

SCAFFOLDS DE QUITOSANA NANOESTRUTURADOS VISANDO UTILIZAÇÃO COMO SUBSTITUTOS Dermo-EPIDÉRMICOS PARA TESTES *IN VITRO*

Julia Vaz Ernesto², Fúlvio Gabriel Corazza², Mônica Beatriz Mathor¹, Classius Ferreira da Silva²,
Patricia Santos Lopes²

¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN-SP, Brasil

² Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Diadema-SP, Brasil

E-mail: juliavaz_e@hotmail.com

RESUMO

O desenvolvimento de arcabouços, ou scaffolds, feitos de materiais biocompatíveis, biodegradáveis e bioativos, tem apresentado um grande potencial na bioengenharia de tecidos. Um material bioativo é considerado um biocondutor de células. A quitosana é um biomaterial com diversas propriedades biológicas que permitem a elaboração de um arcabouço com qualidades satisfatórias. É biocompatível, qualidade que propõe a utilização como suporte. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que a reticulação com epícloridrina promoveu aos scaffolds de quitosana, uma formação controlada da rede polimérica, apresentando alta interconectividade de poros. Esta característica pode conferir ao material propriedades como melhor adesão celular e preenchimento celular. A compatibilidade com crescimento de células pôde ser observada nos ensaios de adesão celular, feito com fibroblastos de linhagem (BALB) e no ensaio de OCT, em que foram utilizados queratinócitos humanos primários. O desenvolvimento deste equivalente dermo-epidérmico pode fornecer um sistema eficiente e prático para a avaliação toxicológica *in vitro*, visando substituição do uso de animais na pesquisa com produtos farmacêuticos e cosméticos. O material é, também, uma alternativa inerte à derme acelular, atualmente utilizada em ensaios *in vitro* para crescimento de queratinócitos e formação de extrato córneo.

1. INTRODUÇÃO

Para que um substituto de pele possa corresponder ao seu objetivo, algumas características são importantes. No caso da pele, o mesmo deve possuir propriedades físico-químicas, bioquímicas e mecânicas compatíveis com seu objetivo, visando à criação de um arcabouço tridimensional que possa agir como o órgão original (YANNAS; BURKE, 1980). Essas propriedades devem ser padronizadas e caracterizadas *in vitro*, e posteriormente testadas em animais e/ou humanos.

As características essenciais que um substituto de pele deve apresentar são (YANNAS; BURKE, 1980; RIVRON et al., 2008; BOYCE, 2001; YILDIRIMERA; SEIFALIAN, 2014):

- *Possibilidade de manuseio* – A membrana deve apresentar boa maleabilidade, possibilitando sua manipulação.
- *Controle dos componentes* – os materiais utilizados na sua confecção não devem apresentar toxicidade, podendo inclusive ajudar em sua integração.
- *Controle em sua fabricação* – o substituto final deve apresentar espessura e tamanho de poros ideais, agindo com eficiência no processo de penetração de células

A quitosana é um biopolímero derivado da quitina, que pode ser obtida a baixo custo das cascas de alguns animais marinhos. A quitina é um polissacarídeo abundante na natureza, encontrado principalmente nas carapaças de crustáceos e insetos. É constituído por unidades N-acetil-D-glicosamina (SILVA et al., 2006). A quitosana é obtida a partir da reação de desacetilação parcial da quitina por hidrólise dos grupos acetamida, com soluções muito concentradas de hidróxido de sódio e temperaturas superiores a 60°C (FREITAS et al., 2012).

Para aplicação da quitosana na produção de scaffolds, é necessário modificá-la tendo em vista a melhoria das propriedades mecânicas bem como a redução da solubilidade. Vários métodos, tanto físicos quanto químicos, têm sido utilizados para modificar a quitosana natural. A reticulação com um agente bifuncional pode ser citada como um exemplo de modificação química promovida sobre a quitosana. A epícloridrina (C₃H₅ClO) foi escolhida como agente reticulante já que a mesma

não elimina os grupos aminos catiônicos da quitosana e tais grupos podem representar pontos potenciais de interação com as células que se pretende incorporar aos *scaffolds*.

Na reação de reticulação com a epícloridrina (Figura 1), a ruptura do anel epóxi e remoção do cloro da epícloridrina, resultam em átomos de carbono que ligam-se aos grupos hidroxila do carbono 6 da quitosana (GONÇALVES et al., 2005).

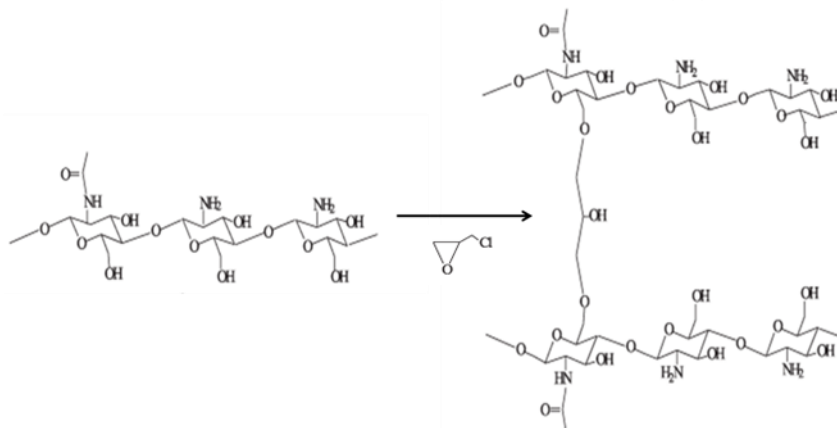


Figura 1: Esquema modificado da reação de reticulação da quitosana com epícloridrina (SILVA; ANDRADE; CESTARI, 2010)

Diante do exposto, foram desenvolvidos arcabouços nanoestruturados de quitosana reticulados com epícloridrina (PROCESSO CNPq 2014/18176-0; Bolsa PIBIC, desenvolvido por Naiara Herculin), em que foram obtidas características satisfatórias para a finalidade de utilização como *scaffolds*. A nanoestruturação destes *scaffolds* visou promover formação controlada da rede polimérica, conferindo propriedades tais como melhor adesão celular e crescimento, dessa forma, garantir a biocompatibilidade.

A aplicação notável deste substituto é a possibilidade de seu uso como equivalentes dermo-epidérmicos para avaliação toxicológica *in vitro* de produtos farmacêuticos ou cosméticos, se mostrando um sistema eficiente e prático que visa a substituição de animais na pesquisa de inocuidade e segurança de produtos, já que, os testes alternativo ao uso de animais são, cada vez mais, uma tendência mundial e atualmente, nacional. Após a oficialização da Lei n. 11.794/08, conhecida como Lei Arouca, a experimentação animal se tornou um tópico bastante discutido no Brasil.

Os padrões éticos aceitos para regulação da experimentação animal são fornecidos pelo princípio proposto por Russell e Burch, conhecido como “3R- “replacement, reduction, and refinement” (RUSSELL; BURCH;. 1959). Os 3R propõem o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais (Reposição), reduzir o número de animais o por meio de protocolos experimentais (Redução), a aplicação de práticas de refinamento (Refinamento), sendo o caminho para garantir à experimentação animal uma validade ética e científica (MANCIOCCO et al., 2009)

2. OBJETIVOS

Avaliar a possibilidade da aplicação de um *scaffold* poroso de quitosana reticulado com epícloridrina como equivalente dermo-epidérmico para a avaliação de cosméticos, sugerindo um método alternativo ao uso de animais nestes casos. Realizar uma análise comparativa entre um *scaffold* de quitosana reticulado com epícloridrina e sem reticulação, ambos desenvolvidos com métodos de congelamento e liofilização. Avaliar parâmetros físicos e biológicos, por meio de ensaios *in vitro*, verificando a possibilidade de cultura celular sobre os *scaffolds*, inclusive de células primárias humanas, partindo de parâmetros de adesão e proliferação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS ARCABOUÇOS DE QUITOSANA RETICULADOS

Soluções de quitosana Polymar 2% (p/v) com o grau de acetilação de 82% foram dispersas em ácido acético P.A. Dispersou-se 50g deste conteúdo em placas de petri, de modo que ficasse homogêneo. As placas foram congeladas a -20°C por 24h e, então, liofilizadas (-60°C e 210 Vca – Liotop L101) por 48h. Para obtenção das amostras reticuladas com epicloridrina, identificadas por “EPI” (Fluka Analytical – 99%), foram adicionados às placas, 50mL de uma solução de epicloridrina 0,01 mol/L solubilizada em NaOH e água destilada. Após 24h, foram feitas 3 lavagens com água destilada e as placas foram submetidas à congelamento (-20°C) e, posteriormente, nova liofilização. As placas identificadas como “controle” passaram pelos mesmos processos, simultaneamente, porém, utilizou-se 50ml de água destilada no momento referente à reticulação da amostra “EPI”.

3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para efeito de comparação da conformação do material, fez-se necessário a visualização da estrutura dos arcabouços por fotomicrografias. As amostras foram previamente metalizadas pela deposição de uma camada de ouro em um Sputter Coater SC 7620 e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura com 10kV de voltagem, 100pA de corrente elétrica. A avaliação da estrutura final da matriz foi feita na superfície longitudinal e na área transversal de ruptura, após resfriamento com nitrogênio líquido. Foram analisadas as amostras Controle e Reticulada com Epicloridrina.

3.3 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

Foram semeadas $2,5 \times 10^4$ cel/poço de uma placa de 24 poços. As células utilizadas foram Balb/c 3T3 ATCC, cultivadas com meio DMEM (Vitrocell Embriolife) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife), 1% L-Glutamina (Vitrocell Embriolife), 1% antibiótico (estreptomicina e penicilina), 0,1% anfotericina (D10).

Foram recortados círculos de cada amostra de diâmetro 15,4mm. As amostras (controle e EPI) e lamínulas (para controle de células) utilizadas foram expostas a luz UV por 15 minutos de cada lado, e dispostas na placa com auxílio de pinças. Colocou-se 250 µL de meio de cultura em cada poço e adicionou-se 500 µL de células ressuspendidas em meio de cultura nos poços indicados a receberem células. Por fim, adicionou-se 250 µL de meio sobre os poços (garantindo que os *scaffolds* fossem cobertos totalmente). As placas foram incubadas por 24h. Posteriormente, o meio de todos os poços foi aspirado e adicionou-se solução salina (1 mL) para lavagem.

As amostras de *Scaffold* e as lamínulas com os controles de células foram transferidas para uma nova placa de 24 poços devidamente identificada, contendo 1000 µL de metanol gelado por 5 minutos, o qual foi aspirado posteriormente. Os poços da placa contendo os *scaffolds* e as lamínulas transferidas foram corados com DAPI (Sigma). Foi preparada uma solução de 1,5µL de DAPI (5mg/mL) em 400 µL de Tampão Fosfato (PBS). Aos poços foram adicionados 250 µL de PBS estéril e 20 µL de DAPI, durante 3 minutos. Lavou-se por 2x com 1000 µL de PBS. Os *scaffolds* e lamínulas foram observados em microscópio de fluorescência (Zeiss, Axio Imager A2).

3.4 OBTENÇÃO E CULTIVO DE QUERATINÓCITOS HUMANOS PRIMÁRIOS

Os fragmentos de pele consistiram em amostras retiradas de mama, pálpebra ou face, obtidas de cirurgias plásticas, estéticas ou reparatórias, realizadas nas dependências da Faculdade de Medicina do ABC. Estes foram cedidos pelos doadores para a finalidade de pesquisa após leitura e autorização do “termo de consentimento livre e esclarecido”, por intermédio do cirurgião plástico, Dr. Victor Hugo Lara Cardoso de Sá. A obtenção de peles foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sob o número CAAE 10867212.3.0000.5421.

A obtenção de queratinócitos por método enzimático foi baseada em DE LUCA; CANCELEDDA (1992) e RHEINWALD; GREEN (1975). A epiderme foi fragmentada e imersa em tripsina 0,05% + EDTA 0,02%, e mantida por 30 minutos em béquer sob agitação constante a 37 °C e 5% de CO₂. O sobrenadante foi, então, transferido para um tubo de centrífuga tipo Falcon® e a tripsina foi neutralizada com adição de solução fisiológica com 10% de SFB e antibiótico. O tubo foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o botão celular foi ressuspendido em meio de cultura. As células foram contadas e reservadas. Ao béquer, foi adicionado novo volume de tripsina e o procedimento foi repetido até que fosse possível notar um decréscimo no rendimento celular. As células obtidas em cada ciclo foram agrupadas e semeadas em garrafas de cultura sobre

camada de sustentação constituída por células CCL-92 (ATCC) e incubadas a 37 °C e CO₂ (5%). As células foram mantidas em meio de cultivo para queratinócito, composto por DMEM (GIBCO) e F12 (GIBCO) na proporção de 1:2, respectivamente, acrescido de 4 mM de L-Glutamina (GIBCO), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B (Invitrogen), adenina (0,18 mM), hidrocortisona (0,4 µg/mL), triiodotironina – T3 (20 pM), toxina da cólera - TC (0,1 nM), insulina de pâncreas bovino (5 µg/mL) e 10% de Soro Fetal Bovino (Hyclone: Fetal Clone III - Thermo Scientific), e acrescido de fator de crescimento epidérmico - EGF (10 ng/mL).

Quando observada a confluência, a cultura foi amplificada pelo método de tripsinização.

3.4.1 TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA (OCT)

As culturas de queratinócitos passaram por processo de tripsinização, e foram semeados $4,9 \times 10^4$ células por poço de transwell. Foram testados três arcabouços, sendo o controle positivo (derme acelular) e duas membranas de quitosana: sem e com reticulante epicloridrina. Foi adicionado meio de cultura nos poços da base e nos transwell, durante os 7 primeiros dias. Depois, passou-se para o modo ar-líquido, onde só foi adicionado meio nos poços da base até o 21º dia. Ao final deste período, as amostras foram analisadas em Tomografia de Coerência Óptica (Spectral Radar OCT, modelo OCP930SR- Thorlabs)

4. RESULTADOS DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DOS ARCABOUÇOS DE QUITOSANA RETICULADOS

Os arcabouços foram produzidos de forma controlada e apresentam diferentes propriedades, quanto a resistência térmica (a amostra reticulada absorve e libera menos energia em forma de calor do que a controle, além de fundir e volatilizar a temperaturas mais altas), quanto a degradação (a amostra reticulada perde menos massa com temperaturas mais elevadas), intumescimento (maior na amostra controle), e porosidade (diminuída quando ocorre a reticulação). Estes parâmetros são garantidos na execução correta de preparo das amostras, conforme protocolado anteriormente (PROCESSO CNPq 2014/18176-0; Bolsa PIBIC, desenvolvido por Naiara Herculin).

4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os poros do scaffold devem ser nanoestruturados, com geometria aberta e com tamanho adequado (BALDINO et al., 2014).

Os *scaffolds* confeccionados no presente trabalho foram obtidos por técnica de liofilização, o que garante a porosidade encontrada, pois sob condições de alto vácuo, os materiais podem se tornar porosos e com interconectividade entre eles (MONTANHA et al., 2012). A liofilização é utilizada para remover o solvente utilizado na produção do *scaffold*, mantendo a temperatura suficientemente baixa para que a região polimérica não se dissolva e constitua uma resistência mecânica eficiente para evitar o colapso dos poros durante a secagem (HO et al., 2004). A reticulação proporcionou ao material uma homogeneização, já que o referido como “controle”, apresenta suas estruturas filamentosas.

É possível observar características distintas entre as áreas transversais das amostras Controle e Reticulada com Epicloridrina. A primeira, apresenta uma estrutura fibrosa, e espaçada, com aspecto laminar e folhas de pequena espessura, remetendo à uma aparência frágil (Figura 2A). A área transversal da segunda expõe um aspecto mais resistente, já que os poros são formados por paredes mais espessas, de forma sinuosa e contínua (Figura 2B). A conformação de ambas as amostras pode favorecer, por conta da porosidade, a adesão celular nos arcabouços

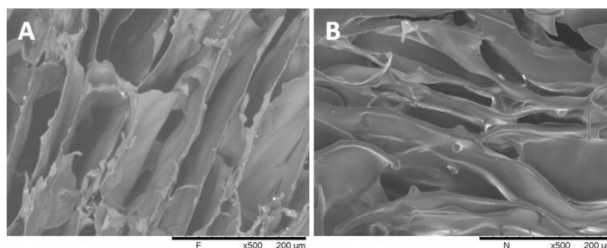


Figura 2: Microscopia Eletrônica de Varredura de área transversal das amostras de *Scaffolds*, em aumento de 500x. A: *Scaffold* Controle (quitosana). B: *Scaffold* Reticulado com Epicloridrina.

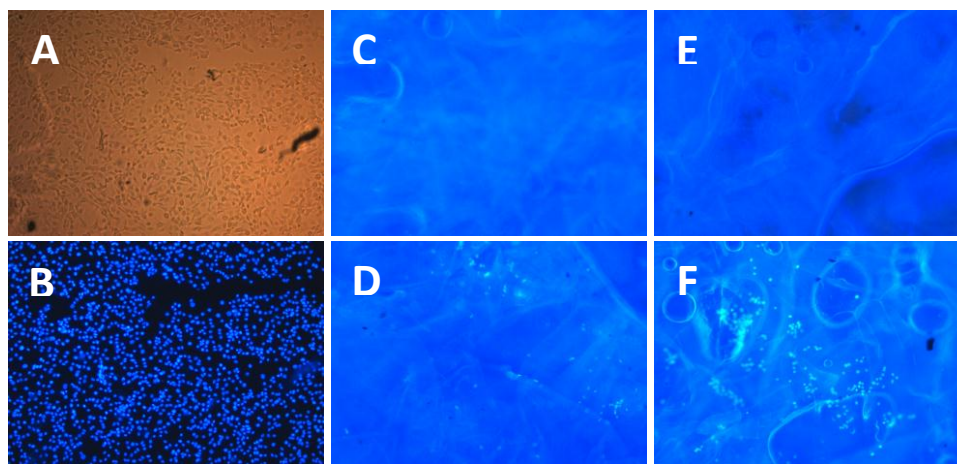
4.3 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

Os *scaffolds* e lamínulas de controle de células foram colocados em lâminas e observados em microscópio de fluorescência (Zeiss, Axio Imager A2). As imagens capturadas foram registradas por uma câmera acoplada ao microscópio (Zeiss, Axio Cam MRC).

A avaliação dos resultados da coloração de fluorescência com DAPI foi feita com base no controle de células, semeado sobre lamínula, antes da ativação do fluoróforo (Figura 3A) e após ativação (Figura 3B). O procedimento de leitura foi feito escolhendo-se um campo do arcabouço para ser observado antes e após ativação da fluorescência. Os arcabouços, após ativação de fluorescência, apresentaram coloração azulada, mas de forma que não obstaculizasse a observação da fluorescência emitida pelas células. Foram verificadas células (de tamanhos iguais aos do controle de células) nos arcabouços Controle e Reticulado (Figuras 3D e 3F, respectivamente). O arcabouço reticulado expôs sítios onde se percebeu uma concentração maior de células (Figura 3F).

Este resultado pode ser explicado pela característica do *scaffold* reticulado, que possui poros mais sinuosos, organizados e mais resistentes, como corroborado pelo MEV.

A quitosana possui carga positiva, possibilitando uma forte ligação com as cargas negativas da superfície de células, resultando no crescimento destas na presença de meio de cultura (MAO et al., 2003).



Figuras 3: Amostras coradas com DAPI aumento de 100x. A: Controle de células, lamínula com células Balb/c 3T3 antes da ativação do fluoróforo. B: Controle de células (mesmo campo de A) após ativação do fluoróforo. C: *Scaffold* Controle (quitosana) sem aplicação de células. D: *Scaffold* Controle (quitosana) com aplicação de células. E: *Scaffold* Reticulado com Epiclorigrina sem aplicação de células. F: *Scaffold* Reticulado com Epiclorigrina com aplicação de células

4.4 OBTENÇÃO E CULTIVO DE QUERATINÓCITOS HUMANOS PRIMÁRIOS

O rendimento médio das culturas de queratinócitos foi variável, o que se deve ao fato da variação dos fragmentos de pele, que apresentaram diferentes tamanhos e locais de origem e da variação interpacientes, já que os doadores apresentavam distinção em fatores como idade e sexo. Estas variações podem ter interferido nas células isoladas dos fragmentos, já que, em alguns casos, as células apresentaram alto grau de diferenciação celular.

Sobre a lâmina basal, que separa epiderme e derme, repousa a camada basal da epiderme, também chamada de camada germinativa. Esta camada germinativa, junto com a camada espinhosa, possui intensa atividade de renovação da epiderme, sendo dependente do local da pele e da idade da pessoa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), o que pode estar relacionado com a diferenciação acelerada encontrada em alguns casos.

4.4.1 TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA (OCT)

Misturas da quitosana com outras substâncias se fazem necessárias para o desenvolvimento de um material adequado para *scaffold*, uma vez que a quitosana tem sua fragilidade como uma grande limitação (HAN et al., 2014).

A análise por OCT fornece a conformação (em corte transversal) apresentada pelas amostras acomodadas aos poços do transwell. Controle e EPI precisaram ser ajustadas aos poços, pois tinham área ligeiramente maior do que a membrana do transwell, resultando em conformação côncava (Figura 4B e 4C), apresentando aspecto disforme em relação à derme (Figura 4A), que foi acomodada corretamente.

BAGNANINCHI et al., (2007) também avaliaram por OCT a estrutura de um *scaffold* de quitosana com microporos, objetivando o uso na engenharia de tecidos de tendões, e obtiveram imagens semelhantes às do presente trabalho, após cultura de células, mostrando uma estruturação diferenciada por conta da proliferação celular e produção de matriz extracelular, que pode preencher os espaços parcialmente.

A reticulação com epicloridrina resultou em um material suficientemente resistente para manuseio. A amostra Controle apresentou menor resistência mecânica, rompendo-se em alguns casos devido ao longo tempo de intumescimento, o que pode ser corroborado pela análise de OCT uma vez que é possível observar algumas falhas no material (Figura 4B). A amostra EPI, apesar de menor em espessura quando comparada à derme, apresentou boa resistência mecânica ainda que em estado de intumescimento (Figura 4C).

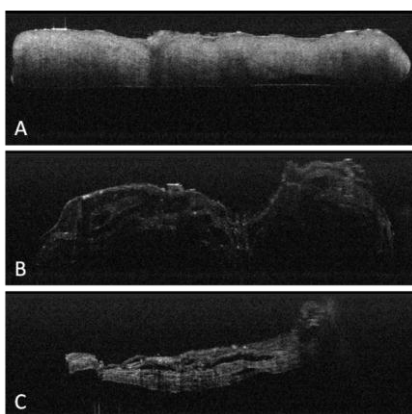


Figura 4: Exemplos de amostras analisados por OCT. A: Derme com Queratinócitos. B: *Scaffold* Controle com Queratinócito. C: *Scaffold* EPI com Queratinócito.

5. CONCLUSÃO

Foram comparados os desempenhos de dois *scaffolds* de quitosana, sendo um deles sem agente reticulante e o outro, reticulado com epicloridrina. A reticulação conferiu ao material uma nanoestruturação de poros, com tamanho e distribuição satisfatórios para permitir troca de gases e aderência de células, visando o uso como substituto dermoepidêmico, buscando a redução do uso de animais para testes de segurança toxicológica de alguns fármacos e de cosméticos. A reticulação conferiu ao material uma maior resistência física. A microscopia eletrônica de varredura, mostrou uma rede mais contínua e sinuosa no caso da amostra reticulada

Desta maneira, é notável o potencial do *scaffold* reticulado como substituto dermo-epidêmico, uma vez que sua fabricação é controlada e a avaliação de sua eficiência no processo de penetração de células pode ser observada *in vitro*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGNANINCHI, P. O. et al. Chitosan Microchannel Scaffolds for Tendon Tissue Engineering Characterized Using Optical Coherence Tomography. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 2, p. 323–331, fev. 2007.

BALDINO, L. et al. Chitosan scaffolds formation by a supercritical freeze extraction process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 90, p. 27–34, jun. 2014.

BOYCE, S.T. Design principles for composition and performance of culture skin substitutes. **Burns**, v. 27, p. 523-533, 2001.

COSTA SILVA, H. S. R.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776–785, 2006.

DE LUCA, M; CANCEDDA, R. Culture of human epithelium. **Burns**, v. 18, n. 1, p. s5-s10, 1992. Suplemento 1.

FREITAS, P.A.B.; BARBOSA, R.C.; GONZAGA, H.G.; CARDOSO, M.J.B.; FOOK, M.V.L. Estudo Físico-Químico e Térmico de Blendas Quitosana-Aloe Vera. 7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2012.

GONÇALVES, V. L. et al. Liberação de ferro (iii) de microesferas reticuladas de quitosana. n. lii, p. 15–24, 2005.

HAN, F. et al. Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 476, n. 1, p. 124–133, 2014.

HERCULIN, N. Preparação e testes de arcabouços feitos com quitosana pelo método de congelamento/ liofilização posteriormente reticulados com epicloridrina visando sua aplicação comosubstituto dermo-epidérmicos. Processo CNPq 2014/18176-0; Bolsa PIBIC.

HO, M.-H. et al. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. **Biomaterials**, v. 25, n. 1, p. 129–138, jan. 2004.

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

MANCIOCCO, A. et al. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. The application of Russell and Burch 3R principle in rodent models of neurodegenerative disease : The case of Parkinson ' s disease. v. 33, p. 18–32, 2009.

MAO, J. et al. Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 64, n. 2, p. 301–308, 2003.

MONTANHA, V. C. **Preparação e caracterização de micropartículas de colágeno ou fibroína como suporte para células-tronco**. Dissertação (mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (2012)

RHEINWALD, J.G. & GREEN, H. Formation of keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from teratoma. **Cell**, v. 6, n. 3, p. 317-330, 1975.

RIVRON, N.C.; LIU, J., ROUWKEMA, J.; BOER, J.; BLITTERSWIJK, C.A. Engineering vascularised tissues in vitro. **Eur. Cell. Mater.**, v. 15, p. 27-40, 2008.

RUSSELL, W.M.S., BURCH, R.L., 1959, reprinted 1992. **The Principles of Humane Experimental Technique**. Universities Federation for Animal Welfare, Wheathampstead, UK. 1992

SILVA, R. C.; ANDRADE JR, M. A. S.; CESTARI, A. R. Adsorção de Cr(VI) em esferas reticuladas de quitosana: novas correlações cinéticas e termodinâmicas utilizando microcalorimetria isotérmica contínua. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 880–884, 2010.

SILVA, H.S.R.; SANTOS, K.S.C.; FERREIRA, E.I. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas e Avanços. **Rev. Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p.776-785, 2006.

YANNAS, I. V; BURKE, J. F. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. **Journal of biomedical materials research**, v. 14, n. 1, p. 65–81, 1980.

YILDIRIMERA, L., SEIFALIAN, A.M. Three-dimensional biomaterial degradation —Material choice, designand extrinsic factor considerations. **Biotechnology Advances** 32 984–999, 2014