UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM PORTO ALEGRE
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

BRUNA GOVONI

COMPARAÇÃO DE *SCAFFOLDS* ELETROFIADOS E MANUAIS A PARTIR DE POLÍMEROS NATURAIS E SINTÉTICOS PARA O TRATAMENTO DE LESÕES NO TECIDO CUTÂNEO POR QUEIMADURA

Trabalho de Conclusão de Curso

PORTO ALEGRE
2021

BRUNA GOVONI

COMPARAÇÃO DE SCAFFOLDS ELETROFIADOS E MANUAIS A PARTIR DE POLÍMEROS NATURAIS E SINTÉTICOS PARA O TRATAMENTO DE LESÕES NO TECIDO CUTÂNEO POR QUEIMADURA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profª Drª Débora Vom Endt

Co-orientadora: Drª Natasha Maurmann

Co-orientadora: Profª Drª Patrícia Pranke

PORTO ALEGRE

2021

BRUNA GOVONI

COMPARAÇÃO DE SCAFFOLDS ELETROFIADOS E MANUAIS A PARTIR DE POLÍMEROS NATURAIS E SINTÉTICOS PARA O TRATAMENTO DE LESÕES NO TECIDO CUTÂNEO POR QUEIMADURA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profª Drª Débora Vom Endt

Co-orientadora: Drª Natasha Maurmann

Co-orientadora: Profª Drª Patrícia Pranke

Aprovado em: 08/12/2021

BANCA EXAMINADORA

_____
Orientadora: Profª Drª Débora Vom Endt
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

_____
Co-Orientadora: Drª Natasha Maurmann
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

_____
Jane Marlei Boeira
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

_____
Profª. Drª Ana Lúcia Kern
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

AGRADECIMENTOS

Acredito que o privilégio da vida, depois destes anos conturbados de pandemia, deve ser o primeiro a ser agradecido. Foram diversos acontecimentos que nos cativaram gratitude pela vida, presença, afeto. Sendo assim, agradeço a Deus e ao Universo por me dar o privilégio de chegar ao final de 2021 com saúde e com meus entes queridos vivos e saudáveis.

Por conquistar o sonho da graduação, agradeço à minha família, meus pais, em especial à minha mãe Erondina, pelo conforto e motivação. Foi por ti, meu alicerce. À minha irmã, Silvana, que além da sua existência, me presenteou com duas vidas, Eduarda e Maria Clara, meus dois pedacinhos de doçura e amor.

Às minhas orientadoras, Débora e Natasha, que com paciência e carinho me ofereceram suporte profissional e pessoal para que eu conseguisse finalizar este trabalho. Ao grupo UFRGS/IPCT por me proporcionar a experiência de fazer parte de um grupo de pesquisa de alta qualidade, agregando conhecimento e crescimento pessoal e profissional.

Dos colegas que seguiram de mãos dadas comigo, tenho de agradecer à Rafaella, Kyng, Louise, Luiza, Vinicius, Marieli e tantos que estiveram sempre ao meu lado.

À UERGS, pelo ensino de qualidade e por não sermos apenas um número de matrícula. Aqui fiz amigos. Obtive crescimento pessoal e científico graças à oportunidade de conviver com a Erli, Adriane, Débora, Clódis e Thiago. Vocês são minha inspiração.

À CEUPA, por me oferecer moradia estudantil, oportunidades e amigos de uma vida, especialmente o Tiago, que além de sempre estar ao meu lado, nunca me deixou esquecer quem eu sou e de onde vim.

Aos meus amigos de infância, em especial à Paulinha, Mirella e “Sora” Dri, que me fazem lembrar a fase linda que vivemos juntos. Minha essência tem uma mistura de todos nós. Sou grata por ter tido vocês comigo durante o meu processo de formação pessoal e por ainda tê-las comigo neste momento tão especial.

RESUMO

A engenharia tecidual utiliza técnicas para manipular materiais e culturas de células, buscando substituir/curar tecidos danificados usando materiais sintéticos ou biológicos. O uso de polímeros naturais na produção de estruturas usadas para estimular o desenvolvimento celular e a regeneração tecidual é uma estratégia promissora na medicina regenerativa. Dessa forma, buscou-se desenvolver *scaffolds* de polímeros naturais e sintéticos, sendo eles produzidos por eletrofiação e filme, avaliar sua influência na viabilidade de queratinócitos humanos entre essas duas formas de deposição do material e compará-los com alguns materiais sintéticos comercialmente disponíveis. Foram preparadas as seguintes soluções: 1% de quitosana em ácido acético 80%; 24% de policaprolactona (PCL) em ácido acético 80% e 1% de quitosana com 24% de PCL em ácido acético 80%. Os mesmos polímeros e solventes supracitados foram usados para eletrofiação; exceto com a quitosana, onde foi usado o 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HPF) como solvente. Os substitutos dérmicos utilizados neste projeto foram: Integra™, Matriderm™ e Pelnac™. As células da linhagem de queratinócitos imortalizados (HaCat) foram semeadas a uma densidade de 50.000 células/poço, diretamente nas placas de cultura (TCPs) ou sobre os *scaffolds*. A viabilidade celular foi avaliada com base nos ensaios Cell Counting Kit-8 (CCK-8), Live/Dead e DAPI após cinco dias de cultivo. Os resultados da viabilidade por CCK-8 foram expressos como a média normalizada da absorbância em comparação com a TCPs (controle) e erro padrão. A comparação dos filmes mostrou que apenas o PCL 24% apresentou diferença estatística em relação ao controle (<0,05), mostrando uma diminuição na viabilidade celular. Comparando os *scaffolds* eletrofiados com o controle, nenhum grupo apresentou diferença estatística, indicando que a viabilidade celular foi mantida. Comparando substitutos dérmicos com o grupo controle, todos mostraram uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular. Isso significa que, apesar do sucesso dos materiais comercialmente disponíveis para auxiliar na cicatrização dérmica, eles diminuem a viabilidade dos queratinócitos *in vitro*.

Palavras-chave: Medicina Regenerativa. Engenharia Tecidual. Biomateriais. *Scaffolds*.

ABSTRACT

Tissue engineering uses techniques to manipulate materials and cell cultures, seeking to replace/cure damaged tissue using synthetic or biological materials. The use of the natural and synthetics polymers in the production of structures used to stimulate cell development and tissue regeneration is a promising strategy in regenerative medicine. Thus, it was sought to develop scaffolds of natural and synthetic polymers, as they are produced by electrospinning and film, to evaluate their influence on the viability of human keratinocytes between these two forms of material deposition and to compare them with some commercially available synthetic materials. The following solutions were prepared: chitosan 1% in acetic acid 80%; polycaprolactone (PCL) 24% in acetic acid 80% e chitosan 1% with PCL 24% in acetic acid 80%. These films were kept in an oven at 37°C until completely dry. The same polymers and solvents mentioned above were used for electrospinning; except for Chi, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HPF) was used as a solvent. The dermal substitutes used in these projects were: Integra™, Matriderm™ and Pelnac™. Cells of the immortalized keratinocyte lineage (HaCat) were seeded at a density of 50,000 cells/well, directly in TCPs or over scaffolds. Cell viability was evaluated based on the Cell Counting Kit-8 (CCK-8), Live/Dead and DAPI assays after five days of cultivation. The viability results by CCK-8 were expressed as the normalized mean and the mean standard error values obtained from the absorbance scaffolds compared to TCP (control). The comparison of the films showed that only PCL 24% showed a statistical difference compared to the control (<0.05), showing a decrease in cell viability. Comparing the electrospun scaffolds with the control, no group showed statistical difference, indicating that cell viability was maintained. Comparing dermal substitutes with the control group, all showed a statistically significant decrease in cell viability. This means that despite the success of commercially available materials to aid in dermal healing, they decrease the viability of keratinocytes in vitro.

Keywords: Regenerative Medicine. Tissue Engineering. Biomaterials. Scaffolds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da pele. 17
Figura 2 - Categorização da lesão do tecido cutâneo por queimadura. 19
Figura 3 - Características necessárias para um scaffold ser utilizado na Engenharia Tecidual. 24
Figura 4 - Produção de biomateriais para uso na Engenharia de Tecidos. 24
Figura 5 - Representação de um polímero. 25
Figura 6 - Síntese da poli(ε-caprolactona) – PCL. 26
Figura 7 - Desacetilação do polímero natural quitina para a formação de quitosana. 28
Figura 8- (a) Técnicas de eletrofiação e (b) formação do Cone de Taylor. 30
Figura 9 - Técnica solvent casting. 34
Figura 10 - Técnica de Eletrofiação – aplicação experimental. 41
Figura 11– Ensaio Live/Dead para testes com scaffolds por deposição manual. 45
Figura 12 - MEV dos scaffolds eletrofiados. 46
Figura 13 - Ensaio Live/Dead e DAPI para testes com eletrofiados poliméricos. 48
Figura 14 – MEV dos substitutos dérmicos: Integra™, Matriderm™ e Pelnac™. 50
Figura 15 – Ensaio Live/Dead e DAPI para testes com substitutos dérmicos comerciais. 51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1– Exemplo de substitutos dérmicos disponíveis no mercado. 21
Quadro 2– Parâmetros da eletrofiação a suas respectivas soluções poliméricas.....40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Viabilidade celular de HaCat sobre filmes poliméricos, em relação ao controle. . 44
Gráfico 2 - Viabilidade celular de HaCat sobre eletrofiados poliméricos, em relação ao controle. 47
Gráfico 3 - Viabilidade celular de HaCat sobre substitutos dérmicos, em relação ao controle. 50
Gráfico 4 - Viabilidade celular de HaCat sobre as diversas matrizes testadas in vitro. 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento
EMA	do inglês, *European Medicine Agency*
FDA	do inglês, *Food and Drug Administration*
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FTIR	do inglês, *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*
IPCT	Instituto de Pesquisa com Células-Tronco
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia Ótica
PCL	Policaprolactona
PLA	do inglês, *Polilatic acid*
TCP	do inglês, *Tissue Culture Plates*
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
1.1. OBJETIVOS 15
1.1.1. Objetivo geral 15
1.1.2. Objetivos específicos 15
1.2. JUSTIFICATIVA 15
2. REFERENCIAL TEÓRICO 17
2.1. A PELE 17
2.2. LESÃO DO TECIDO CUTÂNEO – QUEIMADURA 18
2.3. SUBSTITUTOS DÉRMICOS 20
2.4. ENGENHARIA TECIDUAL 23
2.5. POLÍMEROS 24
2.5.1. Policaprolactona - PCL 26
2.5.2. Quitosana 27
2.6. MÉTODOS DE FABRICAÇÃO DOS *SCAFFOLDS* 28
2.6.1. Técnica de Eletrofiação 29
2.6.2. Técnica de deposição manual ou *solvente casting* 34
2.6.3. Reticulação 35
2.7. TESTES *IN VITRO* 35
3. MATERIAIS E MÉTODOS 37
3.1. MATERIAIS 37
3.2. SOLUÇÕES POLIMÉRICAS 37
3.3. CONFECÇÃO DOS *SCAFFOLDS* 38
3.3.1. Confecção dos filmes poliméricos por deposição manual 39
3.3.2. Confecção dos *scaffolds* por eletrofiação 40
3.3.3. Preparo dos substitutos dérmicos comerciais para o ensaio com células 41
3.4. CARACTERIZAÇÃO DOS *SCAFFOLDS* 41

3.5. AVALIAÇÃO DA ADESÃO E VIABILIDADE CELULAR.....42

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 44

4.1. *SCAFFOLDS* PRODUZIDOS PELA TÉCNICA DE DEPOSIÇÃO MANUAL 44

4.2. *SCAFFOLDS* PRODUZIDOS PELA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO 46

4.3. SUBSTITUTOS DÉRMICOS.....49

4.4. COMPARAÇÕES ENTRE O CONTROLE, DIFERENTES *SCAFFOLDS* E SUBSTITUTOS DÉRMICOS ESTUDADOS 52

5. CONCLUSÕES.....55

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 56

REFERÊNCIAS.....57

1. INTRODUÇÃO

A lesão no tecido cutâneo por queimadura acomete milhares de pessoas anualmente, sendo considerado um problema de saúde pública. Queimaduras podem levar a morte, direta ou indiretamente, uma vez que o tecido lesionado se torna um ambiente favorável a infecções, pois faz com que a eficácia da proteção cutânea seja comprometida, podendo colocar em risco a vida do indivíduo afetado (GIORDANI *et al.*, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2018), estima-se que ocorram cerca de 180 mil mortes anualmente por queimaduras. No caso de sobrevivência, a lesão por queimadura é considerada a maior causa de morbidades, incluindo hospitalização prolongada, desfiguração e incapacidade, geralmente com o estigma e rejeição resultantes.

No tratamento de pacientes acometidos por queimaduras, o mais usual é a utilização de curativos, e em casos mais graves, uso de suturas. Porém, o uso destes curativos acaba por irritar a pele, uma vez que devem ser trocados com frequência. Com isso, é crescente a busca por novos materiais que possam atender a necessidade do tecido lesado, que seja resistente a infecções e proporcione maior conforto ao paciente (HENRIQUE *et al*., 2020). Devido a isso, diversos pesquisadores têm investigado materiais que sejam: 1) Biocompatíveis, evitando a rejeição pelo receptor; 2) Capazes de mimetizar a matriz extracelular, fornecendo suporte mecânico/físico para crescimento celular; 3) Biodegradáveis, possibilitando a degradação natural pelo organismo; 4) Atóxicos, evitando alergias e complicações; 5) Funcionais e; 6) Bioativos, trazendo benefícios ao tecido que o recebe. Essas características são estudadas, podendo ser advindos de materiais naturais ou sintéticos (STEFFENS *et al*., 2018).

Muitos autores desenvolvem biomateriais poliméricos a serem aplicados na engenharia tecidual, com finalidade de regeneração tecidual por meio do uso de suportes para crescimento celular, os chamados *scaffolds* (CARVALHO, 2018; SILVA *et al.*, 2019; JAIN; SHETTY; YADAV, 2020).

Polímeros são estruturas moleculares extensas, compostos por repetições de unidades pequenas de baixo peso molecular, chamadas de monômeros. O processo de união destas repetições de monômeros para a formação dos polímeros é chamado de polimerização. O número de repetições de monômeros e seus arranjos influenciarão diretamente no peso molecular do polímero e nas suas características (NUNES, 2012).

Os materiais compatíveis com o organismo humano, chamados de biomateriais, também podem ser incorporados a materiais bioativos para melhorar/acelerar o processo de recuperação do tecido lesado (SHARIF *et al*., 2018). Um exemplo de biomaterial é o alginato,

um polissacarídeo derivado da alga marrom e também produzido por bactérias, capaz de formar soluções viscosas, grânulos, esponjas e microfibras, capazes de auxiliar na regeneração tecidual, além de poder carregar moléculas ativas para auxiliar o tratamento. Além do alginato, pode-se citar o poli (D, L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), um copolímero sintético biocompatível, muito utilizado nas ciências biomédicas na entrega de fármacos, e para uso na engenharia tecidual, devido as suas propriedades mecânicas e biodragradabilidade (MAURMANN; SPERLING, PRANKE, 2018).

Um polímero que também se destaca em pesquisas na área da medicina regenerativa é o ácido polilático (PLA), um biomaterial que pode ser biologicamente ou quimicamente sintetizado, derivado de recursos naturais e renováveis, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e já utilizado em curativos, devido a suas propriedades mecânicas e durabilidade (MACEDO, 2018). Rahmani *et al*. (2020) incorporaram PLA a poli(sebacato de manitol), a fim de melhorar as propriedades da solução e possibilitar a formação de nanofibras no processo de eletrofiação, obtendo resultados satisfatórios na regeneração de pele.

A policaprolactona (PCL) é um polímero sintético, derivado do petróleo, aprovado pela FDA, amplamente utilizado na área médica, devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade lenta, além de ter uma ótima resistência mecânica (MOCHANE *et al*., 2019). Sharif *et al.* (2018) fabricaram *scaffolds* eletrofiados de PCL para aplicação na regeneração de pele, cultivados com células-tronco endoteliais humanas, e obtiveram resultados semelhantes ao controle.

A quitosana é um polímero natural muito utilizado em pesquisas de diversas áreas, sendo ela sozinha ou em combinação com outros polímeros naturais e/ou sintéticos, com objetivo de melhorar a estabilidade da solução, buscando avaliar a melhor composição polimérica que traga boa regeneração do tecido alvo (CRUZ *et al.*, 2016; ORYAN; SAHVIEH, 2017; GARCIA *et al.*, 2018).

Além disso, por ser um polímero natural de características variáveis, tendo sua caracterização não padronizada, a reprodutibilidade dos experimentos é um problema. O produto final de quitosana irá variar conforme sua fonte, método de extração, grau de desacetilação, massa molecular, pureza, entre outros. Além da alta variabilidade das características da quitosana serem um problema, estas informações são amplamente negligenciadas nos artigos, o que dificulta a discussão de resultados, principalmente quando conflitantes (MARQUES *et al*., 2020).

A quitosana apresenta propriedades antibacterianas e antifúngicas, é biocompatível e biodegradável, podendo ser facilmente degradada *in vivo*, por enzimas como a lisozima, por

exemplo, a oligossacarídeos atóxicos, podendo ser excretada pelo organismo de uma forma não prejudicial. Também é um polímero com propriedades antioxidantes, de baixo custo e renovável (BAKSHI *et al*., 2020).

A quitosana pode ser extraída do exoesqueleto de crustáceos, um importante produto alimentício da aquicultura brasileira, a qual representou um volume de mais de 15 mil toneladas no ano de 2017, contribuindo significativamente com a economia do país. Desta classe de animais marinhos, cabeça, patas e carapaça são resíduos sólidos gerados, onde este último representa cerca de 10% do peso do animal (XIMENES; VIDAL, 2018). Portanto, há uma grande biodisponibilidade de matéria prima para extração deste biopolímero, além do interesse ambiental no seu reaproveitamento.

A quitosana por si só tem baixa solubilidade em soluções fisiológicas, tendo de sofrer manipulações processuais para aumentá-la (BAKSHI *et al*., 2020). Outra característica desfavorável é quanto à manipulação deste biopolímero, devido a sua alta viscosidade, pois soluções mais concentradas muitas vezes são impossíveis de formular. Por este motivo, a quitosana é restrita ao uso na forma não modificada para aplicações biomédicas, mas devido a grande quantidade de grupos reacionais proporcionado pelos seus grupamentos amino, é amplamente estudada nesta área de atuação (ALI; AHMED, 2018).

Para avaliar a possibilidade de substituição de polímeros sintéticos derivados de fontes não renováveis (petróleo) por polímeros de origem natural, renovável e biodegradável, capaz de ser absorvido pelo organismo de forma atóxica, foi selecionado o polímero sintético policaprolactona (PCL), devido a resultados prévios obtidos por ensaios *in vitro* satisfatórios realizados pelas pesquisadoras, sendo este o parâmetro controle para comparação.

Para o desenvolvimento do *scaffold*, também se deve escolher o melhor modo de deposição polimérica, sendo este capaz de mimetizar a matriz extracelular, estabelecendo um ambiente favorável ao crescimento celular (LUO *et al*., 2019). Com isso, há grande interesse em buscar biomateriais que sejam bioativos, atóxicos, de origem preferencial natural e renovável, além de determinar qual o melhor método de produção do *scaffold* para auxiliar na adesão e crescimento celular, podendo assim ser aplicado na engenharia tecidual.

Sendo assim, neste trabalho foram produzidos *scaffolds* de PCL, quitosana e suas misturas, para determinar a viabilidade celular de queratinócitos imortais (HaCat), comparando as soluções poliméricas e também as formas de deposição, sendo eles eletrofiadas ou por deposição manual (*solvent casting*).

1.1. OBJETIVOS

Os objetivos gerais e específicos desta pesquisa estão dispostos nos próximos itens.

1.1.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho de conclusão de curso é produzir *scaffolds* por eletrofiação e deposição manual a partir de polímeros naturais e sintéticos, comparando-os entre si e com alguns substitutos dérmicos comerciais. Para comparação destes materiais, serão utilizados testes de viabilidade, adesão e proliferação celular.

1.1.2. Objetivos específicos

São objetivos específicos desta pesquisa:

1) Produzir *scaffolds* do polímero sintético policaprolactona (PCL), e do polímero natural quitosana e mistura de ambos;
2) Utilizar dois métodos de produção dos *scaffolds*: deposição polimérica manual e eletrofiação;
3) Caracterizar os *scaffolds* produzidos, quanto a sua morfologia, topografia da superfície e seções transversais por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
4) Comparar o polímero natural quitosana, o sintético PCL e a mistura de ambos, utilizados como suporte celular, quanto a adesão, proliferação e viabilidade celular;
5) Comparar os método de obtenção dos *scaffolds* (deposição manual e eletrofiação), utilizados como suporte celular, quanto a adesão, proliferação e viabilidade celular;
6) Comparar os *scaffolds* produzidos com os substitutos dérmicos existentes no mercado quanto a adesão, proliferação e viabilidade celular.

1.2. JUSTIFICATIVA

O uso de *scaffolds* de natureza polimérica para aplicação em substitutos dérmicos com o objetivo de acelerar a regeneração do tecido cutâneo têm se destacado na medicina regenerativa, por oferecer um melhor resultados na adesão e proliferação celular (WU *et al.*,

2020), quando comparado aos métodos convencionais, como a terapia tópica, enxertia autóloga, entre outros (PINHO *et al.*, 2016).

Há no mercado diversas opções de substitutos dérmicos sintéticos acelulares que demonstram eficiência no tratamento de pele lesionada, porém, há um alto custo de mercado agregado. Além da necessidade de encontrar uma alternativa economicamente viável a este material, também é importante buscar uma matéria prima funcional e renovável, visando substituir materiais derivados de petróleo, uma fonte de recurso finita e não renovável.

Em busca de alternativas econômica e sustentavelmente viáveis, este trabalho de conclusão de curso propõe comparar o polímero sintético PCL, derivado de petróleo, com o polímero natural quitosana, e com substitutos dérmicos sintéticos comerciais já utilizados no tratamento de lesões de pele. Para isto, serão produzidos *scaffolds* dos referidos polímeros e suas misturas, bem como a análise da melhor forma de deposição no processo de fabricação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

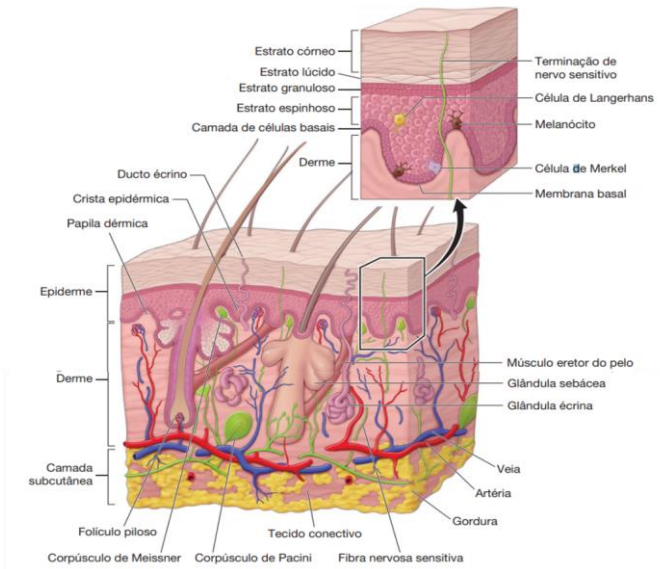
Nesta seção será apresentada uma revisão da literatura abordando os principais temas do trabalho proposto.

2.1. A PELE

A pele é o órgão com maior área de superfície do corpo humano, sendo constituído por, aproximadamente, 16% do peso corporal. Sua principal função é proteger o corpo contra agentes externos, por meio do seu revestimento. Também é capaz de fornecer a troca gasosa entre o sistema interno e externo, uma função essencial para o bom funcionamento das reações bioquímicas que ocorrem internamente, contribuindo para a homeostase do organismo (JOODAKI; PANZER, 2018).

Também chamada de tegumento, a pele (figura 1) é composta por um grupo de tecidos que funcionam em harmonia: a epiderme (camada mais externa), seguida da derme e hipoderme (camada mais interna), juntamente das estruturas anexas, que estão presentes entre os tecidos, sendo elas o sistema vascular, pêlos, poros, glândulas sebáceas e sudoríparas (BOHJANEN, 2015).

Figura 1 - Estrutura da pele.



Fonte: Bohjanen (2015).

A **hipoderme**, camada mais interna da pele, é rica em tecido adiposo, que auxilia na diminuição da perda de calor pelo corpo e reserva energética (gordura). Esta possibilita a união da derme aos tecidos e órgãos subjacentes (CARLSON, 2014).

Sobre a hipoderme está a **derme**, responsável pelas propriedades elásticas e de sustentação da pele, oportunizada pelo grande número de fibras colágenas e elásticas. Também abrigam vasos sanguíneos, glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos, além de nervos, sendo estes responsáveis pela sensibilidade ao tato, temperatura, dor e pressão (SHIER; BUTLER; LEWIS, 2016).

Acima da derme encontra-se a **epiderme**, camada mais externa da pele. Esta é composta por uma membrana basal de células-tronco, diretamente em contato com a derme, que se diferenciam em células importantes para a estrutura da camada externa da pele, como queratinócitos (produtores de queratina – impermeabilizantes da pele), melanócitos (produtores de melanina – pigmentam a pele), células táteis (sensibilidade da pele) e células de Langerhans (fagocitam microorganismos estranhos – ativadoras do sistema imunológico). Com exceção desta última, as células da epiderme sofrem mitoses constantes para repor as células mortas da superfície da pele, que são as células achatadas, compactas e sobrepostas que se desprendem a cada 26 a 28 dias, proporcionando a renovação celular (BOHJANEN, 2015).

Além da epiderme, a camada externa da pele conta com uma fina capa protetora, composta de suor e sebo, fornecido pelas glândulas sudoríparas e sebáceas, respectivamente. Esta camada mantém a pele saudável, conservando-a lubrificada e hidratada, impedindo a perda excessiva de líquidos (BOHJANEN, 2015).

O comprometimento desse órgão decai sua capacidade de proteger os componentes internos do corpo humano, deixando-o suscetível à invasão por patógenos, alterando negativamente suas atividades biológicas. Este rompimento pode-se dar por lesões na pele causadas por agentes químicos, térmicos, elétricos ou radioativos, resultando em queimaduras ou rompimentos na pele (GIORDANI *et al*., 2016).

2.2. LESÃO DO TECIDO CUTÂNEO – QUEIMADURA

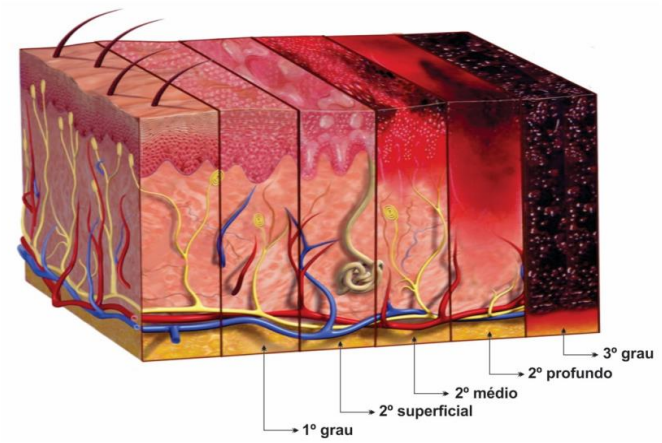
A lesão no tecido cutâneo por queimadura, que acomete milhares de pessoas anualmente, é considerada um problema de saúde pública. Queimaduras podem levar a morte, direta ou indiretamente, uma vez que o tecido lesionado tem sua proteção cutânea comprometida, podendo colocar em risco a vida do indivíduo afetado (GIORDANI *et al.*, 2016).

As lesões do tecido cutâneo por queimadura são categorizadas conforme a sua gravidade, sendo a profundidade do tecido alcançado pelo trauma o agravante, podendo ser de

primeiro, segundo ou terceiro grau, e subdivididas entre superficiais e profundas (DRIGALLA; GEMMILL, 2013).

A figura 2 demonstra como a queimadura é classificada, conforme a profundidade em que a queimadura acomete a pele.

Figura 2 - Categorização da lesão do tecido cutâneo por queimadura.



Fonte: Vana (2017).

Na extrema esquerda da figura 2, encontra-se a superfície de uma pele sadia. No segundo bloco retangular, é representada uma pele com uma queimadura de primeiro grau, a qual atinge apenas a superfície da pele (epiderme). Este tipo de lesão é capaz de se regenerar espontaneamente, entre 5 a 10 dias, com ausência de cicatrização. Os três blocos seguintes da figura 2 exemplificam queimaduras de segundo grau, as quais atingem a epiderme e derme, sendo a pele regenerada espontaneamente no período de 10 a 60 dias, dependendo da profundidade atingida (DRIGALLA; GEMMILL, 2013).

As queimaduras de terceiro grau, como ilustrado na figura 2 pelo bloco retangular da extrema direita, são mais agressivas e profundas, lesando totalmente a epiderme e derme, podendo também atingir a hipoderme, causando perda da sensibilidade na região atingida por acometer as terminações nervosas. Para o tratamento deste último caso, é necessária intervenção clínica, sendo utilizadas técnicas como o autoenxerto, onde o tecido cutâneo é coletado de uma parte sadia do corpo do próprio ferido (“padrão ouro”, por eliminar riscos de rejeição imunológica); o aloenxerto, que utiliza tecido cutâneo da mesma espécie, mas de outro indivíduo, e; com menos frequência, o xenoenxerto, que utiliza tecido cutâneo de outra espécie. Com uso destas técnicas de enxertia, seja ela qual for, há diversas desvantagens, como morbidades locais no doador e escassez de material biológico, além de riscos de infecção (FERRIGNO *et al*., 2020).

Dependendo da gravidade e do local do tecido lesado, há possibilidade da permanência de sequelas, comprometendo a estética da pele, podendo causar desconforto e constrangimento do acometido frente a sua nova aparência, uma vez que estas sequelas podem estar associadas a amputações e deformidades (CAETANO; CABANA; LIMA, 2017). Visto isto, é de suma importância considerar o acompanhamento psicológico aos pacientes para minimizar estes danos e evitar que o paciente entre em um quadro psicológico depressivo (GIORDANI *et al.*, 2016).

Ademais, muitos pacientes necessitam de fisioterapia como tratamento de reabilitação para evitar contraturas musculares e de cicatriz, lesões hipertróficas, entre outros. Sendo assim, para que o paciente retorne a sua funcionalidade, pode-se considerar que o tratamento completo de um paciente que sofreu queimaduras é de ordem multidisciplinar, envolvendo diversas áreas da saúde para que se possa obter um resultado satisfatório (SOUZA *et al.*, 2019).

Com isto, substitutos dérmicos sintéticos podem ser empregados, pois são passíveis de esterilização sem danificar o material, diminuindo assim o índice de infecção/rejeição.

2.3. SUBSTITUTOS DÉRMICOS

Para queimaduras mais agressivas, como as de segundo grau profundo e terceiro grau, utiliza-se técnicas de enxertia, necessitando o uso de curativos aliados à antibióticos, que sejam capazes de conter as possíveis contaminações por agentes patógenos externos, uma vez que a camada externa de proteção (pele) foi comprometida pela lesão (CALONGE, 2018).

Curativos convencionais, como ataduras elásticas e compressas de algodão, podem lesar tecidos recém-formados durante as trocas de curativos, além de possibilitar o contato repentino ao ambiente externo, possibilitando a contaminação do ferimento (CALONGE, 2018). Com isso, substitutos dérmicos sintéticos se sobressaem, tanto por proporcionar uma melhor proteção à ferida, quanto por não haver necessidade de troca frequente do curativo. Além disso, feridas crônicas geralmente não são curadas com uso de tratamento tópico convencional, o qual acaba por ser complementado com uso de substitutos dérmicos (AGENCY FOR HEALTHCARE RESEARCH AND QUALITY, 2020).

Segundo Ferreira *et al*. (2011), os substitutos dérmicos sintéticos são confeccionados a partir de manipulações de materiais com uso de técnicas de engenharia tecidual, com configurações estruturais dependentes do tipo e extensão de ferimento. Complementa ainda, que os substitutos dérmicos podem ser denominados como “um grupo heterogêneo de

elementos biológicos e/ou sintéticos que possibilitam a oclusão temporária ou permanente das feridas". Salienta que a classificação de substituto dérmico pode abranger xenoenxertos, aloenxertos e combinações com queratinócitos aos curativos sintéticos, sempre em busca da maior semelhança possível com a estrutura e condições fisiológicas da pele do paciente.

Segundo Nathoo, Howe e Cohen (2014), um substituto dérmico ideal deve "ser durável, totalmente autólogo, endotelializado e conter estruturas anexiais e células-tronco adultas", além de proteger o tecido de infecções e da perda de líquidos e ter uma relação custo/benefício positiva. Os autores salientam que esta idealidade é ainda inexistente, e que estas matrizes dérmicas são utilizadas como complemento a tratamentos, visando a maximização de sucesso na cura do tecido lesado. Acrescentam, ainda, que os substitutos dérmicos são capazes de oferecer "elementos de matriz, fatores de crescimento e funções de sinalização parácrinas que favorecem um estado de cura".

Outras características esperadas em um substituto dérmico de sucesso é que ele seja biocompatível, biodegradável, capaz de promover a vascularização e ser atóxico, visando, assim, evitar reações alérgicas e cirurgias posteriores. Um bom substituto dérmico também precisa apresentar um fácil manuseio e resistência para resistir às forças de cisalhamento resultantes da sua aplicação sobre a área afetada, principalmente em locais de dobras. Além disso, também deve permitir o fluxo de células formadoras das camadas que constituem aquela área afetada (AGENCY FOR HEALTHCARE RESEARCH AND QUALITY, 2020).

Com base nas características estudadas para a melhoria nos resultados de recuperação de pele lesada, há diversas opções de substitutos dérmicos acelulares no mercado, conforme demonstrado no quadro 1.

Quadro 1– Exemplo de substitutos dérmicos disponíveis no mercado.

Marca	**Característica**	**Composição básica**	**Fonte**
Alloderm Select™ (RTM)	Camada única: matriz dérmica.	Derme liofilizada de cadáver. Sem reticulação química.	https://hcp.alloderm.com/
Integra™	Matriz dupla: uma porosa (colágeno) e uma de silicone.	Colágeno bovino+ glicosaminoglicano + condroitina-6-sulfato derivado de tubarão, e silicone. Reticulado quimicamente.	http://www.ilstraining.com/BMWD/brochures/ER3798_02_10_IBWM_TreatGuideBooklet.pdf
DermaMatrix™ (Synthes, West Chester, Pa.).	Camada única: matriz dérmica.	Derme liofilizada de cadáver. Sem reticulação química.	http://synthes.vo.llnwd.net/o16/LLNWMB8/US%20Mobile/Synthes%20North%20America/Product%20Support%20Materials/Brochures/MXBRODermaMatrixAcellularJ7237F.pdf
Permacol™ (Tissue Science Laboratories,	Camada única: matriz dérmica.	Colágeno suíno. Reticulado quimicamente.	https://www.medtronic.com/covidien/en-us/products/hernia-

Hampshire, Reino Unido)			repair/permacol-surgical-implant.html
Matriderm™ (Skin & Health Care, Alemania)	Camada única: matriz dérmica.	Colágeno bovino e elastina. Sem reticulação química.	https://medskin-suwelack.com/matriderm-dermal-matrix
Pelnac™ (Gunze Corp., Japón)	Matriz dupla: uma porosa (colágeno) e uma de silicone.	Colágeno suíno e silicone. Sem reticulação química.	https://www.gunze.co.jp/e/medical/products/pdf/pelnac_catalog.pdf

Entre os substitutos dérmicos explicitados no quadro 1, pode-se notar que há derivados de cadáveres humanos e de animais. Aqueles derivados de cadáveres humanos são, geralmente, liofilizados, sendo desprovidos de reticulação química. A reticulação química em substitutos dérmicos tem sido menosprezada em aplicações no tratamento de pele, pois demonstram interferência negativa na regeneração de tecidos moles. Os substitutos de dupla camada oferecem maior proteção aos ferimentos, uma vez que são capazes de isolar com melhor eficiência o ambiente externo do interno com a fina camada de silicone, além de serem capazes de controlar a perda de líquidos e gases (NATHOO; HOWE; COHEN, 2014).

Além dos substitutos dérmicos acelulares, é promissor o uso de células pré-cultivadas do próprio paciente sobre as matrizes dérmicas. Um exemplo disso é o substituto dérmico TransCyte™ , composto por uma matriz dupla, sendo uma porosa de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e outra de náilon, com a mesma funcionalidade daquelas silicone citadas anteriormente. Neste, os fibroblastos são previamente cultivados *in vitro* e o substituto dérmico celular é implantado sobre a lesão. Em comparação aos aloenxertos e curativos acelulares, o substituto cutâneo celularizado destaca-se com resultados superiores de cura (UNITEDHEALTHCARE, 2020). Segundo Debels *et al*. (2015), este *scaffold* torna-se, em média, quinze vezes mais caro que o substituto Biobrana™, que é basicamente o TransCyte™, só que acelular. Além do fator econômico, acrescenta que, por conter náilon na composição, não é apropriado para aplicação em pele.

Apesar de serem efetivos no auxílio ao tratamento de recuperação de pele lesada por queimadura, diminuindo o tempo de regeneração do tecido e as infecções (comparando a utilização de retalhos livres), melhorando a estética da cicatriz, entre outros, os substitutos dérmicos sintéticos acelulares hoje comercializados são de difícil acesso, devido seu alto custo (NATHOO; HOWE; COHEN, 2014). Visto isto, há necessidade de desenvolver materiais que tenham uma melhor relação custo benefício e de igual ou superior eficiência.

Com isso, surgem as técnicas de engenharia tecidual, buscando materiais que superem as limitações dos substitutos dérmicos sintéticos disponibilizados no mercado.

2.4. ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual é um ramo da medicina regenerativa que busca o desenvolvimento de biomateriais celulares, capazes de recuperar, reparar ou melhorar o tecido lesionado ou um órgão inteiro. A escolha do tipo celular a ser implantado neste biomaterial é essencial para que o tratamento obtenha sucesso, sendo as células-tronco as mais utilizadas em diversos estudos (GUADIX; ZUGAZA; GÁLVEZ-MARTÍN, 2017).

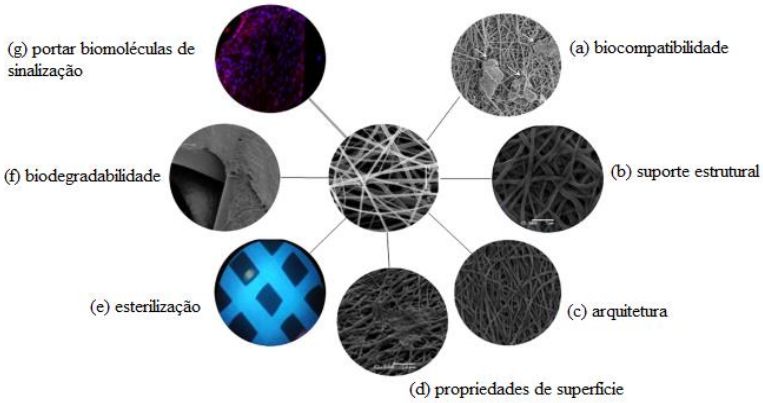
Segundo Gálvez-Martín, Ruiz e Clares (2018), a engenharia tecidual visa utilizar "células-tronco, células especializadas e seus componentes extracelulares; além de fatores que aceleram a proliferação ou a diferenciação celular, sobre uma matriz de suporte, com o objetivo de reproduzir uma estrutura 3D funcional e similar ao tecido ou órgão danificado".

O suporte supracitado é comumente chamado de *scaffold*. A construção estrutural dos *scaffolds* busca mimetizar a matriz extracelular, visando proporcionar um ambiente mais próximo do natural para a adesão e proliferação celular, obtendo assim melhores resultados de adesão e viabilidade celular, quando comparado ao controle (semeadura direto no poço da *Tissue Culture Plate* - TCP), sem o uso do *scaffold*) (MAURMANN; SPERLING; PRANKE, 2018).

Para que haja uma boa resposta ao *scaffold*, as células previamente cultivadas devem adaptar-se ao sistema a elas oferecido. Com isso, o biomaterial deve atender às necessidades das células, tendo características como uma estrutura 3D capaz de mimetizar a matriz extracelular, propriedades mecânicas que possibilitem o desenvolvimento biológico daquelas células, preservando assim sua estabilidade fenotípica. Providas de um ambiente apropriado, as células são capazes de aderir e proliferar naquele *scaffold*, tendo assim a capacidade de auxiliar positivamente a regeneração tecidual *in vivo* (FANG; WANG; LIN, 2011).

Sendo assim, um *scaffold* apropriado (figura 3) deve ter um alto grau de porosidade, uma boa distribuição no tamanho dos poros e uma grande área superficial disponível. Também deve ser biodegradável, tendo uma boa taxa de degradação e formação de novo tecido. Deve ter propriedades mecânicas capazes de suportar os poros, impedindo sua ruptura quando houver a formação do novo tecido. Por último, o *scaffold* deve ser atóxico, tendo uma boa interação com as células, sendo capaz de promover a adesão e subsequente proliferação celular, além de propiciar a diferenciação celular. A adição de sinalizadores ao *scaffold*, como fatores de crescimento, propicia a melhora das condições de regeneração tecidual (MAURMANN *et al*., 2017; FANG; WANG; LIN, 2011).

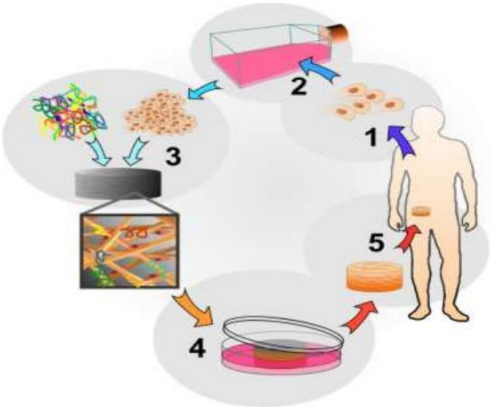
Figura 3 - Características necessárias para um *scaffold* ser utilizado na Engenharia Tecidual.



Fonte: Adaptado de Maurmann *et al.*, (2017).

Portanto, pode-se concluir que a engenharia tecidual (figura 4) utiliza da multiplicação celular do próprio doador (1 e 2) sob condições controladas *in vitro*, para posterior cultivo sobre os *scaffolds*, com ou sem a adição de fatores de crescimento (3 e 4). Após a identificação de uma boa adesão e crescimento celular, este *scaffold* bioativo pode ser implantado no tecido lesado (5), buscando auxiliar a regeneração tecidual.

Figura 4 - Produção de biomateriais para uso na Engenharia de Tecidos.



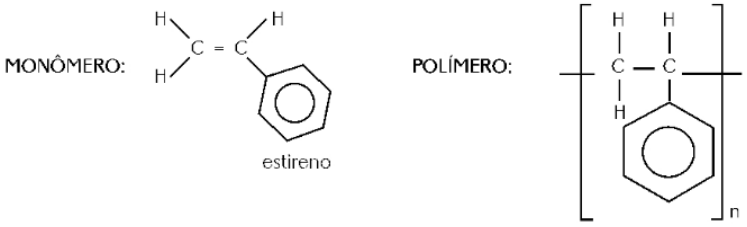
Fonte: Nobre, (2016).

2.5. POLÍMEROS

Polímeros são macromoléculas constituídas pela ligação química entre os monômeros, que são pequenas estruturas de baixo peso molecular. Quando um monômero se liga a outro monômero, passam a ser chamado de meros, o que caracteriza o nome polímero (do Grego, *poli* = muito; *mero* = parte) (NUNES, 2012).

A figura 5 representa um monômero e seu respectivo polímero, neste caso, o polietileno.

Figura 5 - Representação de um polímero.



Fonte: Nunes, (2012).

Segundo Nunes (2012), a partir de um monômero de baixo peso molecular o polímero pode formar-se por meio de reações em cadeia ou por reações de polimerização de adição ou condensação. As ligações formadas podem ser reversíveis ou irreversíveis, de maneira natural ou induzida (usando calor ou reagentes).

Após o tratamento de polimerização, o "*n*" subscrito na figura 5 representa o número de repetições de monômeros. O comprimento, isto é, quantos monômeros há em um polímero, é chamado de Grau de Polimerização (GP). O Grau de Polimerização influencia diretamente no peso molecular do polímero, que pode ser calculado a partir da multiplicação da massa molecular do monômero pelo seu número de repetições (*n*); e em suas características, como viscosidade, espalhamento da luz polarizada, entre outros (PAVANATI, 2015).

Polímeros podem ser constituídos por um único tipo de monômero, chamados de homopolímero, ou por mais de um tipo de monômero, chamado de copolímero. Um exemplo desta classificação é o polipropileno (PP), que pode ser um homopolímero, quando polimerizado a partir de monômeros de propeno, ou então um copolímero, quando polimerizado a partir combinações de monômeros de propeno e eteno (PAVANATI, 2015).

Os polímeros podem ser classificados conforme sua origem, podendo ser naturais ou sintéticos. Os polímeros naturais são aqueles extraídos da natureza, sem alterações em sua estrutura, podendo ser de origem vegetal, animal e mineral (BRAVO; TAMAYO; LINARES, 2018). Além destes, também há polímeros que se originam do metabolismo de fungos e bactérias (os biopolímeros), tendo como vantagem a degradação natural no decorrer de um tempo não muito longo (MANO; MENDES, 2013). Polímeros sintéticos são aqueles que são produzidos artificialmente em laboratório, geralmente proveniente de material fóssil, isto é, não renovável, sendo muitas vezes estruturalmente parecidos com os naturais. Estes surgiram para superar certas limitações do uso dos polímeros naturais, como propriedades mecânicas e térmicas, mas têm degradação geralmente mais lenta, podendo assim ser um problema ambiental (BRAVO; TAMAYO; LINARES, 2018).

Uma propriedade muito importante dos materiais poliméricos é a degradabilidade, isto é, que sejam capazes de se degradar na natureza (GEORGE; SHAH; SHRIVASTAV, 2019). O conceito de biodegradabilidade de um polímero é aplicado àquele de origem natural ou artificial, sem ramificações ou contido de grupos funcionais éster, amida ou acetal, podendo assim ser degradado no meio ambiente. Polímeros de origem natural tem a vantagem sobre os sintéticos no que tange a emissão de CO_2, uma vez que são capazes de emiti-lo de forma neutra ao final de seu ciclo de vida, não causando nenhum dano aos seres vivos (THOLIBON *et al.*, 2019).

Na engenharia tecidual, há grande interesse na busca de biomateriais com capacidade de serem metabolizados e degradados pelo organismo receptor no processo de regeneração tecidual, evitando que haja necessidade da retirada destes implantes. Além disso, também é almejado que o biomaterial seja bioativo, trazendo algum benefício adicional ao receptor (FABBRI *et al.*, 2017; TOMAZ *et al.*, 2018; RAHMANI *et al.*, 2020).

Nos próximos subitens, serão detalhados os polímeros abordados neste estudo.

2.5.1. Policaprolactona - PCL

O polímero policaprolactona [poli(ε-caprolactona)] (PCL) pertence à família dos poliésteres alifáticos sintéticos, derivado de petróleo, tendo como diferencial positivo a sua biodegradabilidade. Este polímero é amplamente utilizado em materiais cirúrgicos e em matrizes carregadoras de compostos ativos, na área farmacêutica, devido às suas propriedades absorvíveis e baixa toxicidade em condições biológicas (DWIVEDI *et al.*, 2020).

A síntese da PCL (figura 7) pode ser realizada a partir da abertura do anel de ε-caprolactona e polimerização, com uso de catalisadores aniônicos e catiônicos (JANMOHAMMADI; NOURBAKHSH, 2018).

Figura 6 - Síntese da poli(ε-caprolactona) – PCL.

Fonte: Gomes, (2017)

A PCL é considerada um polímero termoplástico de cadeia linear, semicristalino e hidrofóbico, sendo compatível com diversos solventes orgânicos. Devido à presença de

grupos éster facilmente hidrolisáveis, que irão gerar ε-hidroxil após completar a degradação de ácido acético biodegradável, conferem boa biocompatibilidade, degradabilidade e baixa toxicidade aos produtos gerados a partir deste polímero (SHAO *et al.*, 2020).

A PCL possui a capacidade de formar blendas poliméricas com diversos biopolímeros, como a quitosana, PLA, entre outros. Assim como o PLA, a PCL é aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicine Agency* (EMA). Devido a isso, é grande o interesse científico e industrial neste material. Porém, por ser derivado de uma fonte não renovável e finita, é de interesse científico e ambiental que sejam buscadas alternativas ao uso deste polímero (MAURMANN *et al.*, 2017).

2.5.2. Quitosana

Um dos polímeros amplamente utilizados em pesquisas relacionadas a ciências biomédicas e engenharia de tecidos é a quitosana, sendo ela sozinha ou em uma mistura polimérica, com o objetivo de melhorar a estabilidade da solução, buscando avaliar a melhor composição polimérica que traga melhorias na regeneração do tecido alvo (ORYAN; SAHVIEH, 2017; GARCIA *et al.*, 2018).

O motivo pelo qual a quitosana é amplamente utilizada em pesquisas é por ter propriedades antibacterianas e antifúngicas, mucoadesivas, analgésicas, de biocompatibilidade e biodegradabilidade, ser atóxica e antioxidante, ter capacidade hemostática, acelerar a regeneração e reepitelização dérmica (SANTOS *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019).

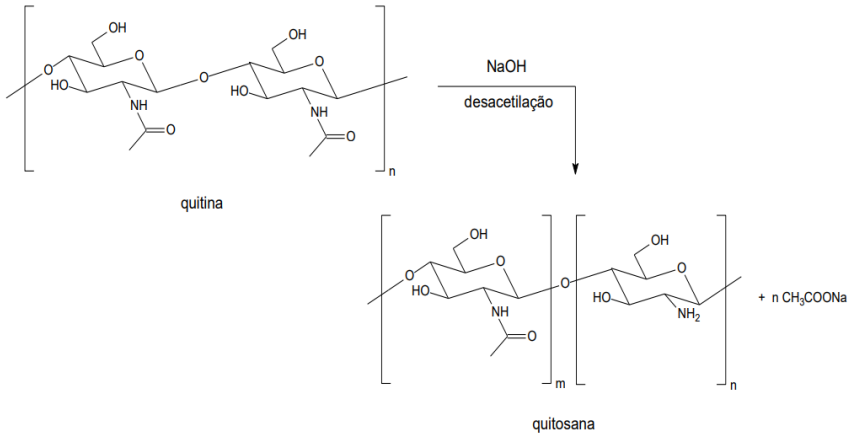
A quitosana pode ser degradada *in vivo* por várias enzimas produzidas pelos seres humanos, resultando em oligossacarídeos atóxicos, que podem ser excretados ou incorporados a glicosaminoglicanos e glicoproteínas (SANTOS *et al.*, 2019).

É um polissacarídeo facilmente processado, sendo obtido pela desacetilação da quitina, o segundo polímero natural mais abundante (sendo o primeiro a celulose), encontrado principalmente no exoesqueleto de artrópodes, mas também em paredes celulares de fungos. Tem baixo custo e é renovável, uma vez que pode ser extraída principalmente da carapaça de crustáceos, um resíduo abundante na indústria pesqueira (GARCIA *et al.*, 2018).

A partir da N-desacetilação da quitina por hidrólise alcalina em um processo termoquímico, forma-se a quitosana, que é um copolímero linear estruturado por ligações glicosídicas randômicas **β**-(1→4), que unem as unidades monoméricas 2-desoxi-N-acetil-D-glucosamina a 2-desoxi-D-glucosamina (figura 8). O grau de desacetilação da quitina

interfere linearmente nas propriedades físicas, químicas e biológicas da quitosana, uma vez que expressa o conteúdo médio de resíduos acetilados presentes nas cadeias deste biopolímero (ALI; AHMED, 2018).

Figura 7 - Desacetilação do polímero natural quitina para a formação de quitosana.



Fonte: Weber, 2016.

A quitosana tem um grupo funcional amino (posição C-2) e dois grupos hidroxila (posições C-3 e C-6), conferindo versatilidade às modificações químicas a cada repetição destes. Por ter grupos funcionais amino ($-NH_2$), a quitosana é um polissacarídeo solúvel em solvente orgânico em meio ácido quando têm seu grau de desacetilação superior a 50%, possibilitando a protonação do seu grupamento amino ($-NH^{3+}$). Com isso, é possível conferir maior estabilidade aos materiais por meio da rede de ligações de hidrogênio em meio sólido, proporcionando boas propriedades mecânicas sob forma de materiais de filme ou fibra (AHMED *et al.*, 2018).

Devido às características supracitadas, a quitosana tem sido amplamente estudada, buscando sempre a melhora da estabilidade das soluções poliméricas. Há grande destaque na indústria, sendo utilizada na área da saúde, em matrizes carregadoras de compostos ativos, podendo ser utilizada em formato de cápsulas de gel, nanopartículas e fibras eletrofiadas ou filme, em curativos no auxílio à cicatrização de pele, em tratamentos estéticos, entre outros, e também na área de alimentos, como suplemento alimentar, embalagens ecológicas, entre outras aplicações (ALI; AHMED, 2018).

2.6. MÉTODOS DE FABRICAÇÃO DOS *SCAFFOLDS*

A forma de produção pode afetar o sucesso do *scaffold* em relação às propriedades estruturais, influenciando na adesão e proliferação celular. Portanto, faz-se necessário

escolher um método de deposição a ser aplicado, buscando oferecer um ambiente mais próximo possível a matriz de origem da célula (LUO *et al*., 2019).

Scaffolds do tipo filmes, fabricados por deposição da solução de forma manual, são compostos de finas camadas de material que podem ser utilizados para cobrir, separar ou embalar produtos e superfícies. São capazes de criar uma barreira à invasão de microrganismos, permitindo a troca de gases, além de reduzir a perda de água. A espessura do filme influencia nas propriedades mecânicas e na permeabilidade do filme (SUHAG *et al*., 2020).

A técnica de eletrofiação pode proporcionar ao *scaffold* características favoráveis para o uso em condições fisiológicas, uma vez que permite total evaporação do solvente durante o processamento da solução, alta porosidade e área por unidade de massa, proporcionando um bom ambiente para diferenciação celular. Além disso, diversas características do *scaffold* podem ser ajustadas, como modificar as tensões aplicadas, a densidade da solução, utilizando solventes de diferentes capacidades condutivas, velocidade de bombeamento, entre outros (MOGHADAM *et al.*, 2016).

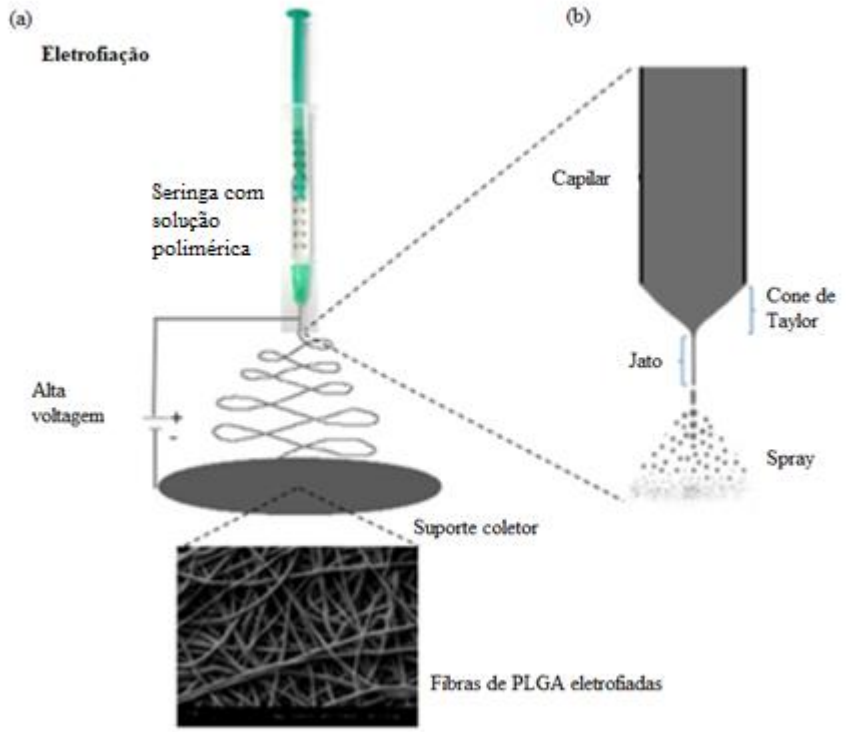
Nos subitens seguintes, serão exemplificadas as técnicas que foram estudadas nesta pesquisa, sendo elas a eletrofiação e a deposição manual.

2.6.1. Técnica de Eletrofiação

Em 1914, Zeleny estudou o comportamento de fluidos sendo dispersados de um tubo metálico por indução de forças eletrostáticas. Em 1969 o estudioso Geoffrey Ingram Taylor descreveu o comportamento do cone produzido pela gotícula formada na ponta de uma agulha ao induzir um campo elétrico, onde conseguiu modelá-la matematicamente, nomeando-a de “Cone de Taylor” (figura 9). A partir destas constatações, o pesquisador Rayleigh, seguido por Morton e Cooley, patenteou, em 1987, o método de dispersão de fluidos com uso de forças eletrostáticas, denominado de eletrofiação (MOHAMMADZADEHMOGHADAM *et al.*, 2016).

A técnica de eletrofiação, ilustrada pela figura 9, consiste basicamente em três componentes principais: i) uma seringa com a solução polimérica, ii) um coletor metálico e iii) uma fonte de alimentação de alta tensão entre a ponta da agulha e o coletor metálico (MAURMANN; SPERLING; PRANKE, 2018).

Figura 8- (a) Técnicas de eletrofiação e (b) formação do Cone de Taylor.



Fonte: Adaptado de Maurmann *et al*., 2019.

Inicialmente, a solução polimérica é bombeada para a ponta da agulha a uma velocidade ajustável e constante. O diferencial de tensão gerado pela fonte fará com que a superfície da solução seja eletrificada na ponta da agulha, deformando-a em forma cônica, possibilitando assim a formação do cone de Taylor. Quando a tensão gerada atinge um ponto crítico, as forças de repulsão eletrostática prevalecem, superando a tensão superficial da solução, fazendo com que esta seja ejetada de forma linear e constante, sendo depositada sob o suporte coletor (MOHAMMADZADEHMOGHADAM *et al.*, 2016).

Por mais que o método de eletrofiação pareça fácil de ser operado, há muitos parâmetros que influenciam no resultado. Este método envolve três parâmetros distintos: a **solução**, o **processamento** e o **ambiente**. Estes três parâmetros influenciam no diâmetro da nanofibra, morfologia do *scaffold*, propriedades mecânicas da estrutura 3D e na porosidade, assim como no tamanho dos poros (KITSARA *et al.*, 2017).

Em relação a **solução**, para que ela seja eletrofiável[1], deve-se considerar sua viscosidade, concentração, peso molecular, tensão superficial e condutividade elétrica, e cada variável tem uma resposta na solução (COSTA *et al.*, 2012).

[1] Solução estável, capaz de gerar nanofibras contínuas, pelo método de eletrofiação.

A viscosidade da solução pode ser ajustada a partir de alterações na concentração do polímero, sendo diretamente proporcional à viscosidade da solução. O peso molecular também influencia na viscosidade, uma vez que uma molécula “mais pesada”, isto é, de maior massa molecular, resultará em uma solução mais densa. Para que a solução seja capaz de gerar fibras contínuas, precisa ter uma viscosidade considerável, mas também não pode ser viscosa ao ponto de não ser possível ejetá-la pela ponta da agulha no processo de eletrofiação. Com isso, faz-se necessário considerar uma concentração limite para se obter a viscosidade desejada (KISHAN; COSGRIFF-HERNANDEZ, 2017).

A concentração interfere, também, no diâmetro da fibra, de modo que quanto maior a concentração da solução, mais viscosa será, e maior o diâmetro da fibra. Uma solução com alta viscosidade diminui a probabilidade da formação de *beads*[2], poros e microporos na superfície do biomaterial. Em contrapartida, uma solução muito diluída pode resultar em fibras combinadas com *beads* e partículas. Portanto, para gerar uma fibra uniforme e sem *beads*, é importante encontrar a concentração ideal para o peso molecular do polímero utilizado na solução (KISHAN; COSGRIFF-HERNANDEZ, 2017).

Além de influenciar na concentração da solução, o peso molecular dos polímeros também influencia na morfologia da fibra, bem como nas propriedades elétricas e físicas da solução, incluindo condutividade elétrica, viscosidade, resistência dielétrica, tensão superficial e número de entrecruzamentos poliméricos na solução. Uma solução cujo peso molecular é alto gera fibras com diâmetros maiores, enquanto que soluções com baixo peso molecular levam a fibras com poros e *beads* (MOHAMMADZADEHMOGHADAM *et al.*, 2016).

A condutividade elétrica da solução é um parâmetro muito importante, uma vez que é por meio desta que haverá a dispersão de cargas dentro da solução, possibilitando que o fluido possa ser transportado pela agulha até o prato coletor. Esta característica é empregada à solução pela natureza do solvente e do soluto. Soluções com condutividades elétricas altas resultam em fibras com diâmetros reduzidos, podendo haver rompimentos na continuidade das fibras (RODRIGUÉZ-TOBÍAS; MORALES; GRANDE, 2019).

Os parâmetros que interferem no **processamento** envolvem o fluxo da solução, a força do campo elétrico, a distância entre a placa coletora e a ponta da agulha, o formato da ponta da agulha, a composição da solução e a geometria do coletor (MOHAMMADZADEHMOGHADAM *et al.*, 2016).

[2] Defeitos na formação das fibras, em formas circulares em pontos da fibra.

A tensão superficial é neutralizada por forças repulsivas eletrostáticas aplicadas por meio de uma tensão de alta potência durante o processo de eletrofiação. Uma baixa tensão superficial gera menor probabilidade de formar *beads*. Já a condutividade elétrica da solução influencia na formação e estrutura da fibra, que varia conforme as características das soluções (tipo de polímero, solvente e presença de sais ionizáveis) (KISHAN; COSGRIFF-HERNANDEZ, 2017).

O diâmetro do filete de solução ejetada varia inversamente com a raiz cúbica da condutividade elétrica da solução. Condutividades mais elevadas induzem ao afinamento das micro e nanofibras e diminuem a probabilidade do surgimento de *beads*, mas quando são muito elevadas, há um desgaste tangencial do campo elétrico ao longo da superfície das gotículas do fluido, impedindo a formação de Cone de Taylor. Por outro lado, condutividades muito baixas não podem ser eletrofiadas, pois não há carga elétrica suficiente na superfície das gotículas do fluido para formar o Cone de Taylor. Portanto, em uma eletrofiação bem sucedida, a constante dielétrica da solução deve ser alta o suficiente para obter a espessura fina necessária para a formação das fibras (MOHAMMADZADEHMOGHADAM *et al.*, 2016).

A velocidade do jato e a taxa de fluxo de material são afetadas pela vazão da solução polimérica, contribuindo para o diâmetro e morfologia da fibra. É necessária uma vazão mínima para a fabricação de nanofibras, pois se a vazão for muito baixa pode impedir a eletrofiação. A taxa de fluxo deve ser suficientemente baixa para garantir que o solvente evapore no caminho entre a ponta da agulha e o prato coletor. A taxa de alimentação deve corresponder à taxa de remoção de solução da ponta da agulha, caso contrário, pode haver a formação de *beads* ou deposição de nanofibras úmidas de solvente na placa coletora, pois o tempo para que o solvente evapore pode ser insuficiente (RODRIGUÉZ-TOBÍAS; MORALES; GRANDE, 2019).

A distância entre a ponta da agulha e o prato coletor, ou distância de folga (RENEKER; YARIN, 2008), também influencia nos resultados da formação do *scaffold*, afetando principalmente o tempo de evaporação do solvente e o diâmetro das nanofibras (ISLAM *et al.*, 2019). Esta distância depende muito de cada solução, mas geralmente esta altura entre a ponta da agulha e a placa coletora é de 8 a 15 cm. Além disso, o *design*, a geometria e a posição da ponta da agulha também influenciam na morfologia e no diâmetro da fibra (MOHAMMADZADEHMOGHADAM *et al.*, 2016).

Condições **ambientais** como temperatura, umidade e fluxo de ar também interferem na produção dos *scaffolds* por eletrofiação. Por mais que existam equipamentos específicos de

eletrofiação capazes de controlar temperatura e umidade, não são abundantes nas pesquisas devido ao seu elevado custo, fazendo com que a maioria dos processos sejam realizados sob condições ambientais (RAY *et al*., 2016).

O aumento da temperatura da solução pode reduzir significativamente os diâmetros médios das fibras, o que pode ser atribuído ao seu efeito indireto na taxa de evaporação do solvente e na viscosidade da solução. Este aumento de temperatura também pode favorecer a formação de *beads*. Já a redução da temperatura, dependendo do polímero utilizado, pode fazer com que a solução endureça e venha a entupir a agulha, interrompendo o processo de eletrofiação (RAY *et al*., 2016; MOGHADAM *et al.*, 2016).

O fator umidade depende da composição da solução. Independentemente da absorção de umidade dos polímeros, a alta umidade pode diminuir ou aumentar o diâmetro da fibra. Na maioria dos casos, em uma baixa umidade, o solvente pode ser evaporado mais rápido do que o normal, invalidando a mistura correta da solução e a eletrofiação. A alta umidade relativa do ar, favorece a formação de pequenos poros na superfície dos *scaffolds* (RAY *et al*., 2016).

A partir do uso da técnica de eletrofiação, a força eletrostática gerada pela diferença de tensão faz com que seja possível criar superfícies fibrosas orientadas ou desordenadas de diferentes diâmetros e comprimento, cascas porosas com núcleo oco, estruturas tubulares ou em formatos de cordão de gotas (MAURMANN; SPERLING; PRANKE, 2018).

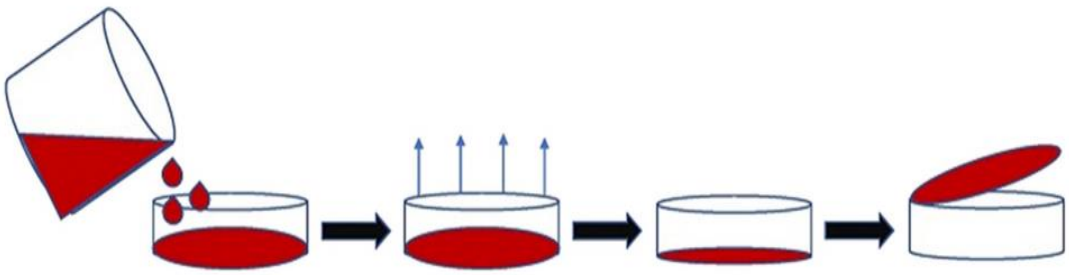
A eletrofiação é muito estudada devido às características que essa técnica pode oferecer ao biomaterial, como uma alta área por unidade de massa (1 a 100m²/g), alta porosidade (até 90%), onde estes poros podem ter seu tamanho ajustado, oferecendo ao biomaterial flexibilidade, resistência mecânica e permeabilidade. Além disso, esta técnica proporciona um biomaterial livre de solvente (MOGHADAM *et al.*, 2016), capaz de ser utilizado no encapsulamento, sequestro e proteção de partículas, moléculas, reagentes, fármacos, entre outros, realizando sua liberação por meio da dissolução da nanofibra, ou usada *in situ*, na cultura de células, por exemplo (RENEKER; YARIN, 2008).

Apesar de ser uma técnica muito estudada por suas vantagens, como baixo custo e simplicidade na aplicação da técnica, não sendo necessário profissional especializado nem infraestrutura complexa, a eletrofiação tem uma produtividade baixa, de até 300mg/h. Também se desprende atenção em relação à toxicidade dos solventes utilizados, pois estes podem intoxicar os manipuladores ao evaporarem, tendo assim a preocupação com o uso de máscaras respiratórias com filtro, bem como o seu bom funcionamento (MOHAMMADZADEHMOGHADAM *et al.*, 2016; KITSARA *et al.*, 2017).

2.6.2. Técnica de deposição manual ou *solvente casting*

Dentre as técnicas existentes para produção de filmes poliméricos, será abordada a técnica de deposição manual, ou *solvent casting* (evaporação de solvente) (figura 10). Essa técnica tem uma forma simples de ser executada, consistindo na solubilização do polímero em um solvente volátil apropriado, objetivando uma solução viscosa. Esta solução é então depositada em uma superfície plana, podendo ser chamada de molde do filme, a qual fica em repouso o tempo suficiente para que ocorra a evaporação total do solvente, podendo ser a temperatura ambiente ou controlada (estufa). Após total evaporação do solvente, o filme seco pode ser facilmente removido da superfície a qual foi depositado (LUO *et al*., 2019).

Figura 9 - Técnica solvent casting.



Fonte: Adaptado de SUHAG *et al*., 2020.

O tamanho do poro gerado irá direcionar a utilidade daquele biomaterial. Filmes com macro e microporos são aplicados como membranas filtrantes para uso na purificação de água ou resíduos. Já os filmes com nanoporos são utilizados para troca e permeação de gases, liberação de drogas, películas para revestimento de alimentos e embalagens (OSHIRO JUNIOR; SHIOTA; CHIAVACCI, 2014).

Películas densas têm sido aplicadas na regeneração de tecidos, principalmente em curativos, uma vez que costumam ser transparentes, podendo acompanhar o progresso da ferida sem a necessidade de retirá-lo, além de não ter limite de extensão (OSHIRO JUNIOR; SHIOTA; CHIAVACCI, 2014).

A técnica *solvent casting* é fácil e prática de ser aplicada, sem necessidade de equipamentos sofisticados ou profissionais especializados. Sua aplicabilidade tem um baixo custo de execução, por ser necessário apenas um molde adequado e um solvente que solubilize o polímero e volátil. Porém, há um grande emprego de tempo para que o solvente seja totalmente evaporado (LUO *et al*., 2019; SUHAG *et al*., 2020).

Tanto para a técnica de eletrofiação quanto deposição manual, ou *solvent casting*, são formadas cadeias poliméricas lineares contínuas, camada por camada. Dependendo do

polímero, para que o *scaffold* cumpra seu papel de sustentação mecânica ao mimetizar a matriz extracelular, faz-se necessária a formação de inter e intraligações entre as cadeias poliméricas, resultando em redes tridimensionais (KRISHNAKUMAR *et al*., 2019).

2.6.3. Reticulação

O processo de formação de inter e intraligações entre as cadeias poliméricas nos filmes são chamados de reticulação, ou *crosslink*. Além de melhorar as propriedades mecânicas, como resistência à força, tração, estabilidade térmica, entre outros, o processo de reticulação permite que as moléculas bioativas venham a ser adicionadas ao filme para auxiliar na cicatrização, como proteínas, medicamentos, entre outros, possam ser absorvidas de forma gradativa, aumentando assim seu tempo de vida útil (ALI; AHMED, 2018).

Filmes de polímeros naturais, como a quitosana, apresentam menor resistência mecânica e maior solubilidade em água, quando comparados a filmes de polímeros sintéticos. Para que esta diferença seja superada, a reticulação se torna uma importante ferramenta, pois possibilita a formação de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas e melhora propriedades mecânicas na estrutura do biomaterial. Além disso, a reticulação também reduz a molhabilidade do biomaterial, possibilitando maior resistência à água e garantindo assim a integridade do material (KRISHNAKUMAR *et al*., 2019).

O processo de formação de ligações cruzadas no *scaffold* ocorre com o uso de um agente reticulante, podendo ser químico ou físico, capaz de reagir com as cadeias poliméricas e estabelecer ligações intermoleculares covalentes e/ou iônicas, para agentes reticulantes químicos; e ligações de hidrogênio e/ou de Van der Waals, para agentes reticulantes físicos (AZEREDO; WALDRON, 2016).

O tamanho molecular do agente reticulante influencia na velocidade de reticulação, de forma que, quanto menor o seu tamanho, mais rápido será o processo de reticulação, uma vez que a sua difusão é mais rápida. Também se deve atentar ao tempo de exposição do material polimérico ao agente reticulante conforme o propósito do material, pois quanto mais reticulado o material, menos permeável e mais rígido ele fica. Dependendo do agente reticulante, também pode haver a mudança de coloração do material polimérico (GARAVAND *et al.*, 2017).

2.7. TESTES *IN VITRO*

Visando analisar o comportamento das células fora do organismo e em um ambiente controlado, o cultivo celular é uma importante ferramenta em diversas pesquisas, utilizado em muitos laboratórios ao redor do mundo (MORALES-SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

A cultura celular pode ser estabelecida a partir de um fragmento de tecido ou órgão que estejam isolados do organismo de origem, em que estas células isoladas são cultivadas em um ambiente propício para o desenvolvimento celular, contendo uma matriz bidimensional ou tridimensional, que busca mimetizar as condições de origem daquele tipo celular, nutrientes requisitados, controle de temperatura, umidade, CO_2 e em condições assépticas. O cultivo celular *in vitro* é uma importante alternativa para entender o comportamento celular de diversas células, além de proporcionar o conhecimento sobre o comportamento de fármacos, biomateriais, citotoxicidade, entre outros (GIL-LOYZAGA, 2011).

Por mais que seja um modelo muito utilizado, os protocolos estabelecidos *in vitro* diferem dos modelos *in vivo*. Um exemplo é a adesão estabelecida entre célula-célula e célula-matriz, que é reduzida consideravelmente no cultivo *in vitro*, uma vez que não detêm da estrutura e heterogeneidade estabelecidas *in vivo*, além do meio de cultivo conter nutrientes e hormônios que diferem do ambiente natural de crescimento celular, alterando assim as respostas celulares. Por mais que existam diferenças, o cultivo celular *in vitro* tem vantagens em relação aos testes *in vivo*, por ter a possibilidade de controlar o ambiente do experimento, induzir a diferenciação celular a partir da suplementação, além do custo agregado ser muito menor quando relacionado aos testes *in vivo*. Portanto, antes de investir em um modelo vivo, é muito importante e corriqueiro realizar testes com células (MCKEE; CHAUDHRY, 2017).

As culturas de células utilizadas para a realização dos experimentos deste trabalho de conclusão de curso consideram o tecido a ser estudado. Como o presente estudo é sobre regeneração de pele, foi selecionada uma linhagem de queratinócitos.

Queratinócitos são os principais tipos celulares da pele, presentes em todas as camadas da epiderme, compondo o tecido epitelial e invaginações da epiderme para a derme (unhas, pelos cabelos), responsáveis pela produção de queratina, uma proteína fibrosa protetora, impermeabilizante e fortalecedora da pele (ŁOS; SKUBIS; GHAVAMI, 2019).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Hematologia e Células-Tronco da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTIC), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o Instituto de Pesquisa com Células-Tronco (IPCT) foram os órgãos fomentadores do trabalho.

A metodologia desenvolvida na realização deste projeto será descrita nos próximos itens desta seção.

3.1. MATERIAIS

Para o preparo das soluções, foram utilizadas ampolas de 5mL com suas respectivas tampas, buscando diminuir a evaporação do solvente enquanto a solução foi homogeneizada. Também foram utilizados equipamentos como balança analítica, pHmetro, equipamento de eletrofiação *(Electrospinning)*, agitadores magnéticos, espectrofotômetro UV-Vis, entre outros. Além disso, todas as soluções foram preparadas precisamente e utilizando-se todos os equipamentos de proteção individual (EPI) necessários, depois de realizados os cálculos e pesquisas adequados para cada reagente.

Na elaboração das soluções poliméricas, foram utilizados os solventes 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP), ácido acético e água ultrapura, e os polímeros policaprolactona (PCL) e quitosana. A quitosana utilizada é de alto peso molecular, ~ 360 kDa, viscosidade de 460 mPa.s, desacetilação de 91%, produzida pelo Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, recebida de doação.

Para o cultivo de células, foram utilizadas TCP (*Tissue Culture Plate*) de 24 poços, *o'rings* de silicone (anéis de silicone flexíveis, para manter os *scaffolds* no fundo do poço), centrífuga, capela de fluxo laminar com esterilização UV prévia, micropipetas, entre outros.

3.2. SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

Os polímeros e suas misturas foram solubilizados em solventes compatíveis, conforme suas particularidades, respeitando afinidades e interações intermoleculares. O intuito foi proporcionar similaridade entre as diluições e porcentagens de massa/volume, oportunizando a comparação dos resultados de forma mais fidedigna possível na produção dos *scaffolds* por

eletrofiação e deposição manual, podendo assim determinar o melhor método de deposição polimérica para o desenvolvimento celular eficiente, além da comparação entre os polímeros e suas formas de deposição.

Para a dissolução polimérica, foram realizados testes com diferentes solventes para os diferentes polímeros e suas misturas, bem como os métodos de deposição, além de levar em conta a variação das concentrações dos polímeros.

O solvente que melhor se comporta na solubilização dos polímeros, para a finalidade desejada, é o 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HPF). Porém, este solvente é muito caro, podendo custar em torno de R$ 450,00 por 5g (MERK, 2021a). Além disso, é um solvente volátil perigoso, classificado como tóxico à reprodução e a órgãos específicos por exposição repetida ou prolongada (categoria 2) (SIGMA-ALDRICH, 2021a), o que faz necessário o uso de equipamentos de proteção individual especiais para quem o manuseia, e para todos que estejam no mesmo ambiente a qual ocorre o teste.

Um solvente que foi utilizado em alguns ensaios para tentar substituir o HPF foi o ácido acético, o qual possibilitou sua substituição em todas as soluções, com exceção da solução eletrofiável de quitosana 1%. O ácido acético é um solvente mais acessível, custando em torno de R$ 96,00 o litro (MERK, 2021b), além de não haver indicação de toxicidade à reprodução e órgãos específicos (SIGMA-ALDRICH, 2021b).

Para homogeneização total da solução, foi utilizado um agitador magnético a velocidade constante, *overnight*, mantendo o frasco fechado para evitar perda de volume de solvente.

3.3. CONFECÇÃO DOS *SCAFFOLDS*

Para testar a aplicabilidade dos materiais poliméricos, foram realizadas duas formas de fabricação dos *scaffolds*: por eletrofiação e por deposição manual do polímero.

Foram confeccionados biomateriais de quitosana e PCL, além de realizar testes com misturas de ambos, visando melhorar a estabilidade da solução.

A composição da solução dos diferentes materiais poliméricos foi a mesma para os dois métodos de produção dos *scaffolds* (eletrofiação e deposição manual).

Para todos os testes, foi utilizada uma TCP de 24 poços, onde cada ensaio foi feito em triplicata. Para os poços testes, ou seja, àqueles que receberem os *scaffolds* anteriormente ao cultivo celular, foram colocados lamínulas de vidro antes de acomodá-los para garantir que os resultados de adesão e proliferação celular sejam atribuídos somente a interação das células

com os biomateriais, uma vez que o fundo da TCP recebe um tratamento especial pelo fabricante, a qual promete promover adesão celular. Os poços controle não receberam lamínulas. Todos os poços, incluindo os poços controle, foram adicionados os anéis *o'rings*.

Depois de acomodados no fundo do poço e fixados com os anéis *o'rings*, todos os *scaffolds* (deposição manual e eletrofiação) receberam o tratamento de reticulação com glutaraldeído 0,5% por 2 horas, sendo posteriormente lavados com Milli-Q® e colocados em estufa à 37ºC por 24h.

Com os biomateriais reticulados e secos foram realizada a esterilização dos mesmos com UV por 1 hora em capela de fluxo laminar, tomando todos os cuidados de esterilização. Após esterilização, foi realizado o cultivo celular sobre os *scaffolds*, utilizando a linhagem celular de queratinócitos imortalizados (HaCat) na densidade de 50.000 células/poço. O cultivo foi realizado por cinco dias, realizando a troca diária com o meio de cultivo de Eagle Modificado por (DMEM) com alta glicose (4.500 mg/L de glicose), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de estreptomicina e penicilina.

Para os substitutos dérmicos, apenas não foi realizada a etapa de reticulação das cadeias poliméricas, uma vez que o mesmo já vem reticulado.

3.3.1. Confecção dos filmes poliméricos por deposição manual

Para a preparação de filmes poliméricos, foi utilizada a técnica de deposição manual, ou *solvente casting*, conforme detalhado no item 2.6.2.

Foram preparadas três soluções: (1) quitosana 1% em ácido acético 80%, (2) PCL 24% em ácido acético 80%, e (3) quitosana 1% com PCL 24% em ácido acético 80%. A mistura de PCL/quitosana resultou em uma proporção de 96:4. Todas foram deixadas em agitação magnética por 24h.

Após totalmente solubilizadas, as soluções foram acomodadas no fundo do poço da TCP no volume de 30µL/poço, com o auxílio de uma seringa sem agulha. Foi utilizada uma seringa para deposição das soluções, pois na técnica de eletrofiação se faz necessário o uso, então, buscou-se utilizar o mesmo tipo de material para buscar tratar ambos os experimentos de forma similar, objetivando a diminuição de erros experimentais.

Após a deposição uniforme da solução polimérica, a TCP foi submetida à estufa 37°C, por 24 horas, a fim de eliminar totalmente o solvente da solução por evaporação.

3.3.2. Confecção dos *scaffolds* por eletrofiação

Para a preparação dos *scaffolds* por eletrofiação, a técnica foi desenvolvida conforme explanado no item 2.6.1.

A placa coletora foi revestida com papel alumínio. Sobre o papel alumínio, foram colocadas lamínulas de vidro, para que o *scaffold* fosse depositado sobre ambos (figura 12a), podendo ser destacado após a eletrofiação no formato circular do poço de cultivo de células.

Foram preparadas três soluções: (1) quitosana 1% em HPF, (2) PCL 24% em ácido acético 80% e (3) a mistura de PCL 24% e quitosana 1% (96:4) em ácido acético 80%, todos no volume de 30µL/poço, deixando-as em agitação magnética por 24h, mantendo os frascos fechados para evitar perda de volume de solvente por evaporação.

Com as soluções homogêneas, foram carregadas em uma seringa e posteriormente, foi posicionada à seringa uma agulha 23G (0,65mm x 1 1/2' 38mm), tendo sua ponta lixada até que ficasse plana para permitir a formação do Cone de Taylor durante a eletrofiação, e posicionadas no equipamento (figura 12b), tendo a distância de folga de 15 cm (entre a ponta da agulha e a placa coletora).

Cada solução foi submetida a um diferencial de tensão, com auxílio de um controlador (figura 12c). Conforme a solução foi sendo pulsionada pela bomba peristáltica para fora da seringa, a diferença de tensão entre a ponta da seringa e a placa coletora faz com que as fibras sejam depositadas de forma randomizada, livre do solvente, uma vez que o mesmo vem a evaporar no caminho entre a ponta da agulha até a placa coletora. As tensões e velocidades utilizadas durante a eletrofiação estão descritas no quadro 2.

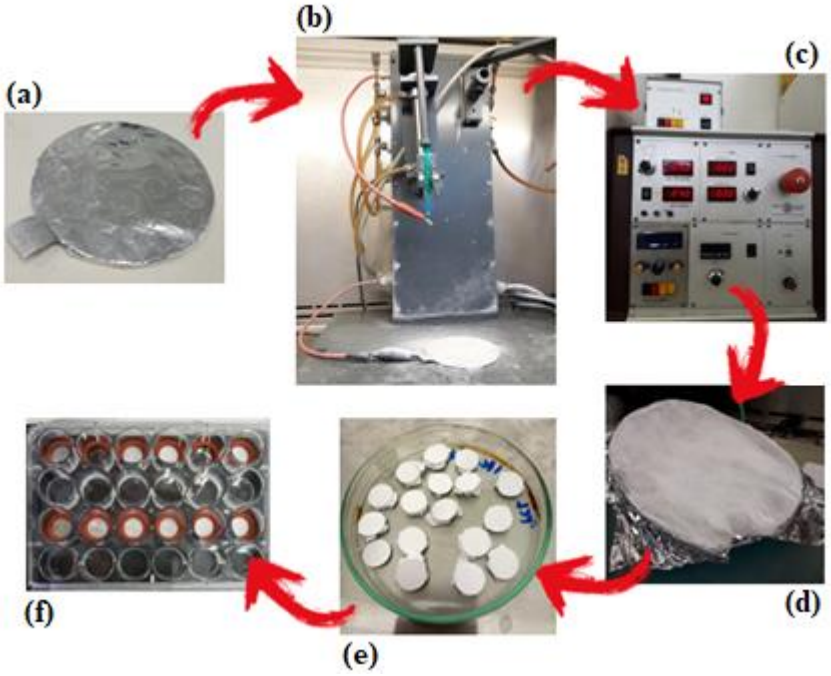
Quadro 2– Parâmetros da eletrofiação a suas respectivas soluções poliméricas.

Solução	**Solvente**	**Tensão (kV)**	**Velocidade (mL/h)**
Quitosana 1%	HPF	+14 e -1	0,643
PCL 24%	Ácido acético 80%	+24 e -2	0,049
PCL 24% + Quitosana 1%	Ácido acético 80%	+24 e -2	0,049

Fonte: Autora, 2021. PCL = policaprolactona.

Ao término da eletrofiação (figura 12d), o *scaffold* foi destacado do papel alumínio, mantendo a lamínula de vidro (figura 12e). Estas lamínulas contendo as fibras randomizadas foram depositada no fundo dos poços da TCP e acomodada sobre eles os anéis *o'ring* (figura 12f).

Figura 10 - Técnica de Eletrofiação – aplicação experimental.



Fonte: Autoras (2019).

3.3.3. Preparo dos substitutos dérmicos comerciais para o ensaio com células

Os substitutos dérmicos utilizados nesta pesquisa foram os da marca Integra™, Matriderm™ e Pelnac™, gentilmente cedidas pelo do colaborador do Laboratório de Hematologia e Células-tronco da UFRGS, o médico Bruno José da Costa Alcantara.

As referidas amostras de substitutos dérmicos comerciais foram cortadas com uma tesoura no diâmetro aproximado de 13mm e esterilizadas com radiação UV em capela de fluxo laminar por 1h. Ainda na capela de fluxo laminar, as amostras foram posicionadas no fundo do poço da TCP e fixadas com *o'ring.*

3.4. CARACTERIZAÇÃO DOS *SCAFFOLDS*

Para avaliar a morfologia dos *scaffolds*, foi utilizado o ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para visualizar o comportamento tridimensional dos *scaffolds*. O ensaio foi realizado no Centro de Microscopia e Microanálise, da unidade universitária da UFRGS, Campus do Vale.

Para que o material possa passar por MEV, ele precisa ser desidratado e colado em "*stubs*" com fita de carbono. Para isso, as amostras foram submetidas a lavagem com álcool,

sendo utilizadas as concentrações de 25%, 40%, 55%, 70%, 85%, 100% e 100%, onde cada concentração foi deixada em contato com o *scaffold* por 5min. Após, foram deixadas em estufa 37ºC, *overnight*.

3.5. AVALIAÇÃO DA ADESÃO E VIABILIDADE CELULAR

Os testes com células foram realizados no Laboratório de Hematologia e Células-tronco, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A linhagem celular comercial de queratinócitos utilizada para este trabalho são as HaCat, aneuploides imortais.

O processo de plaqueamento foi realizado conforme protocolo comum para cultura celular, onde foram cultivadas em uma garrafa de cultivo com meio DMEM, alta glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de estreptomicina e penicilina. Este meio foi retirado e as células foram soltas da garrafa com o auxílio de uma enzima proteolítica, a tripsina, a qual permite a passagem das células em suspensão para novas garrafas de cultivo. Após separação das células do meio de cultivo por centrifugação, as mesmas foram semeadas nas TCPs, com e sem os *scaffolds*, com e sem substitutos dérmicos, acrescidos de anéis *o'ring*, para análise e comparação dos resultados.

Para analisar a viabilidade celular das células expostas aos procedimentos, os poços das TCPs foram submetidos aos seguintes testes colorimétricos, após cinco dias de cultivo:

(1) Kit CCK-8: "Cell Counting Kit-8", utiliza o reagente WST-8 (2- (2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazólio, sal monossódico), e por este motivo também é conhecido por "teste WST-8". O reagente é capaz de produzir um corante de formazan solúvel em água após biorredução na presença de um transportador de elétrons, o 1-Metoxi PMS. Esta solução é então colocada diretamente em contato com as células, onde as desidrogenases celulares reduzem o WST-8 a formazan, solúvel em meio de cultura. O resultado do teste se dá por meio da leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 450nm, onde a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional à quantidade de células vivas. A solução do kit CCK-8 é estável e possui baixa citotoxidade, portanto, possibilita a incubação prolongada, de 24h a 48h. Foi preparada uma solução de 5% de WST-8 por poço em meio de cultura suplementada (diluição de 1:20), para o cultivo de células de 5 dias. Retirou-se o meio de cultivo de cada poço, tendo cuidado para não danificar o tapete de células aderidas ao fundo. Sob

abrigo da luz, foi adicionado o volume de 250µL em cada poço, além de três poços brancos, isto é, sem células. A TCP foi então incubada por 4h e posteriormente colocada no espectrofotômetro, selecionando o protocolo WST-8, o qual realiza a leitura de absorbância no comprimento de onda de 450nm.

(2) DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol): DAPI é um marcador fluorescente que se liga fortemente a regiões do DNA ricas em adenina-timina, emitindo coloração azul quando submetido à microscopia de fluorescência. A metodologia desta técnica segue Maurmann *et al*. (2017). As células foram fixadas em tampão paraformaldeído 4% por 20 min e enxaguadas em tampão PBS. Feito isto, foram lavadas com PBS e tiveram o núcleo corado de azul com 0,5µg/ml de DAPI, por 1 min. As amostras foram submetidas à microscopia de fluorescência no equipamento Leica DMi8 (Leica Microsystems).

(3) Coloração com diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP) - *Live/Dead*: ambos reagentes penetram nas células, tanto vivas quanto mortas. O FDA é incorporado ao citoplasma das células vivas, e ao ser clivado por lipases, emite uma fluorescência de coloração verde. Já o IP, é absorvido pelas células vivas e rapidamente expelido, ao contrário daquelas que estiverem mortas, que acaba marcando-as com uma fluorescência de coloração vermelha. Sendo assim, as células vivas são marcadas de verde (excitação em 494nm e emissão 517nm), e àquelas mortas são marcadas de vermelho (excitação em 528nm e emissão 617nm). A visualização e análise foram realizadas por microscopia de fluorescência. Para aplicação desta técnica, as células previamente lavadas com PBS foram submetidas a 10µg/mL FDA e 5µg/mL de PI em PBS por 7 min, descrito em Vieira (2020). A leitura da fluorescência foi realizada em um microscópio de fluorescência Leica DMi8 (Leica Microsystems).

Os dados do CCK-8 foram expressos como média relacionada à placa de poço (considerada 100%). Para todos os testes foi utilizada a significância estatística definida para valores de “p” inferiores a 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa estão dispostos nesta sessão, trazendo discussões pertinentes sobre o que eles representam para a pesquisa.

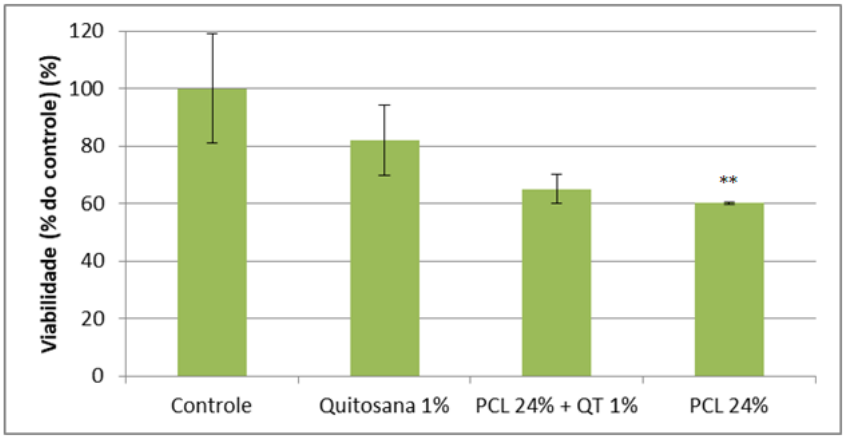
4.1. *SCAFFOLDS* PRODUZIDOS PELA TÉCNICA DE DEPOSIÇÃO MANUAL

Os filmes produzidos por deposição manual foram confeccionados, de forma que obtiveram uma superfície visualmente lisa e livre de solvente.

Por terem sido cultivados sobre o fundo do poço sem o uso da lamínula, não foi possível coloca-los nos *stubs* sem perder o material, impossibilitando, portanto, a realização da análise por MEV. Para que seja possível realizar a análise por MEV em filmes confeccionados por *solvente casting*, é necessário utilizar a lamínula de vidro no fundo do poço, para que seja possível retirar o filme sem danificá-lo.

Os resultados da viabilidade de HaCat por CCK-8 (gráfico 1) foram expressos como a média normalizada, e os valores de erro padrão médios obtidos dos *scaffolds* de absorbância em comparação com o controle (células cultivadas no fundo do poço com *o'ring* da TCP, sem biomateriais). A significância estatística foi com valores de $p \leq 0{,}01$, utilizando o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

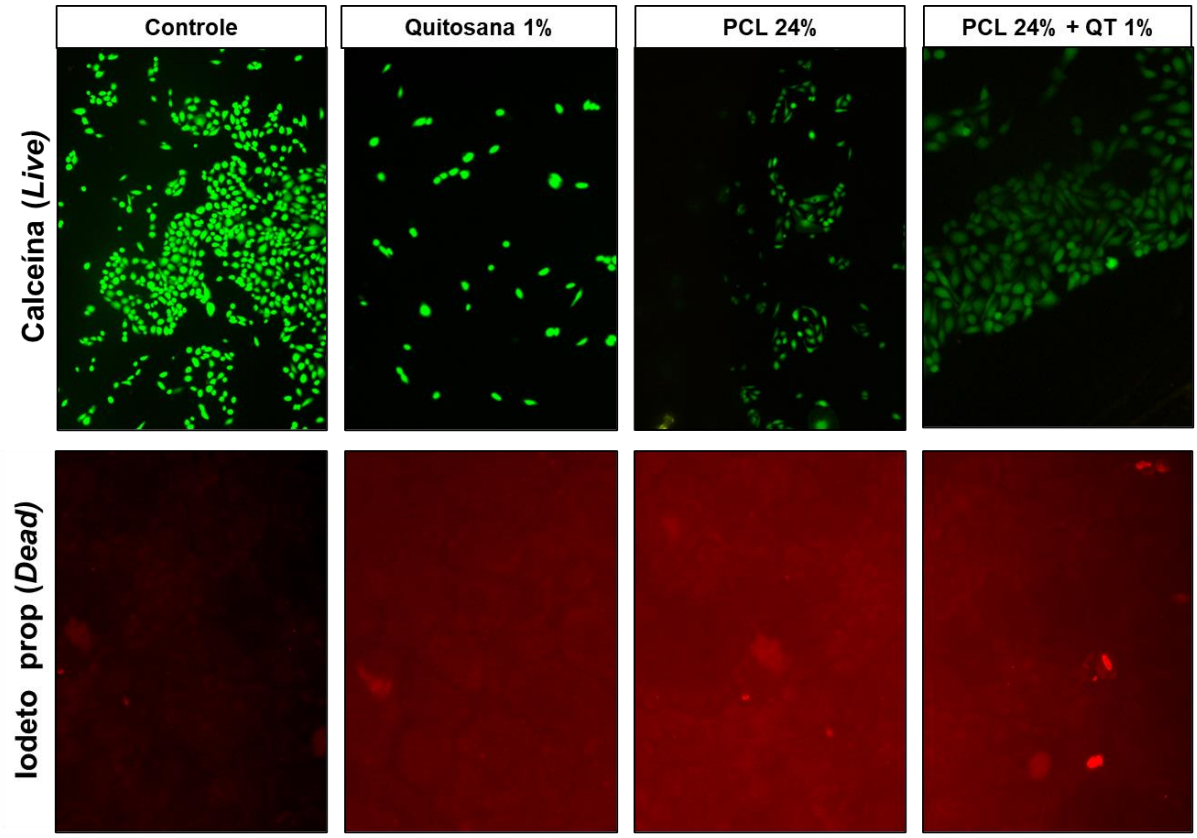
Gráfico 1 - Viabilidade celular de HaCat sobre filmes poliméricos, em relação ao controle.



Fonte: Autoras, 2019. ** indica $p \leq 0{,}01$.

Para consolidar as respostas obtidas pelo ensaio de viabilidade celular por absorbância obtido pelo teste CCK-8, foram realizados os testes *Live/Dead*, e visualizados por microscopia de fluorescência no equipamento Leica Microsystems (Leica DMi8), onde as lâminas foram varridas, e fotografadas as áreas que representaram o todo.

Figura 11– Ensaio *Live/Dead* para testes com *scaffolds* por deposição manual.



Fonte Autoras, 2019. PCL = policaprolactona. QT = quitosana. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência.

A figura 11 é qualitativa e ilustrativa, sem ter levado em consideração testes quantitativos, onde foi possível observar células vivas (verdes) em todos os materiais, e ausência de células mortas (vermelhas). Os pontos vermelhos observados em PCL 24% e na mistura de PCL/Quitosana parecem ser interferentes, e não células.

Os dados apresentados no gráfico 1, as soluções de quitosana 1% e a mistura de PCL 24% com quitosana 1% não demonstraram diferença com o controle, sugerindo que a viabilidade celular foi mantida. Já o filme de PCL apresentou diferença em relação ao controle (<0,05), mostrando uma diminuição na viabilidade celular.

Não foi possível realizar o ensaio de DAPI com os biomateriais produzidos por deposição manual, pois devido à espessura e densidade do filme, a imagem ficou de difícil visualização no microscópio de fluorescência.

Tayebi *et al*. (2021) fabricaram filmes de quitosana misturadas com PCL em diferentes proporções e suplementaram com nanopartículas de quitosana para aplicação em tecido endotelial da córnea e constataram que a viabilidade celular foi mantida. Além disso, após três dias de cultivo houve o aumento da viabilidade celular em relação ao controle, considerando a proporção de quitosana/PCL de 50:25.

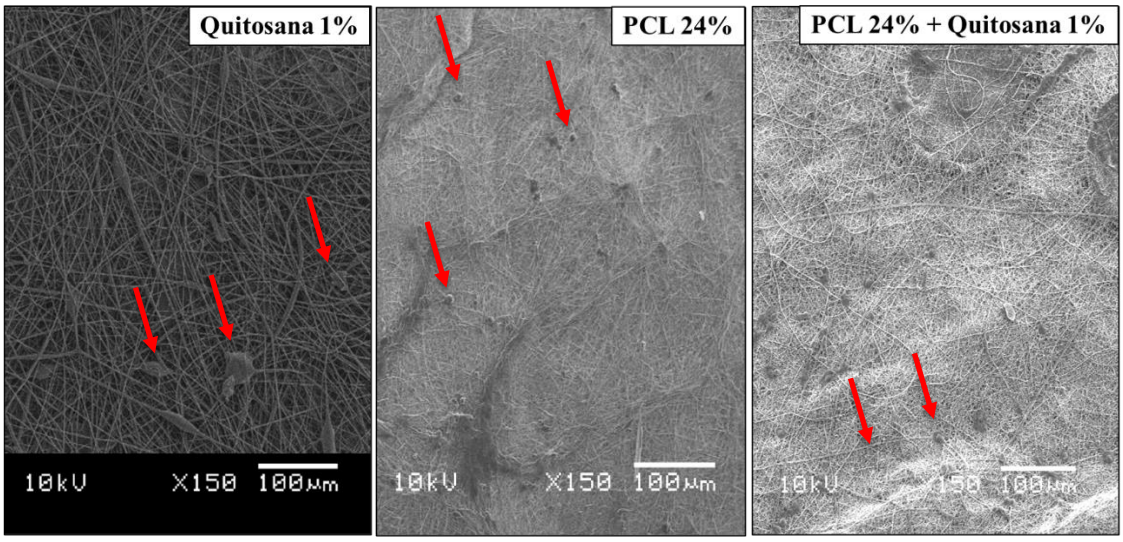
Wang *et al*. (2012) também testaram diferentes concentrações de quitosana/PCL para aplicação em tecido endotelial da córnea, encontrando a melhor combinação na proporção de 75:25. Este autor informa que o grau de desacetilação da quitosana utilizada é de 85%, da mesma forma que Tayebi *et al*. (2021).

Pode-se perceber que a quitosana melhorou as condições do *scaffold* de PCL em relação à adesão e proliferação celular, pois adicionando uma pequena porção de quitosana, como feito neste estudo (PCL/quitosana 96:4), houve a melhora na viabilidade celular em relação ao *scaffold* de PCL puro *in vitro*.

4.2. *SCAFFOLDS* PRODUZIDOS PELA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO

Para avaliar a morfologia e dimensionamento dos *scaffolds* eletrofiados, foi utilizado o ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para visualizar seu comportamento tridimensional, conforme a figura 12.

Figura 12 - MEV dos *scaffolds* eletrofiados.



Fonte: Autoras, 2019. As imagens representam os *scaffolds* de quitosana 1% (à esquerda), policaprolactona (PCL) 24% (ao centro) e a mistura de PCL 24% e quitosana 1% (à direita). Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

Por meio da MEV representada pela figura 12, é possível perceber que, para as condições empregadas, a eletrofiação gerou fibras finas e contínuas mas com alguns *beads*.

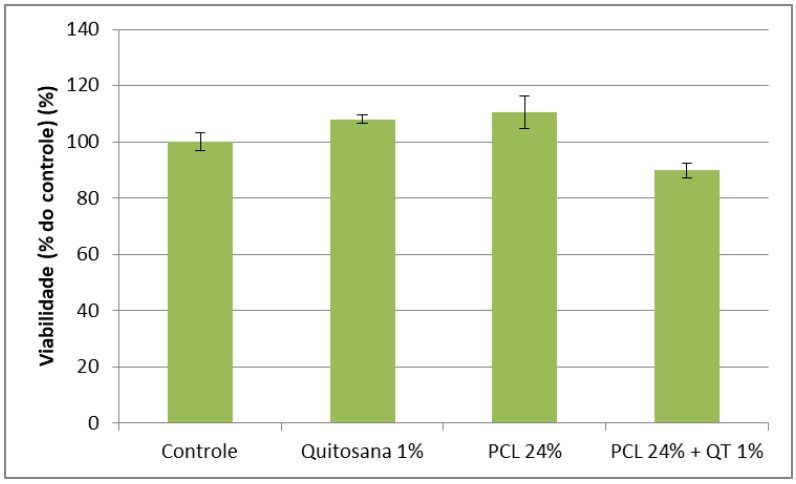
A formação de *beads* pode ser ocasionada por diversos fatores, como estabilidade insuficiente na solução, tensão inapropriada (RENEKER; YARIN, 2008), taxa de fluxo maior do que a solução necessitaria para formar fibras contínuas, a distância entre a ponta da agulha

inadequada, a temperatura durante o experimento poderia estar abaixo do ideal para eletrofiação daquela solução (GHOSAL *et al*., 2018), entre outros já citados no item 2.6.1.

É muito importante a ausência ou pouca incidência de *beads* na matriz eletrofiada, pois um *scaffold* uniforme auxilia no aumento do crescimento, comunicação e diferenciação celular (BALAGANGADHARAN; SELVAMURUGAN, 2016).

Os resultados da viabilidade de HaCat por CCK-8 (gráfico 2) do cultivo celular sobre os *scaffolds* eletrofiados foram expressos como a média normalizada, e os valores de erro padrão médios em comparação com o controle (células cultivadas no fundo do poço com *o'ring* da TCP, sem biomateriais). A significância estatística foi com valores de $p \leq 0{,}01$, utilizando o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

Gráfico 2 - Viabilidade celular de HaCat sobre eletrofiados poliméricos, em relação ao controle.

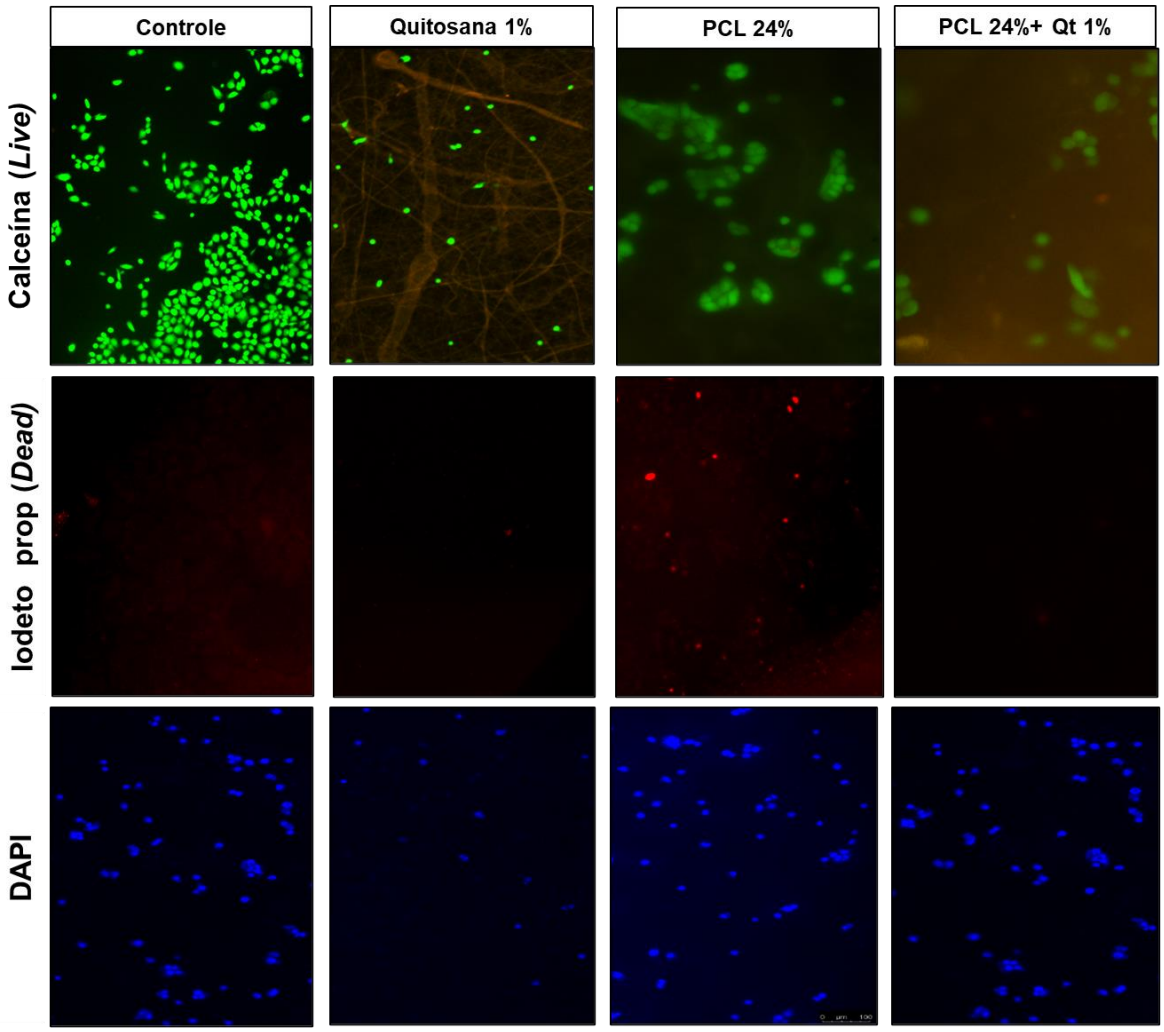


Fonte: Autoras 2019. ** indica $p \leq 0{,}01$. PCL = policaprolactona. QT = quitosana.

Comparando os *scaffolds* eletrofiados com o controle (TCP), como se pode perceber no gráfico 2, nenhum grupo apresentou diferença estatística, indicando que a viabilidade celular foi mantida.

Para consolidar as respostas obtidas pelo ensaio de viabilidade celular por absorbância obtido pelo teste CCK-8, foram realizados os testes *Live/Dead* e DAPI, e visualizados por microscopia de fluorescência, onde as lâminas foram varridas e fotografadas as áreas que representaram o todo, conforme a figura 13.

Figura 13 - Ensaio *Live/Dead* e DAPI para testes com eletrofiados poliméricos.



Fonte: Autoras, 2019. PCL = policaprolactona. QT = quitosana. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência.

As imagens da figura 13 produzidas pelo ensaio *Live/Dead* apresentaram algumas células mortas para a amostra de PCL 24% e basicamente ausência de células mortas para as demais amostras. Já para o ensaio DAPI, para todas as amostras, foi possível perceber visualmente que houve adesão celular satisfatória.

Semnani *et al*. (2016) fabricaram *scaffolds* de PCL/quitosana na proporção 70:30, obtendo resultados de viabilidade celular de 89,9% em relação ao controle. Comparando com a solução testada pelas autoras, o resultado para a proporção de 96:4 foi muito semelhante, tendo a viabilidade celular de 89,8%.

Sabe-se que, no caso da quitosana, por ser um polímero natural, cada lote de produção pode apresentar diferenças na sua composição, o que resultará em soluções com características diferentes ou até semelhantes, mas nunca iguais. A única informação da quitosana utilizada por Semnani *et al.* (2016) é seu peso molecular e sua procedência, a qual

tem 1.000 kDa, da Sigma-Aldrich (Alemanha), enquanto este estudo utilizou uma quitosana de 360 kDa, produzida pelo CERTBIO.

Conforme afirmado por Marques *et al.* (2020), a falta de informações quanto fonte de extração e caracterização da quitosana dificulta a discussão de resultados, uma vez que características como tipo de matéria prima, forma de extração, grau de desacetilação, massa molecular e pureza alteram as características da quitosana resultante, bem como a interação celular com o *scaffold*.

A alteração no peso molecular por meio da modificação na desacetilação da quitosana é uma das maneiras para obter diferentes propriedades fisiomecânicas. Esta diferença entre as massas moleculares dos dois experimentos pode ser o motivo pelo qual as respostas de viabilidade celular tornaram-se parecidas, uma vez que quanto maior for o grau de desacetilação, e consequentemente o peso molecular, maior a probabilidade de formação de ligações de hidrogênio internas, o que deixaria o material menos poroso, e, portanto, menos favorável a adesão e crescimento celular (PERIAYAH; HALIM; SAAD, 2016).

Por outro lado, Nair e Laurencin (2007) afirmam que a "taxa de degradação da quitosana depende inversamente do grau de acetilação e cristalinidade do polímero", onde valores altos de desacetilação (>85%) podem diminuir a taxa de degradação do referido polímero, podendo demorar alguns meses para ser bioabsorvido *in vivo*.

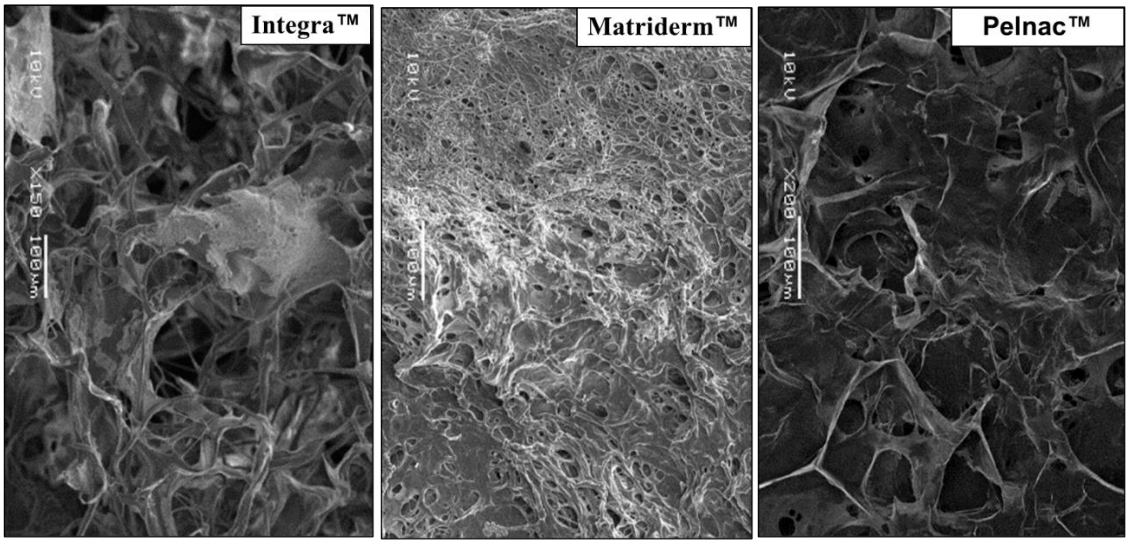
Todavia, Periayah, Halim e Saad (2016) afirmam que a carga elétrica positiva da quitosana atrai moléculas carregadas negativamente, que é o que ocorre quando há um ferimento, onde a barreira positiva é rompida, expondo as cargas negativas do interior das matrizes celulares. Com isso, quando há maior desacetilação, fato que é proporcionado pelo grau de desacetilação superior a 50%, possibilita a protonação do grupamento amino da quitosana, aumentando assim a carga positiva do biomaterial (AHMED *et al.*, 2018), o que proporcionaria o aumento da atração elétrica do biomaterial ao ferimento, havendo assim melhor interação entre ambos, uma vez que é pretendido que o material seja bioabsorvido pelo paciente conforme a cicatrização avança, evitando que seja necessária a troca de curativo, diminuindo o mal estar ao paciente e contribuindo positivamente na regeneração tecidual.

Como este estudo não possibilitou estudos *in vivo*, o debate entre ambos os trabalhos não pode ser realizado quanto a este quesito.

4.3. SUBSTITUTOS DÉRMICOS

Para avaliar a morfologia e dimensionamento dos substitutos dérmicos, foi utilizado o ensaio de MEV para visualizar seu comportamento tridimensional (figura 14).

Figura 14 – MEV dos substitutos dérmicos: Integra™, Matriderm™ e Pelnac™.

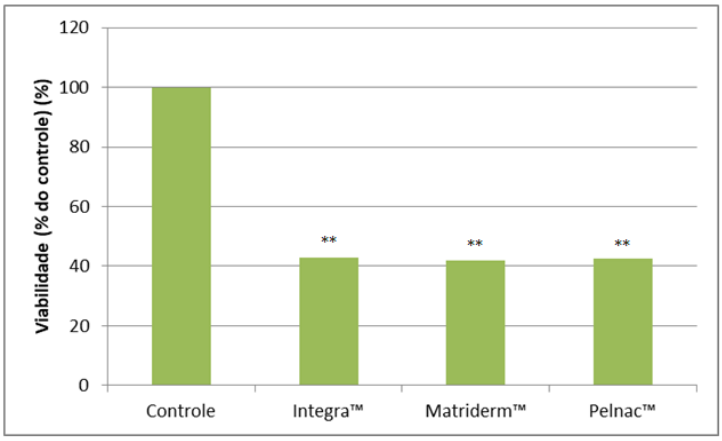


Fonte: Autoras 2019. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

Na figura 14 podemos observar que os substitutos dérmicos possuem alta porosidade, mas de forma desuniforme, havendo falhas circulares, similares a buracos ou perfurações, sendo o Matriderm™ o visualmente menos poroso, o qual parece ser mais denso e compactado, com poucas perfurações em sua estrutura.

Os resultados da viabilidade de HaCat por CCK-8 (gráfico 3) do cultivo celular sobre os substitutos dérmicos foram expressos como a média normalizada, e os valores de erro padrão médios em comparação com a TCP (usando-a como um grupo de controle). A significância estatística foi com valores de $p \leq 0{,}01$, utilizando o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

Gráfico 3 - Viabilidade celular de HaCat sobre substitutos dérmicos, em relação ao controle.

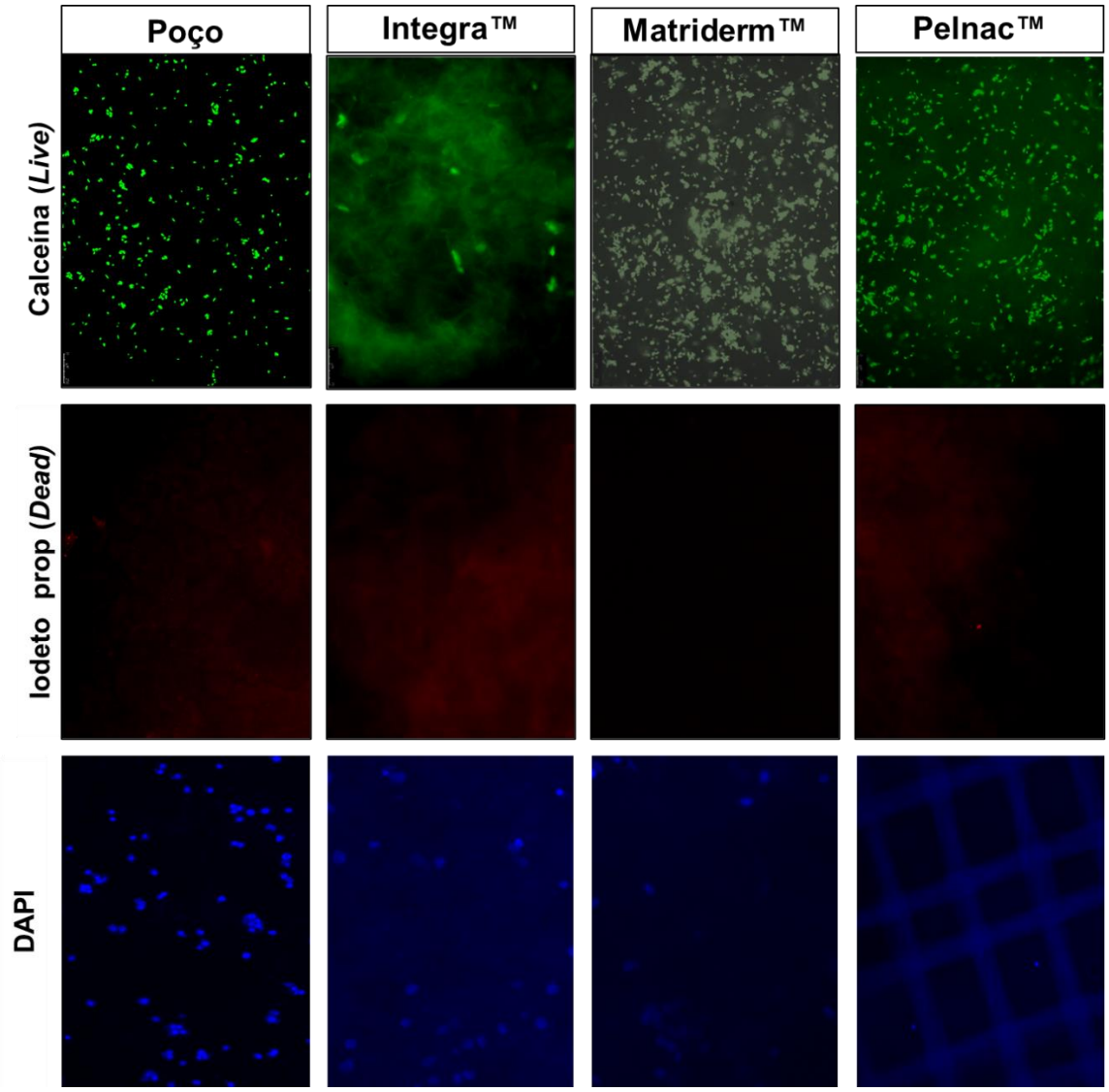


Fonte: Autoras 2019. ** indica $p \leq 0{,}01$.

Comparando os substitutos dérmicos com o grupo controle, todos mostraram uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular. Isso sugere que os substitutos dérmicos diminuem a viabilidade dos queratinócitos *in vitro*.

Para consolidar as respostas obtidas pelo ensaio de viabilidade celular por absorbância obtido pelo teste CCK-8, foram realizados os testes *Live/Dead* e DAPI, e visualizados por microscopia de fluorescência, onde as lâminas foram varridas e fotografadas nas áreas que representaram o todo, conforme a figura 15.

Figura 15 – Ensaio *Live/Dead* e DAPI para testes com substitutos dérmicos comerciais.



Fonte: Autoras, 2019. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência.

O ensaio *Live/Dead* apresentado pela figura 15 ficou de difícil identificação, uma vez que a matriz é espessa, sendo de difícil visualização por este método. O mesmo aconteceu no ensaio DAPI. Além disso, o teste não foi apresentado de forma quantitativa, sendo adicionado ao estudo apenas em caráter visual.

Francesco *et al*. (2020) realizaram testes *in vitro* e *in vivo* com os substitutos dérmicos Integra™ e Pelnac™, onde constataram que ambos apresentaram viabilidade celular e eficiência na cicatrização das feridas semelhantes, o que corrobora com o resultado obtidos neste estudo, uma vez que a viabilidade celular dos substitutos dérmicos são similares entre si. Porém, Francesco *et al*. (2020) não apresentaram dados de controle, o que não pode-se comparar, portanto, a sua eficiência quanto a viabilidade celular em relação a uma situação favorável ao crescimento celular.

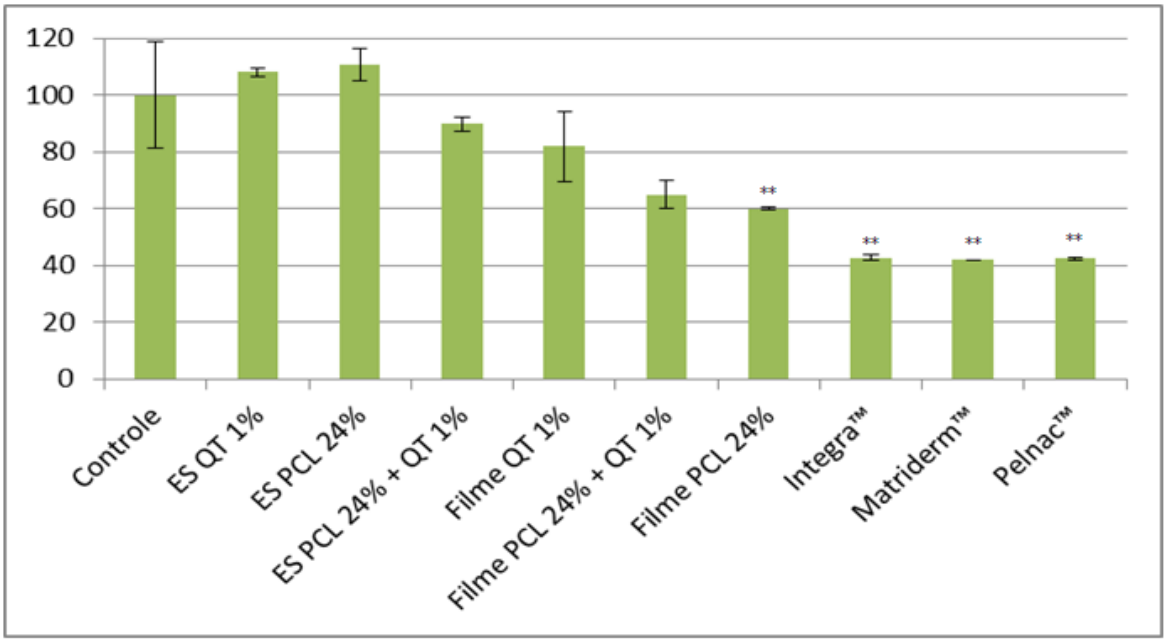
Os substitutos dérmicos comercialmente disponíveis são os principais materiais utilizados como alternativa ao enxerto, por serem produzíveis em grandes quantidades, por terem fácil armazenamento e manuseio. Além disso, são projetados para proteger a lesão do ambiente externo e auxiliar na cicatrização, uma vez que detêm de uma matriz porosa, construída para induzir a migração celular e acelerar o processo de cicatrização (Hori *et al*., 2017).

Hori *et al*. (2017) utilizaram os substitutos Terudermis™, Pelnac™, e Integra™, onde a porosidade destes variavam de 2 mm a 200µm. Para que haja uma boa migração e crescimento celular no *scaffold*, o diâmetro médio adequado varia entre 20 e 120µm (YANNAS *et al*., 2010). Sendo assim, a falta de uniformidade e a alta variabilidade no tamanho dos poros dos substitutos dérmicos comerciais, fugindo um pouco dos valores ótimos para migração e crescimento celular, podem ser as causas que prejudiquem a viabilidade celular *in vitro*.

4.4. COMPARAÇÕES ENTRE O CONTROLE, DIFERENTES *SCAFFOLDS* E SUBSTITUTOS DÉRMICOS ESTUDADOS

A comparação da viabilidade celular de HaCat entre as diferentes matrizes pode ser observada no gráfico 4.

Gráfico 4 - Viabilidade celular de HaCat sobre as diversas matrizes testadas in vitro.



Fonte: Autoras 2019. ** indica $p \leq 0{,}01$. ES = *scaffolds* produzidos por eletrofiação. Filme = *scaffolds* produzidos por deposição manual. PCL = policaprolactona. QT = quitosana.

Dentre as formas de deposição polimérica testadas, a que melhor propiciou o crescimento celular foi àquelas eletrofiadas, onde todas as amostras mostraram-se similares ao grupo controle, não resultando em diferença estatística significativa, o que sugere que a viabilidade celular foi mantida. Este resultado corrobora com o estudo realizado por Ahmed *et al*. (2018), a qual afirma que *scaffolds* de nanofibras são morfologicamente similares à matriz extracelular natural da pele.

No caso dos *scaffolds* produzidos por deposição manual, o único que apresentou diferença estatística com o controle foi aquele composto por PCL 24%, demonstrando a diminuição da viabilidade celular. Porém quando acrescido de 1% de quitosana, o resultado melhora, demonstrando-se estatisticamente similar ao controle. O *scaffold* composto apenas por quitosana 1% também não demonstrou diferença estatística com o controle, sugerindo que a viabilidade celular foi mantida. Sendo assim, pode-se considerar que a quitosana proporcionou um ambiente mais vantajoso para a adesão e proliferação celular.

Dentre as matrizes dérmicas testadas, os modelos comerciais Integra™, Matriderm™ e Pelnac™ demonstraram comportamento similares entre si. Já em relação ao controle, apresentaram resultados de diminuição da viabilidade celular *in vitro*, sugerindo que não puderam promover a adesão e proliferação celular adequada. Quando comparados aos demais

scaffolds, estes se sobressaem negativamente, sugerindo ser a pior matriz dérmica no que tange a viabilidade celular *in vitro*.

Substitutos dérmicos foram projetos para resolver o problema da falta de tecido na prática do autoenxerto, tendo de ser capaz de cobrir e proteger o tecido lesado, fornecer uma melhor qualidade de cicatrização e propiciar a produção de matriz extracelular, por meio da promoção da migração e crescimento celular (HORI *et al*., 2017; EHRENREICH; RUSZCZAK, 2006).

Sendo assim, para o propósito do material, o mesmo atende as expectativas, porém, é possível observar que há algumas propriedades que não propiciam o ambiente mais próximo do ideal para a prática da regeneração tecidual, onde os *scaffolds* produzidos por este estudo parecem suprir estas necessidades. Contudo, é preciso realizar testes *in vivo* para poder avaliar melhor os resultados, podendo comparar os substitutos dérmicos e os scaffolds com e sem células, para determinar qual melhor se comportaria na regeneração tecidual. O grupo controle deste estudo poderia ser a lesão sem curativo.

5. CONCLUSÕES

Por meio deste projeto de pesquisa, foi possível confeccionar *scaffolds* pelas técnicas de deposição manual (*solvent casting*) e eletrofiação, utilizando os polímeros PCL, quitosana e suas misturas. Além disso, foi possível compará-los com substitutos dérmicos comerciais.

Por meio de comparações estatísticas de viabilidade celular *in vitro* da semeadura de HaCat sobre os *scaffolds* produzidos pelas técnicas deposição manual e eletrofiação, apenas o *scaffold* de PCL 24% feito por deposição manual demonstrou diminuição da viabilidade celular em relação ao controle, sugerindo que este polímero sozinho não propicia um ambiente favorável para adesão e proliferação celular.

Além disso, quando adicionado quitosana 1% ao *scaffold* de PCL 24%, a viabilidade celular melhorou em relação a PCL sozinho, uma vez que não demonstrou diferença estatística com o controle, sugerindo similaridade. Sendo assim, pode-se considerar que a quitosana melhorou as propriedades do *scaffold*, no que tange a viabilidade celular.

Com estes resultados, pode-se considerar a mistura da quitosana ao PCL, buscando diminuir a proporção do uso deste polímero derivado de fontes não renováveis e objetivando a regeneração de pele é uma opção promissora.

Comparando substitutos dérmicos comerciais com o grupo controle, todos mostraram uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular em relação ao controle. Isso significa que, apesar do sucesso dos materiais comercialmente disponíveis para auxiliar na cicatrização dérmica, eles diminuem a viabilidade dos queratinócitos *in vitro*.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Alguns objetivos específicos mencionados no Trabalho de Conclusão de Curso 1 (TCC 1) apresentados ao final do ano de 2020 não puderam ser executados, uma vez que a UFRGS não liberou o acesso de pesquisadores de nível de graduação ao laboratório durante todo o ano de 2020 e 2021, devido a pandemia do novo coronavírus.

Referente aos testes de caracterização dos biomateriais, não foi possível realizar a molhabilidade, propriedades mecânicas, viscosidade e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

Além disso, não foi possível testar o polímero ácido polilático (PLA), por se tratar de um experimento que havia sido projetado para ser incluído no referido projeto de conclusão de curso.

Caso os testes sejam retomados assim que as diretrizes da UFRGS permitam, deverão ser repetidas as confecções de todos os biomateriais, bem como métodos de caracterização e viabilidade celular.

Ademais, o filme de PCL (técnica de deposição manual) demonstrou diminuição da viabilidade celular, e este poderia ser usado como controle negativo ou até mesmo retirado do estudo.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os *scaffolds* de PCL/quitosana apresentam resultados satisfatórios quanto à viabilidade celular *in vitro*.

Para que seja possível determinar a efetiva habilidade de regeneração de pele dos *scaffolds* de PCL/quitosana, se faz necessária à realização de estudos *in vivo*. Poderiam ser comparadas lesões tratadas com *scaffolds* de PCL/quitosana, PCL, quitosana, substitutos dérmicos comerciais com e sem células, determinando assim qual a interferência do uso de cada matriz dérmica e o uso de células na regeneração de pele.

Como citado por Marques *et al*. (2020), é importante para o quesito reprodutibilidade que a quitosana utilizada seja caracterizada quanto a sua massa molecular (por exemplo, por cromatografia de exclusão de tamanho), viscosidade (por exemplo, por viscosimetria capilar), grau de desacetilação (por exemplo, por ressonância magnética nuclear) e quantificar o conteúdo de endotoxinas (por exemplo, por teste de Lisado de Amebócito de Limulus).

Para garantir que outros autores possam reproduzir este estudo, todas estas informações devem estar dispostas nos trabalhos futuros, além de buscar incentivar os leitores a também partilhar mais informações sobre polímeros naturais.

REFERÊNCIAS

AGENCY FOR HEALTHCARE RESEARCH AND QUALITY. **Technology Assessment Program** - Skin Substitutes for Treating Chronic Wounds. Philadelphia: AHRQ, 2020.

AHMED, S. *et al*. A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier, Amsterdã, v. 116, set. 2018, p. 849-862. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.176.

ALI, A.; AHMED S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier, Amsterdã, v. 109, n. 1, p. 273-286, abr. 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078.

AZEREDO, H. M.C.; WALDRON, K. W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review. **Trends in Food Science & Technology**, Elsevier, Amsterdã, v. 52, p. 109-122, jun. 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.008.

BALAGANGADHARAN, K.; DHIVYA S.; SELVAMURUGAN N. Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering. International Journal of Biological Macromolecules – Part B, Elsevier, Amsterdã, v. 104, p. 1372-1382, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.046.

BAKSHI, P. S. *et al*. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier, Amsterdã, v. 150, p. 1072-1083, mai. 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113.

BOHJANEN, K. Seção I base para diagnóstico e tratamento: Estrutura e funções da pele. In: SOUTOR, C; HORDINSKY, M. **Dermatologia Clínica**. São Paulo: AMG Editora LTDA, 2015, cap. 1, item 1, p. 1-5.

BRAVO, L. E. C.; TAMAYO, L. F. V.; LINARES, R. A. R. Los materiales y su clasificación. In: ___. **Procesos de fabricación em polímeros y cerâmicos**. Bogotá: Ediciones de la U, 2018. p. 23-24, cap. 1.

CAETANO, F. M. F. S; CABANA, M.C.F.L.; LIMA, C.F. Autoestima em crianças e adolescentes com queimaduras. **HumanÆ:** Questões controversas do mundo contemporâneo. 2017. v 11, n. ISSN: 1517-7606. Disponível em: <http://www.humanae.esuda.com.br/index.php/humanae/article/view/539/177>. Acesso em: 21 dez 2019.

CALONGE, H. Bases Fisiopatológicas da Terapêutica Clínica das Feridas Cutâneas com Ênfase em Curativos. In: RIVITTI, E. A. **Dermatologia:** de Sampaio e Rivitti. 4 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2018. cap. 93, p 1427 – 1439.

CARLSON, B. M. Parte II - Desenvolvimento dos Sistemas Corporais: Sistema Tegumentar, Esquelético e Muscular. In: ___. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. cap. 2, p. 156-165.

CARVALHO, L. P. B de. **Efeito de diferentes doses de laser de baixa intensidade em células-tronco dentais cultivadas sobre arcabouços de ácido polilático**. 2018. 84 f. Tese (Doutorado em Patologia Oral) - Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

COSTA, R. G. F. *et al*. Eletrofiação de Polímeros em Solução: parte I: fundamentação Teórica. **Polímeros**, São Carlos, v. 22, n. 2, p. 170–177, 2012. DOI: 10.1590/S0104-14282012005000026.

CRUZ, J. B. da *et al*. Síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agentes antineoplásicos. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 129-140, 28 out. 2016.

DAPI (4',6- Diamidino -2- Phenylindole, Dihydrochloride) for nucleic acid staining. (Boster Biological Technology, Pleasanton C, USA, Catalog# AR 1176 AR 1177. Köln, Alemanhã: BIO TREND, [20-?]. Disponível em: <https://www.biotrend.com/-186/dapi-4-6-diamidino-2-phenylindole-120000082.html>. Acesso em: 12 dez. 2020.

DEBELS, H. *et al*. Dermal Matrices and Bioengineered Skin Substitutes: A Critical Review of Current Options. **Plast Reconstr Surg Glob Open**, Filadélfia, v. 1, n. 3, jan. 2015. DOI: 10.1097/GOX.0000000000000219.

DRIGALLA, D.; GEMMILL, J. Emergências não traumáticas: Queimaduras e inalação de fumaça. In: STONE, C. K.; HUMPHRIES, R. L. CURRENT. **Diagnóstico e Tratamento**: Medicina de Emergência. 7 ed. Porto Alegre: AMGH Editora LTDA, 2013. cap. 45. p 822 – 828.

DWIVEDI, R. *et al*. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, Elsevier, Amsterdã, v. 10, n. 1, p. 381-388, jan–mar. 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2019.10.003.

EHRENREICH, M. ; RUSZCZAK, Z. Update on Tissue-Engineered Biological Dressings. **Tissue engineering**, New Rochelle, v. 12, n. 9, 2006.

FABBRI, M. *et al*. Micro-structured 3D-electrospun scaffolds of biodegradable block copolymers for soft tissue regeneration. **European Polymer Journal**, Elsevier, Amsterdã, v. 94, p. 33-42, set. 2017. Elsevier BV. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.06.042.

FANG, J.; WANG, X.; LIN, T. Functional Applications of Electrospun Nanofibers. In: LIN, T. **Nanofibers** – Production, Properties and Functional Applications. Rijeka: IntechOpen, 2011, cap. 14, p. 287-326.

FERREIRA, M. C. *et al*. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 696-702, out./dez. 2011.

FERRIGNO, B. *et al*. Bioactive polymeric materials and electrical stimulation strategies for musculoskeletal tissue repair and regeneration. **Bioactive Materials**. v. 5, n. 3, p. 468-485. 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.03.010.

FRANCESCO, F. *et al*. Artificial dermal substitutes for tissue regeneration: comparison of the clinical outcomes and histological findings of two templates. **Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 8, 2020. DOI: https://doi.org/10.1177/0300060520945508.

GÁLVEZ-MARTÍN, P.; RUIZ, A.; CLARES, B. Aplicación clínica de las terapias con células, genes y tejidos en España. **Revista Clínica Española**, Elsevier, Amsterdã, v. 218, n. 4, p. 199-206, mai. 2018. Elsevier BV. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.rce.2017.08.004.

GARAVAND, F. *et al*. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier, Amsterdã, v. 104, p. 687-707, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.093.

GARCIA, C. E. G. *et al*. Biomaterials Based on Electrospun Chitosan. Relation between Processing Conditions and Mechanical Properties. **Polymers**. Elsevier, Amsterdã, v. 10, n 3, 2018. DOI: https://doi.org/10.3390/polym10030257.

GEORGE, A.; SHAH, P. A.; SHRIVASTAV, P. S. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. **International Journal of Pharmaceutics**. Elsevier, Amsterdã, v. 561, 20 abr. 2019, p. 244-264. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.011.

GHOSAL, K. *et al*. Electrospinning over Solvent Casting: Tuning of Mechanical Properties of Membranes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 5058, 2018.

GIL-LOYZAGA, P. E. Cultivo de células animales y humanas: conceptos y aplicaciones. Historia de los cultivos celulares. In:___. **Cultivo de células animales y humanas:** Aplicaciones en medicina regenerativa. Madrid: Editorial Vision Libros, 2011. cap. 1, p. 17-25.

GIORDANI, A.T. *et al*. Complicações em pacientes queimados: revisão integrativa. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, Brasília, vol. 7, n. 2, p. 535-48, 2016. Disponível em: < https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5555886 >. Acesso em: 15 jan. 2020.

GOMES, A. C. D. **Desenvolvimento e caracterização de blendas poliméricas biodegradáveis de quitosana e policaprolactona**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biomateriais) – à Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2017. 57f.

GUADIX, J. A.; ZUGAZA, J. L.; GÁLVEZ-MARTÍN, P. Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular. **Medicina Clínica**, Elsevier, Amsterdã, v. 148, n. 9, p. 408-414, mai. 2017. Elsevier BV. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2016.11.033

HENRIQUE, K. S. *et al*. Colas à base de cianoacrilato como método auxiliar na cicatrização tecidual: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of health Review**, Curitiba, v. 3, n. 3, p.5278-5289, mai/jun. 2020. DOI: 10.34119/bjhrv3n3-103.

HORI, K. *et al*. Comparison of contraction among three dermal substitutes: Morphological differences in scaffolds. **Burns**, Elsevier, Amsterdã,v. 43, n. 4, 2017, p. 846-851. DOI: https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.10.017.

ISLAM, M. S. *et al*. A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications. **SN Appl. Sci**., 1, 1248, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/s42452-019-1288-4.

JAIN, R.; SHETTY, S.; YADAV, K. S. Unfolding the electrospinning potential of biopolymers for preparation of nanofibers. **Jurnal Of Drug Delivery Science And Technology**, Elsevier, Amsterdã, v. 57, p.101604-101654, jun. 2020. Elsevier BV. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101604.

JANMOHAMMADI, M.; NOURBAKHSH, M. S. Electrospun polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: a review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, Filadélfia, v. 68, n. 9, p. 527-539, 2018. DOI: https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1466139.

JOODAKI, H.; PANZER, M. B. Skin mechanical properties and modeling: A review. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H**: Journal of Engineering in Medicine, v. 232, p. 323-343, mar. 2018. DOI: https://doi.org/10.1177/0954411918759801.

KISHAN, A. P.; COSGRIFF-HERNANDEZ, E. M. Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. **Journal of Biomedical Materials Research**, Warrendale v. 105, ed. 10, p. 2892-2905, out. 2017. DOI: https://doi.org/10.1002/jbm.a.36124.

KITSARA, M. *et al*. Fibers for hearts: A critical review on electrospinning for cardiac tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, Elsevier, Amsterdã, v. 48, p. 20-40, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.014.

KRISHNAKUMAR *et al*. Importance of crosslinking strategies in designing smart biomaterials for bone tissue engineering: A systematic review. **Materials Science and Engineering:** C, Elsevier, Amsterdã, v. 96, p. 941-954, mar. 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.081.

LUO H. *et al*. Advances in tissue engineering of nanocellulose-based scaffolds: A review. **Carbohydrate Polymers**, Elsevier, Amsterdã, v. 224, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115144.

ŁOS, M. J.; SKUBIS, A.; GHAVAMI, S. Stem Cells. In: ŁOS, M. J.; HUDECKI, A.; WIECHEC´, E. **Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine**. Londres: Academic Press, 2019. cap. 2, p. 5-16.

MACEDO, R. A de P. **Efeito da fotobiomodulação na proliferação de células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados cultivadas sobre filmes de ácido poliláctico**. 2018. Dissertação (Mestrado em Patologia Oral) - Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. A importância dos polímeros naturais. In: ___. **A natureza e os polímeros:** meio ambiente, geopolímeros, fitopolímeros e zoopolímeros. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2013. p 19-39.

MARQUES, C. *et al*. How the Lack of Chitosan Characterization Precludes Implementation of the Safe-by-Design Concept. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 8, n. 165, p. 1-12, mar. 2020. DOI: https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00165.

MAURMANN, N. *et al*. 3D electrospinning used in medical materials. **International Journal of Advances in Medical Biotechnology**, Araraquara, v. 2, n. 1, p. 27-32, 2019. DOI: https://doi.org/10.25061/2595-3931/IJAMB/2019.v2i1.26.

MAURMANN, N. *et al*. Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. **Biomedical Physics & Engineering Express**. v 2, n. 1, 2017. DOI: https://doi.org/10.1088/2057-1976/aa6308.

MAURMANN, N.; SPERLING, L.E., PRANKE P. Electrospun and Electrosprayed Scaffolds for Tissue Engineering. **Cutting-Edge Enabling Technologies for Regenerative Medicine**, Singapura: Springer Link, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0950-2_5.

MERK. **1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol**. 2021a. Disponível em: < https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol?focus=products&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=1%2C1%2C1%2C3%2C3%2C3-Hexafluoro-2-propanol&type=product>. Acesso em: 16 set. 2021.

___. **Ácido Acético**. 2021b. Disponível em: < https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/64-19-7?focus=products&gclid=Cj0KCQjws4aKBhDPARIsAIWH0JU_q0Et614KkbzYsIf88-9kK6GmGGU3scU_4uAO-QvPjKr6Fj8kqIUaArsxEALw_wcB&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=64-19-7&type=cas_number#>. Acesso em: 16 set. 2021.

MCKEE, C.; CHAUDHRY, G. R. Advances and challenges in stem cell culture**. Colloids and Surfaces B:** Biointerfaces, Elsevier, Amsterdã, v. 159, p. 62–77, nov. 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.051.

MOCHANE, M. J. *et al*. Morphology and Properties of Electrospun PCL and Its Composites for Medical Applications: A Mini Review. **Applied Sciences**, v.9, n.11, MDPI, 2019. DOI: https://doi.org/10.3390/app9112205.

MOGHADAM, S. M. *et al*. Electrospun Silk Nanofibres and their Potential for Tissue Scaffolding. In: FAKIROV, S. **Nano-size Polymers:** Preparation, Properties, Applications. Berlim: Springer, 2016, cap 4, p. 89-139.

MOHAMMADZADEHMOGHADAM, S. *et al*. Electrospinning: Current Status and Future Trends. In: FAKIROV, S. *et al*. **Nano-size Polymers:** Preparation, Properties, Applications. Aukland: Springer, 2016. cap. 4, p 89-139.

MORALES-SÁNCHEZ, J. *et al*. Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina. **Tecnología en Marcha**, Costa Rica, v. 32, p. 56-65, set. 2019. DOI: https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4628.

NATHOO, R.; HOWE, N.; COHEN, G. Skin Substitutes: An Overview of the Key Players in Wound Management. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, West Chester, v. 7, n. 10, out. 2014. PMID: 25371771; PMCID: PMC4217293.

NOBRE, R. M. L. **Hidrogéis:** Potencial de aplicação em Engenharia de Tecidos. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Química e Farmácia, Universidade do Algarve, Algarve - Portugal, 2016.

NUNES, L. de P. Materiais não Poliméricos. In:___. **Materiais:** aplicações de engenharia, seleção e integridade. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, 2012. cap. 4, p. 100-131.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Tópicos de saúde:** Queimaduras. Genebra: Departamento de Saúde; 2018. Disponível em: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/burns. Acesso em: 22 dez 2019.

ORYAN, A.; SAHVIEH, S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. **International Journal of Biological Macromolecules**. Elsevier, Amsterdã, v. 104, p. 1003-101, nov. 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.124.

OSHIRO JUNIOR, J. A.; SHIOTA, L. M.; CHIAVACCI, L. A. Desenvolvimento de formadores de filmes poliméricos orgânico-inorgânico para liberação controlada de fármacos e tratamento de feridas. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rmat/v19n1/1517-7076-rmat-19-01-00024.pdf. Acesso em: 27 abr. 2020.

PAVANATI, H. C. Materiais poliméricos. In: ___. **Ciência e Tecnologia dos Materiais**. São Paulo: Pearson, 2015. cap. 3, p 132-147.

PINHO, F. M. de *et al*. Guideline das ações no cuidado de enfermagem ao paciente adulto queimado. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Goiânia, v. 15, n. 1, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/325292663_Guideline_das_acoes_no_cuidado_de_enfermagem_ao_paciente_adulto_queimado. Acesso em: 20 abr. 2020.

RAHMANI, M. *et al*. Development of poly (mannitol sebacate)/poly (lactic acid) nanofibrous scaffolds with potential applications in tissue engineering. **Materials Science And Engineering:** C, Elsevier, Amsterdã, v. 110, p. 110626-110656, mai. 2020. Elsevier BV. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2020.110626.

RAY, S. S. *et al*. A comprehensive review: electrospinning technique for fabrication and surface modification of membranes for water treatment application. **RSC Advances**, v. 6, p. 85495-85514, 2016. DOI: https://doi.org/10.1039/C6RA14952A.

RENEKER, D. H.; YARIN, A. L.. Electrospinning jets and Polymer nanofibers. **Polymer**, [s.l.], v. 49, n. 10, p.2387-2425, maio 2008. DOI: https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.02.002.

RODRIGUÉZ-TOBÍAS, H.; MORALES, G.; GRANDE, D. Comprehensive review on electrospinning techniques as versatile approaches toward antimicrobial biopolymeric composite fibers. **Materials Science and Engineering:** C, Elsevier, Amsterdã, v. 101, p. 306-322, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.099.

SANTOS, E. P. dos *et al*. Chitosan/Essential Oils Formulations for Potential Use as Wound Dressing: Physical and Antimicrobial Properties. **Materials**, Basileia/Suíça, v. 12, n. 14, p. 2223-2244, 10 jul. 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ma12142223.

SEMNANI D. *et al*. Evaluation of PCL/chitosan electrospun nanofibers for liver tissue engineering. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, Londres, v. 66, n. 3, 2016. DOI: https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1190931

SHAO, H. *et al*. Effect of PCL concentration on PCL/CaSiO3 porous composite scaffolds for bone engineering. **Ceramics International**, Elsevier, Amsterdã, v. 1, n. 1, p.1-6, 12 fev. 2020. Elsevier BV. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.02.079.

SHARIF, S. *et al*. Collagen-coated nano-electrospun PCL seeded with human endometrial stem cells for skin tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research:** Part B Applied Biomaterials, v. 106, ed. 4, p. 1578-1586, 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ma11102051.

SHIER, D.; BUTLER, J.; LEWIS, R. Integumentary System. In: ___. **Human Anatomy & Physiology**. Ed. 14. Nova York, McGraw-Hill Education, 2016. cap. 6, p. 177-194.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – FISPQ**: 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol. Canada, 2021a. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/sds/aldrich/105228 >. Acesso em: 16 set. 2021.

___. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – FISPQ**: Ácido acético. Canada, 2021a. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/sds/sigald/a6283>. Acesso em: 16 set. 2021.

SILVA, M. C. da *et al*. N-Acetyl-D-Glucosamine-Loaded Chitosan Filaments Biodegradable and Biocompatible for Use as Absorbable Surgical Suture Materials. **Materials**, Basileia/Suíça, v. 12, n. 11, p. 1807-1825, 4 jun. 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ma12111807.

SOUZA, G. L. *et al*. Estudo epidemiológico dos indivíduos vítimas de queimaduras no Brasil: revisão de literatura. In: XVI Mostra Acadêmica do Curso de Fisioterapia da UniEVANGÉLICA, 2019, Anápolis. **Anais**... v. 7. n.1. 2019. Disponível em: <http://anais.unievangelica.edu.br/index.php/fisio/article/view/4313/2873>. Acesso em 17 dez 2019.

STEFFENS, D. *et al*. Update on the main use of biomaterials and techniques associated with tissue engineering. **Drug Discovery Today**, Elsevier, Amsterdã, v. 23, ed. 8, p. 1474-1488, ago. 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.03.013.

SUHAGA, R. *et al*. Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. **Food Research International**, Elsevier, Amsterdã, v. 136, p. 1-16, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109582.

TAYEBI, T. *et al.* Biofabrication of chitosan/chitosan nanoparticles/polycaprolactone transparent membrane for corneal endothelial tissue engineering. **Scientific Reports**, v. 11, n. 7060, 2021. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-021-86340-w.

THOLIBON, D. *et al*. Kenaf Fiber Composites: A Review on Synthetic and Biodegradable Polymer Matrix. **Jurnal Kejuruteraan**, Bangi, v. 31, n. 1, p. 65-76, 2019. DOI: dx.doi.org/10.17576/jkukm-2019-31(1)-08.

TOMAZ, A. F. *et al*. Ionically Crosslinked Chitosan Membranes Used as Drug Carriers for Cancer Therapy Application. **Materials**, Basileia/Suíça, v. 11, n. 10, p. 2051-2069, 20 out. 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ma11102051.

UNITEDHEALTHCARE. **Skin and Soft Tissue Substitutes**. Califórnia: UnitedHealthcare Commercial Medical Policy, 2020.

VANA, L. P. M. **Estudo comparativo de matrizes dérmicas de colágeno bovino com e sem lâmina de silicone no tratamento da contratura cicatricial pós-queimadura - Análise clínica e histológica**. 2017. 230 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Curso Superior de Ciências, São Paulo, 2017. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5132/tde-09112017-112831/publico/LuizPhilipeMolinaVanaVersaoCorrigida.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2019.

VIEIRA, J. L. **Síntese por coprecipitação de magnetita modificada superficialmente por policaprolactona (PCL) e sua caracterização microestrutural e de propriedades para aplicação no tratamento de câncer**. 2020. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

WANG, T.-J. *et al*. Novel chitosan-polycaprolactone blends as potential scaffold and carrier for corneal endothelial transplantation. **Molecular Vision**, v. 18, p. 255–264, 2012.

WEBER, B. **Suportes poliméricos à base de quitosana: preparação, caracterização e aplicações biocatalíticas na síntese de ésteres terpênicos**. 2016. Relatório (Estágio Supervisionado II) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

WU, G. *et al*. Accelerating dermal wound healing and mitigating excessive scar formation using LBL modified nanofibrous mats. **Materials & Design**, Elsevier, Amsterdã, v. 185, p.108265-108274, jan. 2020. Elsevier BV. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108265.

XIMENES, L. J. F.; VIDAL, M. de F. Pescado no Brasil: produzir bem e vender melhor. **Caderno Setorial ETENE**, ano 3, nº 49, nov. 2018. Disponível em: < https://www.bnb.gov.br/documents/80223/4141162/49_aquipesca.pdf/12f1d694-e694-21ac-7085-40cc571bf95c >. Acesso em: 30 out. 2020.

YANNAS, I. V. *et al*.,Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization. **Royal Society**, Londres, v. 368, n. 1917, 2010. DOI: https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0015.