	-	0.21 ± 0.02^a	3.59 ± 0.23^b	0.49 ± 0.06^a	3.7 ± 1.2^d	4.6 ± 1.6^a
Ch-X-K10	733 ± 186^a	1.71 ± 0.25^b	3.80 ± 0.35^b	$2.67 \pm 0.12^{b,c}$	$6.7 \pm 2.2^{c,e}$	$8.2 \pm 2.6^{c,d,e}$
Ch-X-S-K10	752 ± 297^a	2.46 ± 0.11^c	5.55 ± 0.30^c	2.89 ± 0.32^b	$6.0 \pm 1.4^{a,c,d,f}$	$7.4 \pm 1.8^{a,d}$
Ch-X-K25	$1050 \pm 245^{b,c}$	1.79 ± 0.18^b	2.83 ± 0.44^a	$2.62 \pm 0.39^{b,c}$	$8.5 \pm 2.3^{b,e,f}$	$10.8 \pm 3.3^{b,e}$
Ch-X-S-K25	$816 \pm 167^{a,c}$	2.24 ± 0.11^c	3.39 ± 0.21^b	2.39 ± 0.23^c	$7.0 \pm 2.6^{b,c}$	$8.9 \pm 3.2^{d,e}$

Different letters in the same column indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

The visual aspect of dense scaffolds was altered after the addition of Silpuran[®] 2130 A/B (Figure 3.2 A, D, G, J, M, P), but porous formulations did not change significantly in comparison to the correspondent formulations without silicone. However, the micrographs show the presence of small droplets of the elastomer dispersed in the matrix of all Silpuran[®] 2130 A/B-containing formulations (red arrows in Figure 3.2 indicate the location of some of these droplets to illustrate previous statement).

The presence of these silicone droplets was also observed by Pires and Moraes (2015), who added Silpuran[®] 2130 A/B to chitosan-alginate matrices. The authors attributed the occurrence of the droplets to the high viscosity and the hydrophobic nature of the silicone. These

droplets are much smaller in the formulations prepared with Kolliphor[®] P188 (Figure 3.2 – K, Q) than in the formulation prepared without the surfactant (Figure 3.2 – E), possibly because the surfactant promoted a better dispersion of the hydrophobic silicone compound throughout the matrix.

The thickness of dry samples and after immersion in water and culture medium are shown in Table 3.1. Dry scaffolds prepared with the surfactant are approximately 7.5 or 11 times thicker than dense scaffolds, when comparing formulations without and with Silpuran[®] 2130 A/B, respectively. This result was expected, since more air was incorporated into the scaffold structure when the surfactant was present in the polymeric mixture. Besides, matrices containing silicone are thicker due to the small droplets present in their structure. The scaffolds swell after immersion in water or culture medium. In water, average thickness increases 12 to 17 times for dense formulations and 1.5 to 2.3 times for porous formulations. However, when in culture medium, they all increase in the range of 1.1 to 2.4 times in comparison to dry samples. The analysis of thickness adequacy of the scaffolds is important to determine if the material will be suitable for a specific application in tissue engineering. For instance, skin substitutes should ideally be thinner than the human dermis (Ma *et al.*, 2001), whose thickness varies from 0.5 up to 2 mm depending on age, sex and body region where the biomaterial is to be applied.

For human cartilage joint substitution, on the other hand, values in the range of 0.35 to 6.25 mm and 0.89 to 5.94 mm, respectively, for tibia and patella may be appropriate (Ateshian *et al.*, 1991). Considering this examples, it can be assumed that all formulations tested in the present work could be suitable for application in soft tissue engineering.

Surface roughness of the scaffolds is another important property to be determined, as it directly influences *in vitro* and *in vivo* cellular morphology, proliferation and phenotype expression. Moreover, cell differentiation is stimulated when they grow in microrough surfaces instead of smooth ones (Chang and Wang, 2011). Roughness values of the dense and porous scaffolds are shown in Table 3.1. According to Gadelmawla *et al.* (2002), the parameter Rq is more sensitive than Ra when deviation from the mean line is large, which is the case in this study. Thus, Rq will be considered as the representative value for scaffolds roughness. Microscale surface roughness can be defined by irregularities from 1 to 100 μm (Bacakova *et al.*, 2011), which include the values obtained for all types of scaffolds in the present study (average Rq ranging from 4.63 to 10.75 μm). Surface roughness of formulations prepared in the presence

of 25% of Kolliphor® P188 is significantly greater than roughness of formulations free of the surfactant. However, no difference was observed between formulations produced with 10% of the surfactant or prepared without the additive. Moreover, the presence of silicone did not alter surface roughness, despite the presence of S droplets in these formulations. Surface micro-roughness influence on cell behavior is actually controversial, since it can hamper cell spreading and proliferation, but enhances cell differentiation, e.g. for osteogenic cells (Bacakova *et al.*, 2011). Thus, this property should be carefully analyzed when the scaffold is considered for a specific application.

Scaffold porosity for formulations prepared with Kolliphor® P188 is shown in Table 3.2. Adequate porosity of the biomaterial is important for key processes of nutrient supply to cells, metabolite removal, local pH stability and cell signaling. Both pore size and matrix porosity affect cell infiltration and host tissue ingrowth (Chang and Wang, 2011). In the present study, Ch-X porous scaffolds presented high porosity, from approximately 72 to 85%. As expected, the presence of Silpuran® 2130 A/B in the structure of porous scaffolds slightly reduced their porosity. Silicones present anti-foam property, which affect mixture stability. Westin *et al.* (2017) produced porous Ch-X matrices using a higher fraction of surfactant in the mixture and obtained materials with similar porosity (89.7%), considered adequate for cell accommodation and nutrient transport.

Table 3.2: Porosity, true density and tridimensional expansion for chitosan-xanthan (Ch-X) scaffolds produced in the presence or not of the additives Silpuran® 2130 A/B (S) and Kolliphor® P188 (K).

Formulation	Porosity (%)	True density (g/cm ³)	Volumetric expansion (%)
Ch-X	-	2.007 ± 0.017 ^a	1380.2 ± 108.7 ^a
Ch-X-S	-	1.956 ± 0.013 ^a	2234.1 ± 275.9 ^a
Ch-X-K10	84.9 ± 1.2 ^a	0.281 ± 0.015 ^b	151.1 ± 24.3 ^b
Ch-X-S-K10	71.8 ± 1.1 ^b	0.252 ± 0.002 ^b	136.7 ± 34.5 ^b
Ch-X-K25	84.7 ± 0.6 ^a	0.435 ± 0.003 ^b	76.4 ± 9.5 ^c
Ch-X-S-K25	80.3 ± 0.7 ^c	0.331 ± 0.003 ^b	70.2 ± 5.9 ^c

Different letters in the same column indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

As also expected, the results of true density determined by helium gas picnometry show that formulations prepared in the presence of Kolliphor® P188 are less dense than matrices without this additive (Table 3.2). In addition, according to the Silpuran® 2130 A/B manufacturer (Wacker Chemie AG), the density of both components of this compound is equal to 0.97 g/cm³, therefore, its addition would probably reduce the overall density of the membranes containing it.

Volumetric expansion is an important property to be considered for the *in vivo* final application of the scaffolds as it shows how the biomaterial will behave in the presence of different media regarding its swelling and tridimensional rearrangement after liquid uptake. The volumetric expansion of the tested materials seems to be closely related to its porosity, as shown in Table 3.2. Dense formulations presented higher volumetric expansion than porous formulations, which is a result of higher thickness increase after immersion of dense formulations in water (12 to 17 times against 1.5 to 2.3 times for porous formulations, as shown in Table 3.1) and also higher diameter (or width) increase at the same condition.

According to Ratner (2013), there are three different forms in which water can be entrained in gels: free water, tightly-bound water and intermediate water (with properties of free and bound molecule). Thus, the water molecules that enter the scaffolds could be found in different regions inside the matrix, bound directly to the polymer molecules in the matrix structure (hydrogen bonds), as well as stay between the lamellae and inside the pores. In dense formulations, water remains between lamellae, increasing polymer chains separation.

3.1.4.2. *Mechanical properties*

The addition of the silicone compound Silpuran® 2130 A/B to Ch-X matrices was performed as a strategy to improve the mechanical properties of porous scaffolds. Although the presence of pores is essential to facilitate nutrient and oxygen deliver as well as to enable more effective cell ingrowth, the large amount of void volume of highly porous scaffolds negatively affects their mechanical properties (Loh and Choong, 2013).

The mechanical behavior of the scaffolds was assessed with stress-relaxation tests of samples submitted to both compressive and tensile loads, as the material response depends on the direction to which the load is applied. Most biological tissue materials present mechanical anisotropy, which means that they have varying properties in different orientations (Lee, 2006). Soft tissues behave anisotropically because their fibers of collagen and elastin, main constituents

of this type of tissue, tend to be oriented in preferential directions (Holzapfel, 2000). Moreover, as a consequence of their highly hydrated structures, both soft and hard biological tissues present viscoelastic behavior, which in soft tissues is associated to shear interaction of collagen with the gelatinous matrix of proteoglycans that constitute the tissue (Lee, 2006; Bueno and Moraes, 2011). The viscoelastic properties of tissues promotes an environment which is critical for cell viability and function, thus it is important that prepared scaffolds have compatible behavior (Ratakonda *et al.*, 2012). Viscoelasticity is manifest in a variety of time-dependent mechanical features, including stress relaxation (decay of stress under constant strain) (Lee, 2006).

The stress-strain curves obtained for Ch-X formulations are shown in Figure 3.3. The mechanical behavior of the scaffolds is compatible to that of soft tissues as they typically present nonlinear load-deformation curves, with concave upward shape (Lee, 2006). The experimental data was satisfactorily fitted to equation (3) and the fitting parameters are shown in Appendix I.

The addition of Silpuran[®] 2130 A/B to the polysaccharide matrices improved their mechanical properties, as formulations containing the silicone are stiffer when compared to the respective formulations prepared in the absence of the additive. Pires and Moraes (2015) attributed the improvement of the mechanical properties of chitosan-alginate matrices containing Silpuran[®] 2130 A/B to the binding of platinum groups present in the silicone compound to amino groups of chitosan.

The calculated elastic moduli in compression and in tension are shown in Table 3.3. In the physiological environment, different types of biological tissues are submitted to varying strains, depending on the functions that they exert. Coronary arteries, for instance, undergo circumferential wall strains in the range of 10 and 15%, whereas longitudinal strains are higher because of the large deformations of the pumping heart (Bouten *et al.*, 2011). In this work, strains of 30% and 50% were chosen to illustrate the calculated elastic modulus. The elastic modulus is, in all cases, higher for formulations containing the silicone when compared to the respective formulations prepared without the additive. This increase in the moduli ranged from 10% to 150% in compression (maximum for Ch-X-S-K25) and from 5% to 85% in tension (maximum for Ch-X-S-K10), being more pronounced at 50% strain.

Despite the increase of the moduli with the addition of silicone to the scaffolds structures, porous formulations continue to present lower elastic moduli than dense formulations,

and the more the amount of surfactant used to prepare the scaffolds, the lower their elastic modulus.

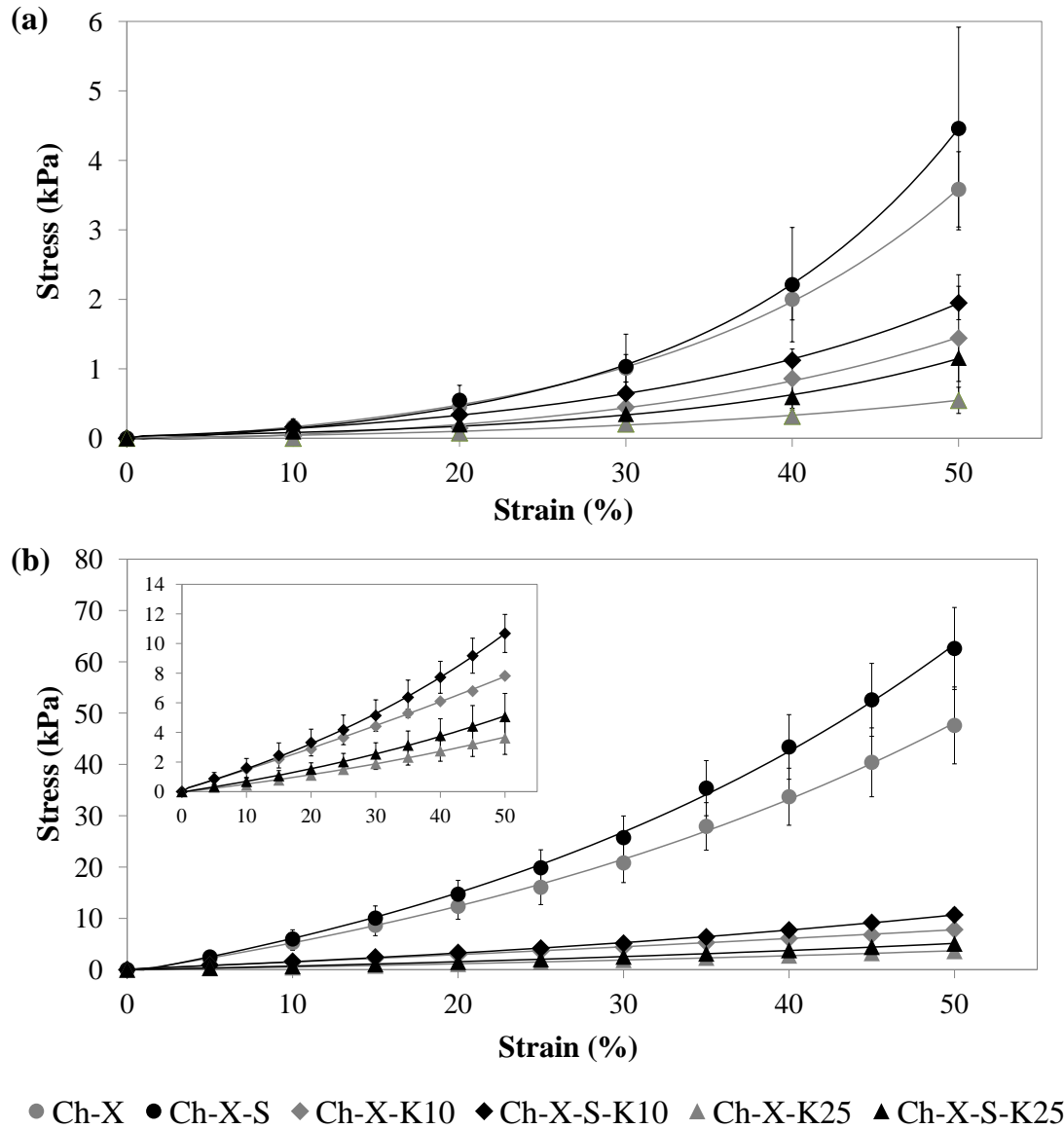


Figure 3.3: Stress-strain curves for chitosan-xanthan (Ch-X) scaffolds produced in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) submitted to compressive (a) or tensile (b) loads. The detail in (b) zooms in curves of the formulations prepared with the surfactant K. Experimental data are shown with markers and the solid lines represent the fitted curves obtained using equation (3).

Table 3.3: Elastic moduli of chitosan-xanthan (Ch-X) scaffolds produced in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) in compression and in tension calculated at strains of 30 and 50%.

Formulation	Elastic Modulus (kPa)			
	Compression		Tension	
	30% strain	50% strain	30% strain	50% strain
Ch-X	7.08	21.05	103.00	167.87
Ch-X-S	8.22	30.52	135.82	239.40
Ch-X-K10	3.02	7.91	15.70	17.49
Ch-X-S-K10	3.89	10.07	22.30	32.36
Ch-X-K25	1.11	2.69	7.82	10.36
Ch-X-S-K25	2.14	6.89	10.86	15.07

3.1.4.3. *Behavior of scaffolds in physiological environment*

The evaluation of dense and porous Ch-X scaffolds regarding water contact angle, liquid uptake capacity and stability in aqueous media, thrombogenicity, biodegradation and cytotoxicity to fibroblasts, osteoblasts and stem cells derived from adipose tissue was performed. The analysis of these properties allows us to infer on how the materials would behave and what response would be triggered by them in an *in vivo* application.

The water contact angle is related to surface wettability. Contact angles smaller than 90° correspond to high wettability, whereas higher contact angles (>90°) indicate low wettability. Thus, the lower the contact angle, the more hydrophilic the surface is (Chang and Wang, 2011). This property governs cell response when in contact with a material's surface, since adhesion of cells is mediated by proteins that spontaneously adsorb to the material. These proteins can be provenient from the culture media, blood or be deposited by the cells themselves. If the material's surface is too hydrophobic, these proteins adsorb in a denatured and rigid state and, as consequence, they are not able to bind cell adhesion receptors (e.g., integrins). On the other hand, on hydrophilic surfaces, these molecules adsorb in a more flexible form and then the cells can reorganize them to provide access to adhesion receptors (Bacakova *et al.*, 2011). The water contact angle of dense and porous Ch-X scaffolds surfaces are presented in Table 3.4. The

contact angles are higher for formulations produced in the absence of Kolliphor[®] P188 than for formulations obtained in its presence. This behavior may be attributed to residual additive that possibly remained in the matrix structure even after profusely washing the scaffolds. The ether groups of Poloxamer 188 increase dipole-dipole interactions with water and consequently reduce the contact angle (Pinto *et al.*, 2010). Westin *et al.* (2017) detected residual Poloxamer 188 in Ch-X matrices produced using higher fractions of the surfactant following matrix washing step. Since water contact angles are superior to 90 degrees for Ch-X and Ch-X-S, these formulations have more hydrophobic character than the others.

Silicone compounds are expected to increase the surface hydrophobicity of a material, since their Si-CH₃ groups are directed outwards the structure (Brachaczek, 2014). The water contact angle of scaffolds containing Silpuran[®] 2130 A/B was increased in relation to materials without this additive, but the increase was not statistically relevant. Probably, the polymer layer covering the silicone droplet is interacting with the methyl groups of the compound, so they are not fully accessible on the materials' surface.

The uptake capacity and mass loss of scaffolds in different aqueous media are shown in Table 3.4. High water, PBS and DMEM uptake capacity is observed for all formulations. Dense formulations, Ch-X and Ch-X-S, presented the highest water uptake capacity (approximately 63 and 50 g_{water}/g_{scaffold}, respectively). This result corroborates with the higher volumetric expansion observed for dense formulations when compared to porous formulations, as shown in Table 3.2. They also showed higher capacity of water uptake than of PBS or DMEM uptake (around 3 and 4.6 g_{water}/g_{scaffold}, respectively). The ions present in the complex media tested (PBS and culture medium) can shield the free charges existing in the Ch or X chains, reducing electrostatic repulsion between the polymers and originating a more compacted structure, in which water penetration is hampered. Moreover, the osmotic potential is reduced, which leads to a decrease in the flux of water to the matrix (Souza *et al.*, 2017; Bueno *et al.*, 2014). Porous formulations can uptake similar amounts of water, PBS or DMEM. Besides, they can absorb higher proportions of complex media than dense formulations.

Souza *et al.* (2017) obtained Ch-X dense matrices with water uptake capacity of 58 g_{water}/g_{matrix}. The authors stated that the branched structure of xanthan gum is responsible for the retention of higher amount of water when compared to the other formulations studied, in which the polymer complexed to chitosan had linear chain. Bellini *et al.* (2012) produced dense

and porous Ch-X matrices in the presence of higher amount of the surfactant. Higher water uptake capacity for Ch-X dense formulations ($85.6 \text{ g}_{\text{water}}/\text{g}_{\text{matrix}}$) and higher uptake of complex media ($24.6 \text{ g}_{0.9\% \text{NaCl}}/\text{g}_{\text{matrix}}$ and $15.8 \text{ g}_{\text{simulated body fluid}}/\text{g}_{\text{matrix}}$) were observed. For porous formulations, the uptake capacity of all media was also higher than the values obtained herein ($29.8 \text{ g}_{\text{water}}/\text{g}_{\text{matrix}}$, $17.1 \text{ g}_{0.9\% \text{NaCl}}/\text{g}_{\text{matrix}}$ and $18 \text{ g}_{\text{simulated body fluid}}/\text{g}_{\text{matrix}}$). The results observed by the authors probably differs from the results presented in this work as consequence of the different proportion of surfactant used for material fabrication, as well as of the different properties of chitosan and xanthan used (molecular weight, deacetylation degree of Ch, pyruvic acid content in X, etc.). Westin *et al.* (2017) also produced Ch-X porous matrices and reported culture medium uptake capacity of $13.2 \text{ g}/\text{g}_{\text{matrix}}$, which is similar to the value presented in this study.

Table 3.4: Water contact angle (WCA), liquid uptake capacity and mass loss of chitosan-xanthan (Ch-X) scaffolds produced in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K), exposed to different aqueous solutions.

Formulation	WCA (degrees)	Liquid uptake (g/g)			Mass loss (%)		
		Water	PBS	DMEM	Water	PBS	DMEM
Ch-X	109.3 ± 12.6^a	62.7 ± 1.3^A	$2.9 \pm 0.1^{a,B}$	$4.7 \pm 0.1^{a,C}$	$28.8 \pm 2.6^{a,A}$	$19.4 \pm 1.6^{a,B}$	$17.3 \pm 0.3^{a,B}$
Ch-X-S	121.7 ± 7.0^a	$49.7 \pm 1.3^{b,A}$	$3.0 \pm 0.1^{a,B}$	$4.6 \pm 0.3^{a,C}$	$27.5 \pm 1.3^{a,A}$	$15.2 \pm 3.4^{a,B}$	$12.7 \pm 2.8^{a,B}$
Ch-X-K10	68.6 ± 10.2^b	$16.7 \pm 1.9^{c,A}$	$10.5 \pm 0.3^{b,B}$	$12.2 \pm 1.1^{b,B}$	$11.7 \pm 1.3^{b,A}$	$17.5 \pm 1.1^{a,B}$	$21.6 \pm 1.1^{b,c,C}$
Ch-X-S-K10	81.1 ± 8.0^b	$15.6 \pm 0.8^{c,A}$	$10.0 \pm 0.7^{b,B}$	$12.4 \pm 0.3^{b,C}$	$12.0 \pm 1.1^{b,A}$	$16.9 \pm 1.4^{a,B}$	$17.6 \pm 0.8^{a,b,B}$
Ch-X-K25	53.2 ± 12.5^c	$14.5 \pm 0.4^{c,A}$	$10.5 \pm 0.2^{b,B}$	$13.0 \pm 0.7^{b,C}$	$21.0 \pm 2.1^{c,A}$	$22.8 \pm 2.9^{a,A}$	$29.8 \pm 0.8^{d,B}$
Ch-X-S-K25	76.9 ± 13.3^b	$13.7 \pm 1.5^{c,A}$	$11.3 \pm 0.2^{b,B}$	$14.3 \pm 0.5^{b,A}$	$17.4 \pm 1.4^{c,A}$	$21.5 \pm 0.9^{a,B}$	$25.1 \pm 0.9^{c,d,C}$

Different letters in the same column or row indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test). Lowercase letters refer to the comparison of data in the same column and capital letters refer to comparison of data in the same row, for the same property.

Mass loss of scaffolds is shown in Table 3.4, and it corresponds to the stability of the matrices after immersion in different aqueous media during 7 days. The highest mass loss is observed for dense scaffolds exposed to water. Because these formulations presented high uptake capacity, the polymeric chains became more flexible due to the great amount of water in the structure, facilitating mass transfer and matrix erosion (Souza *et al.*, 2017). The highest mass loss in culture medium was attained for formulations prepared with 25% of surfactant (around 30%). According to Bellini *et al.* (2015), this level of degradation is acceptable, since the material

would remain stable long enough to allow new tissue formation, for instance in the case of obtaining skin substitutes.

Since scaffolds prepared with the surfactant at the proportion of 25% (w/w) presented less mechanical resistance and lower stability in culture medium, the formulations prepared with 10% (w/w) of K were selected for further characterization, regarding biodegradation with lysozyme, thrombogenicity and cytotoxicity tests.

The biodegradation of the scaffolds is another important property to be assessed. Once implanted, the biomaterial should present adequate rate of degradation to match the formation of the new tissue. The degradation and resorption kinetics of the scaffold depends on its physical properties and mass loss, as well as on the new tissue development rate (Zhang *et al.*, 2014). Lysozyme is a enzyme present in human body that degrades chitosan by hydrolyzing the $\beta(1-4)$ linkages between N-acetyl glucosamine and glucosamine groups according to the distribution of N-acetyl on polymer chain. Because this enzyme acts on N-acetyl glucosamine residues, the more deacetylated is the chitosan, the less it will be degraded by lysozyme (Han *et al.*, 2012). When degradation occurs, there is resorption of the scaffold and N-acetyl glucosamine, glucosamine and other oligomers (which are responsible for macrophages activation) are released and then incorporated into the ECM for the rebuilding of physiological normal tissues (Adekogbe and Ghanen, 2005).

The results of mass loss related to the incubation of scaffolds in PBS and PBS solution containing lysozyme are shown in Table 3.5. Significant difference of mass loss values are observed mostly when formulations with and without Silpuran[®] 2130 A/B are compared at 25 days, but the addition of lysozyme to the PBS solution did not result in improvements in the scaffolds degradation. This result can be related to the high degree of deacetylation of the chitosan used to produce the scaffolds in the present work (88%). Freier *et al.* (2005) evaluated the biodegradation by lysozyme of chitosan films with different deacetylation degrees using the same conditions employed in the present work. They observed more than 50% of mass loss for chitosan films with 30-70% deacetylation degree, however, degradation of films with very low or high acetylation was minimal for the period of the study (28 days).

Considering scaffolds for skin tissue engineering, for example, the degradation time of 25 days is adequate for healing an acute wound; however a degradation period of 8 weeks would be required for a scaffold to be suitable for the treatment of chronic wounds (Adekogbe

and Ghanen, 2005). For tendon and ligament, tissue repair times may vary from 3 to 12 months, depending on the age of the individual (Ratcliffe *et al.*, 2015). Thus, depending on the intended application, long degradation times, as obtained for the Ch-X scaffolds studied herein, is desirable.

Table 3.5: Lysozyme degradation of chitosan-xanthan (Ch-X) scaffolds produced in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) represented in terms of mass loss for 5, 10 and 25 days. Mass is loss in PBS is also shown as control for sample dissolution.

Formulation	Mass loss in PBS (%)			Mass loss in lysozyme solution (%)		
	5 days	10 days	25 days	5 days	10 days	25 days
Ch-X	21.8 ± 1.0 ^{a,A,C}	23.1 ± 0.6 ^{a,A,C}	29.4 ± 1.5 ^{a,B}	20.3 ± 1.9 ^{a,A}	25.0 ± 1.6 ^{a,C}	33.3 ± 1.0 ^{a,D}
Ch-X-S	15.4 ± 2.1 ^{b,A}	19.0 ± 1.0 ^{b,c,A,B}	22.7 ± 1.0 ^{b,B}	16.1 ± 2.1 ^{a,A}	19.7 ± 1.3 ^{b,A,B}	24.0 ± 3.1 ^{b,B}
Ch-X-K10	18.4 ± 1.4 ^{a,b,A}	23.1 ± 1.3 ^{a,A}	23.0 ± 3.3 ^{b,A}	19.8 ± 2.8 ^{a,A}	22.0 ± 1.4 ^{a,b,A}	25.0 ± 3.2 ^{b,A}
Ch-X-S-K10	18.4 ± 0.9 ^{a,b,A}	21.4 ± 1.3 ^{a,c,B}	17.0 ± 1.9 ^{c,A}	18.9 ± 0.5 ^{a,A,B}	21.8 ± 0.9 ^{a,b,B}	17.6 ± 0.2 ^{c,A}

Different letters in the same column or row indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test). Lowercase letters refer to the comparison of data in the same column and capital letters refer to comparison of data in the same row.

The thrombogenicity test was performed to evaluate the response of the scaffolds when in contact with blood, regarding the formation of blood clots. Depending on the desired application of the scaffold, this aspect of the material may be considered beneficial or not. In the case of devices designed to be applied as wound dressings, blood clotting is an advantage as the haemostatic character of the material would contribute to stop the bleeding and aid wound cicatrization. The formation of clots on scaffolds depends on their surface characteristics, including hydrophilicity/hydrophobicity and charge, which influence protein adsorption during the initial response to material–blood contact (Sperling *et al.*, 2009).

The results obtained for the thrombogenicity test are shown in Figure 3.4. Higher percentage of free hemoglobin indicates less thrombi formation, thus being the sample less thrombogenic. Teflon[®] was used as one of the controls as it is a common constituent of implantable biomaterials. All the materials tested presented lower values of free hemoglobin than Teflon[®], comparable to glass and higher than those observed for the polystyrene plate control.

This indicates that the studied materials would not present a performance as good as Teflon[®] regarding blood compatibility if implanted, however, they can still be considered hemocompatible. All formulations studied presented comparable thrombogenicity levels.

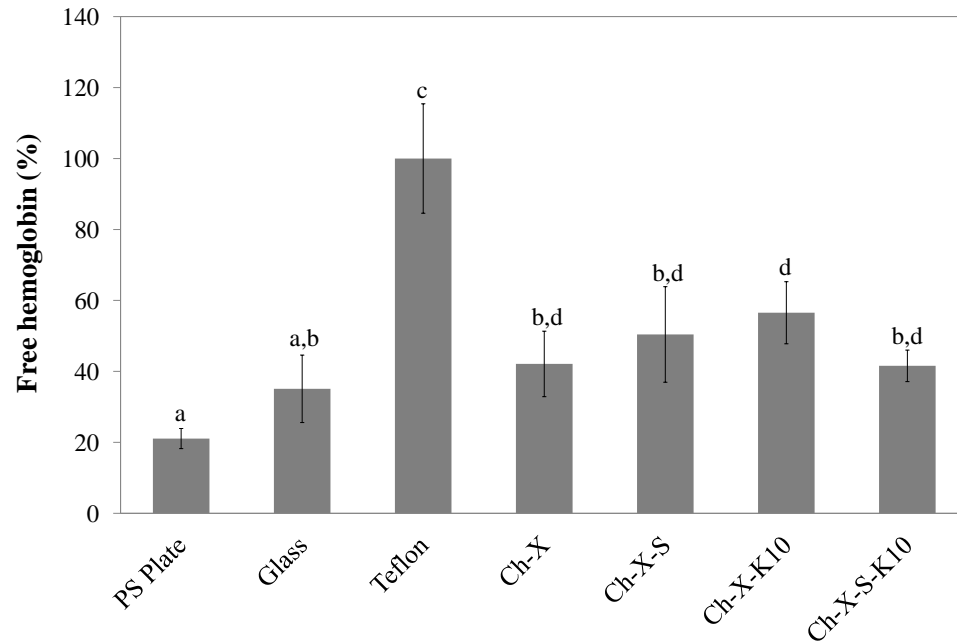


Figure 3.4: Thrombogenicity of chitosan-xanthan (Ch-X) scaffolds produced in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K), expressed as percentage of free hemoglobin. Glass, Teflon[®] and polystyrene plate were used as controls for the assay.

Cytotoxicity is one of the most important methods for biological evaluation and uses cells *in vitro* to assess the effect of medical devices on cell growth, proliferation and morphological aspects (Li *et al.* 2015). The toxicity of biodegradable scaffolds is mainly attributed to the release of degradation products, which can stimulate or inhibit cell metabolic activities. In this work, the chitosan-based scaffolds were conditioned in the cell culture medium for 24 h, forming an extract in which neither the presence of bacterial contamination nor visible modifications in the medium color were observed, indicating no sudden change of its physiological-like pH.

HDF were chosen as representatives of soft tissue cells in the present work. Fibroblasts are responsible for producing the extracellular matrix forming the connective tissue and play a crucial role during wound healing, being therefore indicated for biomaterials

cytotoxicity studies. To assess cell viability, resazurin sodium salt is often used to evaluate metabolic function and cellular health (O'Brien *et al.*, 2000). The results of the indirect cytotoxicity assay are shown in Figure 3.5.

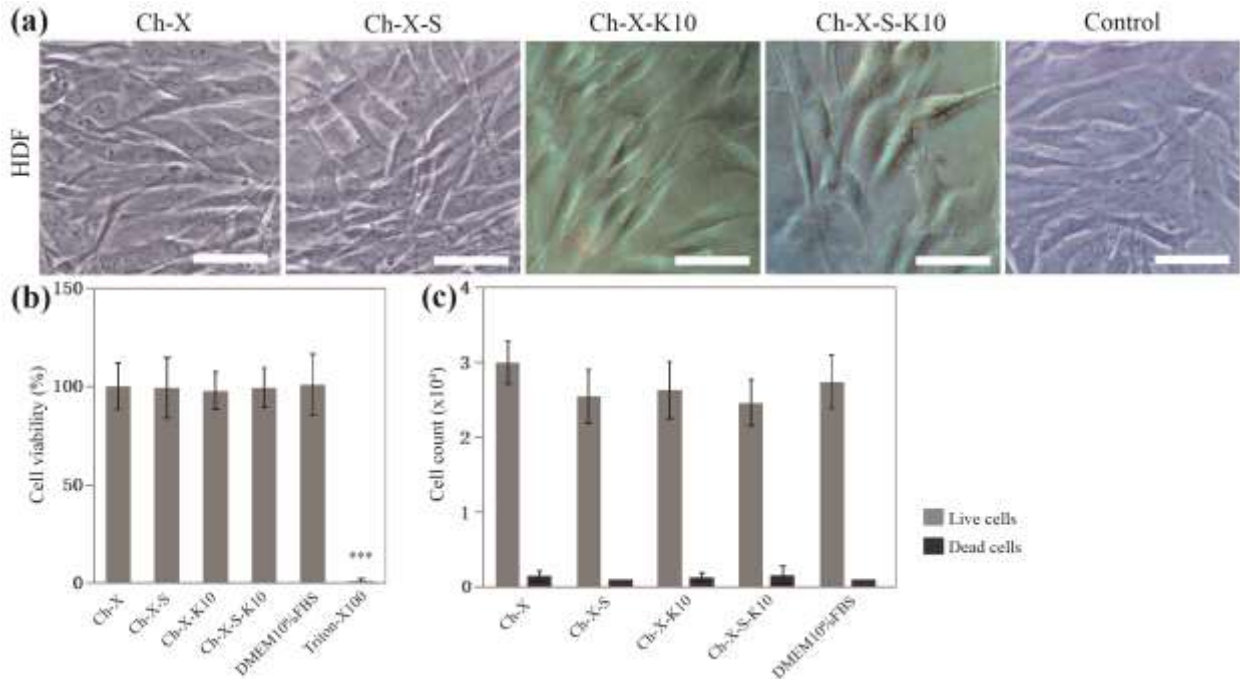


Figure 3.5: Indirect cytotoxicity of the scaffolds to HDF cells. Human fibroblasts morphology (a): The cells showed no alteration in their shape after treatment with Ch-based scaffolds when compared to control cultures that received only the standard medium for 24 h. Scale bar: 40 μ m. Viability assay (b): The graph demonstrates the maintenance of fibroblast viability, with no statistical difference when compared to the negative control. Cell culture with standard supplemented culture medium was used as negative control and with 1% (v/v) Triton® X-100 in PBS as positive control of toxicity. Cell proliferation in 24 h (c): No statistical difference was observed when comparing the number of live and dead cells in the samples experimental groups and in the control group.

HDF cultures exposed to Ch-X extract presented $103.2 \pm 12\%$ viability, followed by Ch-X-S treatment with $100.4 \pm 15.5\%$, Ch-X-K10 with $97.7 \pm 9.6\%$, and Ch-X-S-K10 with $101.5 \pm 9.9\%$, all similar to those of the negative control (DMEM supplemented with 10% FBS) with $106 \pm 15.4\%$ (Figure 3.5(b)). According to ISO 10993-5 (2009), the reduction of cell viability by

more than 30% is considered a cytotoxic effect, thus, no cytotoxicity to HDF cells was observed for any of the scaffold formulations. Phase-contrast optical microscopy did not show significant changes in fibroblasts morphology nor differences in cell monolayer confluence after exposure to the different scaffold formulations extracts. The HDF exhibited an elongated shape, similarly to the control, as shown in Figure 3.5(a). No significant increase in cells in suspension was observed, as demonstrated by the trypan blue exclusion assay. Trypan blue is a dye exclusion method that uses membrane integrity to identify dead and living cells (Altman *et al.*, 1993), well complementing the viability data determined by the resazurin assay. The number of live and dead cells observed after culture with standard media in the presence or absence of the different scaffold formulation extracts is shown in Figure 3.5(c).

Many studies in the literature report the evaluation of cytotoxicity of chitosan or chitosan associated with other materials to fibroblasts. Barton *et al.* (2012) did not observe any decrease in viability of human primary fibroblasts after 48 h of direct contact with chitosan adhesive strips. However, Grobler *et al.* (2016) studied the cytotoxic effect of chitosan with different deacetylation degrees to murine fibroblasts and stated that less cell survival rate is observed for polymer with lower deacetylation degree. The authors also observed different levels of cytotoxicity when different cell lines were used. Luna *et al.* (2011) showed that chitosan membranes with plasma surface modification increased the number of L929 murine fibroblasts after 7 and 14 days of cell culture on the membranes. The results reported in the present work indicate that the level of cytotoxicity due to the associations of chitosan with xanthan and other additives (silicone rubber and surfactant) appeared to be minimal to primary human fibroblasts.

The cytotoxicity of the scaffolds was also assessed after 1 day of ADSC culture on them by LDH assay. Multipotency of ADSC rendered them attractive for applications in tissue engineering, with several studies evidencing their ability of differentiation and formation of a range of tissue types (Simonacci *et al.*, 2017). The results are shown in Figure 3.6.

LDH is a cytoplasmic enzyme present in all cells and any damage in plasma membrane releases this compound to the surrounding medium. The spontaneous release of LDH was set as the normal enzyme level released by cells growing *in vitro*, with no contact with the scaffold samples. The maximum release of LDH was obtained when cells were exposed to Triton X-100. The normalized LDH release was calculated as the ratio between LDH release of samples and the spontaneous release (Figure 3.6). For this assay only porous formulations prepared with

the proportion of 10% of surfactant were tested. All formulations presented LDH release comparable to the spontaneous release and lower than the Triton-X control, meaning that the produced scaffolds are not cytotoxic to ADSC.

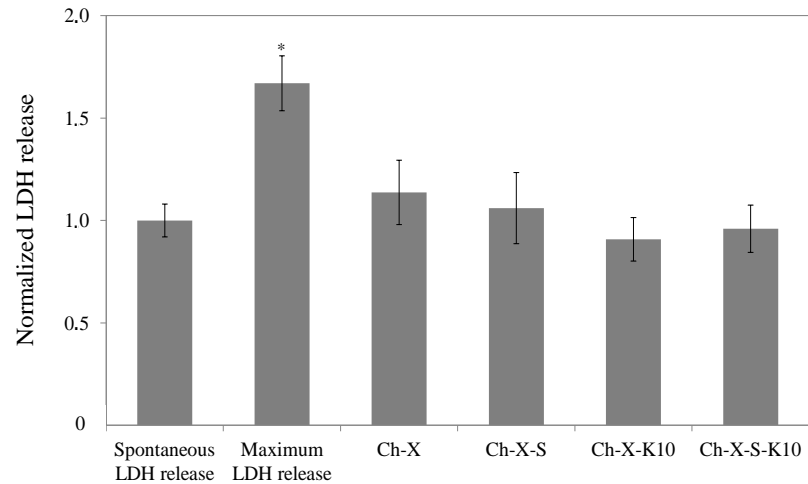


Figure 3.6: Cytotoxicity of chitosan-xanthan scaffolds produced in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) to ADSC after 24 h culture obtained with the LDH release assay. Spontaneous LDH release was set as the enzyme release by cells growing in the well plate, with no contact with the scaffold samples. Maximum LDH release was obtained when cells were exposed to Triton X-100. Normalized LDH release was calculated as the ratio between LDH release of samples and the spontaneous release. Significant statistical difference was observed between the maximum release and all the other experimental groups.

3.1.5. Conclusions

Dense and porous chitosan-xanthan scaffolds containing or not Silpuran[®] 2130 A/B were investigated in this work. Two different proportions of the surfactant Kolliphor[®] P188 were used (10 and 25% w/w), resulting in matrices with high porosity and large pore sizes. The less surfactant is added to the matrix, the better is its mechanical resistance. The silicone polymer Silpuran[®] 2130 A/B successfully improved the mechanical properties of Ch-X scaffolds, which is represented by the higher elastic moduli of silicone containing formulations, both under compressive or tensile loads. Moreover, the presence of Silpuran[®] 2130 A/B did not affect negatively the properties of the materials regarding important aspects related to their application

as scaffolds, such as porosity, liquid uptake capacity and stability, thrombogenicity and cytotoxicity.

In general, all formulations studied presented suitable physicochemical and biological properties for their application as scaffolds. These properties are tunable, by changing the proportion of Kolliphor® P188 and the presence of Silpuran® 2130 A/B in the matrices, and can be adjusted according to the intended application in tissue engineering.

3.1.6. Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support to this research from Coordination for the Improvement of Higher Educational Personnel (CAPES, Brazil), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil), the Emerging Leaders in America Program (ELAP, Canada) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Program). We also acknowledge Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria (Campinas, SP, Brazil) for performing the sterilization of scaffolds samples.

3.1.7. Appendix I: Curve fitting parameters

Table 3.6: Parameters obtained after fitting experimental stress-strain data to equation (3).

Formulation	Fitting parameters							
	β		C		γ		R ²	
	Compression	Tension	Compression	Tension	Compression	Tension	Compression	Tension
Ch-X	0.05450	0.02442	0.013800	0.4951	0.014840	0.5042	0.9998	0.9988
Ch-X-S	0.06557	0.02834	0.011500	0.5804	0.012820	0.5979	0.9981	0.9985
Ch-X-K10	0.04822	0.005385	0.007100	0.1336	0.009015	0.133	0.9938	0.9991
Ch-X-S-K10	0.04755	0.01861	0.009346	0.1276	0.008363	0.1249	0.9991	0.9993
Ch-X-K25	0.04417	0.01407	0.002951	0.05127	0.002670	0.05176	0.9902	0.9981
Ch-X-S-K25	0.05843	0.0164	0.003711	0.06637	0.001803	0.06673	0.9931	0.9994

3.2. PHOSPHORYLATION OF CHITOSAN TO IMPROVE OSTEOINDUCTION OF CHITOSAN/XANTHAN-BASED SCAFFOLDS FOR PERIOSTEAL TISSUE ENGINEERING §

Renata Francielle Bombaldi de Souza¹, Fernanda Carla Bombaldi de Souza¹, Andrea Thorpe², Diego Mantovani³, Ketul Popat² and Ângela Maria Moraes^{1*}

¹ Department of Engineering of Materials and of Bioprocesses, School of Chemical Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

² Department of Mechanical Engineering, School of Biomedical Engineering, Colorado State University (CSU), Fort Collins, CO, USA

³ Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Canada Research Chair I in Biomaterials and Bioengineering for the Innovation in Surgery, Department of Min-Met-Materials Engineering, Research Center of CHU de Quebec, Division of Regenerative Medicine, Laval University, Quebec, QC, Canada

*Correspondence to: Â. M. Moraes (E-mail: ammoraes@feq.unicamp.br)

3.2.1. Abstract

The periosteum is a membrane that surrounds bones, providing essential cellular and biological components for fracture healing and bone repair. Tissue engineered scaffolds able to function as periosteum substitutes can significantly improve bone regeneration in severely injured tissues. Efforts to develop more bioactive and tuneable periosteal substitutes are required to improve the success of this tissue engineering approach. In this work, a chemical modification was performed in chitosan, a polysaccharide with osteoconductive properties, by introducing phosphate groups to its structure. The phosphorylated polymer (Chp) was used to produce chitosan-xanthan-based scaffolds for periosteal tissue engineering. Porous and mechanically reinforced matrices were obtained with addition of the surfactant Kolliphor[®] P188 and the silicone rubber Silpuran[®] 2130A/B. Scaffolds properties, such as large pore sizes (850-1097 µm), micro-roughness and thickness (0.7-3.5 mm in culture medium), as well as low thrombogenicity compared to standard implantable materials, extended degradation time and negligible cytotoxicity, enable their application as periosteum substitutes. Moreover, the higher adsoption of bone morphogenetic protein mimic (cytochrome C) by Chp-based formulations suggests improved osteoinductivity of these materials, indicating that, when used *in vivo*, the material

§ Este artigo foi publicado com modificações na revista internacional indexada *International Journal of Biological Macromolecules* está sendo reproduzido com permissão da editora Elsevier / This paper was published with modifications in the journal *International Journal of Biological Macromolecules* and is herein reprinted with permission from Elsevier. Ref.: Souza, R.F.B.; Souza, F.C.B.; Thorpe, A.; Mantovani, D.; Popat, K.C.; Moraes, A.M. Phosphorylation of chitosan to improve osteoinduction of chitosan/xanthan-based scaffolds for periosteal tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 143, p. 619-632, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.004>

would be able to concentrate native BMPs and induce osteogenesis. The scaffolds produced were not toxic to cell lines relevant as periosteum substitutes such as HDF, Saos-2, ADSC and VEC cells however, cell adhesion and proliferation on the scaffolds surfaces can be still further improved.

KEYWORDS: chitosan, phosphorylation, xanthan, surfactant, silicone, tissue engineering, periosteum

3.2.2. Introduction

The periosteum is a dense and highly vascularized connective tissue membrane covering most of the bone surfaces, consisting of two distinct layers. The inner cambium layer contains osteoblasts and osteogenic progenitor cells, whereas the outer fibrous layer contains collagen fibers, fibroblasts and blood vessel networks. The periosteum provides essential cellular and biological components necessary for fracture healing and bone repair (Fan *et al.*, 2010; Dwek, 2010). Bone healing induced by periosteum is advantageous in comparison to treatments involving direct bone or bone-substitute transplantation, resulting in optimal bone integrity in the defect area, with appropriate vascularization and minimal ectopic ossification (Fan *et al.*, 2010).

The use of decellularized periosteum from alo or xenogenic origins, as well as of cell sheet technology is reported for periosteal tissue engineering (Syed-Picard *et al.*, 2014; Rapp *et al.*, 2012), and a few works also focus on the use of synthetic or natural polymers to produce biomaterials capable to replace the periosteum (Fan *et al.*, 2010; and Hoffman *et al.* 2013).

Good examples of polymers derived from biological sources frequently used in tissue engineering are those of the polysaccharide class, e.g. chitosan. This linear osteoconductive molecule is capable to enhance osteogenesis and angiogenic activity (Nassif and El Saban, 2011) and also to form polyelectrolyte complexes with negatively charged molecules such as alginate, pectin and xanthan gum. Combinations of chitosan and alginate or pectin have already been reported in the literature for the production of scaffolds useful in bone therapy applications (Li *et al.*, 2005; Florczyk *et al.*, 2013 and Munarin *et al.*, 2011). Xanthan gum alone or its combination with other materials has not yet been fully exploited for this application, with only few works being reported in the literature (*e.g.*, Pérez-Dosal *et al.*, 2010; Izawa *et al.*, 2014 and Dyondi *et al.*, 2013), none of them specifically for periosteal tissue engineering. Xanthan gum is a

polyssacharide with a branched structure (García-Ochoa *et al.*, 2000) and its combination with chitosan can result in matrices with interesting mechanical properties, stability to changes in pH and absorption of aqueous media for tissue engineering applications (Bellini *et al.*, 2012).

The addition of the non-ionic surfactant Poloxamer 188 (Kolliphor[®] P 188) to chitosan-xanthan matrices enables the production of porous scaffolds (Bellini *et al.*, 2012; Section 3.1 – previous work), and the incorporation of the biocompatible silicone liquid rubber Silpuran[®] 2130 A/B (polydimethylsiloxane, PDMS) can improve the mechanical properties of polysaccharide-based materials (Pires and Moraes, 2015; Section 3.1 – previous work).

It is hypothetically possible to increase the osteoinductivity of chitosan-xanthan scaffolds through the introduction of phosphate groups to hydroxyl and amino groups of chitosan, improving its cation-exchange properties. Phosphate groups bind calcium ions, which may then induce the formation of a calcium phosphate layer known to promote osteoinduction of polymer-based implants. In addition, surface binding of signaling molecules such as bone morphogenetic proteins (BMPs) growth factors on phosphorylated chitosan can stimulate the osteoinductivity of the material (Amaral *et al.*, 2005). BMPs are able to promote bone, cartilage, ligament, and tendon formation by inducing stem and mesenchymal cell differentiation into osteogenic cells (Granjeiro *et al.*, 2005), being, for these reasons, largely used in bone tissue engineering. Low doses of BMPs (nanograms or micrograms) are usually bioactive in native tissues, however, in the surgical site, higher dosages (milligrams) of this protein are necessary to attain osteoinductivity due to its short half-life. In this sense, the use of very efficient devices is required to release adequate amount of BMPs for clinical application, avoiding undesirable long-term effects such as overdose (Carreira *et al.*, 2014) and even the formation of neotissues with inadequate quality (adipogenic and osteoporotic bones). Due to the high cost of directly incorporating BMP and other expensive growth factors in scaffolds useful in bone lesions repair, the development of biomaterials capable of attracting and concentrating these compounds and other native proteins *in vivo*, straight from the patient's blood, is of major interest (de Groot, 1998; Mucalo *et al.*, 2009,).

The purpose of this work was then to produce bioactive, porous and flexible scaffolds by the combination of phosphorylated chitosan and xanthan gum in the presence or not of the additives Kolliphor[®] P 188 and Silpuran[®] 2130 A/B to be used as periosteal substitutes. To validate their use for the proposed application, the scaffolds obtained were characterized

regarding physical, physicochemical and mechanical properties. Moreover, their responses to cells relevant for periosteal engineering (fibroblasts, osteoblasts, endothelial cells and adipose tissue-derived stem cells) were assessed.

3.2.3. Materials and Methods

3.2.3.1. Materials

Chitosan-xanthan scaffolds were prepared using chitosan from shrimp shells (Sigma-Aldrich, C3646, lot number 061M0046V, with deacetylation degree, DD, of 88% and molar mass, MM, of 1.26×10^6 g/mol), xanthan gum (CP Kelco, Xantural[®]180, lot number 2J7007K, with pyruvic acid content >1.5% and MM of 10.01×10^5 g/mol), Kolliphor[®] P188 (Sigma-Aldrich, P1300), Silpuran[®] 2130 A/B (Wacker Chemie AG) and glacial acetic acid (Synth). The water used was purified in a Milli-Q[®] system (Millipore). All reagents used were of analytical grade.

3.2.3.2. Chitosan phosphorylation and product characterization

3.2.3.2.1. Synthesis of phosphorylated chitosan

Chemical modification of chitosan was performed using phosphoric acid, phosphorus oxide, triethyl phosphate and hexanol ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{Et}_3\text{PO}_4/\text{hexanol}$ method), based on the procedure described by Jayakumar *et al.* (2008a) and adapted by Venkatesan *et al.* (2010), with slight modifications. Initially, 20 mL of 1-hexanol were added to 6 g of chitosan in a 70 mL glass reactor. Then, a mixture of P_2O_5 (10 g), H_3PO_4 (5 mL) and Et_3PO_4 (5 mL) was added to the chitosan solution. The reactor was closed and the mixture was homogenized at 150 rpm (Kline shaker plate, Q225K, Quimis) and 35 °C (thermostatic bath, 214 M2, Quimis) for 72 hours. Afterwards, excess of methanol was poured into the reaction mixture and the brown color solid product obtained was filtered with filter paper (20 μm pore size) under vacuum. The phosphorylated chitosan (Chp) powder was then dried to remove residual solvent for 24 hours at room temperature.

3.2.3.2.2. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

Infrared spectroscopy analysis was performed to assess the presence of functional groups introduced by the chitosan phosphorylation process. The spectra were obtained for both modified and unmodified chitosan in a spectrophotometer (Nicolet 6700, Thermo Scientific),

using the KBr pellet method, with wave number ranging from 4000 to 400 cm^{-1} , resolution of 4 cm^{-1} and 32 accumulated scans

3.2.3.2.3. *Degree of substitution*

Quantification of phosphorus was performed by inductively coupled plasma – optical emission spectroscopy (ICP-OES Radial, Arcos, Spectro) and determination of carbon, nitrogen and hydrogen was assessed by elemental analysis (Vario MACRO Cube, Elementar). The degree of substitution (DS) was calculated as the percentual molar ratio between P and N.

3.2.3.3. *Scaffolds preparation*

Dense and porous chitosan-xanthan matrices were prepared according to a previously reported procedure (Section 3.1). Initially, 1% (w/v) pristine and modified chitosan solutions were prepared in aqueous acetic acid solution at 1% (v/v). The Ch and Chp solutions were then mixed at the proportion of 1:1 in volume and added to 1% m/v aqueous xanthan solution (aqueous solution) also at 1:1 volume ratio, under controlled conditions (100 rpm, 9 mL/min, 25 °C). Production of the scaffolds was performed using the mixture of chemically modified and unmodified chitosan to assure that enough Ch free amino groups (i.e., non substituted by phosphate) were available to interact with xanthan gum amino groups. In the case of dense formulations, the polymeric mixture was degassed.

Porous matrices were obtained by adding Kolliphor[®] P 188 to xanthan solution (10%, w/w) prior to the addition of chitosan. For formulations containing silicone, Silpuran[®] 2130 A/B was added to the polymeric mixture at 10% (w/w). The proportion of the additives refer to the mass of polysaccharides.

The final mixture, in all cases, was transferred to two polystyrene Petri dishes (15 cm diameter) and the solvent was evaporated at 37 °C for 24 or 48 hours, for dense or porous formulations, respectively. The scaffolds were then washed with water and HEPES buffer. Final drying was done at room temperature for dense formulations and at 37 °C for 24 hours for porous formulations.

The scaffolds were cut into appropriate sizes and sterilized with ethylene oxide (EO) by exposure to Oxyfume-30 (30% EO and 70% carbon dioxide) for 8 h at 40 °C and relative humidity of 30–80%.

3.2.3.4. *Scaffolds characterization*

3.2.3.4.1. *Morphological aspects, physicochemical and mechanical properties*

The characterization of the scaffolds was performed according to the procedures described in previous work (Section 3.1) and summarized below.

The morphology of surface and cross section of dry membranes was assessed by scanning electron microscope (SEM). Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis was performed to detect the presence of phosphorus in membrane formulations containing Chp and also in the chemically modified and unmodified chitosan powders. For this analysis, samples were coated with carbon, since gold interferes in phosphorus evaluation. The average pore size was obtained by analyzing SEM images of porous formulations with the Image J software. Scaffold thickness was measured using a dial thickness gage (Mitutoyo) for dry samples and samples previously immersed in phosphate-buffered saline (PBS) or RPMI (Roswell Park Memorial Institute) culture medium for 24 hours. Surface roughness of the dry scaffolds, expressed as the root mean square roughness, R_q , was evaluated using a portable rugosimeter (SJ-210, Mitutoyo). Total porosity of the porous formulations was calculated using the apparent density (calculated as the ratio between mass and the volume of each sample) and the true density measured by helium pycnometry. The volumetric expansion of the scaffolds was determined as the ratio between the increase of sample's final volume after immersion in water or culture medium and its initial volume (dry sample). The behavior of the membranes in water, PBS and RPMI culture medium regarding liquid uptake capacity and mass loss was analyzed by gravimetry. The *in vitro* biodegradation of scaffolds was analyzed by gravimetry after incubating scaffolds samples in lysozyme solution of concentration corresponding to the concentration in human serum (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 5, 10 and 25 days. The thrombogenicity of the material, *i. e.*, the evaluation of thrombi formation when human blood is in contact with the surface of the scaffolds was determined through the free hemoglobin methodology, using polystyrene plate as positive control, and both Teflon[®] and glass as negative controls. Cytochrome C adsorption was analyzed by incubating the scaffolds in 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cytochrome C solution in PBS during 3, 6 and 24 hours and determining the final protein content in the supernatant using a micro BCA assay kit (Thermo Scientific).

The relaxation behavior of scaffolds in unconfined compression conditions was assessed using a 1.47 N and 7 N load cell for porous and dense formulations, respectively (Mach

1, Biomomentum), in a bath of PBS. Induced force was recorded as a function of time and the (nominal) stress was calculated considering the sample's initial thickness, diameter and residual load. The elastic moduli were calculated using the first derivative of the stress-strain adjusted curve for each formulation.

3.2.3.4.2. *Biological characterization*

Indirect cytotoxicity assessed with HDF (fibroblasts) and Saos-2 (osteoblasts):

The *in vitro* toxicity of the scaffolds was assessed indirectly by exposing both primary human dermal fibroblasts (HDFs) and osteoblast-like cells (Saos-2, human osteosarcoma) (ATCC, Manassas, Virginia, USA) to extracts of the materials, and by subsequently determining cell viability with resazurin sodium salt.

To prepare the scaffold extracts, samples were first conditioned for 24 h with the specific culture medium (0.01 g of dry material/mL of medium), and then further incubated for another 24 h (37°C, 5% CO₂) in the same w/v proportion to obtain the final extract.

Both HDF and Saos-2 cells were cultured and used independently. HDF cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Sigma-Aldrich), with 4500 mg/L glucose, in the presence of 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), and 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, Sigma-Aldrich), while Saos-2 cells were cultured in McCoy's 5A medium (Sigma-Aldrich), with 2.2 g/L sodium bicarbonate, 15% FBS, and 1% Pen/Strep.

The cells were seeded in a 96-well plate at a density of 31.2×10^3 cells/cm² and cultured for 24 h to allow cell adhesion. The cultures were washed with PBS and incubated with 100 µL of the extract for 24 h (37°C, 5% CO₂). After this period, cells were washed twice with PBS, and 150 µL of resazurin (Sigma-Aldrich) solution (250 mg/L in PBS, diluted in standard culture medium at 10% v/v) were added. The cells were incubated for 4 h (O'Brien *et al.*, 2000) and afterwards, 100 µL of the liquid in each well were transferred to a 96-well plate protected from light. The fluorescence, resulting from the reduction of resazurin to resorufin caused by viable cells, was analyzed at 544 nm excitation and 590 nm emission using a spectrophotometer (SpectraMax i3x, Molecular Probes). Cultures exposed to the standard culture medium for 24 h were used as a negative control and those exposed to 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS for 5 min were used as a positive control of toxicity. Results were expressed setting the

fluorescence of the negative control as 100% viability. The cultures were also analyzed by phase-contrast microscopy (BX-50, Olympus) regarding cell morphology, vacuole formation and confluence.

Cell proliferation and viability were also analyzed using the 0.4% trypan blue (Bio-Rad, Hercules) exclusion method (Altman *et al.*, 1993). Both cultures tested were washed with PBS, detached using 0.25% trypsin and 0.01% EDTA (Gibco) in PBS (v/v), and dissociated for counting. The numbers of viable and dead cells were assessed by counting with a Neubauer chamber under a phase-contrast microscope (BX-50, Olympus). Additionally, the presence of non-adherent cells in the supernatant was also investigated after 24 h of exposure to the scaffolds extracts.

ADSC (adipose derived stem cells) culture on the scaffolds: The protocols for ADSC culture and testing were based on the procedures described by Pulyala *et al.* (2017). ADSC isolated from human fat tissue were obtained from the laboratory of Dr. Kimberly Cox-York (Department of Food Science and Human Nutrition - Colorado State University). The experiments for this study were performed using fourth passage ADSC. Prior to cell culture, sterile membrane samples (n=5) (8 mm diameter) were fixed to sterile titanium plates (8 mm x 8 mm) using carbon tape to avoid their flotation during the study. Sample surfaces were pre-conditioned by incubation in 500 μ L of collagen (Gibco, Life Technologies) dissolved in deionized water (50 μ g/mL) at 37 °C in a 48-well plate. After 1 hour of incubation, the samples were rinsed with deionized water and washed with culture medium. ADSC suspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/high glucose, HyClone™, GE) supplemented with 10% (v/v) of fetal bovine serum (FBS) and 1% (v/v) Pen/Strep solution (Sigma) were seeded (500 μ L per well) on the surface of the samples at a concentration of 1.5×10^4 cells/mL (or approximately 1.5×10^4 cells/cm²).

The lactate dehydrogenase (LDH) assay was performed to evaluate the toxicity of the scaffolds towards ADSC. LDH is a stable cytoplasmic enzyme present in all cells. It is rapidly released into the cell culture supernatant upon damage of the plasma membrane. Thus, the number of dead cells is proportional to the amount of enzyme detected in the cell culture supernatant (Weyermann *et al.*, 2005). After 24 h of culture incubation at 37 °C under 5% CO₂, 100 μ L of medium were collected from each well and the LDH concentration in these aliquots was assayed using a commercial kit (item 601170, Cayman Chemical), based on the analysis of

nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) reduction in the presence of lactate by LDH at 490 nm, according to the manufacturer's protocol, using a plate reader (BMG LabTechFluostar Omega). Positive controls were performed with Triton X-100 (10% in volume in relation to culture media in the wells) and set as the maximum LDH release. Spontaneous LDH release, corresponding to negative controls, was determined in the wells in which the cells were not exposed to the scaffolds. The normalized LDH release was calculated as the ratio between LDH release of samples and the spontaneous release.

The performance of ADSCs cultured on the scaffolds was investigated regarding cellular short-term response (up to 7 days of culture) concerning cell adhesion, viability, and morphology), and long-term response (for up to 3 weeks after supply of differentiation media), considering osteogenic differentiation and matrix production (Ruckh *et al.*, 2010).

For the evaluation of short-term ADSC response, cell viability evaluation was performed by Alamar blue (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) assay after 1 and 7 days of culture. At those specific culture times, the culture medium was replaced with fresh medium containing 10% of Alamar blue. After 8 h of incubation (37 °C, 5% CO₂), the reduction percentage of Alamar blue was calculated as described by the manufacturer (Thermo Fischer Scientific), by analysing the absorbance at 570 nm and 600 nm using a plate reader (BMG LabTechFluostar Omega), considering culture medium as background (Pulyala *et al.*, 2017). The result was expressed as the normalized percentage difference between treated and control cells, related to the viability of control cells at first day of cell culture. The result for wells with culture medium and Alamar blue solution only, without cells, was taken as blank. The morphology of ADSC adhered to the scaffolds was evaluated by SEM after 1 and 7 days of culture. Cells were fixed with a primary fixative solution constituted of 25% glutaraldehyde solution, 0.1 mol/L sucrose and 0.1 mol/L sodium cacodylate for 45min. The scaffolds were then incubated for 10 min in a buffer solution (0.1 mol/L sucrose and 0.1 mol/L sodium cacodylate in deionized water). After that, samples were dehydrated by exposure to aqueous solutions with increasing concentrations of ethanol (35%, 50%, 70% and 100% in volume), for 10 min each. Finally, they were incubated in 100% hexamethyldisilazane (HMDS) for 10 min. The materials were then dried at RT and stored in a desiccator. Before analysis of cell morphology by SEM (JSM-6500F, JEOL), scaffold surfaces were sputtered with a 10 nm layer of gold and imaging was carried out at 10 kV (Pulyala *et al.*, 2017).

For the analysis of long-term ADSC response, after 7 days of cell culture on the scaffolds, the culture medium was replaced with osteogenic differentiation medium consisting of DMEM supplemented with 10% FBS, 1% Pen/Strep, 10^{-8} mol/L of dexamethasone (D8893, Sigma), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ascorbic acid (255564, Sigma) and 6 mmol/L of β -glycerol phosphate (G6251, Sigma). Three weeks after providing the cells with osteogenic differentiation medium, alkaline phosphatase (ALP) activity, calcium deposition, and extracellular matrix (ECM) protein production were assessed to evaluate the osteoinductivity of the scaffolds.

Prior to ALP analysis, the specimens were removed from the culture media, rinsed in PBS and then incubated in Triton X-100 (0.2% in water) for 20 min at 150 rpm. Afterwards, the supernatant of each well was transferred to Eppendorf tubes for ALP activity analysis. The solid samples were rinsed with water, dried at room temperature and placed in a desiccator for later calcium analysis. A commercially available colorimetric assay kit (Quantichrome™, BioAssay Systems) was used to quantify ALP concentration. ALP catalyzes the reaction of p-nitrophenolphosphate to p-nitrophenol and phosphate. p-Nitrophenol is a yellow compound that can be detected at 405 nm using a plate reader. Absorbance was monitored at 1 and 4 min of reaction and the ALP activity was calculated using the manufacturer's guidelines. The total protein content in each sample was determined using a commercially available micro BCA assay kit (Thermo Scientific). ALP activity was normalized with regard to total protein content of each sample to account for the number of cells present on each surface.

Calcium deposited on the surface of the scaffolds was quantified using a commercially available kit (Calcium reagent set, Teco Diagnostics). Dry samples were prepared by exposing them to 500 μL of HCl (at 6 N) for 2 h in a 48-well plate. After that, an aliquote of 20 μL was removed from each well and then mixed with a reagent solution containing cresolphthalein complexone, according to the manufacturer's guidelines. Calcium carbonate solution (in dilute hydrochloric acid, 10 mg/dl) was used as Ca standard solution. Calcium reacts with cresolphthalein complexone to form a purple complex that can be detected at 570 nm (using a plate reader (BMG LabTechFluostar Omega)). Calcium concentration was calculated according to the manufacturer's instructions and normalized with regard to total protein content to consider variations in the number of cells present on each surface.

Mineralization was also studied by analysis of cell morphology and ECM on each sample by SEM, following the procedure described earlier.

VECs (vascular endothelial cells) culture on the scaffolds: The protocols for VEC culture on the scaffolds were analogous to the protocol described for ADSCs. In this case, porcine endothelial cell growth medium (Cell Applications, Inc.) supplemented with 10% (v/v) of fetal bovine serum (FBS) and 1% (v/v) Pen/Strep solution was used. LDH assay was performed after 1 day of culture to evaluate the toxicity of the scaffolds towards the vascular endothelial cells, following the same procedure described above.

3.2.3.5. *Statistical analysis*

The results obtained were analyzed using the Tukey test to determine statistically significant differences among averages at 95% confidence limits with the Software Statistica 7.0.

3.2.4. *Results and discussion*

3.2.4.1. *Chitosan phosphorylation*

The introduction of phosphate groups into chitosan structure can promote its osteoinduction and ability to recruit signaling biomolecules (Amaral *et al.*, 2005), which are characteristics considered very attractive for the intended application of the material developed in the present work. Thus, efforts were made to obtain a chemically modified chitosan that could be used to produce chitosan-xanthan matrices with improved osteoconductive properties.

Various methods of phosphorylation of chitosan are reported in the literature and they basically follow three main approaches: modification via orthophosphoric acid/urea/dimethylformamide; $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{Et}_3\text{PO}_4$ /hexanol method; and P_2O_5 /methanesulfonic acid (Tachaboonyakiat *et al.*, 2010). The phosphorylation of chitosan was carried out in the present work using the $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{Et}_3\text{PO}_4$ /hexanol method, which is advantageous because it allows obtaining products free of biological hazardous chemical compounds, usually present when other methods are used (Jayakumar *et al.*, 2008a). As a result of this method, both hydroxyl and amino groups of chitosan are phosphorylated (Jayakumar *et al.*, 2008b). According to Amaral *et al.* (2005), due to the acidic nature of the reaction medium, the amino groups of chitosan are protonated and then ionic binding with free phosphate ions (H_2PO_4^- and HPO_4^{2-}) takes place. Besides, intra- and intermolecular crosslinks between phosphate groups and protonated amino groups of chitosan may occur (salt linkages). The condensation of phosphates within chitosan chains and with incoming phosphoric acid from the reaction media are also likely to occur.

To assess the introduction of phosphate groups into chitosan structure by the method used in this work, FTIR analysis was performed. The FTIR spectra of chitosan (Ch) and phosphorylated chitosan (Chp) are shown in Figure 3.7 and the correspondent characteristic FTIR peaks are pointed in Table 3.7.

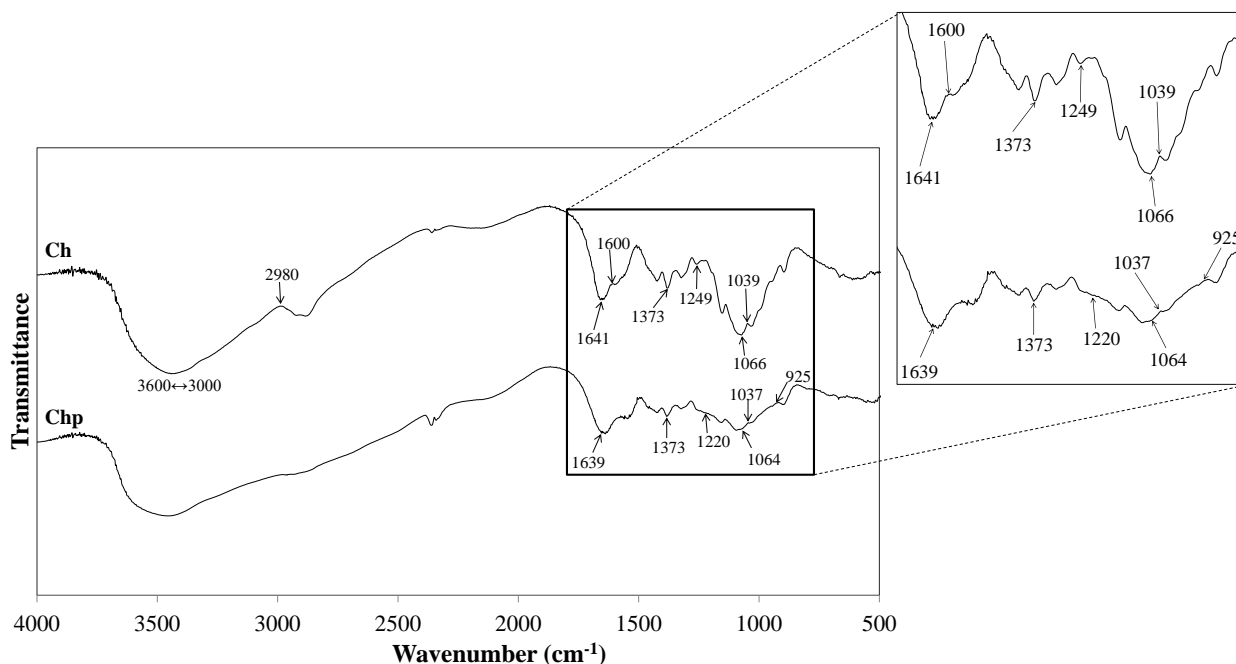


Figure 3.7: Fourier Transform Infrared Spectra obtained for pristine chitosan (Ch) and phosphorylated chitosan (Chp).

As indicated in Table 3.7, the peaks at 1064, 925 and 1220 cm^{-1} suggest the presence of phosphate functionalities in Chp structure. The intensity of the peaks related to the presence of amino groups (1600 and 1249 cm^{-1}) was drastically reduced after polymer modification, probably because phosphate substitution occurred in these groups. Besides, the peak at 1064 cm^{-1} for Chp, larger and attenuated when compared to peak at 1066 cm^{-1} in Ch (related to C–O stretching bonds of ether groups, characteristic of polysaccharides) suggest the substitution of hydroxyl group by phosphate group in Chp. Despite these evidences, it is important to highlight that further analysis would be necessary to assess the presence of phosphate groups in polymer structure, since the peaks observed in FTIR spectra are mostly attenuated and not easily detectable.

Table 3.7: FTIR peaks for unmodified chitosan (Ch) and phosphorylated chitosan (Chp).

Wavenumber (cm ⁻¹)		Peak designation	References
Ch	Chp		
Contribution of different vibrations:			
3000-3600	3000-3600	O–H stretching, –NH ₂ asymmetric stretching, –NH stretching, O=C bonding	Amaral <i>et al.</i> , 2005
2980	2980 (attenuated)	C–H stretch	Venkatesan <i>et al.</i> , 2010; Amaral <i>et al.</i> , 2005
1641	1639	C=O bond of amide I groups	Smitha <i>et al.</i> , 2005; Popa <i>et al.</i> , 2010
1600	-	–NH ₂ bonding of amino groups	Popa <i>et al.</i> , 2010
1373	1373	–CH ₃ symmetric deformations	Venkatesan <i>et al.</i> , 2010; Amaral <i>et al.</i> , 2005
1249	-	C–N stretching vibrations	Popa <i>et al.</i> , 2010
1066/1039	1037	C–O stretching bonds (ether and alcohol groups) - characteristic polysaccharide peak	Smitha <i>et al.</i> , 2005; Li <i>et al.</i> , 2005
-	1064 (larger and attenuated)	C–O–P stretching in phosphate ethers, overlapping the C–O stretching vibrations in chitosan ether groups, in accordance to the substitution of an hydroxyl group by a phosphate one	Amaral <i>et al.</i> , 2005
-	925	P–OH stretching	Amaral <i>et al.</i> , 2005
-	1220	P=O asymmetric stretching from phosphates	Amaral <i>et al.</i> , 2005

The degree of phosphate substitution of phosphorylated chitosan is shown in Table 3.8. The DS found in this work (0.25) is lower than that reported by Jayakumar *et al.* (2008a) (1.18), who used lower molecular weight chitosan (48 kDa, DD 88%) when compared to that used herein (1260 kDa, DD 88%). Jayakumar *et al.* (2009) also reported higher DS value (above 0.42) when phosphorylating chitin (200 kDa, DD 27.6%). The same modification method was used in both mentioned works, but with different proportions of the mixture H₃PO₄/P₂O₅/Et₃PO₄/hexanol to polymer. While Jayakumar *et al.* (2008a) used the proportion of

0.8/1.7/0.8/0.8 parts of each component in the mixture per gram of polymer, Jayakumar *et al.* (2009) employed the ratios of 4/12.5/4/5, while in this work, the proportion used per gram of chitosan was 0.8/1.7/0.8/3.4.

Table 3.8: Mass percentage of the elements C, H and N, determined by elemental analysis and P, determined by ICP-OES. The degree of substitution (DS) was calculated as the molar percentual ratio between P and N.

Polymer	Element (%)				DS
	C	H	N	P	
Ch	37.08 ± 0.14 ^a	7.59 ± 0.04 ^a	8.22 ± 0.44 ^a	0.17 ± 0.03 ^a	-
Chp	30.38 ± 0.05 ^b	6.97 ± 0.02 ^b	6.70 ± 0.04 ^b	3.77 ± 0.31 ^b	0.25

Different letters in the same column indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

After the phosphorylation reaction, the product exhibited a brownish-yellow color and had very limited solubility in water, but was partially soluble in acetic acid solution at 1% and 2% (v/v). The water solubility of phosphorylated chitosan is inversely proportional to its degree of substitution (DS) and the deacetylation degree (DD) (Tachaboonyakiat *et al.*, 2010). Modified chitosan presenting high DS is insoluble in water due to its amphoteric property (Nishi *et al.*, 1986), since the phosphate groups introduced in chitosan structure promote inter- and intramolecular crosslinks (Tachaboonyakiat *et al.*, 2010). The DS of 0.25 indicates that phosphate groups are introduced into 2 positions of a total of 8 positions available for modification. Despite the low DS obtained in this work, the molecular weight and the DD of chitosan were very high, which means that a large quantity of amino groups were available for modification, directly affecting polymer solubility. As mentioned before, Jayakumar *et al.* (2008a) used lower molecular weight chitosan (48 kDa, DD 88%), obtaining a water soluble product, as well as Venkatesan *et al.* (2010), who modified chitosan oligosaccharides.

Results related to EDS analysis are shown in Figure 3.8. The presence of phosphorus in the spectra of phosphorylated chitosan and Chp-based scaffolds indicate that the polymer modification was successfully performed. Moreover, the phosphorus surface mapping analysis showed that the element is homogeneously distributed over the surface of the scaffolds.

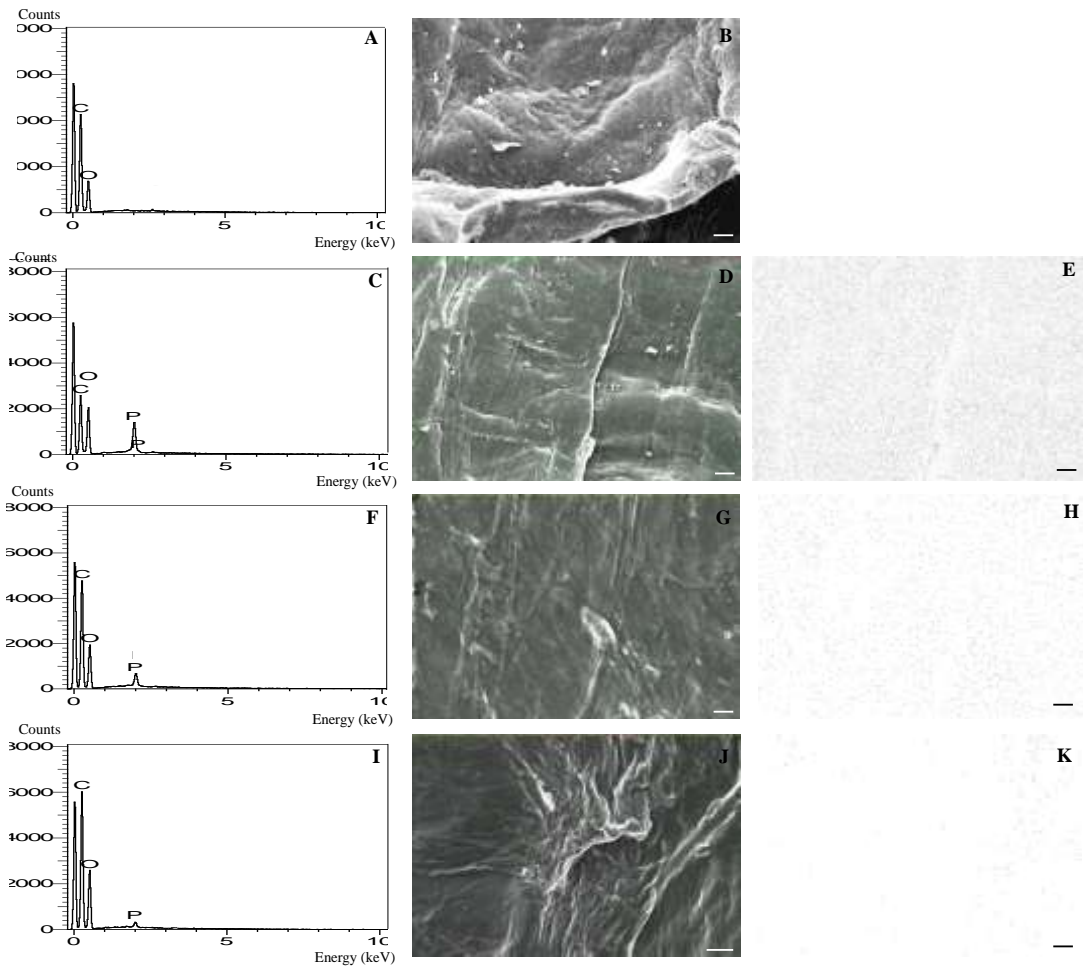


Figure 3.8: Typical EDS spectra (left column) and mapping of phosphorous (green dots in the middle and blue dots in right column) of unmodified chitosan powder (A and B), phosphorylated chitosan powder (C-E), Chp-X scaffold (F-H) and Chp-X-K10 scaffold (I-K). In images shown in E, H and K, white background was used to improve contrast and facilitate observation of phosphorous distribution. Scale bars are 20 μm .

3.2.4.2. *Morphological aspects and physicochemical characterization*

The morphologies of the scaffolds produced in this work are presented in Figure 3.9. The scaffolds present similar matrix structure organization and compaction to the scaffolds obtained in previous work (Section 3.1), in which analogous formulations using non-phosphorylated chitosan were produced. However, the surface of Chp-based scaffolds is more irregular and heterogeneous due to the presence of Chp particles. Since the phosphorylated chitosan obtained herein was only partially soluble in acetic acid (1% v/v), the particles of the

polymer that were not soluble in this medium were dispersed in the Ch/Chp/Xn mixture, originating a composite material with two different phases as final product.

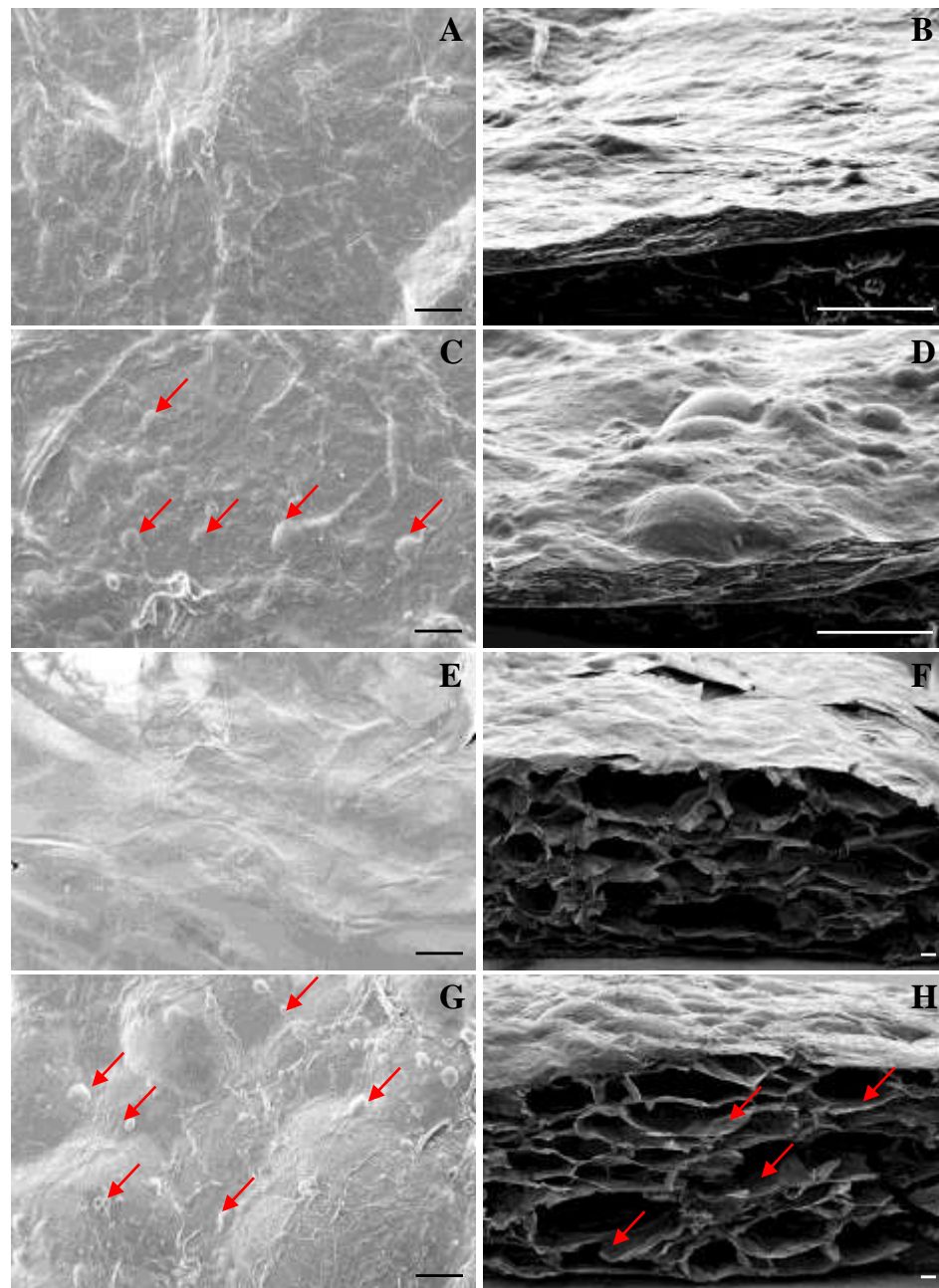


Figure 3.9: Surface and cross section morphologies of Chp-X (A, B), Chp-X-S (C, D), Chp-X-K10 (E, F) and Chp-X-S-K10 (G, H) scaffolds. Scale bars are 200 μm. Red arrows indicate the presence of silicone droplets in S-containing formulations.

Introduction of Kolliphor® P 188 during scaffold preparation resulted in porous matrices, with pore size ranging from around 850 to 1097 μm , what can be considered as an attractive result. Improved osteogenesis occurs when pore size of implants are larger than 300 μm , while the presence of smaller pores result in enchondral (indirect) ossification (Holzapfel *et al.*, 2013). Analogously to a previously reported work (Section 3.1), the silicone rubber Silpuran® 2130 A/B can be observed in the structure of S-containing formulations as small droplets (indicated by red arrows in Figure 3.9).

The roughness parameters, R_q , for the studied scaffolds are shown in Table 3.9. Roughness parameters of scaffolds prepared in previous work with chemically unmodified chitosan (Section 3.1) were lower than those observed for the scaffolds herein studied. In the mentioned work (Section 3.1), it was reported R_q values of approximately 4.63 to 6.24 μm and 7.40 to 8.19 μm for dense and porous formulations, respectively, while in the present work, R_q of 5.60 to 7.02 μm and 10.60 to 11.17 μm for dense and porous formulations were obtained. This result can be attributed to irregularities of the surface caused by the presence of particles of insoluble Chp in the matrix structure, as mentioned before. It has been demonstrated that surface micro-roughness (defined in the range of 100 nm – 100 μm , Bacakova *et al.* 2011) can enhance the stimulatory effects of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and dexamethasone on the production of mineralized bone extracellular matrix (Boyan *et al.*, 2002), which improves osseointegration.

The thickness values of dry and swollen samples (after immersion in water, PBS and RPMI culture medium) are shown in Table 3.9. The thickness of porous samples is higher than the thickness of the remaining formulations, as expected, due to the incorporation of air into the scaffold structure during fabrication. Thickness of samples after immersion in water increases 10.8 to 12.7 times in dense formulations and 2 to 2.5 times in porous formulations in comparison to dry samples. However, the correspondent increase in PBS or culture medium is lower than the one observed in water. In general, thickness of dry samples ranged from 0.26 to 1.98 mm and after immersion in liquid, it ranged from 0.56 to 4.71 mm. The periosteum is 0.07-0.15 mm thick in long bones of growing individuals (Burr and Guillot, 2012), 0.8-1.8 mm thick in nasal bones (Tsai *et al.*, 2010), and about 0.5 mm thick in alveolar periosteum (under gingiva) (Cho *et al.*, 2011). Considering these data, it can be assumed that both dense and porous scaffolds could be appropriate for periosteal tissue engineering, mostly if thickness reduction occurs as a

consequence of normal tissue compression once the biomaterial is implanted in the body.

Table 3.9: Pore size, roughness and thickness of dry samples and samples swollen with water, PBS and DMEM for Chp-X scaffolds prepared in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K).

Formulation	Pore size (μm)	Roughness (μm)	Thickness (mm)			
			Dry	Water	PBS	RPMI
Chp-X	-	5.6 ± 0.9^a	0.3 ± 0.1^a	2.8 ± 0.6^a	0.6 ± 0.1^a	0.7 ± 0.1^a
Chp-X-S	-	$7.0 \pm 1.6^{a,b}$	0.3 ± 0.1^a	4.1 ± 0.5^b	0.6 ± 0.0^a	0.7 ± 0.0^a
Chp-X-K10	850 ± 310^a	11.2 ± 4.6^c	1.9 ± 0.4^b	4.7 ± 0.4^c	3.1 ± 0.3^b	3.5 ± 0.3^b
Chp-X-S-K10	1097 ± 447^a	$10.6 \pm 3.9^{b,c}$	2.0 ± 0.2^b	4.0 ± 0.2^b	3.1 ± 0.5^b	3.4 ± 0.2^b

Different letters in the same column indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

According to the data shown in Table 3.10, the porous formulations obtained in this work present high porosity, equal to 80% and 93% for formulations containing or not the additive Silpuran[®] 2130 A/B, respectively. The presence of phosphate groups in chitosan structure slightly increased the porosity of the materials when comparing to analogous formulations produced with unmodified chitosan (72% and 85% for formulations with or without silicone, respectively) (Section 3.1). According to Karageorgiou and Kaplan (2005), high porosity of materials enhances osteogenesis. Roy *et al.* (2003) produced scaffolds of poly(L-lactide-co-D,L-lactide) containing 20% (w/w) of β -tricalcium phosphate with porosity of 80 to 88% and, after implantation in rabbit craniums, the authors observed more tissue ingrowth and new bone formation in areas with higher porosity.

The liquid uptake capacity of the Chp-based scaffolds is shown in Figure 3.10(a). Water uptake is higher than the uptake of complex media (PBS and RPMI) for all formulations. The same behavior was observed in previous work (Section 3.1) for Ch-X formulations prepared with unmodified chitosan. However, the uptake capacity values are lower for formulations prepared with Chp than with Ch. In Chp, electrostatic interactions may occur between the amino groups of chitosan and the phosphate groups introduced into the molecule, leading to the formation of inter- or intramolecular crosslinks in the chitosan chains (Tachaboonyakiat *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2001). The resulting entanglement of Chp chains may reduce water absorption

by Chp-X scaffolds, as their physical distribution may hamper the penetration of the fluid through the structure of the material. Regarding PBS and RPMI uptake, comparable amounts of media are absorbed by Chp and Ch containing formulations, according to data previously reported (Section 3.1). With regard to the absorption of complex media, other issues are involved in addition to hydrogen bonding or steric hindrance due to crosslinked chains, such as ionic strength and osmotic potential (Bueno *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2017). The materials produced absorb between 5 and 15 times their dry weight of PBS and RPMI, indicating that, considering their desired application as scaffolds for tissue engineering, enough media is capable to penetrate and swell the material structure, assuring nutrient supply for cells in culture.

Table 3.10: Porosity, true density and tridimensional expansion in water and RPMI medium for Chp-X scaffolds prepared in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K).

Formulation	Porosity (%)	Volumetric expansion (%)	
		Water	RPMI
Chp-X	-	953.09 ± 257.10 ^a	197.19 ± 15.42 ^a
Chp-X-S	-	1217.40 ± 259.62 ^a	185.69 ± 26.46 ^a
Chp-X-K10	93.2 ± 0.2 ^a	56.38 ± 15.59 ^b	13.42 ± 3.64 ^b
Chp-X-S-K10	80.2 ± 0.6 ^b	104.47 ± 14.38 ^c	60.02 ± 7.63 ^c

Different letters in the same column indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

The mass loss of the scaffolds in aqueous media (Figure 3.10b) is, in general, higher for porous formulations than for dense ones, reaching the maximum of around 23% in culture medium after 7 days of exposure of the scaffold samples to the medium.

The volumetric expansion of the scaffolds is shown in Table 3.10. Higher expansion due to swelling is observed for dense formulations and, when comparing to values obtained for scaffolds produced in a previous work, with unmodified chitosan (Section 3.1), Chp-based scaffolds present lower tridimensional expansion. As discussed above, due to entanglement of Chp chains, lower water uptake capacity of scaffolds containing it was expected. Besides, for the same reason, Chp polymer chains are less flexible and prone to extend.

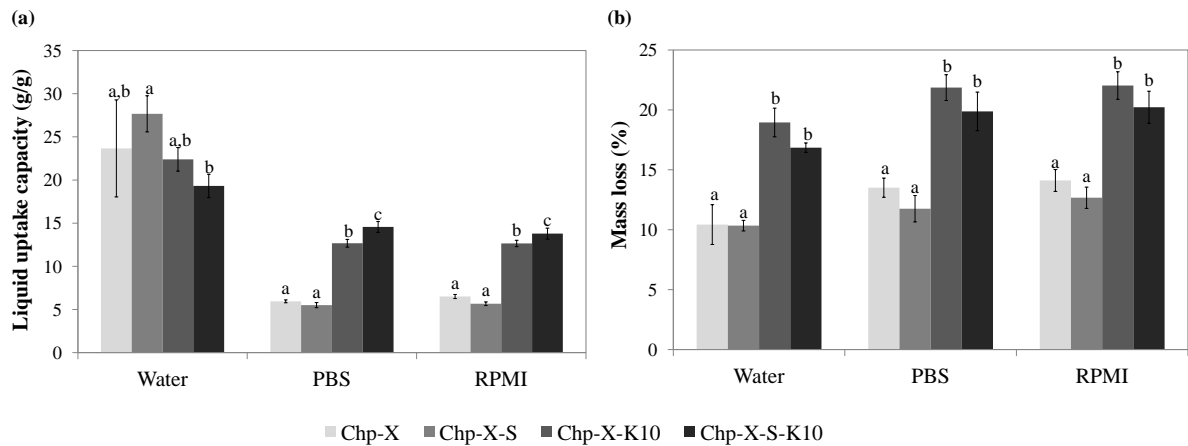


Figure 3.10: Liquid uptake capacity (a) and mass loss (b) of Chp-X scaffolds prepared in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K), exposed to water, phosphate buffer saline (PBS) or RPMI culture medium. Different letters in a group of data for the same solution indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

In vitro biodegradation of Chp-based scaffolds due to exposure to lysozyme was analyzed for up to 25 days (Table 3.11). Lysozyme degrades chitosan *in vivo* by hydrolysis of the polysaccharide's acetylated residues and the degradation rate is proportional to the deacetylation degree of the polysaccharide (Nair and Laurencin, 2007). Degradation of the scaffolds caused by PBS was analyzed as a control for sample dissolution. In general, no difference between mass loss of the samples in lysozyme solution and in PBS was observed, meaning that, for the studied period, no relevant enzyme-associated degradation occurred on the samples. Moreover, mass loss did not significantly increase with time. The results obtained in the present study are similar those reported in previous work (Section 3.1) for Ch-X based scaffolds. Thus, it is possible to infer that the phosphorylation of chitosan did not affect the degradation behavior of the scaffolds in the conditions studied. Considering that the tri-saccharide side chains of xanthan are likely to act as a barrier to enzymatic attack (Kumar *et al.*, 2018), probably blocking the access of lysozyme to cleavage sites in chitosan, the complexation of xanthan gum with chitosan certainly contributed to this result. In addition, the high desacetylation degree of the chitosan used may also had a significant effect on the low degradation rates observed.

Considering the aimed *in vivo* application, the scaffolds should be capable to degrade in a controlled manner, so that the new bone tissue has sufficient time to grow. For bone tissue engineering, long degradation times are usually required. The ideal degradation time varies

according to the specific application, being as low as 3 to 6 months for cranio-maxillofacial treatments to more than 9 months for scaffolds used in spinal fusion, for example (Bose *et al.*, 2012).

Table 3.11: Lysozyme degradation of Chp-X scaffolds prepared in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) represented in terms of mass loss for 5, 10 and 25 days. Mass is loss in PBS is also shown as control for sample dissolution.

Formulation	Mass loss in PBS (%)			Mass loss in lysozyme (%)		
	5 days	10 days	25 days	5 days	10 days	25 days
Chp-X	17.67 ± 3.94 ^{a,A}	15.39 ± 3.77 ^{a,A}	25.96 ± 0.40 ^{a,A}	14.45 ± 4.76 ^{a,A}	20.04 ± 5.21 ^{a,A}	29.34 ± 6.01 ^{a,B}
Chp-X-S	18.25 ± 4.66 ^{a,A}	19.80 ± 4.31 ^{a,A,B}	27.60 ± 1.80 ^{a,B}	17.71 ± 1.17 ^{a,A}	20.38 ± 3.04 ^{a,A,B}	25.96 ± 1.92 ^{a,A,B}
Chp-X-K10	21.61 ± 1.61 ^{a,A}	21.91 ± 1.02 ^{a,A}	24.98 ± 1.46 ^{a,A}	19.29 ± 0.92 ^{a,A}	21.64 ± 3.46 ^{a,A}	24.40 ± 3.06 ^{a,A}
Chp-X-S-K10	19.20 ± 3.60 ^{a,A}	16.95 ± 1.86 ^{a,A}	15.39 ± 2.70 ^{b,A}	19.92 ± 1.40 ^{a,A}	18.56 ± 1.64 ^{a,A}	20.33 ± 2.98 ^{a,A}

Different letters in the same row or column indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test). Lowercase letters refer to the comparison of data in the same column and capital letters refer to comparison of data in the same row.

Protein adsorption on biomaterials is of high relevance, being directly related to their surface properties and having an impact on their biocompatibility. When a surface is placed in contact with blood, protein adsorption is the first step that occurs (Wang *et al.*, 2004). In this work, the interaction of the scaffolds with blood was assessed with the free hemoglobin assay (Montaño-Machado *et al.*, 2015) (results shown in Figure 3.11a). The more the free hemoglobin, the less thrombogenic is the material, which is highly desirable for implantable devices. Teflon[®], as a material commonly used for implantable devices, was used as the negative control for thrombogenicity, having its percentage of free hemoglobin being arbitrarily set to 100% as a reference. The polystyrene (PS) plate surface, which is associated to thrombogenic response, giving a 20% response for free hemoglobin, was considered as a positive control for this parameter. Porous formulations presented lower percentage of free hemoglobin than Teflon[®], however, the values were significantly above that of PS plate for all samples, varying from around 50% to 70%, which may be deemed as a good result considering the intended application as implantable materials.

With the purpose of understanding how the scaffold would interact with bone morphogenetic proteins after implantation, the study of cytochrome C adsorption on the materials

was performed. Since the costs for purchasing even small quantities of BMPs are significant, cytochrome C may be used as an alternative for this type of evaluation. According to Mucalo *et al.* (2009), cytochrome C is as a good mimic for BMP-type proteins due to its similarity to BMPs regarding molecular weight (12 kDa), and pI (value in the upper limit of the range exhibited by isolated BMP-1 protein fraction).

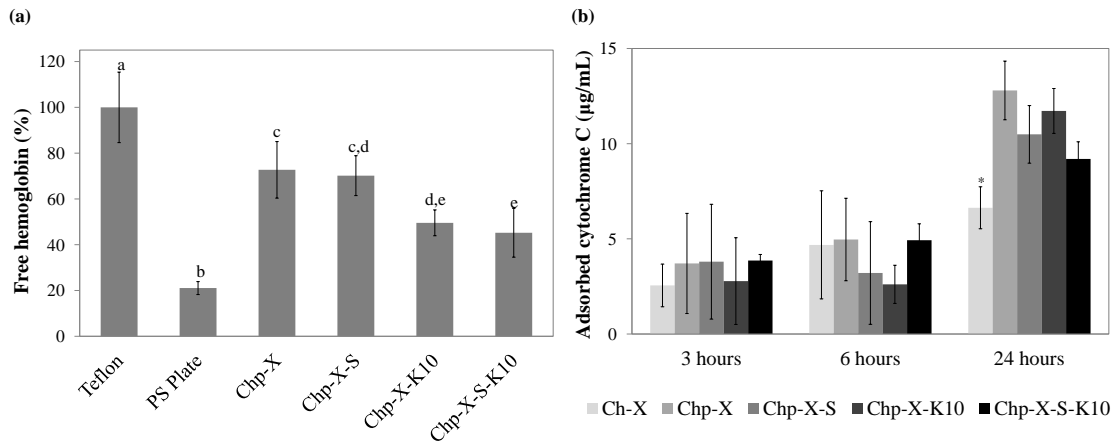


Figure 3.11: (a) Thrombogenicity of Chp-based scaffolds prepared in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) expressed as percentage of free hemoglobin. Glass, Teflon[®] and polystyrene (PS) plate were used as controls for the assay. Different letters indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test). (b) Adsorbed cytochrome C on scaffolds surfaces after 3, 6 and 24 hours of incubation at 37 °C. Significant statistical difference was only observed for Chp-X in the 24 h group.

The results of cytochrome C adsorption are shown in Figure 3.11(b). For this test, unmodified chitosan-xanthan (Ch-X) scaffolds were used as a control to analyze if the phosphorylation procedure had indeed affected the adsorption of BMP-like proteins by the scaffolds. No significant difference was observed for Cytochrome C adsorption on the different formulations in the first 6 hours. For 24 hours, however, the adsorption of the control was lower than that of Chp-containing formulations, evidencing the ability of the phosphorylated chitosan to improve the binding of cytochrome C to the material. Thus, it allows inferring that, in an application of the material *in vivo*, the Chp- based scaffolds would be able to attract BMPs and induce osteogenesis.

3.2.4.3. Mechanical properties

The mechanical behavior of the scaffolds was assessed by unconfined compression relaxation tests. The stress-strain curves obtained for Chp-based scaffolds are shown in Figure 3.12.

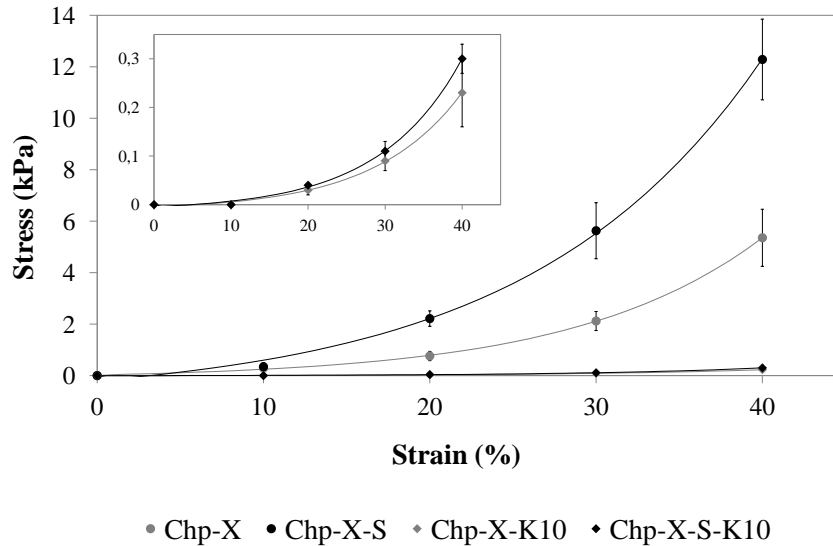


Figure 3.12: Stress-strain curves for Chp-based scaffolds prepared in the presence of not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) submitted to compressive loads. The detail zooms in curves of the formulations prepared with the surfactant K. Experimental data are shown with markers and the solid lines represent fitted curves.

Similarly to what was described in a previous work for non-phosphorylated chitosan combined with xanthan gum and the additives S and K (Section 3.1), the addition of silicone improves the mechanical properties of Chp-based scaffolds, as demonstrated by the higher slope of stress-strain curves of formulations containing S when compared to respective formulations without this additive. It means that the scaffolds with Silpuran[®] 2130 A/B are stiffer than the others. Moreover, formulations without surfactant, *i. e.*, dense membranes, have also improved mechanical properties.

The calculated elastic moduli (Table 3.12) obtained for dense formulations are higher than the moduli of porous scaffolds. For both dense and porous matrices, the elastic modulus is higher for formulations containing the silicone when compared to the respective formulations prepared without this additive. This increase ranged from 62 to 230 % for Chp-X-S, and 16.5 to

44% for Chp-X-S-K10 at different strains (10 to 50%).

Table 3.12: Elastic moduli of Chp-based scaffolds prepared in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) submitted to compressive loads at 10 to 50 % strain.

Formulation	Elastic Modulus (kPa) at different strain values				
	10%	20%	30%	40%	50%
Chp-X	3.35	8.20	20.08	49.13	120.22
Chp-X-S	1.06	22.66	46.42	95.11	194.85
Chp-X-K10	0.15	0.36	0.88	2.14	5.18
Chp-X-S-K10	0.18	0.45	1.14	2.92	7.46

3.2.4.4. *Biological characterization*

Indirect cytotoxicity assessed with HDF (fibroblasts) and Saos-2 (osteoblasts)

Indirect toxicity of scaffolds towards fibroblasts and osteoblasts was analyzed. In this work, both HDFs and Saos-2 cells were chosen as representatives of the periosteum tissue. In addition to the stromal cells and its microvascular network, the human periosteum consists of fibroblasts and osteogenic cells forming two distinct layers which embrace the external surfaces of the bones. Fibroblasts are responsible for producing collagen and elastin fibers forming the outer fibrous layer, while the osteogenic cells make up an inner cambium layer positioned in direct contact with the bone surface. Therefore, both cells seem responsible for the periosteum homeostasis, as well as the health of the surrounding bone (Allen *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2014).

To evaluate metabolic function and cellular health, both Saos-2 and HDF cells were exposed to scaffolds extracts for 24 h. Viability of both cell lineages tested did not undergo any significant change in relation to negative controls, as can be seen in Figure 3.13 (b). Moreover, HDF and Saos-2 cultures exposed to phosphorylated chitosan-based scaffolds extracts presented viability similar to the cultures exposed to extracts of non-phosphorylated membrane (Ch-X), taken as a second control. According to ISO 10993-5 (2009), a reduction of cell viability by more than 30% is considered a cytotoxic effect, therefore the absence of statistical difference between samples and controls demonstrates the non-cytotoxicity of the biodegradable scaffolds tested for both types of cells.

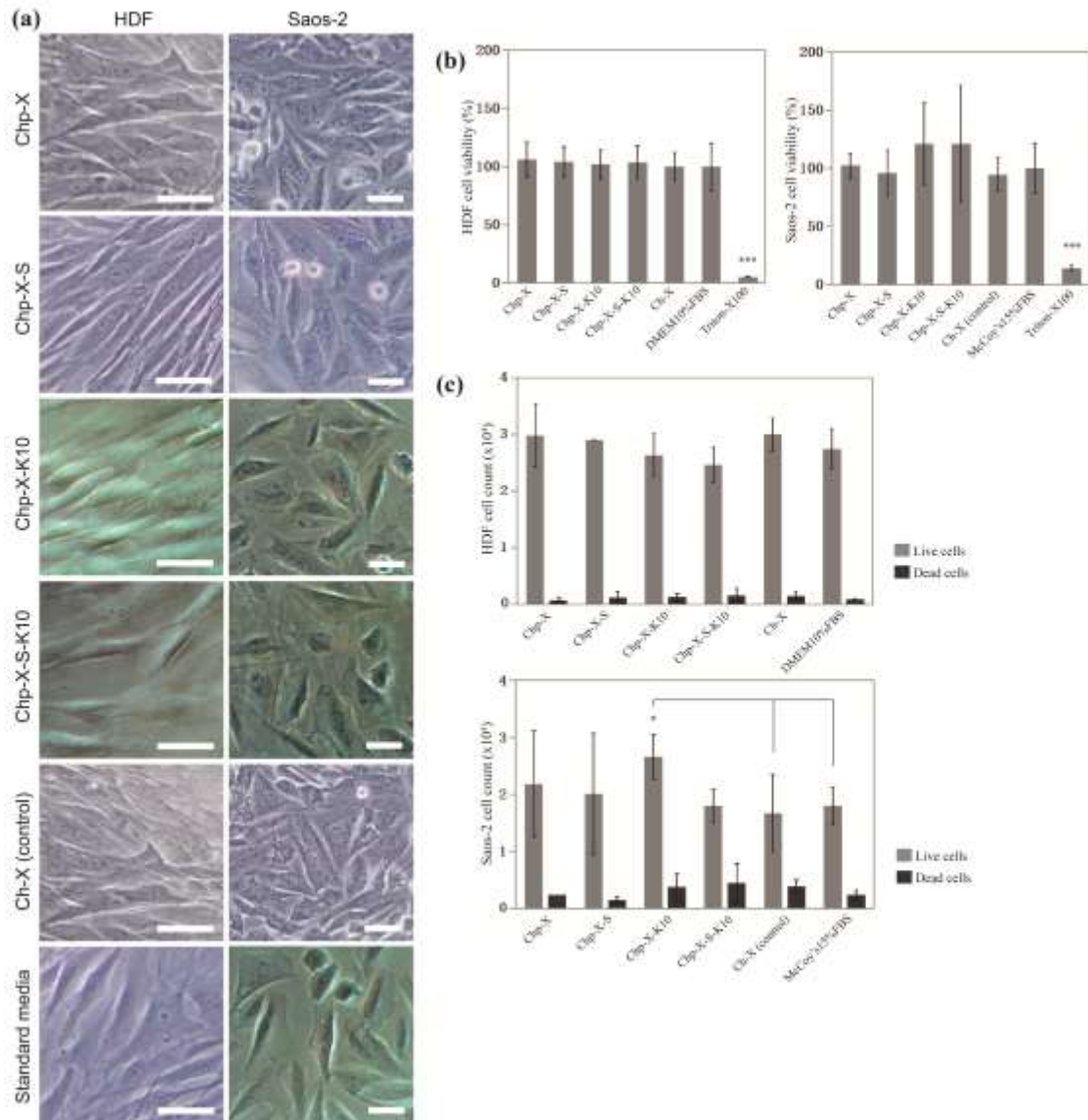


Figure 3.13: Indirect cytotoxicity to HDF and Saos-2 cells. Human fibroblasts and osteoblasts morphology (a) (scale bar: 40 μm); Viability assay (b): The graphs demonstrates the maintenance of cell viability in fibroblasts and osteoblastic cells, with no statistical difference when compared to the negative control. Cell cultures with standard supplemented culture medium were used as negative control and with 1% (v/v) Triton X-100 in PBS as positive control of toxicity; Cell proliferation in 24 h (c): No statistical difference was observed when comparing the number of live and dead HDF cells in the samples experimental groups and in the control group. Saos-2 cells increased their population in 24 h when they received the Chp-X-K10 membrane extract.

Evaluation of cell cultures under phase-contrast optical microscope reveals no significant change in fibroblasts and osteoblasts morphology as well as no difference in cell monolayer confluence after exposure to the degradation products of scaffold samples. The HDFs exhibited an elongated shape, while Saos-2 displayed polygonal and spindle-shaped morphologies, all similar to the control cultures, as shown in Figure 3.13 (a). No significant increase in cells in suspension compared to controls was observed, as demonstrated by trypan blue exclusion assay. Trypan blue is a dye exclusion method based on membrane integrity assessment to identify dead and live cells. The number of live and dead cells observed is shown in Figure 3.13 (c). Proliferation in 24 hours is similar to that of the control, for both types of cells, except for Saos-2 cells in contact with the Chp-X-K10 extract, which presented a population increase of $165.9 \pm 38.9\%$ ($p < 0.05$), higher than the control, McCoy's 15% FBS with $79.9 \pm 29.1\%$, and Ch-X membrane, with $67.6 \pm 32\%$. López-Pérez *et al.* (2010) observed osteoblast population increase on phosphorylated chitosan membranes in 1, 7 and 14 days of culture. The authors also observed that the membrane with phosphorylated surface was able improve the adhesion and viability of osteoblastic cells.

Altogether, the results regarding indirect cytotoxicity reported in the present work indicate that the toxicity due to the presence of phosphate groups in chitosan structure as well as the associations of phosphorylated chitosan with xanthan and other additives (silicone rubber and surfactant) appeared to be minimal in primary human fibroblasts and osteoblastic cells, interfering discretely in fundamental cellular parameters.

LDH assay

The toxicity of Chp-based scaffolds to adipose-tissue derived stem cells (ADSCs) and vascular endothelial cells (VECs) was also assessed after 1 day of cell culture on the materials by LDH assay and the results are shown in Figure 3.14.

LDH is a cytoplasmic enzyme, which is released from the cell when its membrane is damaged. The normalized LDH release was calculated as the ratio between LDH release of samples and the spontaneous release. After culture of ADSCs on the scaffolds, LDH released by cells on tested samples was lower than maximum and spontaneous release, meaning that the tested materials is not deleterious to this type of cell, having, in fact, beneficial effects on them. Similarly, LDH released by VECs cells in contact with the tested samples was comparable to the

spontaneous release and lower than that attained with the Triton X-100 control. These results clearly demonstrate that the biomaterials developed are also non-cytotoxic to these cells. ADSC are of great interest in the field of tissue engineering as cells easily harvestable from the adipose tissue through high yield procedures and with minimal donor-site morbidity. Moreover, these cells are capable of differentiating in a variety of cell lineages, including osteoblasts. Thus, ADSCs were used in this study to assess the toxicity of the Chp-based scaffolds and validate their possible use as scaffolds for the engineering of the periosteum.

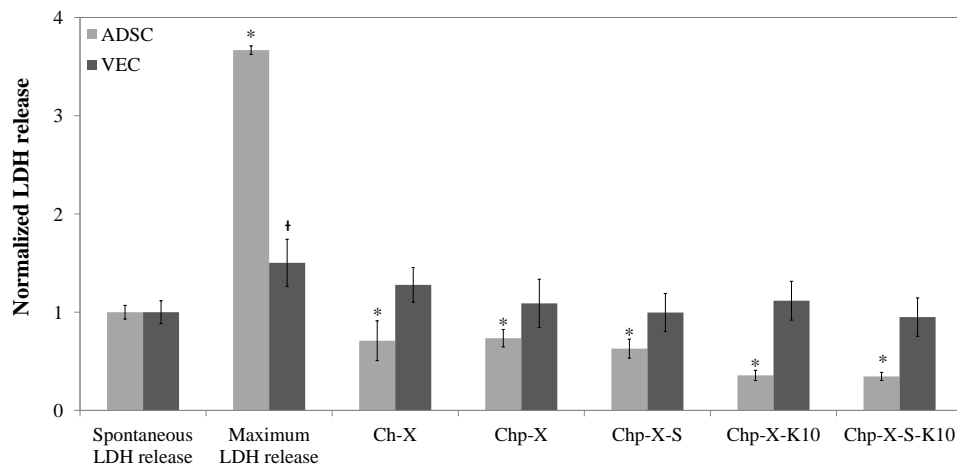


Figure 3.14: Cytotoxicity of Chp-X scaffolds prepared in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) to ADSC and VEC after 24 h culture obtained with the LDH release assay. Spontaneous LDH release was set as the enzyme release by cells growing in the control well plate, with no contact with the scaffold samples. Maximum LDH release was obtained when cells were exposed to Triton X-100. Normalized LDH release was calculated as the ratio between LDH release of samples and the spontaneous release. Significant statistical difference was observed between all groups and the spontaneous release group for ADSC and only between the maximum release and the spontaneous release for VEC.

Adequate vascularization of the scaffold is highly relevant to assure nutrient and oxygen supply to cells both *in vivo* and *in vitro* in tissue engineering applications, including bone tissue engineering (Bose *et al.*, 2012). The non-cytotoxic effect of the Chp-based scaffolds on vascular endothelial cells is therefore a very attractive feature of the scaffolds, as these cells must be part of the tissue formed after regeneration.

ADSC culture on the scaffolds

(i) Short-term ADSC response to culture on scaffolds: cell adhesion, proliferation and viability

Initial attachment and proliferation of cells on scaffolds are important since they will affect their long-term stability and differentiation. The ability of scaffolds to support ADSC adhesion and proliferation was evaluated by SEM and Alamar Blue assay. Figure 3.15 shows the SEM of surfaces of scaffolds after 1 or 7 days of ADSC culture. After 1 day of culture, very few cells spread individually on the surface of Ch-X scaffold (as demonstrated by black arrows, Figure 3.15, A). In Chp-based scaffolds, round-shaped cells were predominantly observed, being more abundant in dense formulations. However, for all formulations, mainly containing Chp, the presence of ECM deposit on material surface is noted. Upon analyzing Figure 3.15, A-J, it seems that cells prefer attaching and spreading on smoother surfaces rather than rougher regions. Indeed, the presence of cells is lower in porous scaffolds, which are rougher than dense formulations (as shown earlier in Table 3.9). After 7 days of culture, contrary to expected, the proliferation of cells on materials surfaces was not observed, and round-shaped cells could still be observed. It is possible that, during the procedure of fixation of cells for SEM imaging, the cells were leached from the scaffold, since, apparently, they were very weakly attached to the sample surface. Despite that, higher amount of ECM deposits can be noticed, mainly for Chp-X, Chp-X-S and Chp-X-K10 (Figure 3.15, Q-S) formulations.

Impairment of cell adhesion and proliferation on the scaffolds' surfaces may be related to their hydrophobic character. As shown in a previous work (Section 3.1), Ch-X surface can be considered slightly hydrophobic, since its water contact angle is higher than 90 degrees (109.3 degrees). After introduction of surfactant Kolliphor[®] P188, the authors showed reduction of surface hydrophobicity (68.6 degrees), however it can still be considered only moderately hydrophilic. After phosphate groups introduction to the material structure, it was also expected a reduction on water contact angle and a consequent increase in surface wettability due to the hydrophilic character of these polar groups. Despite that, the cell behavior observed in the present work suggests that binding of cell adhesion receptors on materials surfaces was hampered due to material surface hydrophobicity.

Surface modification can be an interesting strategy to favor cell adhesion and proliferation on scaffolds, e.g. by plasma surface modification (Luna *et al.*, 2011),

functionalization (Hansson *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016), coating (Zhen *et al.*, 2016) or nanofiber deposition (Seung-Yun *et al.*, 2005; Saad *et al.*, 2017), and should be considered to improve the surface hydrophylicity.

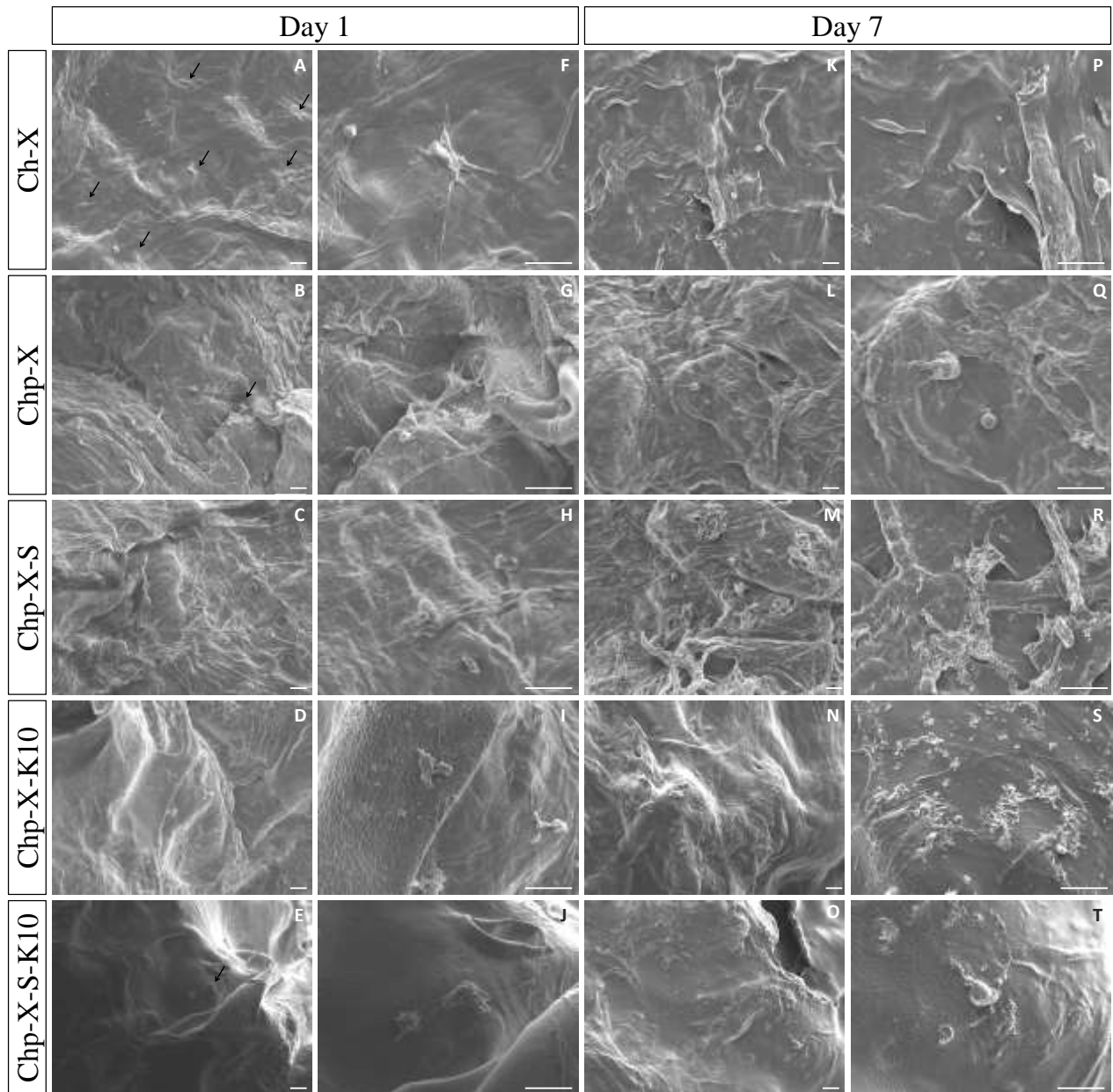


Figure 3.15: SEM images of cells on the surface of Ch-X (control) and Chp-X scaffolds prepared in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) after 1 or 7 days of ADSC culture. Black arrows indicate spread cells on materials surface. Scale bars are 50 μm .

Another reason for limited cell adhesion can be associated to the stiffness of the material. Soft and stiffness of substrates regulate cell-ECM interaction mechanism and is related to adhesion response (Chang and Wang, 2011). All materials herein studied are very soft when in cell culture, but the cells used for the assays are intended to be part of a hard tissue (bone). Therefore, an environment capable of mimicking this property might promote more intense cell adhesion and proliferation.

The analysis of ADSC proliferation and viability performed by Alamar Blue assay is shown in Figure 3.16.

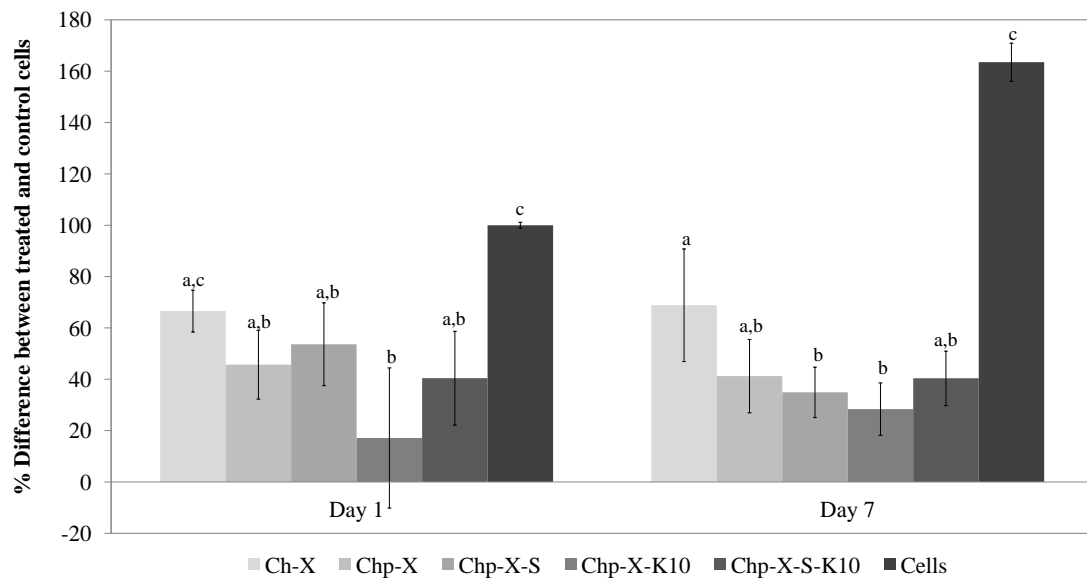


Figure 3.16 : Alamar Blue assay for Ch-X and Chp-X scaffolds prepared in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) after 1 or 7 days of ADSC culture. The results are expressed as the normalized percentage difference between treated and control cells, related to the viability of control cells at first day of cell culture. Different letters indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

The results of Alamar Blue assay were expressed as the percentage difference between control and treated cells (cells cultured on scaffolds surfaces) normalized to the cellular activity of control at Day 1, *i. e.*, the activity of cells at Day 1 was set as 100%. In accordance to what was observed by SEM (Figure 3.15), there was no significant increase on cell concentration from Day 1 to Day 7, on the surface of all formulations, while the increase in cell concentration for the control was 64%. It means that only few cells were able to adhere on scaffolds surface

and, as consequence, they could not easily proliferate, since cell-cell or cell-ECM interactions play a crucial role on the development and preservation of a tissue structure (Ayuob and Ali, 2012).

(ii) Long-term ADSC response to culture on scaffolds: osteogenic differentiation and mineralization

After 7 days of ADSC culture on scaffolds, osteogenic media was provided to induce the differentiation of cells into osteoblasts. Three weeks later, scaffolds samples were analyzed regarding the presence of differentiated cells by phosphatase alkaline activity and calcium content. Mineralization was also evaluated by SEM imaging. ALP activity and extracellular matrix deposition on material surface are important indicators of normal phenotypic behavior of osteoblasts (Popat *et al.*, 2006).

The normalized ALP activity and calcium content are shown in Figure 3.17 (a and b, respectively). ALP is a key component of bone matrix vesicles because of its role in mineralization, and it is an early indicator of immature osteoblast activity (Ruckh *et al.*, 2010). The expression profile of ALP typically presents a peak during early differentiation of progenitor cells into mature osteoblast phenotypes (Ruckh *et al.*, 2012). Corroborating the results obtained from short-term study, ALP activity observed after culture of ADSC on the scaffolds during 3 weeks in the presence of osteogenic medium was low. It means that, as few cells were able to proliferate on the scaffolds surfaces, the total level of ALP expressed by these cells after differentiation was also low. Ruckh *et al.* (2012) produced scaffolds composed of hydroxyapatite and polycaprolactone composite nanofibers and evaluated the osteogenic response of bone marrow stromal cells cultured on the materials. The authors reported maximum normalized ALP activity around 0.027 for scaffolds containing 10% of hydroxyapatite after 3 weeks of study. At the first week, the normalized ALP activity was lower than 0.005.

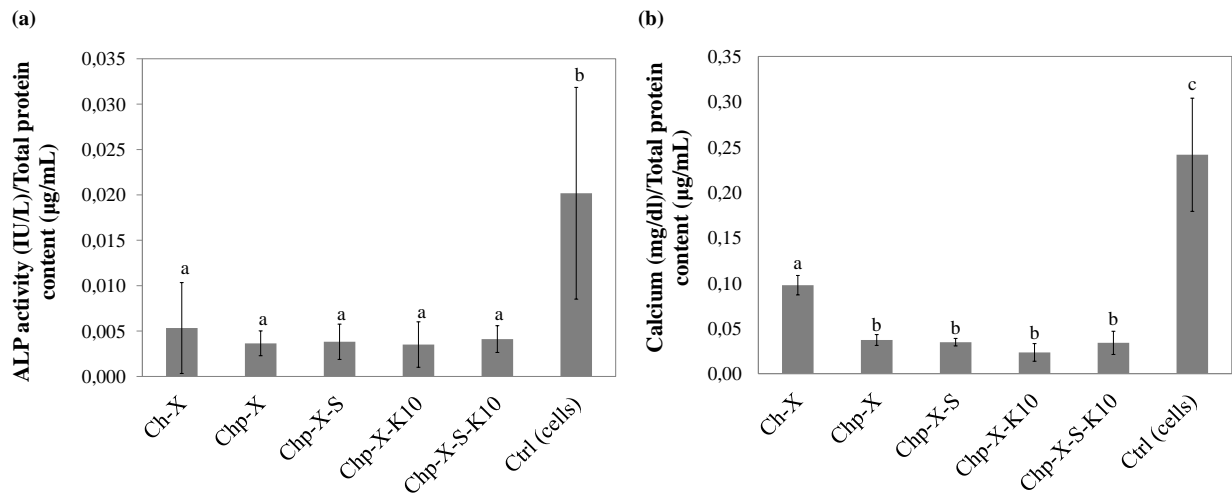


Figure 3.17 : Normalized ALP activity (a) and calcium content (b) for Ch-X and Chp-X scaffolds prepared in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) after 3 weeks of ADSC culture in osteogenic medium. Different letters in the same graph indicate significant difference at 95% confidence limits (Tukey test).

Despite the very low ALP activity, these results, along with calcium content analysis (Figure 3.17 – b), show that the differentiation of ADSC into osteoblasts occurred at some extent. The calcium content of control is from 2.5 to 10 times higher than that of tested scaffolds, being Ch-X the formulation with higher calcium content. However, SEM images (Figure 3.18) show that dense Chp-based formulations present the highest amount of ECM and mineral deposit on the surface. Mineralization is observed for all formulations studied due to the presence of calcium phosphate and oxalate crystals.

Even in the absence of cells (control samples, Figure 3.18 –A,E,I,M,Q), mineral deposit on the surface of the samples was observed, however, the amount of crystals is lower, qualitatively, when compared to test samples. It means that the material itself is able to promote mineralization, which is a very attractive result for the proposed application. Although all formulations have this ability, fewer crystal deposits are observed on porous formulations than on the other materials.

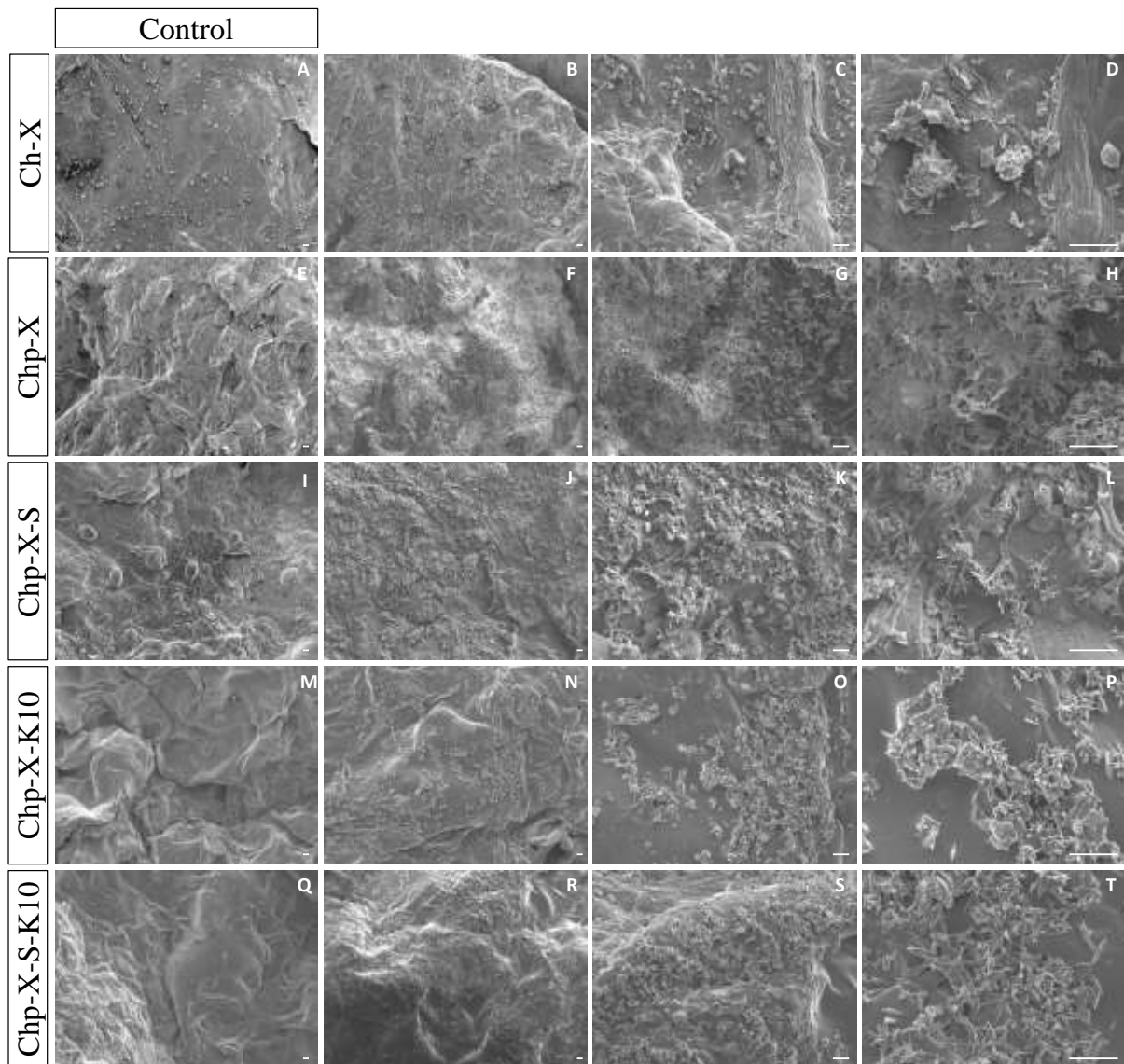


Figure 3.18: SEM images of Ch-X and Chp-X scaffolds prepared in the presence or not of the additives Silpuran[®] 2130 A/B (S) and Kolliphor[®] P188 (K) after 3 weeks of ADSC culture in the presence of differentiation medium. Control samples were exposed to differentiation medium, but in absence of cells. Scale bars are 50 μm .

3.2.5. Conclusions

In this work, a chemical modification was performed in chitosan by introducing phosphate groups to its structure and the phosphorylated polymer was used to produce chitosan-xanthan-based scaffolds. Highly porous and mechanically reinforced matrices were obtained, with physical and physicochemical features similar, in general, to those of scaffolds produced

with unmodified chitosan complexed to xanthan. The formulations prepared with Chp showed to be advantageously able to adsorb higher amounts of cytochrome C, indicating that, in a possible application of the material *in vivo*, they would be able to concentrate native BMPs and induce osteogenesis.

Besides, it was demonstrated that the Chp-based scaffolds are attractive candidates for periosteal tissue engineering, as many of their characteristics match the requirements for appropriate cell growth and osseointegration, such as roughness, porosity and medium uptake. Moreover, given their extended degradation time, they may be able to provide a stable environment that would last long enough for cells to grow and regenerate the periosteal tissue.

Despite the limited cell adhesion and proliferation on scaffolds surfaces, the cytotoxicity assays with HDF, Saos-2, ADSC and VEC showed that all materials herein studied are non-toxic to important cell lineages for application as periosteum substitutes. Together with their morphological aspects, physicochemical and mechanical properties, these results demonstrate that the biomaterials obtained have potential to be used for the proposed application. Nevertheless, further surface modification studies are required to favor cell adhesion and proliferation, e.g. by plasma surface modification, functionalization, coating or nanofiber deposition. The mineralization observed on the surface of all formulations also indicates that the materials studied have promising characteristics for the application in bone regeneration. Moreover, as demonstrated by the ability of Chp-based scaffolds to adsorb cytochrome C, it can be expected that in an *in vivo* application the material could behave differently than *in vitro*, presenting better performance regarding cell adhesion, proliferation and differentiation, since they would be able to recruit local BMPs, improving their osteoinductivity, as mentioned above. Further evaluation on the response of Chp-based scaffolds *in vivo* will be performed to assess the suitability of the produced scaffolds as periosteum substitutes and the need of extra surface modifications to improve material osteoinductivity.

3.2.6. Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support to this research from Coordination for the Improvement of Higher Educational Personnel (CAPES, Brazil), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), São Paulo Research

Foundation (FAPESP, Brazil) and the Emerging Leaders in America Program (ELAP, Canada). We acknowledge Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria (Campinas, SP, Brazil) for performing the sterilization of scaffolds samples.

We also thank Prof. Gustavo Cabrera, PhD., from the Unit of Technology Development, (UDT, University of Concepción, Chile) for sharing his expertise in chitosan phosphorylation for the analysis of the data related to this part of the work.

3.3. ENSAIO PILOTO PARA A DETERMINAÇÃO DO DESEMPENHO DOS SCAFFOLDS IN VIVO

O desempenho dos *scaffolds in vivo* foi averiguado por meio da avaliação do reparo ósseo em calota craniana de ratos através de um ensaio piloto realizado na UNIARARAS (Fundação Hermínio Ometto) em parceria com o grupo da Prof. Dra. Gláucia M. T. dos Santos. A metodologia utilizada e resultados preliminares do estudo são mostrados neste capítulo.

3.3.1. Metodologia utilizada

3.3.1.1. Obtenção dos animais

Foram utilizados 45 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas, com 90 dias e peso médio de 250 g, obtidos do Centro de Experimentação Animal Prof. Dr. Luiz Edmundo de Magalhães do Centro Universitário Hermínio Ometto - UNIARARAS. Os animais foram alojados em caixas individuais sob temperatura constante (23 ± 2 °C), com ciclo claro/escuro de 12 h com água e ração *ad libitum* durante todo o protocolo experimental. Todos os procedimentos experimentais e cirúrgicos foram realizados após aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UNIARARAS (protocolo 055/2017, em anexo no Apêndice C).

3.3.1.2. Protocolo experimental

Todos os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (3,0 mL/kg) e cloridrato de xilazina (1,0 mL/kg). Em seguida, foi realizada tricotomia na pele dorsal dos animais, assepsia da área cirúrgica (região occipital) com digluconato de clorexidina 4% e posterior ostectomia com sistema piezoelétrico (VK Driller, Piezosonic Esacrom), potência de 50

W e frequência de 100 Hz, com ponta de 5,0 mm (SIN 300.0112), sob irrigação constante de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), para criação de um defeito crítico de 25 mm².

Os animais foram divididos randomicamente em nove grupos listados na Tabela 3.13.

Tabela 3.13: Descrição dos tratamentos aplicados nos defeitos ósseos de animais de diferentes grupos (n=5).

Grupo	Tratamento aplicado no defeito ósseo
1	Ch-X
2	Ch-X-S
3	Chp-X
4	Chp-X-S
5	Ch-X-K10
6	Ch-X-S-K10
7	Chp-X-K10
8	Chp-X-S-K10
9 (Controle Sham)	Nenhum (somente reposicionamento muscular e sutura)

Logo após a colocação do *scaffold* sobre o defeito ósseo, o tecido muscular e a pele foram reposicionados e suturados com fio agulhado de Nylon 5-0 (Figura 3.19).

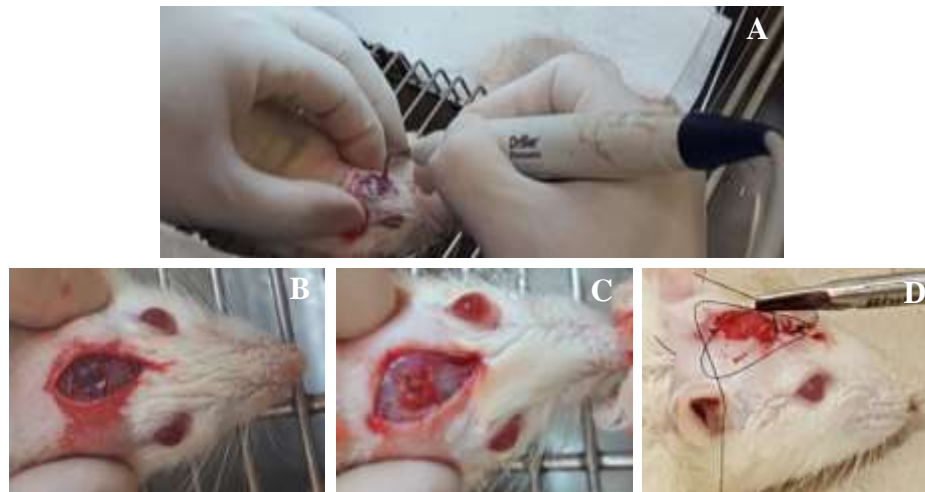


Figura 3.19: Fotografias do procedimento cirúrgico realizado para colocação dos *scaffolds* na calota craniana de ratos. Osteotomia com sistema piezoelétrico (A); animal com *scaffold* denso (B) ou poroso (B) sobre o defeito criado; e sutura da pele e tecido muscular (C).

Após o procedimento cirúrgico, todos os animais receberam uma associação de analgésicos, tramadol (0,1 mg/kg) e dipirona sódica (50 mg/ml), via oral na água durante cinco dias. Sete dias após a indução da lesão todos os animais tiveram a sutura removida.

3.3.1.3. *Obtenção das amostras de tecidos*

Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados com aprofundamento anestésico no 60º dia após o procedimento experimental, para a coleta das amostras da área de lesão. Para isto delimitou-se uma área de 10,0 mm² do centro do defeito para todas as amostras. As amostras foram direcionadas às análises histológicas, sendo imersas em solução fixadora de formaldeído 10% imediatamente após a coleta.

3.3.1.4. *Análises histomorfológicas*

Vinte e quatro horas após a coleta das amostras os fragmentos imersos em solução fixadora (formaldeído 10%) foram lavados e deixados em solução descalcificante, à base de EDTA, por sessenta dias com trocas em dias alternados. Em seguida, as peças foram lavadas em solução fisiológica e submetidas aos procedimentos padrões para embebição em parafina e realizados cortes transversais das peças com 4,0 µm de espessura.

As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação e quantificação do infiltrado inflamatório (importante para a produção de fatores que estimulam a osteogênese), fibroblastos (relevantes na formação de matriz tecidual e deposição de colágeno) e vasos sanguíneos (cruciais no que se refere ao suprimento nutricional e de oxigênio do tecido neoformado).

3.3.1.5. *Análise estatística*

Foram aplicados os teste One way ANOVA e Tukey post-hoc test utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0. Os valores de $p < 0,05$ mostram evidências estatísticas de que há diferença entre os dados em questão em um intervalo de confiança de 95%.

3.3.2. *Resultados e discussão*

Na análise histomorfométrica foi observado que a formulação Ch-X-K10 apresentou maior quantidade de infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos e fibroblastos em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figuras 3.20 e 3.21).

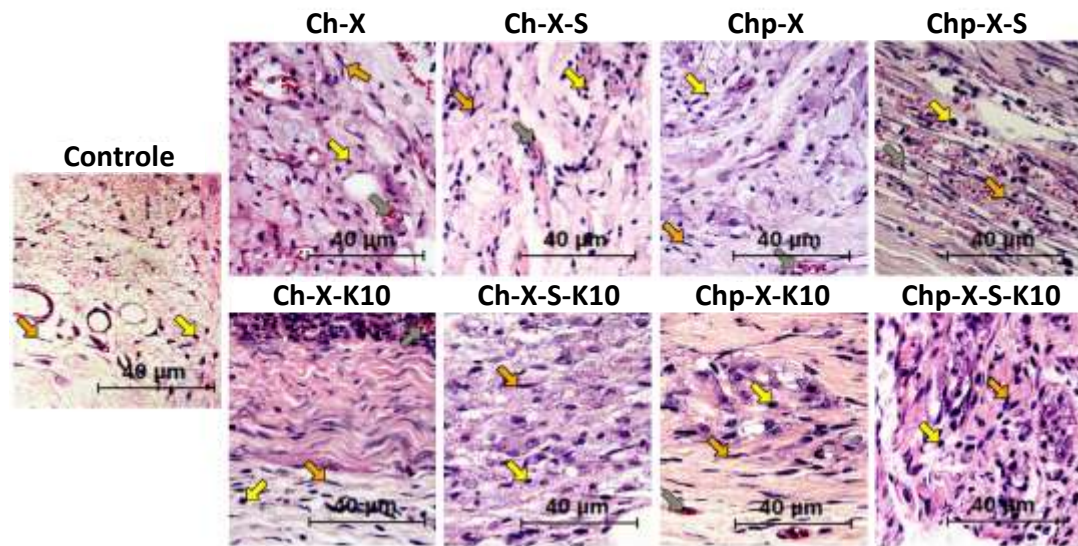


Figura 3.20: Fotomicrografias representativas das quantificações de infiltrado inflamatório (setas amarelas), fibroblastos (setas alaranjadas) e vasos sanguíneos (setas acizentadas) para tecidos coletados no 60º dia de seguimento de animais tratados com *scaffolds* à base de quitosana (Ch) e quitosana fosforilada (Chp) combinada com xantana (X) preparados na presença ou não dos aditivos Silpuran® 2130 A/B (S) e Kolliphor® P188 (K) e do controle (animal sem tratamento) (coloração HE, aumento 400x).

A modulação do processo inflamatório é de extrema importância para o desenvolvimento do reparo ósseo e envolve a liberação controlada de complexa cascata de sinais pró-inflamatórios e fatores de crescimento que recrutam células inflamatórias e promovem angiogênese (Mountziaris e Mikos, 2008).

O infiltrado inflamatório apresenta número representativo de macrófagos e uma das funções desse tipo celular é a síntese das citocinas EGF (fator de crescimento epidérmico), FGF (fator de crescimento dos fibroblastos), que favorecem a quimiotaxia e proliferação de fibroblastos e queratinócitos, e PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas) que, além dessas funções, está envolvido no *turnover* do colágeno, com a degradação do colágeno tipo I e síntese do colágeno III (Balbino *et al.*, 2005; Isaac *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2016). Uma vez que fibroblastos estão envolvidos na síntese de colágeno, que reestabelece a matriz extracelular lesionada, o resultado observado com a formulação Ch-X-K10 pode indicar que esta apresenta efeitos positivos na remodelação do osso. Baum e Arpey (2005) retratam que os macrófagos que permanecem na área lesionada favorecem as fases subsequentes de cicatrização de feridas, incluindo a formação de colágeno, angiogênese e reepitelização.

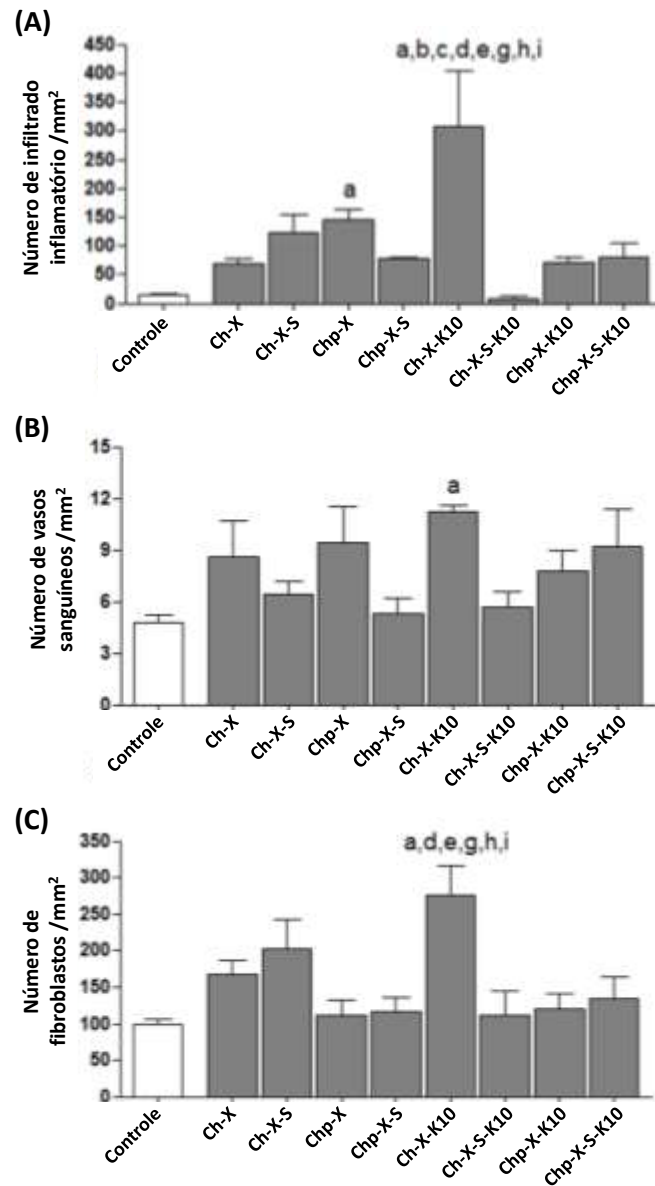


Figura 3.21: Análise histomorfométrica. (A) Média do número de infiltrado inflamatório, (B) de vasos sanguíneos e (C) de fibroblastos dos grupos controle (defeito ósseo sem *scaffold*) e tratamento com *scaffolds* à base de quitosana (Ch) e quitosana fosforilada (Chp) combinada com xantana (X) preparados na presença ou não dos aditivos Silpuran[®] 2130 A/B (S) e Kolliphor[®] P188 (K) no 60º dia de seguimento (ANOVA One-way e Tukey pós-teste entre cada grupo). Resultados expressos como a média \pm desvio padrão da média. Letras nas barras dos gráficos correspondem a $p < 0,05$ em relação ao grupo correspondente, considerando-se as seguintes representações: (a) Controle, (b) Ch-X, (c) Ch-X-S, (d) Chp-X. (e) Chp-X-S, (f) Ch-X-K10, (g) Ch-X-S-K10, (h) Chp-X-K10 e (i) Chp-X-S-K10.

Também citocinas inflamatórias estão envolvidas na remodelação do osso e executam um papel muito importante no reparo pós lesão. A IL-6 e o TNF- α se destacam logo no início do reparo ósseo e, na lesão óssea, recrutam células inflamatórias, aumentam a síntese da matriz extracelular e estimulam a angiogênese (Wong *et al.*, 2001). São secretadas no local da lesão por macrófagos, sendo que as expressões de IL-1 e IL-6 aumentam durante a formação do osso, enquanto que a expressão do TNF- α aumenta em associação com a reabsorção da cartilagem mineralizada até ao final da fase de reparação da fratura endocondral (Gerstenfeld *et al.*, 2003).

A vascularização apresenta importante papel no desenvolvimento, remodelação e homeostasia do osso e é essencial para a diferenciação celular, presença de citocinas e fatores de crescimento envolvidos na remodelação óssea (Saran *et al.*, 2014). Os resultados encontrados neste estudo apontam para maior eficácia dos *scaffolds* com formulação Ch-X-K10 e Chp-X, promovendo maior angiogênese e conseqüentemente melhor remodelação óssea. No entanto, estudos adicionais são necessários em outros tempos de seguimento, por exemplo, 30, 90 e 120 dias.

O aspecto visual das lesões após 60 dias é mostrado na Figura 3.22. Pode-se observar que, em alguns animais a lesão se mostra, aparentemente, já fechada após o período do estudo (Figura 3.22). No entanto em outros animais, podendo ser eles pertencentes ao mesmo grupo que aquele nos quais se observou aparente fechamento da lesão ou não, observou-se, macroscopicamente, no momento da coleta das amostras, um tecido fibroso atípico na área do defeito ósseo. Cortes histológicos mostraram que o tecido estava formado por intenso infiltrado inflamatório com presença de alguns vasos sanguíneos e fibroblastos (Figura 3.23), parecendo representar uma resposta tecidual anormal na presença do material. Vale ressaltar que os animais do grupo controle não apresentaram a formação de tecido fibroso.

Quanto ao aspecto dos *scaffolds* após o período do estudo, pode-se afirmar que não havia dispositivo íntegro em nenhum dos animais, ou seja, o material já havia sido degradado e reabsorvido em 60 dias.



Figura 3.22: Aspecto visual das lesões 60 dias após realizado o defeito na calota craniana de ratos. *Scaffolds* à base de quitosana (Ch) e quitosana fosforilada (Chp) combinada com xantana (X) preparados na presença ou não dos aditivos Silpuran[®] 2130 A/B (S) e Kolliphor[®] P188 (K) foram utilizados no tratamento das lesões. As setas verdes indicam regiões onde houve fechamento da lesão, as vermelhas mostram lesões não fechadas e as amarelas, tecido fibroso.

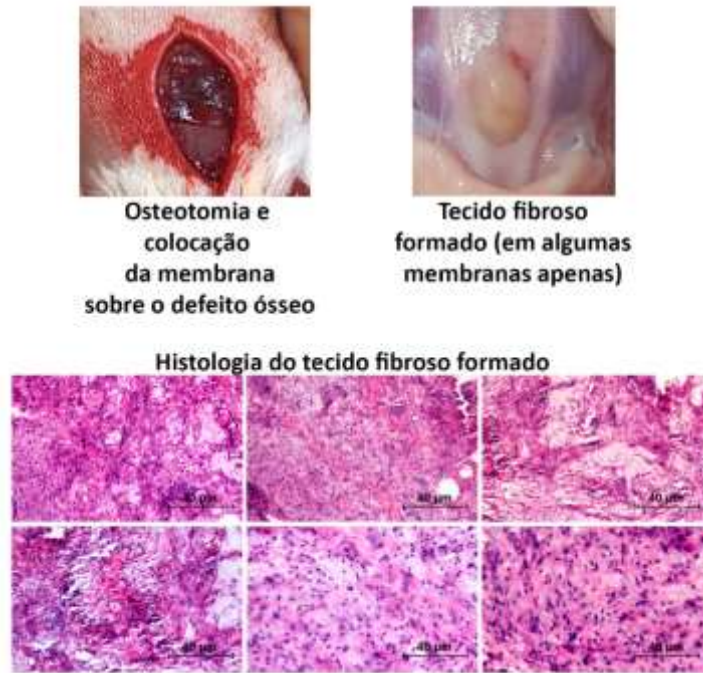


Figura 3.23: (A) Imagem representando a osteotomia (lesão na calota craniana) e representação da instalação das membranas no local do defeito ósseo. Algumas membranas, ou *scaffolds*, apresentaram atipicamente formação de um tecido fibroso no local da osteotomia. Imagens histológicas realizadas do tecido fibroso coletado de um rato do grupo tratado com o *scaffold* Chp-X-S-K10 estão representadas logo abaixo das fotografias (aumento de 400x).

3.3.3. Conclusão

O teste *in vivo* demonstrou a capacidade dos *scaffolds* de atuarem na promoção da restauração de lesões cranianas em ratos. Houve a formação de um tecido fibroso atípico na área do defeito ósseo para algumas formulações, no entanto, as análises realizadas são inconclusivas no que diz respeito à origem, constituição ou mesmo às implicações da formação desse tecido.

Com base nas análises realizadas até o momento, não se pode chegar a afirmações conclusivas devido a não reprodutibilidade dos resultados observados para uma mesma formulação, sendo requeridos estudos futuros mais detalhados e aprofundados para se alcançar conclusões de caráter mais elaborado.

Capítulo 4:
ANÁLISE CONJUNTA DOS
RESULTADOS

4. ANÁLISE CONJUNTA DOS RESULTADOS

Este trabalho visou à obtenção de *scaffolds* constituídos fundamentalmente de polissacarídeos para serem aplicados na regeneração do tecido ósseo guiada pelo periósteo. De modo geral, foi possível obter matrizes de quitosana (quimicamente modificada ou não) complexada com xantana e combinada ou não com um agente porogênico e um gel de silicone, com propriedades que as tornam atrativas para a aplicação desejada.

Foi possível observar que a adição tanto de 10% quanto de 25% (m/m) do surfatante Kolliphor® P188 às matrizes de quitosana-xantana resultou em materiais altamente porosos, com poros de tamanho na faixa de 733 a 1050 μm . Quanto menor a quantidade de surfatante utilizada para preparar a matriz, maior é a resistência mecânica do material.

A fosforilação da quitosana e sua combinação com a xantana resultou em matrizes íntegras, com aspecto e porosidade similar à dos dispositivos produzidos com quitosana não modificada, estando o tamanho médio dos poros localizado na faixa de 850 a 1097 μm para formulações porosas produzidas com 10% (m/m) do surfatante. Devido ao fato de a quitosana fosforilada obtida ser apenas parcialmente solúvel em água ou em solução levemente ácida, pode-se afirmar que se obteve um material compósito, constituído de duas fases.

A adição de 10% (m/m) do gel silicone Silpuran 2130® A/B acarretou em uma melhoria das propriedades mecânicas dos *scaffolds*, comprovada pelo aumento do módulo de elasticidade dos materiais contendo o composto quando comparados às respectivas formulações preparadas sem o silicone, tanto em modo de compressão quanto de tensão. Observou-se ainda, pela análise dos dados dos testes de compressão, que valores muito maiores de módulo de elasticidade foram obtidos para formulações densas de quitosana fosforilada e xantana (Chp-X e Chp-X-S) em comparação a todas as demais. Isto pode estar associado ao fato de que, como discutido na seção 3.2, nas formulações contendo quitosana fosforilada tem-se maior entrelaçamento e empacotamento das cadeias poliméricas devido a interações eletrostáticas entre grupos fosfato e amino presente nas cadeias de quitosana, acarretando em maior rigidez da estrutura da matriz.

Devido a esse maior empacotamento da estrutura, a penetração de água na matriz das formulações contendo quitosana fosforilada é inferior, o que reflete em sua menor capacidade de absorção de água, em torno de 2 a 3 vezes menor, no caso das formulações densas, em

comparação à das matrizes produzidas com quitosana não modificada.

De maneira geral, a presença do gel de silicone nas matrizes não afetou negativamente suas propriedades relacionadas a aspectos considerados importantes para sua aplicação como *scaffolds*, como absorção e estabilidade em meio de cultura, porosidade, trombogenicidade e citotoxicidade. Essas características dos *scaffolds* produzidos, juntamente com outras analisadas, como a rugosidade, são adequadas para promover crescimento celular e osseogênese. Além disso, o tempo de degradação dos materiais é relativamente longo, o que sugere que estes eles forneceriam um ambiente estável durante tempo suficiente para o crescimento celular e regeneração do tecido periosteal e, portanto, para o tratamento da lesão óssea.

Os *scaffolds* produzidos com a quitosana fosforilada apresentaram maior potencial de adsorção de citocromo C, uma proteína que mimetiza proteínas morfogenéticas ósseas, indicando que estes materiais seriam capazes de concentrar BMPs nativas no local da lesão, quando numa aplicação *in vivo*, e assim induzir a diferenciação de células tronco locais em osteoblastos.

Não foi observado efeito citotóxico considerável dos materiais em células tronco do tecido adiposo (ADSC), endoteliais vasculares (VEC), fibroblastos (HDF) ou osteoblastos (Saos-2), o que constitui um indício de que os mesmos são biologicamente compatíveis e, portanto, promissores para a aplicação proposta.

Os estudos realizados *in vitro* com as formulações contendo quitosana fosforilada, referentes à adesão, proliferação, viabilidade, diferenciação de ADSC em osteoblastos e mineralização mostraram que, apesar de possuírem características favoráveis ao crescimento celular, demonstradas pelas caracterizações anteriores, os *scaffolds* não propiciaram o desempenho esperado das células cultivadas sobre sua superfície, uma vez que grande parte dessas células não foi capaz de aderir e proliferar como previsto. No entanto, observou-se elevada deposição de minerais e formação de matriz extracelular por meio do estudo de mineralização, sugerindo que estes materiais teriam capacidade osteoindutiva e osteogênica.

O teste piloto realizado *in vivo* demonstrou a capacidade dos *scaffolds* de atuarem na promoção da restauração de lesões cranianas em ratos. Houve a formação de um tecido fibroso atípico na área do defeito ósseo para algumas formulações, no entanto, as análises realizadas são inconclusivas no que diz respeito à origem e constituição desse tecido. Além disso, constatou-se a

necessidade de estudos futuros mais aprofundados para que se possa chegar a conclusões mais elaboradas, uma vez que não se verificou alta reprodutibilidade nos resultados obtidos e nem mesmo foi possível estabelecer uma correlação com os resultados dos estudos realizados *in vitro*.

Apesar dos resultados pouco conclusivos dos ensaios preliminares realizados *in vivo*, considerando-se todos os dados gerados nesse estudo e avaliando-se os resultados obtidos dentro de um panorama geral, pode-se afirmar que os *scaffolds* produzidos mostraram potencial para serem usados em outras aplicações além daquela proposta neste trabalho. Suas propriedades podem ser ajustadas de modo a direcionar seu uso para uma aplicação específica na engenharia de tecidos, alterando-se a proporção do surfatante e a presença do gel de silicone na matriz, e até mesmo optando-se pela utilização da quitosana fosforilada ou não modificada para a produção dos materiais. Com isso, altera-se, por exemplo, a rigidez e flexibilidade do material, sua porosidade, molhabilidade e comportamento em ambiente fisiológico, como absorção de fluidos, estabilidade, expansão volumétrica, adsorção de proteínas e capacidade de mineralização.

Apesar de estar disponível na literatura uma vasta gama de estudos acerca da produção de biomateriais projetados para a terapia de lesões ósseas, a utilização dos princípios da engenharia de tecidos no desenvolvimento de biomateriais especificamente voltados para a substituição do periósteo, que atuem como *scaffolds* promovendo a regeneração do tecido afetado, ainda é pouco explorada. Portanto, com a realização do presente trabalho foi possível contribuir para a ampliação dessa área de conhecimento e demonstrar que a abordagem utilizada se mostra promissora para esta aplicação.

Capítulo 5:

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Analisando-se o panorama completo deste trabalho, pode-se concluir que os materiais produzidos são promissores para aplicação na engenharia de tecidos como um todo, não só na engenharia periosteal, uma vez que suas características se adéquam aos requisitos para tal aplicação, podendo estas ser adaptadas e melhoradas para um uso específico pela alteração de sua composição ou formulação. Apesar de o desempenho celular sobre os *scaffolds* não ter se mostrado tão efetivo quanto o que era esperado, considerando as expectativas geradas pela caracterização inicial do material, pode-se afirmar que, ainda assim, a ausência de toxicidade a diversos tipos celulares caracteriza uma importante e fundamental propriedade, que os torna atraentes para o estudo de modificações químicas adicionais ou tratamentos superficiais simples que favoreçam o crescimento celular.

O ensaio piloto *in vivo* demonstrou que os *scaffolds* produzidos têm potencial para promover a recuperação de lesões ósseas, no entanto, um estudo mais sistemático é necessário, a fim de se compreender como a composição dos materiais afeta de fato o processo de cura da lesão. Além disso, é de extrema importância se investigar com maior detalhamento a origem e composição do tecido fibroso observado em alguns animais utilizados no estudo, para melhor entendimento acerca dos mecanismos envolvidos no reparo da lesão, isto é, quais etapas do processo de cicatrização óssea são ou não afetados pela presença do material.

Capítulo 6:
SUGESTÕES PARA
TRABALHOS FUTUROS

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Trabalhos futuros para promover melhorias ou esclarecimentos a respeito de alguns resultados originados do presente estudo podem ser vislumbrados, sendo estes listados a seguir:

- a) Utilização de quitosana de menor massa molar para se realizar a modificação química, ou fosforilação. Com isso, espera-se a obtenção de um produto solúvel em água, o que seria vantajoso, pois assim se dispensaria o uso de ácido acético para solubilização da quitosana. Como consequência, o material final obtido seria mais homogêneo, composto de apenas uma fase, e não apresentaria resíduo ácido, sendo necessárias menos etapas de lavagem durante sua fabricação. Nesse caso, se também for utilizado o surfatante para a produção do dispositivo, é possível que ele permaneça em sua estrutura devido à redução do número de lavagens. Assim, é recomendável avaliar a presença desse composto na matriz, uma vez que PEO e PPO são considerados antiaderentes de células e, por isso, poderiam afetar negativamente a adesão celular.
- b) Estudo do efeito do uso de quitosanas fosforiladas com diferentes graus de substituição na produção dos *scaffolds* e em suas propriedades. O grau de substituição pode ser controlado alterando-se a quantidade relativa dos reagentes utilizados no procedimento de fosforilação realizado no presente trabalho, por exemplo, quanto maior a quantidade de P_2O_5 utilizada, maior é o grau de substituição esperado. Além disso, podem ser utilizados outros métodos para a introdução dos grupos fosfato na estrutura da quitosana, visando à substituição de grupos hidroxila e amino, ou somente um deles.
- c) Produção de *scaffolds* porosos utilizando-se a técnica de lixiviação de sal (*solvent casting – particulate leaching*) em combinação com o uso do tensoativo Kolliphor[®] P188, a fim de se obter poros interconectados, que seriam vantajosos para a proliferação celular no material.
- d) Utilização do fator de crescimento transformador β (TGF- β) para o ensaio de adsorção de proteína. Como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) pertencem à superfamília dos fatores de crescimento TGF- β , seria interessante, como análise complementar à realizada com

o citocromo C, avaliar a cinética de adsorção dessa proteína nos *scaffolds* produzidos, a fim de se fazer uma analogia ao comportamento dos materiais em relação às BMPs nativas locais *in vivo*.

e) Realização do teste de biodegradação *in vitro* com lisozima por um período mais prolongado, de 3 meses ou mais, por exemplo, melhor simulando o período de recuperação de lesões ósseas de maior porte, uma vez que durante o período estudado no presente trabalho, 25 dias, não se observou a degradação do material.

f) Tratamento superficial ou modificação da superfície dos *scaffolds* a fim de favorecer a adesão e proliferação celular, por meio do aumento da hidrofiliabilidade e redução da rugosidade, por exemplo, ou da introdução de moléculas que promovam a osteogênese. Para isso, sugere-se a modificação da superfície por tratamento com plasma (Luna *et al.*, 2011), funcionalização (Hansson *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016), recobrimento com outros polímeros naturais (Zhen *et al.*, 2016) ou deposição de nanofibras (Seung-Yun *et al.*, 2005; Saad *et al.*, 2017).

g) Utilização de diferentes células mesenquimais, diferenciadas ou pré-diferenciadas para realização dos ensaios *in vitro*. Um estudo comparativo entre os resultados obtidos neste trabalho com resultados utilizando-se outros tipos celulares, por exemplo células-tronco provenientes da polpa dentária ou mesmo do próprio periósteo, seria interessante para se verificar possíveis diferenciais na qualidade do tecido ósseo formado.

h) Análise do comportamento de células inoculadas em dispositivos submetidos a estímulos cíclicos, capazes de simular os movimentos do corpo, como uma caminhada, por exemplo. Esta análise seria de interesse, pois a indução da diferenciação celular ocorre não somente na presença de compostos químicos, mas também por meio de estímulos mecânicos.

Capítulo 7:
REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- A.D.A.M. Illustrated Medical Encyclopedia: Periosteum. Disponível em: <<http://reidhosp.adam.com/content.aspx?productId=39&pid=1&gid=002280>>. Acesso em: 08/01/2018.
- Adekogbe, I.; Ghanem, A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials* 26 (2005) 7241-7250.
- Aguiar, A.; Bertran, C. Synthesis and characterization of mineralized films from xanthan and chitosan hydrogels by layer-by-layer and dip-coating methods. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress (2016).
- Allen, M.R.; Hock, J.M.; Burr, D.B. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone*, 35 (2004) 1003-1012.
- Altman, S.A.; Randers, L.; Rao, G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Journal of Biotechnology* 9 (1993) 671-674.
- Amaral, I.F.; Granja, P.L.; Barbosa, M.A. Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 16 (2005) 1575-1593.
- Andrades, J.A.; Claros, S.; Jiménez-Palomo, P.; López-Puertas, J.M.; Zamora-Navas, P.; Guerado, E.; Monleón, M.; Araque, M.C.; Becerra, J. Skeletal Regeneration by Mesenchymal Stem Cells: What Else?. In: Eberli, D. (Ed.). *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. InTech (2011) Cap. 5. ISBN: 978-953-307-663-8.
- Ateshian, G.A.; Soslowsky, L.J.; Mow, V.C. Quantitation of articular surface topography and cartilage thickness in knee joints using stereophotogrammetry. *Journal of Biomechanics* 24 (1991) 761-776.
- Ayuob, N.N.; Ali, S.S. Cell-Cell Interactions and Cross Talk Described in Normal and Disease Conditions: Morphological Approach. In: *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. Gowder, S. (Ed); IntechOpen (2012) Chapter 8 downloaded from: <http://www.intechopen.com/books/cell-interaction>
- Bacakova, L.; Filova, E.; Parizek, M.; Ruml, T.; Svorcik, V. Modulation of cell adhesion,

- proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* 29 (2011) 739-767.
- Balbino, C.A.; Pereira, L.M.; Curi, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 41(2005) 27-51.
- Barbanti, S.H.; Zavaglia, C.A.C.; Duek, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 15 (2005) 13-21.
- Barton, M.; Piller, S.C.; Mahns, D.A.; Morley, J.W.; Mawad, D.; Longo, D.; Lauto, A. In vitro cell compatibility study of rose bengal–chitosan adhesives. *Lasers in Surgery and Medicine* 44 (2012) 762-768.
- Baum, C.L.; Arpey, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic Surgery* 31 (2005).
- Beck, G.R. Jr.; Zerler, B.; Moran, E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Science. PNAS-U.S.A.* 97 (2000) 8352-8357.
- Bellini, M.Z.; Caliarí-Oliveira, C.; Mizukami, A.; Swiech, K.; Covas, D.T.; Donadi, E.A.; de Oliva-Neto, P.; Moraes, Â.M. Combining xanthan and chitosan membranes to multipotent mesenchymal stromal cells as bioactive dressings for dermo-epidermal wounds. *Journal of Biomaterials Applications* 29 (2014) 1155-1166.
- Bellini, M.Z.; de Oliva-Neto, P.; Moraes, Â.M. Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 58 (2015) 289-299.
- Bellini, M.Z.; Pires, A.L.R.; Vasconcelos, M.O.; Moraes, Â.M. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science* 125 (2012) E421-E431.
- Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; Felt, O.; Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 35-52.
- Betts, J.G.; DeSaix, P.; Johnson, E.; Johnson, J.E.; Korol, O. *Anatomy and Physiology*, OpenStax, Rice University: United States, Chapter 6: Bone tissue and the skeletal system (2013) 213-245. Available from: <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology>.
- Bierhalz, A.C.K.; Moraes, A.M. Tuning the properties of alginate–chitosan membranes by

- varying the viscosity and the proportions of polymers. *Journal of Applied Polymer Science* 133 (2016) 1-11.
- Bierhalz, A.C.K.; Westin, C.B.; Moraes, A.M. Comparison of the properties of membranes produced with alginate and chitosan from mushroom and from shrimp. *International Journal of Biological Macromolecules* 91(2016) 496-504.
- Bose, S.; Roy, M.; Bandyopadhyay, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology* 30 (2012) 546-554.
- Bouten, C.V.C.; Dankers, P.Y.W.; Driessen-Mol, A.; Pedron, S.; Brizard, A.M.A.; Baaijens, F.P.T. Substrates for cardiovascular tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 221-241.
- Boyan, B.D.; Bonewald, L.F.; Paschalis, E.P.; Lohmann, C.H.; Rosser, J.; Cochran, D.L. Osteoblastmediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcified Tissue International* 71 (2002) 519-529.
- Brachaczek, W. The modelling technology of protective silicone coatings in terms of selected physical properties: Hydrophobicity, scrub resistance and water vapour diffusion. *Progress in Organic Coatings* 77 (2014) 859-867.
- Bueno, C. Z. Influência do tipo de estratégia de reforço das propriedades mecânicas nas características de membranas de quitosana e alginato projetadas para o recobrimento de lesões de pele; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas; Campinas (2010).
- Bueno, C.Z.; Dias, A.M.A.; Sousa, H.C.; Braga, M.E.M.; Moraes, Â.M. Control of the properties of porous chitosan-alginate membranes through the addition of different proportions of Pluronic F68. *Materials Science and Engineering C* 44 (2014) 117-125.
- Bueno, C.Z.; Moraes, Â.M. Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: effect of different surfactants on biomaterial properties. *Journal of Applied Polymer Science* 122 (2011) 624-631.
- Bunnell, B.A.; Flaas, M.; Gagliardi, C.; Patel, B.; Ripoll, C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45 (2008) 115-120.
- Burr, D. B.; Guillot G. M. Almost invisible, often ignored: periosteum, the living lace of bone. *Medicographia* 34 (2012) 221-227.
- Carreira, A.C.; Alves, G.G.; Zambuzzi, W.F.; Sogayar, M.C.; Granjeiro, J.M. Bone

- Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 561 (2014) 64-73.
- Chang, H.; Wang, Y. Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds, In: *Advances in biomaterials science and biomedical applications*. D. Eberli Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2; Chapter 27 (2011) 569-588.
- Chen, Q.; Liang, S.; Thouas, G.A. Elastomeric materials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science* 28 (2013) 584-671.
- Chen, Z.C.; Wu, S.S.; Su, W.Y.; Lin, Y.C.; Lee, Y.H.; Wu, W.H.; Chen, C.H.; Wen., Z.H. Anti-inflammatory and burn injury wound healing properties of the shell of *Haliotis diversicolor*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16 (2016) 487.
- Cho, E.H.; Park, J.C.; Cha, J.K.; Kim, Y.T.; Jung, U.W.; Kim, C.S.; Choi, S.H.; Kim, C.K. Dimensional change of the healed periosteum on surgically created defects. *Journal of Periodontal & Implant Science* 41 (2011) 176-184.
- Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 3 (2008) S131-S139.
- Coviello, T.; Matricardi, P.; Marianecchi, C.; Alhaique, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulation. *Journal of Controlled Release* 119 (2007) 5-24.
- Crha, M.; Nečas, A.; Srnec, R.; Janovec, J.; Stehlík, L.; Raušer, P.; Urbanová, L.; Plánka, L.; Jančář, J.; Amler, E. Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue Regeneration and Application to Bone Healing. *Acta Veterinaria Brno* 78 (2009) 635-642.
- Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* 49 (2013) 780-792.
- Cuthbert, R.J.; Churchman, S.M.; Tan, H.B.; McGonagle, D.; Jones, E.; Giannoudis, P.V. Induced periosteum a complex cellular scaffold for the treatment of large bone defects. *Bone* 57 (2013) 484-492.
- Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R.M.; Chiellini, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 36 (2011) 981-1014.
- de Groot, K. Carriers that concentrate native bone morphogenetic protein in vivo. *Tissue Engineering* 4 (1998) 337-341.
- Devi, D.R.; Sandhya, P.; Hari, B.N.V. Poloxamer: a novel functional molecule for drug delivery and gene therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5(2013)159-165.

- Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D.S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International Journal of Polymer Science* (2011) 1-19.
- Dong, C.; Lv, Y. Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives. *Polymers* 8 (2016) 1-20.
- Dwek, J.R. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radiology* 39 (2010) 319-323.
- Dyondi, D.; Webster, T. J.; Banerjee, R. A nanoparticulate injectable hydrogel as a tissue engineering scaffold for multiple growth factor delivery for bone regeneration. *International Journal of Nanomedicine* 8 (2013) 47-59.
- Fan, T.; Chen, J.; Pan, P.; Zhang, Y.; Hu, Y.; Liu, X.; Shi, X.; Zhang, A. Bioinspired double polysaccharides-based nanohybrid scaffold for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 147 (2016) 217-223.
- Fan, W.; Crawford, R.; Xiao, Y. Enhancing in vivo vascularized bone formation by cobalt chloride-treated bone marrow stromal cells in a tissue engineered periosteum model. *Biomaterials* 31 (2010) 3580-3589.
- Florczyk, S.J.; Leung, M.; Li, Z.; Huang, J. I.; Hopper, R.A.; Zhang, M. Evaluation of three-dimensional porous chitosan-alginate scaffolds in rat calvarial defects for bone regeneration applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101 (2013) 2974-2983.
- Freier, T.; Koh, H.S.; Kazazian, K.; Shoichet, M.S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials* 26 (2005) 5872-5878.
- Gadelmawla, E.S.; Koura, M.M.; Maksoud, T.M.A.; Elewa, I.M.; Soliman, H.H. Roughness parameters. *Journal of Materials Processing Technology* 123 (2002) 133-145.
- García-Ochoa, F.; Santos, V.E.; Casas, J.A.; Gómez, E. Xanthan gum – Production, recovery and properties. *Biotechnology Advances* 18 (2000) 549-579.
- Gerstenfeld, L.C.; Cullinane, D.M.; Barnes, G.L.; Graves, D.T.; Einhorn, T.A. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry* 88 (2003) 873-884.
- Gorgieva, S; Kokol, V. Collagen- vs. gelatine-based biomaterials and their biocompatibility: review and perspectives, *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. Prof. Rosario Pignatello (Ed.), ISBN: 978-953-307-661-4, InTech (2011) Available from: <http://www.intechopen.com/books/biomaterials-applications-for-nanomedicine/collagen-vs->

- gelatine-based biomaterials- and-their-biocompatibility-review-and-perspectives
- Goycoolea, F.M.; Arguelles-Monal, W.; Peniche, C.; Higuera-Ciajara, I. Chitin and chitosan. *Novel Macromolecules in Food Systems* (2000) 265-308.
- Granjeiro, J.M.; Oliveira, R.C.; Bustos-Valenzuela, J.C.; Sogayar, M.C.; Taga, R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38 (2005) 1463-1473.
- Grobler, S.R.; A. Olivier, H.W. Kruijsse, V.T. Perchyonok, Cytotoxicity of different degrees of deacetylated chitosan on 3T3- and two human tooth fibroblast cell-lines. *International Journal of Dentistry and Oral Science* 3 (2016) 337-339.
- Hamman, J.H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Marine Drugs* 8 (2010) 1305-1322.
- Han T., Nwe N., Furuike T., Tokura S., Tamura H., Methods of N-acetylated chitosan scaffolds and its in vitro biodegradation by lysozyme. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 5 (2012) 15-23.
- Hanson, A.; Hashom, N.; Falson, F.; Rousselle, P.; Jordan, O.; Borchard, G. In vitro evaluation of an RGD-functionalized chitosan derivative for enhanced cell adhesion. *Carbohydrate Polymers* 90 (2012) 1494-1500.
- Heath, C.A. Cells for tissue engineering. *Trends in Biotechnology* 18 (2000) 17-19.
- Henry, J.M.; Frederick, S.F.; Antra, Z.T.; Farooq, J. Massive Resection and Allograft Transplantation in the Treatment of Malignant Bone Tumors. *New England Journal of Medicine* 294 (1976) 1247-1255.
- Hoffman, M.D.; Xie, C.; Zhang, X.; Benoit, D.S.W. The effect of mesenchymal stem cells delivered via hydrogel-based tissue engineered periosteum on bone allograft healing. *Biomaterials* 34 (2013) 8887-8898.
- Holzappel, B.M.; Reichert, J.C.; Schantz, J.T.; Gbureck, U.; Rackwitz, L.; Nöth, U.; Jakob, F.; Rudert, M.; Groll, J.; Hutmacher, D.W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (2013) 581-603.
- Holzappel, G.A.; Biomechanics of soft tissue. *Biomech Preprint Series* 7 (2000) 1-12.
- Horn, M.M.; Martins, V.C.A.; Plepis, A.M.G. Influence of collagen addition on the thermal and morphological properties of chitosan-xanthan hydrogels. *International Journal Biological*

- Macromolecules 80 (2015) 225-230.
- Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21 (2000) 2529-2543.
- Ikada, Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface* 3 (2006) 589-601.
- International Organization for Standardization, Biological Evaluation of Medical Devices. ISO 10993-5 (2009).
- International Osteoporosis Foundation, IOF Compendium of Osteoporosis (2017). Disponível em:<http://share.iofbonehealth.org/WOD/Compendium/IOF-Compendium-of-Osteoporosis-WEB.pdf>
- Isaac, C.; Ladeira, P.R.S.; Rego, F.M.P.; Aldunate, J.C.B.; Ferreira, M.C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Revista Médica (São Paulo)* 89 (2010) 125-131.
- Izawa, H.; Nishino, S.; Maeda, H.; Morita, K.; Ifuku, S.; Morimoto, M.; Saimoto, H.; Kadokawa, J. Mineralization of hydroxyapatite upon a unique xanthan gum hydrogel by an alternate soaking process. *Carbohydrate Polymers* 102 (2014) 846-851.
- Jayakumar, R.; Egawa, T.; Furuike, T.; Nair, S.V.; Tamura, H. Synthesis, characterization, and thermal properties of phosphorylated chitin for biomedical applications. *Polymer Engineering and Science* (2009) 844-849.
- Jayakumar, R.; Nagahama, H.; Furuike, T.; Tamura, H. Synthesis of phosphorylated chitosan by novel method and its characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 42 (2008a) 335-339.
- Jayakumar, R.; Selvamurugan, N.; Nair, S.V.; Tokura, S.; Tamura, H. Preparative methods of phosphorylated chitin and chitosan - An overview. *International Journal of Biological Macromolecules* 43 (2008b) 221-225.
- Kai, D.; Prabhakaran, M.P.; Chan, B.Q.Y.; Liow, S.S.; Ramakrishna, S.; Xu, F.; Loh, X.J. Elastic poly(ϵ -caprolactone)-polydimethylsiloxane copolymer fibers with shape memory effect for bone tissue engineering. *Biomedical Materials* 11 (2016).
- Kan, P.; Chen, Z.B.; Kung, R.Y.; Lee, C.J.; Chu, I.M. Study on the formulation of o/w emulsion as carriers for lipophilic drugs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 15 (1999) 117-125.
- Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26 (2005) 5474-5491.

- Kaveh, K.; Ibrahim, R.; Bakar, M.Z.A.; Ibrahim, T. A. Bone grafting and bone graft substitutes. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9 (2010) 1055-1067.
- Keane, T.J.; Badylak, S.F. Biomaterials for tissue engineering applications. *Seminars in Pediatric Surgery* 23 (2014) 112-118.
- Khan, F.; Ahmad, S.R. Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application. *Macromolecular Bioscience* 13 (2013) 395-421.
- Khojasteh, A.; Behnia, H.; Naghdi, N.; Esmaeelinejad, M.; Alikhassy, Z.; Stevens, M. Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: a systematic review. *Oral and Maxillofacial Surgery* 116 (2013) e405-e423.
- Khouryieh, H.A.; Herald, T.J.; Aramouni, F.; Bean, S.; Alavi, S. Influence of deacetylation on the rheological properties of xanthan-guar interactions in dilute aqueous solutions. *Journal of Food Science* 72 (2007) C173-C181.
- Kim, J.; Hwang, J.; Seo, Y.; Jo, Y.; Son, J.; Choi, J. Engineered chitosan-xanthan gum biopolymers effectively adhere to cells and readily release incorporated antiseptic molecules in a sustained manner. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 46 (2017) 68-79.
- Kim, S.; Cui, Z.-K.; Fan, J.; Fartash, A.; Aghaloo, T.L.; Lee, M. Photocrosslinkable chitosan hydrogels functionalized with the RGD peptide and phosphoserine to enhance osteogenesis. *Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine* 4 (2016) 5289-5298.
- Kong, L.; Ao, Q.; Wang, A.; Gong, K.; Wang, X.; Lu, G.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications* 22 (2007) 223-239.
- Kostenuik, P.J. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Current Opinion in Pharmacology* 5 (2005) 618-625.
- Krampera, M.; Pizzolo, G.; Aprili, G.; Franchini, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 39 (2006) 678-683.
- Kumar, A.; Rao, K.M.; Han, S.S. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydrate Polymers* 180 (2018) 128-144.
- Lander, R.; Pfister, A.; Hubner, U.; John, H.; Schmelzeisen, R.; Muhlaupt, R. Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques. *Journal of Materials Science* 37 (2002) 3107-3116.
- Langer, R.; Vacanti, J.P. Tissue Engineering. *Science* 260 (1993) 920-926.

- Lee, J.M. Tissue mechanics, Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering, John Wiley & Sons, Inc. (2006).
- Li, J.; Liu, X.; Crook, J.M.; Wallace, G.G. Development of a porous 3D graphene-PDMS scaffold for improved osseointegration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 159 (2017) 386-393.
- Li, W. J. Zhou, Y. Xu, Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports* 3 (2015) 617-620.
- Li, Z.; Ramay, H.R.; Hauch, K.D.; Xiao, D.; Zhang, M. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26 (2005) 3919-3928.
- Lian, J.B.; Stein, G.S. The cells of bone. In: *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. Seibel, M.J.; Robins, S.P.; Bilezikian, J.P. (Eds); Academic Press: San Diego (1999) 165-186.
- Lin, Z.; Fateh, A.; Salem, D.M.; Intini, G. Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration. *Journal of Dental Research* 93 (2014) 109-116.
- Liu, Y.; Lim, J.; Teoh, S. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularized bone tissue engineering. *Biotechnology Advances* 31 (2013) 688-705.
- Loh, Q.L.; Choong, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 19 (2013) 485-502.
- Lopez-Perez, P.M.; da Silva, R.M.P.; Serra, C.; Pashkuleva, I.; Reis, R.L. Surface phosphorylation of chitosan significantly improves osteoblast cell viability, attachment and proliferation. *Journal of Materials Chemistry* 20 (2010) 483-491.
- Luna, S.M.; Silva, S.S.; Gomes, M.E.; Mano, J.F.; Reis, R.L. Cell adhesion and proliferation onto chitosan-based membranes treated by plasma surface modification. *Journal of Biomaterials Applications* 26 (2011) 101-116.
- Luo, Y.; Wang, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* 64 (2014) 353-367.
- Ma, J.; Wang, H.; He, B.; Chen, J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials* 22 (2001) 331-336.
- Malafaya, P.B.; Silva, G.A.; Reis, R.L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery*

- Reviews 59 (2007) 207-233.
- Mankin, H.J.; Fogelson, F.S.; Thrasher, A.Z.; Jaffer, F. Massive resection and allograft transplantation in the treatment of malignant bone tumors. *The New England Journal of Medicine* 294 (1976) 1247-1255.
- Manoli, S.; Avranas, A. Aqueous solutions of the double chain cationic surfactants didodecyldimethylammonium bromide and ditetradecyldimethylammonium bromide with Pluronic F68: Dynamic surface tension measurements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436 (2013) 1060-1068.
- Mao, J.S.; Zhao, L.G.; Yin, Y.J.; Yao, K.D. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials* 24 (2003) 1067-1074.
- Marreco, P.R.; Da Luz Moreira, P.; Genari, S.C.; Moraes, A.M. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* 71 (2004) 268-277.
- Martino, A.D.; Sittinger, M.; Risbud, M.V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 26 (2005) 5983-5990.
- Montaño-Machado, V.; Chevallier, P.; Mantovani, D.; Pauthe, E. On the potential for fibronectin/phosphorylcholine coatings on PTFE substrates to jointly modulate endothelial cell adhesion and hemocompatibility properties. *Biomatter* 5 (2015) e979679.
- Mountziaris, P.M.; Mikos, A.G. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14 (2008) 179-86.
- Mucalo, M. R.; Kato, K.; Yokogawa, Y. Phosphorylated, cellulose-based substrates as potential adsorbents for bone morphogenetic proteins in biomedical applications: A protein adsorption screening study using cytochrome C as a bone morphogenetic protein mimic. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 71 (2009) 52-58.
- Munarin, F.; Guerreiro, S.G.; Grellier, M.A.; Tanzi, M.C.; Barbosa, M.A.; Petrini, P.; Granja, P.L. Pectin-based injectable biomaterials for bone tissue engineering. *Biomacromolecules* 12 (2011) 568-577.
- Nair, L.S.; Laurencin, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 762-798.
- Nakahara, H.; Bruder, S.P.; Haynesworth, S.E.; Holecek, J.J.; Baber, M.A.; Goldberg, V.M.;

- Caplan, A.I. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 11 (1990) 181-188.
- Nassif, L.; El Sabban, M. Mesenchymal Stem Cells in Combination with Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials* 4 (2011) 1793-1804.
- Niklason, L.E. Engineering of bone grafts. *Nature Biotechnology* 18 (2000) 929-930.
- Nishi, N.; Ebina, A.; Nishimura, S.; Tsutsumi, A.; Hasegawa, O.; Tokura, S. Highly phosphorylated derivatives of chitin, partially deacetylated chitin and chitosan as new functional polymers: preparation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 8 (1986) 311-317.
- O'Keefe, R.J.; Mao, J. Bone Tissue Engineering and Regeneration: From Discovery to the Clinic - An Overview. *Tissue Engineering: Part B* 17 (2011) 389-392.
- O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267 (2000) 5421-5426.
- Outlander Anatomy: < <https://www.outlanderanatomy.com/wp-content/uploads/2016/05/periosteum-endosteum-KLS-edited.jpg>> Acesso em 08/01/2018.
- Page, R.C.; Schroeder, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease: a summary of current work. *Laboratory Investigation: a Journal of Technical Methods and Pathology* 34 (1976) 235-249.
- Park, S.Y.; Han, B.R.; Na, K.M.; Han, D.K.; Kim, S.C. Micellization and gelation of aqueous solution of star-shaped PLLA-PEO block copolymers. *Macromolecules* 23 (2003) 4115-4124.
- Pedraza, E.; Brady A.; Fraker, C.A.; Stabler, C. L. Synthesis of macroporous poly(dimethylsiloxane) scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 24 (2013) 1041-1056.
- Pérez-Dosal, M.; Martínez-López, V.; Ruvalcaba, E.; Zarate-Triviño, D. López-Corella, E.; Ibarra, C.; Luna-Bárceñas, G.; Velasquillo, C. Osteogenic construct with potential for treatment of primary cleft palate. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – EU Meeting - Galway, Ireland* (2010).
- Pinto, S; Alves, P.; Matos, C.M.; Santos, A.C.; Rodrigues, L.R.; Teixeira, J.A.; Gil, M.H. Poly(dimethyl siloxane) surface modification by low pressure plasma to improve its

- characteristics towards biomedical applications. *Colloids and Surfaces B* 81 (2010) 20-26.
- Pires, A. L. R. Desenvolvimento de Curativos Flexíveis e Neutralizados de Quitosana e Alginato contendo Alphasan® RC 2000; Dissertação de mestrado; Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (2013).
- Pires, A.L.R.; Moraes, A.M. Improvement of the mechanical properties of chitosan-alginate wound dressings containing silver through the addition of a biocompatible silicone rubber. *Journal of Applied Polymer Science* 132 (2015) 1-9.
- Popat, K.C.; Chatvanichkul, K-I.; Barnes, G.L.; Latempa Jr., T.J.; Grimes, C. A.; Desai, T. A. Osteogenic differentiation of marrow stromal cells cultured on nanoporous alumina surfaces *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2006) 955-964.
- Pulyala, P.; Singh, A.; Dias-Netipanyj, M. F.; Cogo, S.C.; Santos, L.S.; Soares, P.; Gopal, V.; Suganthan, V.; Manivasagam, G.; Popat, K. C. In vitro cell adhesion and proliferation of adipose derived stem cell on hydroxyapatite composite surfaces. *Materials Science and Engineering C* 75 (2017) 1305-1316.
- Rao, R.R.; Stegemann, J.P. Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytotherapy* 15 (2013) 1309-1322.
- Rapp, S.J.; Jones, D.C.; Gerety, P.; Taylor, J.A. Repairing critical-sized rat calvarial defects with progenitor cell-seeded acellular periosteum: a novel biomimetic scaffold. *Surgery* 152 (2012) 595-605.
- Ratakonda, S.; Sridhar, U.M.; Rhinehart, R.R.; Madihally, S.V. Assessing viscoelastic properties of chitosan scaffolds and validation with cyclical tests. *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 1566-1575.
- Ratcliffe, A.; Butler, D.L.; Dymont, N.A.; Cagle Jr., P.J.; Proctor, C.S.; Ratcliffe, S.S.; Flatow, E.L. Scaffolds for tendon and ligament repair and regeneration. *Annals of Biomedical Engineering* 43 (2015) 819-831.
- Ratner, B.D. Chapter I.1.6.: Role of water in biomaterials. In: *Biomaterials science - An introduction to materials in medicine*, 3rd ed.; B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.G. Schoen, J.E. Lemons, Eds.; Elsevier: Amsterdam (2013) 55-59.
- Reintjes, T. Chapter 10: Kolliphor™ P grades (Poloxamers). In: *Solubility Enhancement with BASF Pharma polymers: Solubilizer compendium*; Reintjes, T., Ed., BASF SE – Pharma Ingredients and Services: Alemanha (2011) 103-111.

- Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31 (2006) 603-632.
- Rizzoli, R.; Bonjour, J.P. Physiology of calcium and phosphate homeostasis. In: *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. Seibel, M.J.; Robins, S.P.; Bilezikian, J.P. (Eds); Academic Press: San Diego (1999) 247-260.
- Rodan, G.A.; Martin, T. J. Therapeutic Approaches to Bone Diseases. *Science* 289 (2000) 1508-1514.
- Rodrigues, A.P.; Sanchez, E.M.S.; Costa, A.C.; Moraes, A.M. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science* 109 (2008) 2703-2710.
- Roy, T.D.; Simon, J.L.; Ricci, J.L.; Rekow, E.D.; Thompson, V.P.; Parsons, J.R. Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 66 (2003) 283-91.
- Ruckh, T.T.; Carroll, D.A.; Weaver, J.R.; Papat, K.C. Mineralization content alters osteogenic responses of bone marrow stromal cells on hydroxyapatite/polycaprolactone composite nanofiber scaffolds. *Journal of Functional Biomaterials* 3 (2012) 776-798.
- Ruckh, T.T.; Kumar, K.; Kipper, M.J.; Papat, K.C. Osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells on poly(ϵ -caprolactone) nanofiber scaffolds. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 2949-2959.
- Saad, B.Q.; Shariq, N.; Robin, M. D-S.; Andrew, R.; IhteschanUr, R. Potential of electrospun chitosan fibers as a surface layer in functionally graded GTR membrane for periodontal regeneration. *Dental Materials* 33 (2017) 71-83.
- Salerno, A.; Pascual, C.D. Bio-based polymers, supercritical fluids and tissue engineering, *Process Biochemistry* 50 (2015) 826-838.
- Salgado, A.J.; Coutinho, O.P.; Reis, R.L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromolecular Bioscience* 4 (2004) 743-765.
- Salgado, C.L.; Sanchez, E.M.S.; Mano, J.F.; Moraes, A.M. Characterization of chitosan and polycaprolactone membranes designed for wound repair application. *Journal of Materials Science* 47 (2012) 659-667.
- Saran, U.; Gemini, P.S.; Chatterjee, S. Role of angiogenesis in bone repair. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 561 (2014) 109-117.

- Seeman, E.; Periosteal bone formation—a neglected determinant of bone strength. *New England Journal of Medicine* 349 (2003) 320-323.
- Seung-Yun, S.; Ho-Nam, P.; Kyoung-Hwa, K.; Myung-Hee, L.; Young, S.C.; Yoon-Jeong, P.; Young-Moo, L.; Young, K.; In-Chul, R. Soo-Boo, H.; Seung-Jin, L.; Chong-Pyoung, C. Biological Evaluation of Chitosan Nanofiber Membrane for Guided Bone Regeneration *Journal of Periodontology* 76 (2005), 1778-1784.
- Shaker, J.L. Paget's Disease of Bone: A Review of Epidemiology, Pathophysiology and Management. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 1 (2009) 107-125.
- Shi, X.; Chen, S.; Zhao, Y.; Lai, C.; Wu, H. Enhanced Osteogenesis by a Biomimic Pseudo-Periosteum-Involved Tissue Engineering Strategy. *Advanced Healthcare Materials* 2 (2013) 1229-1235.
- Simonacci, F.; Bertozzi, N.; Raposio, E. Off-label use of adipose-derived stem cells. *Annals of Medicine and Surgery* 24 (2017) 44-51.
- Souza, R.F.B.; Souza, F.C.B.; Moraes, Â.M. Analysis of the performance of polysaccharide membranes in aqueous media as a tool to assist wound dressing selection. *Journal of Applied Polymer Science* 134 (2017) 45386.
- Souza, R.F.B.; Souza, F.C.B.; Moraes, Â.M. Polysaccharide-based membranes loaded with erythromycin for application as wound dressings. *Journal of Applied Polymer Science* 133 (2016) 43428.
- Sperling, C.; Fischer, M.; Maitz, M.F.; Werner, C. Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes. *Biomaterials* 30 (2009) 4447-4456.
- Su, W.T.; Chiou, W.L.; Yu, H.H.; Huang, T.Y. Differentiation potential of SHEDs using biomimetic periosteum containing dexamethasone. *Materials Science and Engineering C* 58 (2016) 1036-1045.
- Syed-Picard, F.N.; Shah, G.A.; Costello, B.J.; Sfeir, C. Regeneration of periosteum by human bone marrow stromal cell sheets. *Dental implants* 72 (2014) 1078-1083.
- Tachaboonyakiat, W.; Netswasdi, N.; Srakaew, V.; Opaprakasit, M. Elimination of inter- and intramolecular crosslinks of phosphorylated chitosan by sodium salt formation. *Polymer Journal* 42 (2010) 148-156.
- Taichman, R.S. Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem cell niche. *Blood* 105 (2005) 2631-2639.

- Tatsuyama, K.; Maezawa, Y.; Baba, H.; Imamura, Y.; Fukuda, M. Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone. *European Journal of Histochemistry* 44 (2000) 269-278.
- Tejeda-Montes, E.; Smith, K.H.; Rebollo, E.; Gómez, R.; Alonso, M.; Rodrigues-Cabello, J.C.; Engel, E.; Mata, A. Bioactive membranes for bone regeneration applications: Effect of physical and biomolecular signals on mesenchymal stem cell behavior. *Acta Biomaterialia* 10 (2014) 134-141.
- Thein-Han, W.W.; Misra, R.D.K. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 1182-1197.
- Torres, A.L.; Gaspar, V.M.; Serra, I.R.; Diogo, G.S.; Fradique, R.; Silva, A.P.; Correia, I.J. Bioactive polymeric-ceramic hybrid 3D scaffold for application in bone. *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 4460-4469.
- Tsai, F.C.; Liao, C.K.; Fong, T.H.; Lin, J.Y.; Wu, S.T. Analysis of nasal periosteum and nasofrontal suture with clinical implications for dorsal nasal augmentation. *Plastic and Reconstructive Surgery* 126 (2010) 1037-1047.
- Veiga, I.G.; Moraes, A.M. Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes. *Journal of Applied Polymer Science* 124 (2012) E154-E160.
- Venkatesan, J.; Pangestuti, R.; Qian, Z.; Ryu, B.; Kim, S. Biocompatibility and alkaline phosphatase activity of phosphorylated chitooligosaccharides on the osteosarcoma MG63 cell line. *Journal of Functional Biomaterials* 1 (2010) 3-13.
- Wacker Chemie AG: Healthcare – Wound Care. Silicones for wound care. Disponível em: <http://www.wacker.com/cms/media/publications/downloads/6365D_EN.pdf> Acesso em 08/01/2018.
- Wang, X.; Ma, J.; Wang, Y.; He, B. Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements. *Biomaterials* 22 (2001) 2247-2255.
- Wang, Y.; Robertson, J.L.; Spillman, W.B.; Claus, R.O. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *Pharmaceutical Research* 21 (2004) 1362-1373.
- Westin, C.B.; Trinca, R.B.; Zuliani, C.; Coimbra, I.B.; Moraes Â.M. Differentiation of dental pulp stem cells into chondrocytes upon culture on porous chitosan-xanthan scaffolds in the

- presence of kartogenin. *Materials Science and Engineering C* 80 (2017) 594-602.
- Weyermann, J.; Lochmann, D.; Zimmer, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics* 288 (2005) 369-376.
- Wheater, G.; Elshahaly, M.; Tuck, S.P.; Datta, H.K.; van Laar, J.M. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *Journal of Translational Medicine* 11 (2013) 201.
- Wong, C.K.; Ho, C.Y.; Ko, F.W.; Chan, C.H.; Ho, A.S.; Hui, D.S.; Lam, C.W. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clinical & Experimental Immunology* 125 (2001) 177-183.
- Wu, S.; Liu, X.; Yeung, K.W.K.; Liu, C.; Yang, X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 80 (2014) 1-36.
- Yang, B.; Yin, Z.; Cao, J.; Shi, Z.; Zhang, Z.; Song, H.; Liu, F.; Catterson, B. In vitro cartilage tissue engineering using cancellous bone matrix gelatin as a biodegradable scaffold. *Biomedical Materials* 5 (2010) 1-8.
- Yang, S.; Leong, K.; Du, Z.; Chua, C. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering* 7 (2001) 679-689.
- Zhang, D.; Gao, P.; Li, Q; Li, J; Li, X; Liu, X.; Kang, Y.; Ren, L. Engineering biomimetic periosteum with β -TCP scaffolds to promote bone formation in calvarial defects of rats. *Stem Cell Research & Therapy* 8:134 (2017) 1-11.
- Zhang, H.; Zhou, L.; Zhang, W. Control of scaffold degradation in tissue engineering: A Review. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 20 (2014) 492-502.
- Zhang, X.; Awad, H.A.; O'Keefe, R.J.; Guldborg, R.E.; Schwarz, E.M. A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 466 (2008) 1777-1787.
- Zhao, D.; Xu, J.; Wang, L.; Du, J.; Dong, K.; Wang, C.; Liu, X. Study of Two Chitosan Derivatives Phosphorylated at Hydroxyl or Amino Groups for Application as Flocculants. *Journal of Applied Polymer Science* 125 (2012) E299-E305.
- Zhen, Z.; Xian, C.; Yao, Y.; Jiabin, L.; Qingming, T.; Hongling, W.; Sihan, L.; Changjun, H.; Qingsong, W.; Lili, C. Electrophoretic deposition of chitosan/gelatin coatings with controlled porous surface topography to enhance initial osteoblast adhesive responses. *Journal of Materials Chemistry B* 4 (2016) 7584-7595.

APÊNDICE A

Neste apêndice são descritas as metodologias detalhadas para a fosforilação da quitosana, fabricação dos *scaffolds* e avaliação das propriedades mecânicas.

A.1. Fosforilação da Quitosana

A fosforilação da quitosana a ser utilizada para a produção dos *scaffolds* foi fosforilada pelo método $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{Et}_3\text{PO}_4/\text{hexanol}$ (ácido fosfórico/ pentóxido de fósforo/ trietil fosfato/ hexanol), com base no procedimento descrito por Jayakumar *et al.* (2008a) e adaptado por Venkatesan *et al.* (2010).

Inicialmente, 20 mL de 1-hexanol foram adicionados a 6 g de quitosana contida em um reator de vidro encamisado de volume total de 70 mL. Em seguida, foi adicionada uma mistura de 10 g de P_2O_5 , 5 mL de H_3PO_4 e 5 mL de Et_3PO_4 , preparada separadamente. O reator foi então fechado e mantido a temperatura de 35 °C, utilizando-se para isso um banho termostático (Modelo 214 M2, Quimis). O aparato foi posicionado sobre uma mesa agitadora do tipo Kline (Modelo Q225K, Quimis) e a agitação foi mantida a 150 rpm por 72 horas. Após esse período, a mistura reacional, de coloração marrom-avermelhada, foi lavada com excesso de metanol e filtrada a vácuo em papel filtro (tamanho de poro 20 μm). O pó recuperado permaneceu na capela durante 24 horas para garantir a remoção do solvente. As etapas descritas neste procedimento são ilustradas na Figura A.1.

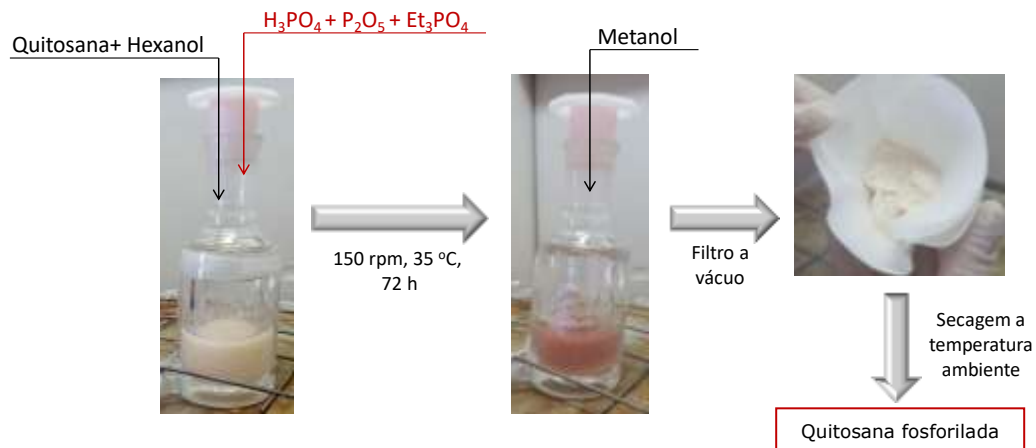


Figura A.1: Esquema representando as etapas do procedimento para fosforilação da quitosana.

A.2. Fabricação dos *scaffolds*

As matrizes densas e porosas foram preparadas de acordo com adaptações dos procedimentos descritos por Bellini *et al.* (2012), utilizando-se a razão mássica Ch:X igual a 1:1.

Neste procedimento foram utilizadas soluções de quitosana (em solução aquosa de ácido acético a 1% v/v) e de xantana (solução aquosa) em concentração de 1% (m/v), além da mistura de quitosana fosforilada e quitosana não modificada na proporção de 1:1 (ambas a 1% v/v em solução aquosa de ácido acético). O volume empregado de cada solução foi de 200 mL. A solução ácida de quitosana (ou mistura de quitosana fosforilada e não modificada) foi adicionada a uma vazão de 200 mL/h através de uma bomba peristáltica (Modelo Minipuls 3, Gilson) em um reator de aço inoxidável encamisado com diâmetro interno de 10 cm e altura de 20 cm contendo a solução de xantana. Para as formulações contendo o agente porogênico Kolliphor[®] P188, o composto foi misturado à solução de xantana previamente à adição da quitosana ao reator nas proporções de 10% (m/m) e 25% (m/m), *i. e.*, 0,4 g e 1 g de tensoativo, respectivamente. A temperatura foi mantida em 25 °C durante todo o processo, utilizando-se para isso um banho termostático (Modelo 214 M2, Quimis). O sistema foi mantido sob agitação constante de 1000 rpm através de agitador mecânico (Modelo 251 D, Quimis) com hélice do tipo naval com raio de 2,5 cm durante o gotejamento. Após o término do gotejamento, a mistura foi agitada por mais 10 min para que houvesse sua completa homogeneização. A adição de polímero à base de gel de silicone Silpuran[®] 2130 A/B foi feita na proporção de 10% (v/v), *i. e.*, 412 µL, após a formação do complexo de quitosana com a xantana. O sistema utilizado para a preparação dos materiais é apresentado na Figura A.2.

Em seguida, a mistura polimérica foi desaerada em bomba a vácuo (Modelo Q-355B, Quimis) por 2 horas (somente no caso de dispositivos não porosos, ou seja, sem o tensoativo) e então transferida para duas placas de Petri de poliestireno de 15 cm, de modo a se obter a mesma quantidade de mistura em cada placa. A mistura foi colocada em estufa com circulação de ar (Modelo 410D, Nova Ética) a 37 °C, durante 24 ou 48 horas, para dispositivos densos ou porosos, respectivamente, para promover a evaporação do solvente. Em seguida, os *scaffolds* obtidos foram imersos duas vezes em 200 mL de água deionizada (por amostra de cerca de 177 cm²), por 30 minutos cada vez, a fim de se remover o ácido acético residual. Em seguida, as membranas foram lavadas com 150 mL de 10mM HEPES por duas vezes (20 min) e mais uma vez com 200 mL de água deionizada, durante 15 minutos. Por fim, os materiais foram secos a temperatura

ambiente, para formulações densas, ou a 37 °C, para formulações porosas, por 24 horas. As etapas envolvidas na fabricação dos *scaffolds* estão representadas na Figura A.3.

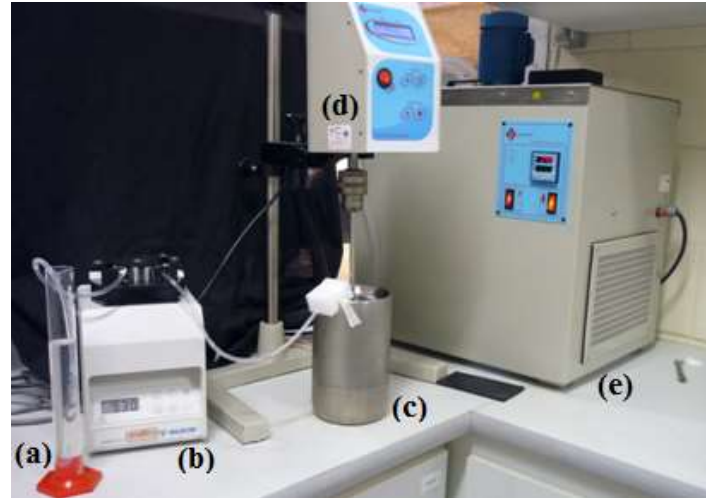


Figura A.2: Sistema utilizado para o preparo dos *scaffolds*. a) Proveta contendo solução de quitosana; b) bomba peristáltica; c) reator contendo solução de xantana; d) agitador mecânico; e) banho termostático.

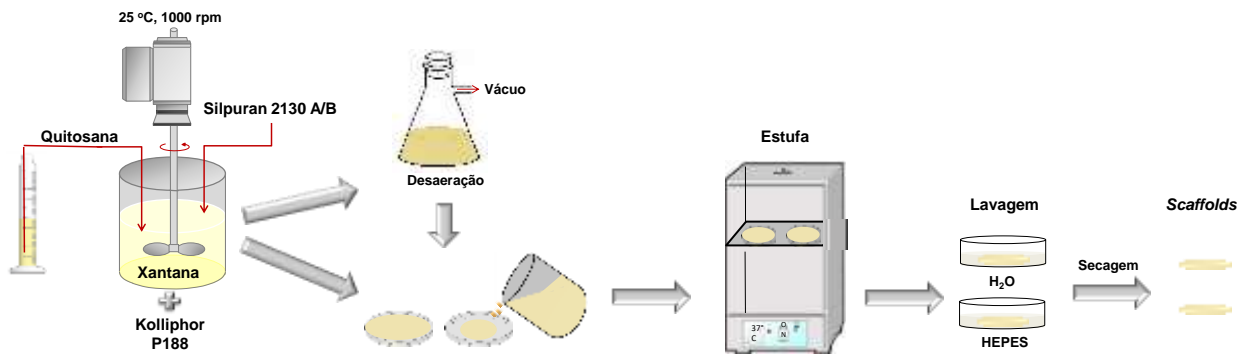


Figura A.3: Representação esquemática das etapas envolvidas no procedimento de fabricação dos *scaffolds*.

A.3. Avaliação das propriedades mecânicas dos *scaffolds*

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* foram testadas em relação à relaxação após tensão ou compressão. No teste de relaxação, mede-se a força necessária ao longo do tempo para que se mantenha uma deformação constante que foi inicialmente aplicada à amostra. A

metodologia para a realização dos ensaios e para a análise dos resultados será descrita nos itens a seguir.

A.3.1. Teste de relaxação após tensão

O teste de relaxação após tensão foi realizado no equipamento universal para ensaios mecânicos ElectroPuls E1000 (Instron Corporation). Amostras de tamanho 2 cm x 1 cm foram previamente intumescidas em PBS, tendo sua espessura sido medida por meio de micrômetro a laser (Lasermike 183-04, Techmet, EUA). Cada amostra foi posicionada entre as garras do equipamento com uma distância inicial entre garras de 10 mm (0% de deformação), e o conjunto foi mantido imerso em banho de PBS durante o ensaio (Figura A.4). Ao se iniciar o teste, as garras do equipamento eram afastadas a uma velocidade de 0,05 mm/s, seguido de um intervalo para relaxação da amostra de 1200 s a uma deformação constante, a fim de se levar em consideração o comportamento viscoelástico do material, obtendo-se ao final desse intervalo um valor de tensão residual, ou seja, o valor da força aplicada na condição de equilíbrio. O teste consistiu de 10 rampas de deformação (5% de deformação/rampa), com deformação final nominal de 50%. A força induzida para manter a deformação constante foi monitorada em função do tempo, utilizando-se uma célula de carga de 5 N (Instron Corporation). A tensão nominal foi calculada considerando-se a área da seção transversal da amostra e a tensão residual, conforme será mostrado no item A.3.3.

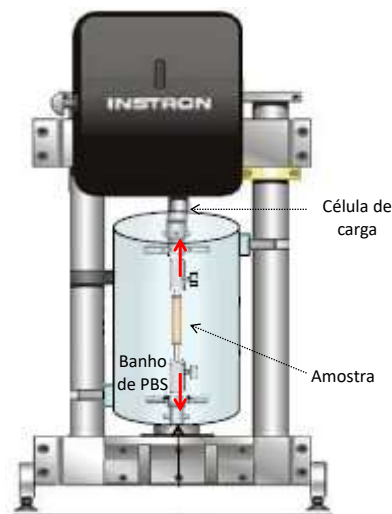


Figura A.4: Representação esquemática do equipamento utilizado no teste de relaxação após tensão

A.3.2. Teste de relaxação após compressão

O teste de relaxação após compressão sem confinamento lateral foi realizado utilizando-se células de carga de 1,47 N e 7 N (Mach 1, Biomomentum), para formulações porosas e densas, respectivamente. Amostras de diâmetro nominal de 10 mm foram previamente intumescidas em PBS e seu diâmetro então medido por meio de um micrômetro a laser (Lasermike 183-04, Techmet, EUA). Cada amostra foi então imersa em banho de PBS, e sua espessura inicial foi determinada por meio do equipamento. O pistão se movia em direção à amostra com uma velocidade de 0,05 mm/s, gerando uma deformação constante, conforme ilustrado na Figura A.5. Cinco rampas de deformação foram aplicadas às amostras, com 10% de deformação a cada rampa, até que se atingisse a deformação nominal final de 50%. O tempo de relaxação a cada rampa foi de 2000 s para amostras não porosas e 5000 s para as amostras porosas. De maneira análoga ao teste de compressão após tensão, a força induzida para manter a deformação constante foi monitorada em função do tempo, e a tensão nominal foi calculada considerando-se a espessura da amostra e a tensão residual ao final de cada rampa, conforme será mostrado no item A.3.3.

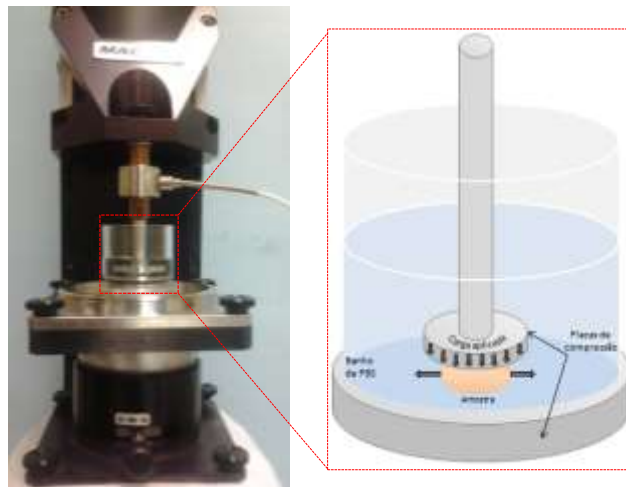


Figura A.5: Equipamento utilizado para o teste de relaxação após compressão sem confinamento lateral.

A.3.3. Forma de análise dos resultados

Os equipamentos de teste forneceram dados da força aplicada pela célula de carga para manter a deformação constante em função do tempo para cada rampa, gerando um conjunto

de dados como o mostrado na Figura A.6. Os dados referentes cada rampa foram ajustados no programa Matlab® (R2010a) utilizando-se a Equação A.1.

$$L = L_0 + L_1 \cdot e^{\left(\frac{-t}{T_1}\right)} + L_2 \cdot e^{\left(\frac{-t}{T_2}\right)} + L_3 \cdot e^{\left(\frac{-t}{T_3}\right)} \quad (\text{A.1})$$

onde L é a carga aplicada em função de um tempo t , L_0 é a carga residual ao fim de uma determinada rampa, T_1 , T_2 e T_3 são constantes de tempo e L_1 , L_2 e L_3 são constantes que se referem à contribuição de cada termo exponencial.

Na Figura A.7 está exemplificado o ajuste referente à curva gerada em uma das rampas, utilizando-se a Equação A.1, e os parâmetros calculados a partir deste ajuste.

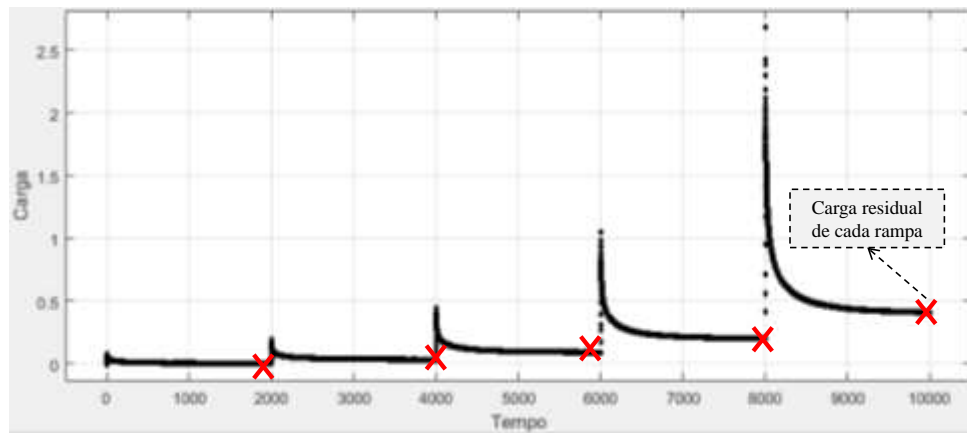


Figura A.6: Representação do gráfico carga *versus* tempo para 5 rampas de deformação, sendo o tempo de relaxação, neste caso, de 2000 s.

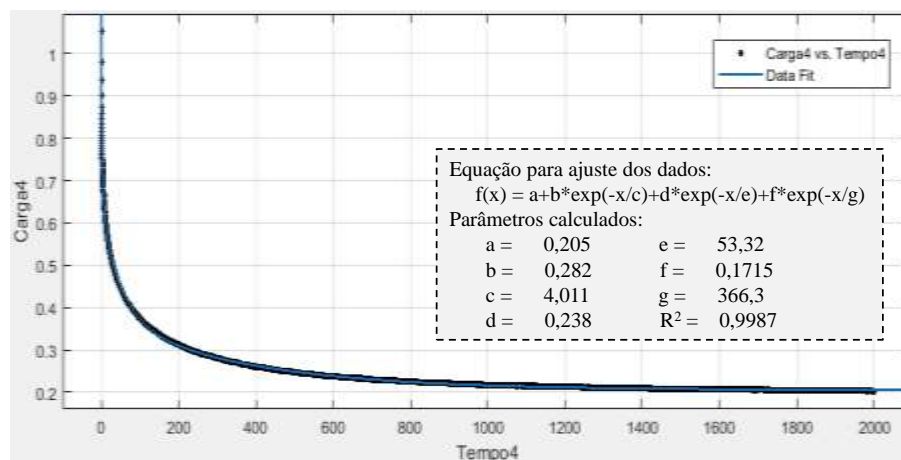


Figura A.7: Ajuste dos dados gerados quarta rampa do conjunto de dados apresentado na Figura A.6, utilizando-se a Equação A.1, e os parâmetros calculados a partir deste ajuste.

Utilizando os valores de L_0 obtidos a partir do ajuste, foi possível calcular a tensão nominal ($\sigma_{nominal}$) e a deformação nominal ($\varepsilon_{nominal}$) em cada rampa, de acordo com as Equações A.2 ou A.3 e A.4.

$$\sigma_{nominal} = \frac{L_0}{\text{Área}} = \frac{4 \cdot L_0}{\pi \cdot D_0^2} \quad (\text{ensaio de compressão}) \quad (\text{A.2})$$

$$\sigma_{nominal} = \frac{L_0}{\text{Área}} = \frac{L_0}{l \cdot s_0} \quad (\text{ensaio de tensão}) \quad (\text{A.3})$$

$$\varepsilon_{nominal} = \frac{s_0 - s}{s_0} \quad (\text{A.4})$$

onde Área corresponde à área onde a força é aplicada sobre a amostra, D_0 é o diâmetro inicial da amostra (no caso de ensaio de compressão), s_0 é a sua espessura inicial, s é a espessura da amostra ao final de uma rampa, l é a largura inicial da amostra (no caso de ensaio de tensão). No ensaio de tensão, a área corresponde à seção transversão da amostra, sendo ela representada pela espessura vezes a largura da mesma.

Para cada amostra, os ajustes das curvas (Equação A.1) e cálculo dos valores de tensão nominal (Equações A.2 e A.3) foram realizados cinco vezes (no caso do ensaio de compressão, sendo uma vez para cada rampa, correspondente a 10% de deformação) ou dez vezes (para ensaio de tensão, sendo 5% de deformação a cada rampa), e então obteve-se a curva tensão x deformação para cada amostra (Figura A.8). Para cada formulação de *scaffold*, o teste foi realizado em triplicata, por isso, ao final da análise, foram obtidas três curvas como a da Figura A.8 com os pontos experimentais, cuja média foi apresentada nos resultados e discussões.

Para o ajuste da curva de tensão x deformação, utilizou-se a Equação A.5 apresentada no trabalho de Lee (2006), que descreve o formato típico de curvas desse tipo obtidas para tecidos moles.

$$\sigma = \frac{1}{\beta} (C e^{\beta \varepsilon} - \gamma) \quad (\text{A.5})$$

onde C , β e γ são constantes empíricas utilizadas no ajuste de dados.

Por fim, o módulo de elasticidade foi calculado como a inclinação da curva a uma dada deformação, a partir do cálculo da primeira derivada da curva ajustada pela Equação A.5.

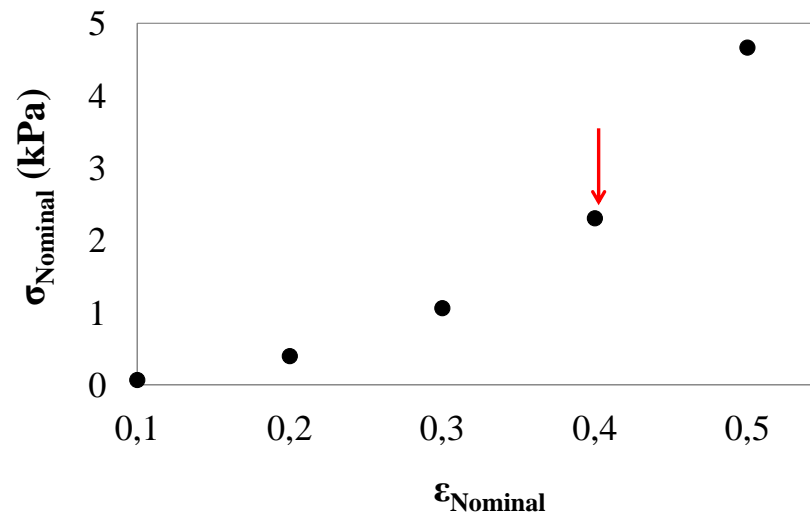


Figura A.8: Exemplo do gráfico de tensão x deformação gerado para uma amostra submetida ao ensaio de compressão. Cada ponto foi obtido a partir da análise do conjunto de dados equivalente a uma determinada rampa. Indicado pela seta vermelha está o ponto gerado a partir da análise dos dados da Figura A.7.

APÊNDICE B

Neste apêndice são apresentadas imagens dos *scaffolds* produzidos, tanto no estado seco quanto no estado úmido (Figura B.1), a fim de se evidenciar o comportamento desses materiais ao manuseio após o seu intumescimento.

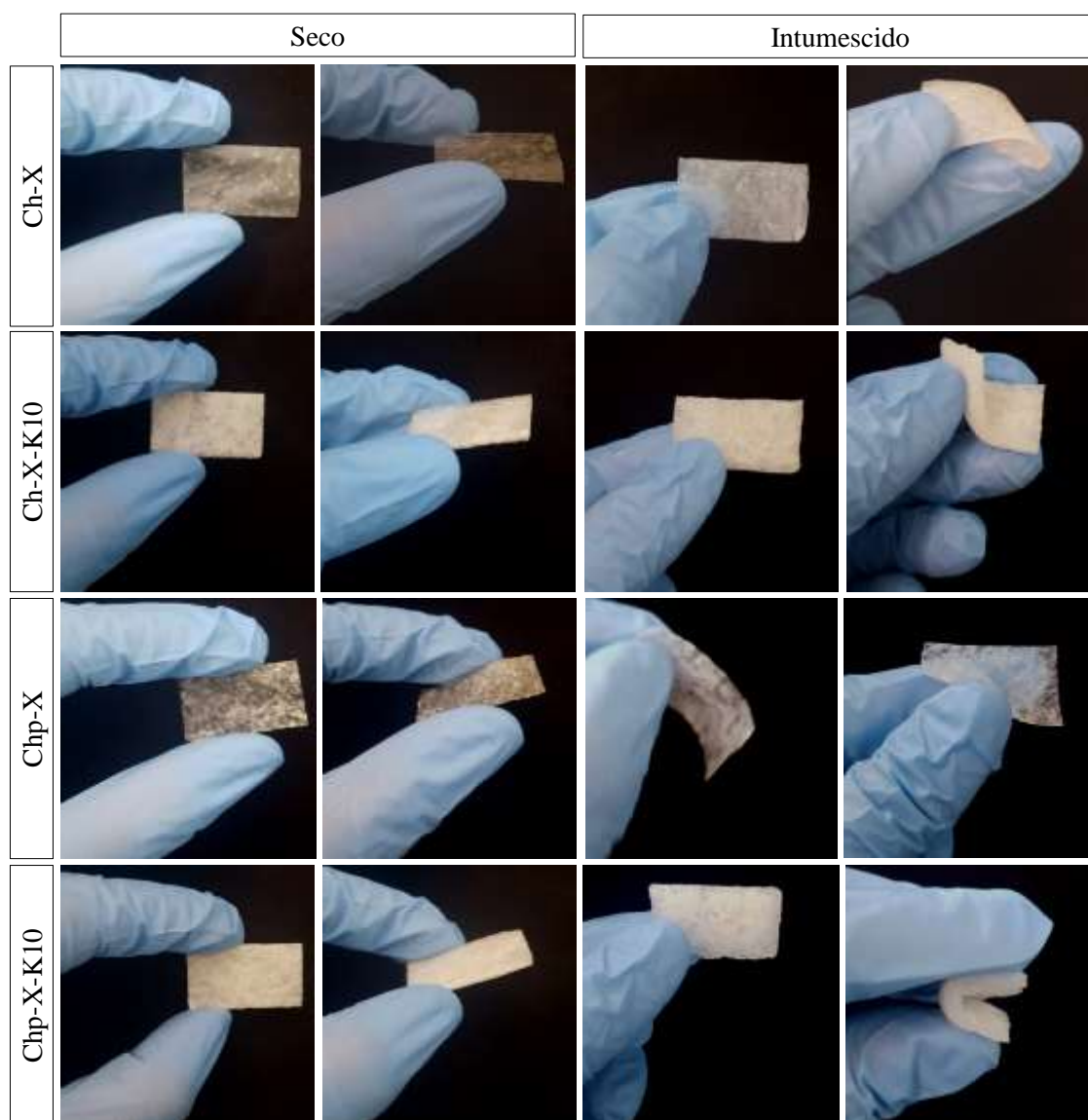


Figura B.1: Aspecto visual dos *scaffolds* à base de quitosana (Ch) ou quitosana fosforilada (Chp) combinada com xantana (X) preparados na presença ou não do tensoativo Kolliphor® P188 (K, 10%) em estado seco ou após o intumescimento com água deionizada durante 1 hora.

Portanto, na Figura B.1 é mostrado o aspecto visual dos *scaffolds* secos, de tamanho 2,5 cm x 1,5 cm, bem como dos *scaffolds* intumescidos com água deionizada. O intumescimento foi realizado por um período de 1 hora. Observa-se que, quando secos, os materiais se mostram mais rígidos e, por isso, quebradiços. Já na condição úmida, os materiais apresentam maior flexibilidade e podem ser facilmente manuseados. Além disso, após o intumescimento, suas dimensões são aumentadas, conforme mostrado nas seções 3.1 e 3.2 deste trabalho.

APÊNDICE C

Neste apêndice é apresentado o parecer da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UNIARARAS (protocolo 055/2017).



CEUA- 2017-2018

Fundação Herminio Ometto

Título: DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLDS DE QUITOSANA COMPLEXADA COM XANTANA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO DE TECIDOS ÓSSEOS GUIADA PELO PERIÓSTEO.

Orientador Responsável: Gláucia Maria Tech dos Santos

Aluno(s)

RENATA FRANCIELLE BOMBALDI DE SOUZA

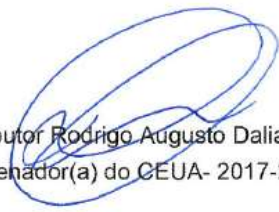
Curso: Mestrado em Ciências Biomédicas

Nº de Inscrição no CEP: 055/2017

Data Apreciação do CEP: 03/10/2017

O Comitê de Ética e Mérito Científico informa que o projeto acima especificado foi registrado em seus arquivos com o parecer APROVADO.

Araras, 05 de junho de 2018.


Doutor Rodrigo Augusto Dalia
Coordenador(a) do CEUA- 2017-2018