

# SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE TERMOGEL A BASE DE QUITOSANA/ÁCIDO HIALURÔNICO APLICADA À ENGENHARIA DE TECIDO CARTILAGINOSO

Vieira Souza, T.<sup>1</sup>, Malmonge, S.M.<sup>2</sup>, Santos Jr, A.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo (SP), Brasil

<sup>2</sup>Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas, UFABC, São Bernardo do Campo (SP), Brasil  
thais.souza@ufabc.edu.br

**Resumo.** Hidrogéis à base de polímeros naturais são conhecidos por suas propriedades favoráveis biocompatíveis, fornecem um ambiente tridimensional aquoso que mimetiza a matriz extracelular (MEC). O tecido cartilaginoso é um tipo especializado de tecido conjuntivo rígido. Por ser um avascular e possuir capacidade de proliferação limitada, as lesões na cartilagem são tipicamente seguidas de necrose. A quitosana (QUI) e o ácido hialurônico (AH) são amplamente pesquisados para aplicações biomédicas. Foram sintetizados hidrogéis de QUI e de QUI + AH, neutralizado com  $\beta$ -glicerofosfato (pH=7,14) que formam um gel em temperatura em torno da biológica (38°C). Células Vero foram inoculadas sobre gotas de hidrogel, cultivadas por 24h e 72h, fixadas e coradas com Cristal Violeta, Xylidine Ponceau (pH=2,5) e Azul de Toluidina (pH=2,5 e 4,0) para avaliar morfologia, proteínas totais, glicosaminoglicanos, DNA e RNA, respectivamente. Testes de citotoxicidade direto e por extrato demonstraram não haver citotoxicidade. Células cresceram ao redor e sobre as gotas. Dados citoquímicos mostram que as células acumulam grande quantidade de material proteico. Constatou-se que quando o AH é adicionado ao gel observamos maior número de células. Os hidrogéis apresentam potencial tanto para as aplicações propostas quanto para outras aplicações que estão sendo estudadas.

**Palavras-chave:** Biomateriais e engenharia de tecidos, Cultura Celular, Citotoxicidade, Quitosana, Ácido Hialurônico

## 1. INTRODUÇÃO

Os hidrogéis são estruturas reticuladas de alto peso molecular que intumescem em solução aquosa (Choi *et al.*, 2014; Ji e Guvendiren, 2017). Permanecem em contato direto com células, mantêm sua viabilidade e sustentam seu crescimento e proliferação. Além disso, eles também podem servir como *scaffolds* para a adesão e a proliferação celular. Hidrogéis à base de polímeros naturais são conhecidos devido as suas propriedades favoráveis biocompatíveis, além de serem biomateriais atraentes para o encapsulamento celular (Souza, Maria e Santos, 2018). Eles fornecem um ambiente 3D aquoso com sinais químicos e físicos biologicamente relevantes, imitando o ambiente da matriz extracelular. Normalmente os materiais usados para a fabricação de *scaffolds* podem ser de origem natural ou sintética. Os de origem natural são: colágeno, gelatina, alginato, quitina e seus derivados deacetilados como a quitosana, por exemplo, ácido hialurônico e glicosaminoglicanos. Dentre estes a quitosana é um biopolímero que apresenta semelhanças estruturais às dos glicosaminoglicanos da matriz extracelular que são grande importância para a adesão celular (Oryan e Sahviah, 2017).

Engenharia de tecidos e Medicina Regenerativa (ETMR) pode ser entendida como a aplicação dos princípios de ciências exatas e engenharia para a criação e reparação de tecidos. Algumas estratégias gerais foram adotadas para a obtenção de novos tecidos (Langer e Vacanti, 1993; Santos Jr., Lombello e Genari, 2012). É uma ciência multidisciplinar que requer o conhecimento de áreas biológicas, engenharia, ciências de materiais e ciências da saúde (Santos Jr. e Zavaglia, de, 2016). A ETMR vem se destacando como um ramo científico capaz de fornecer metodologias promissoras para o tratamento de patologias do tecido cartilaginoso

(Nascimento e Lombello, 2016), o que é de tamanha importância visto que este tecido raramente tem a capacidade de se regenerar sozinho após ser lesionado.

Os três elementos principais da ETMR são; o arcabouço (*scaffold*), as células, e o microambiente fisiológico (Nascimento e Lombello, 2016). O arcabouço é responsável por fornecer suporte estrutural para a fixação e crescimento celular criando um ambiente ideal onde irá acontecer o reparo ou substituição do tecido.

As técnicas de ETMR possuem aplicações em diversas áreas como no caso de tratamentos de lesões extensas e contínuas do tecido cartilaginoso, por tornar possível a criação de estruturas *ex-vivo* a partir de biomateriais substitutos de cartilagem formados por uma matriz tridimensional associada a moléculas sinalizadoras onde pode haver deposição celular, proporcionando a obtenção de estruturas condrais que podem ser integralmente implantadas nos pacientes (Hunziker, 2002; Solchaga, Penick e Welter, 2011).

Os hidrogéis se apresentam como uma oportunidade única para a regeneração da cartilagem através da introdução de condrocitos e seus precursores em um ambiente fisicamente controlável o que permite o transporte eficiente de nutrientes e moléculas biológicas (Choi *et al.*, 2014).

Por ser capaz de simular a maioria dos tecidos moles, os hidrogéis são biomateriais altamente atraentes para a produção e desenvolvimento de análogos sintéticos da matriz extracelular. Sua formação estrutural à base de cadeias poliméricas reticuladas possui alto teor de água e fácil transporte de oxigênio, nutrientes e resíduos. Além disso, muitos hidrogéis podem ser facilmente modificados para apresentar ligantes de adesão celular, viscoelasticidade e degradabilidade (Nascimento e Lombello, 2016).

A quitosana tem sido amplamente pesquisada para aplicações biomédicas, tais como administração controlada de medicamentos e proteínas, administração de genes não-virais e ETMR. Além disso, a quitosana não só pode fornecer microambiente apropriado para a regeneração da cartilagem, mas também pode estimular a proliferação celular e promover reparo tecidual através de diversas vias (Bhattarai, Gunn e Zhang, 2010; Cao, Dou e Dong, 2014).

A quitosana pode ser dissolvida em soluções ácidas, tornando-se um polissacárido policatiônico com alta densidade de cargas positivas (grupos  $-NH_3^+$ ) que compreende resíduos de glucosamina e N-acetilglucosamina (Tan *et al.*, 2009; Wu, Lin e Yao, 2014). As cadeias de quitosana podem formar hidrogéis contendo grupos ionizáveis devido à ligações de hidrogênio, forças polares e íons móveis, com o desenvolvimento de uma alta pressão de dilatação (Demirtaş, Irmak e Gümüşderelioğlu, 2017). Além disso, a quitosana pode ser degradada enzimaticamente, *in vivo*, por proteínas presentes na matriz extracelular da cartilagem humana. Essas características fazem da quitosana um material potencial para uso na engenharia do tecido cartilaginoso (Tan *et al.*, 2009).

O AH, é um polissacarídeo poliônico linear e hidrofílico, que permite repelir os radicais livres, assim concedendo a característica de antioxidante o qual media a inflamação (Burdick e Prestwich, 2011). Sintetizado na membrana plasmática, a cadeia do AH é constituída por unidades alternadas de dissacarídeo  $\alpha$ -1,4-d-glucorônico e ácido  $\beta$ -1,3-N-acetil-d-glucosamina ligadas através  $\beta$ -1,4 e alternativa  $\beta$ -1,3 ligações glicosídicas (Dumitriu, 2001).

O AH também tem sido utilizado na síntese de arcabouços biológicos para aplicações de cicatrização de feridas. Estes arcabouços têm tipicamente proteínas agregadas, tais como a fibronectina que facilita a migração celular para o local do trauma. Uma variedade de funções celulares que são essenciais para o reparo tecidual pode ser atribuída à presença de AH. Estas funções incluem a facilitação da migração celular para a matriz provisória da ferida, proliferação celular e organização da matriz do tecido de granulação (Anderson *et al.*, 2004).

Acreditamos ser uma boa escolha do uso de hidrogéis de quitosana para a engenharia de tecido cartilaginoso por causa de seu teor de glicosaminoglicanos e ácido hialurônico serem similares aos dos tecidos nativos. Além de se mostrarem biocompatíveis, biodegradáveis e atóxicos (Campos *et al.*, 2015).

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Preparação dos hidrogéis**

O protocolo de partida para a formulação da solução gelificante seguiu o que foi descrito por Chenite *et al.* 2000 (Chenite *et al.*, 2000), com modificações. Brevemente, dissolver 200 mg de quitosana (Sigma Chemical Co.) em 9 ml de soluções aquosas de ácido clorídrico (0,1M). Preparar solução de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma-Aldrich) dissolvendo de 560mg de  $\beta$ -glicerofosfato em ~1ml de água deionizada. Resfriar a solução de quitosana até 4°C, sob agitação, e adicionar 1ml de solução de  $\beta$ -glicerofosfato gota a gota. Soluções finais de 10ml contendo 2% de quitosana. Feito isso, é adicionado ácido hialurônico (Sigma-Aldrich), gota a gota, em diferentes proporções.

### **2.2 Culturas Celulares**

Para os testes de toxicidade, foram utilizadas células Vero, uma linhagem celular fibroblástica estabelecida a partir de células do rim do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), obtidas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. As mesmas foram cultivadas em meio de cultura 199 (Lonza Group Ltd, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brasil), 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich) a 37% em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Foi feita a troca de meio sempre que houvesse acidificação do mesmo e os subcultivos foram efetuados duas vezes por semana. As células Vero são recomendadas para estudos sobre citotoxicidade e interações entre células em biomateriais (ISO 10993-5, Kirkpatrick, 1992).

### **2.3 Análise Citoquímica**

Uma suspensão celular na concentração de  $1 \times 10^5$  células/ml (n=8) em meio de cultura com 10% SFB foi inoculada sobre os diferentes materiais em estudo e a placa cultivada por 24 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram fixadas em formaldeído 10% por 2h. As amostras foram então coradas com Cristal Violeta, para análise morfológica, com Azul de Toluidina (AT) em pH 4,0, para detecção de ácidos nucleicos (DNA/RNA) e glicosaminoglicanos, AT em pH 2,5, para detecção de glicosaminoglicanos apenas, e Xylidine Ponceau (XP) em pH 2,5, para detecção de proteínas totais (Lison, 1960).

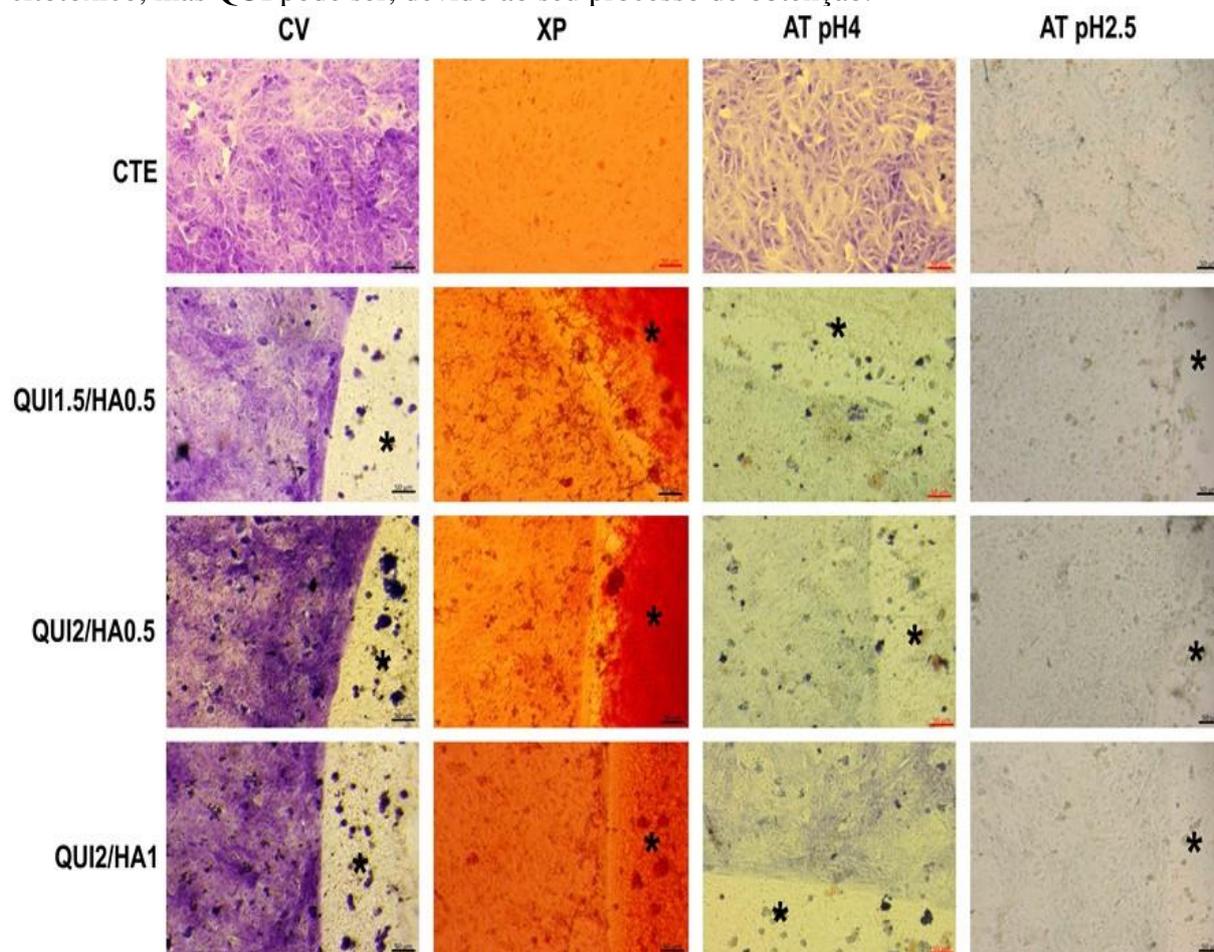
### **2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para analisar o crescimento, adesão e espalhamento as células foram cultivadas sobre os materiais e observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para isso os materiais foram colocados sobre lamínula circular com 13 mm e em seguida foi inoculada uma suspensão celular na concentração de  $3 \times 10^5$  células/ml e a placa foi incubada por 24 h a 37°C. Em seguida, as lamínulas e os materiais foram fixados por 2 h em temperatura ambiente em solução de paraformaldeído 2,5%, glutaraldeído 2,5% (Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolvidos em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4). Em seguida os materiais foram lavados em três banhos com solução de PBS por 15 minutos, pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% (Sigma, St. Louis,

MO, USA) em geladeira por 15 minutos, lavados em três banhos com água por 15 minutos e desidratados em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 95% e 100%). Em seguida, as lamínulas e os materiais foram secos em equipamento de Ponto Crítico (Leica EM CPD300), submetidos à metalização a ouro em *Sputtering* (Leica EM ACE 200) e observados em Microscópio Eletrônico de Varredura (FEI Quanta 250).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ácido hialurônico foi adicionado à composição de gel de quitosana, nas seguintes concentrações: QUI 1,5% + AH na proporção 1:0,5, QUI 2% + AH na proporção 1:0,5 e QUI 2% + AH na proporção 1:1. O objetivo foi tornar o gel mais similar ao ambiente da MEC do tecido cartilaginoso. Os resultados são apresentados na figura 3 logo a seguir. AH não é citotóxico, mas QUI pode ser, devido ao seu processo de obtenção.



**Figura 3.** Teste citoquímico de células cultivadas em gotículas de termogel de quitosana/ácido hialurônico. O símbolo \* corresponde ao hidrogel utilizado. O substrato não se cora com os corantes utilizados, exceto pelo XP. Note as células ao redor dos substratos, mas com dificuldades de crescer sobre o mesmo. Barra de aumento: 50  $\mu$ m para todas as imagens.

Os dados da figura 3 mostram que o hidrogel de QUI cora-se intensamente com o XP, o que mostra a presença dos grupos  $\text{NH}_3^+$  disponíveis. O gel não se corou com os demais corantes utilizados. Notamos poucas células sobre os géis, mas grande quantidade ao redor dos mesmos.

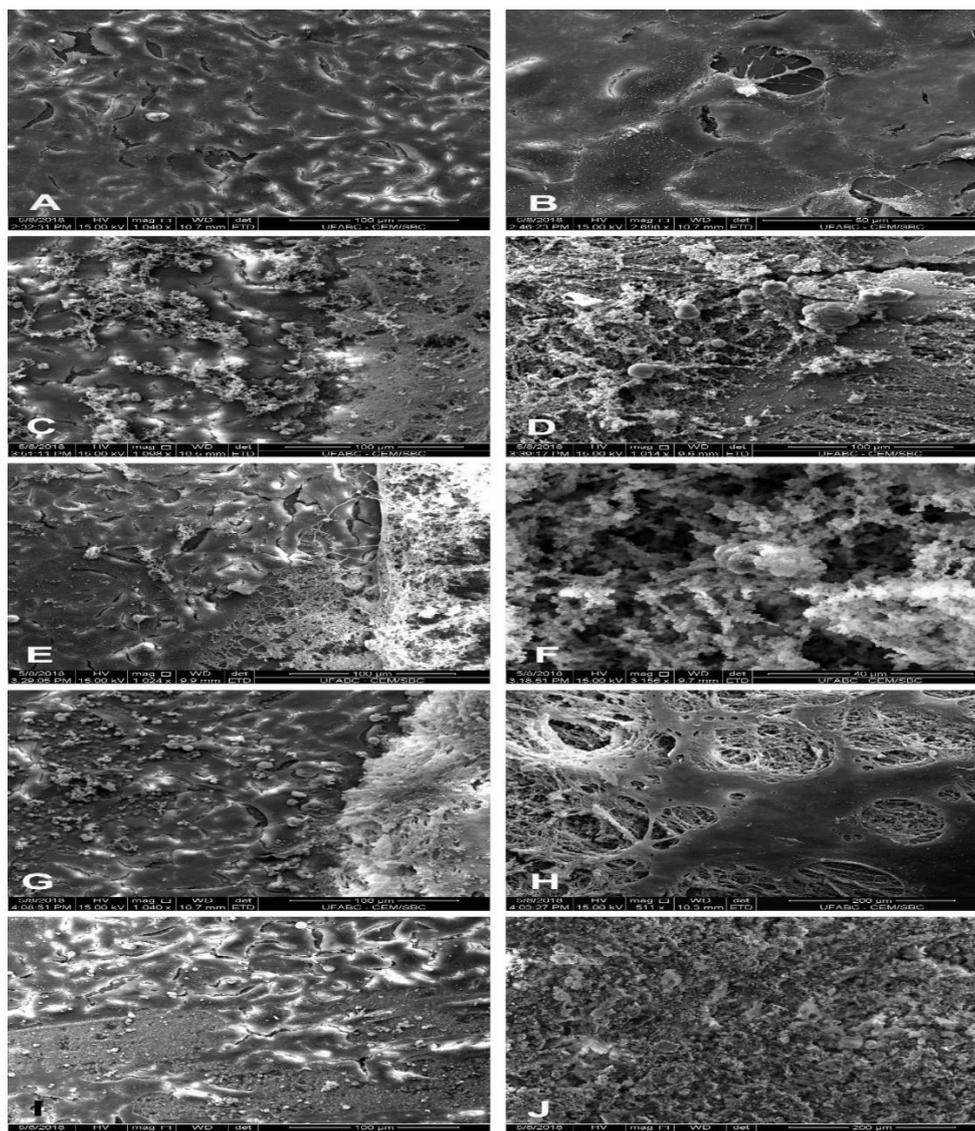
Fizemos a análise dessa situação também em microscopia eletrônica de varredura (Figura 4). Na situação controle (lamínula de vidro sem hidrogel) notamos um tapete celular semiconfluyente com muito pouco espaço para o crescimento celular. As células mostraram morfologia irregular. Sobre as mesmas algumas microvilosidades puderam ser vistas. Entre as células, eventualmente encontramos prolongamentos ligando uma célula a outra (Figura 4A e B). Nas demais condições experimentais, buscamos mostrar as células ao redor do hidrogel e sobre ele.

Sobre a QUI notamos que a monocamada celular ao redor do hidrogel tinha características semelhantes à do controle. Porém, encontramos um material levemente reticulado sobre as células, como se o gel estivesse liberando esse material (Figura 4C e D). Interessante que isso também pode ser visto na Figura 18 quando as amostras foram coradas com o XP.

Sobre o gel de QUI 1,5% AH 0.5 observamos também um material filamentososo, levemente reticulado, no limite do gel e ao redor das células. Ao redor do hidrogel, as células apresentavam características semelhantes ao controle. Por outro lado, sobre o mesmo, as células se apresentavam arredondadas (Figura 4E e F).

Ao redor do gel QUI 2% AH 0,5 encontramos células semelhantes ao controle. Novamente um material granuloso pode ser visto sobre as células. Sobre o hidrogel, observamos uma camada semelhante a células com morfologia alongada e bastante achatada (Figura 4G e H).

Ao redor do gel QUI 2% AH 1 as células se mostraram com o controle. Nessa condição pudemos observar, onde o hidrogel é mais fino, as células migrando para ele. Nessa parte inicial da migração, notamos células com características semelhantes ao controle. Por outro lado, sobre o hidrogel ficou difícil reconhecer claramente as células no mesmo. Aparentemente, elas assumiram um aspecto arredondado (Figura 4I e J).



**Figura 4.** Microscopia eletrônica de varredura das células nas diferentes condições experimentais com 48h de cultivo. A) e B): Controle C) e D) QUI; E) e F) QUI 1,5% AH 0,5; G) e H) QUI 2% AH 0,5; I) e J) QUI 2% AH 1. Em A, C, E, G e I ao redor do hidrogel. Em B, D, F, H e J no interior do mesmo.

A morfologia das células Vero nas condições controle são compatíveis com dados previamente publicados (Santos Jr et al., 2009). Não temos experiência na observação de células Vero por MEV em substratos de quitosana.

Ragety e colaboradores fizeram testes comparando *scaffolds* fibrosos e esponjosos obtidos a partir de técnicas de *wet spinning* e liofilização, respectivamente. Eles estudaram como as células se comportam quando estão em contato com esses *scaffolds*, uma vez que eles apresentam estruturas macro e microscopicamente distintas. Eles descobriram que a geometria dos *scaffolds* pode influenciar o contato celular e seus efeitos na proliferação e migração celular através da matriz, além de permitir o crescimento celular dentro das estruturas, assim como o transporte de nutrientes e produtos residuais do metabolismo celular (Reys et al., 2017). Estudos mostraram que *scaffolds* com fibras alinhadas aumentam as chances da interação entre células devido à redução da superfície de biomaterial disponível por célula. Estruturas abertas que consistem em fibras soltas ou com poros abertos, podem melhorar a difusão celular através da matriz, promovendo a interação intercelular (Ragety et al., 2010).

A estrutura também pode afetar a difusão de nutrientes dentro do *scaffold*. O fluxo de fluidos através da estrutura é uma combinação de 5 importantes parâmetros do scaffold: porosidade, tamanho e distribuição dos poros, interconectividade, tamanho e distribuição de fenestrações. Diferenças nessas características podem afetar a interação célula-nutriente. Conexões celulares aos substratos modificam as redes citoesqueléticas compostas por microfilamentos de actina, microtubos e filamentos intermediários influenciando as sinalização e função celulares. (Ragety *et al.*, 2010).

De acordo com alguns autores, os diferentes padrões na arquitetura dos poros estão relacionados à homogeneidade da mistura entre as soluções de quitosana e de ácido hialurônico. Assim como o aumento da concentração de AH na solução a torna mais opaca, observamos isso em nosso experimento (Correia *et al.*, 2011).

Observamos que quando o AH é adicionado ao gel, encontramos uma quantidade de células maior nos substratos. Ao que parece, crescendo sobre eles. Nossos dados preliminares indicam que o AH torna o gel mais atrativo ao crescimento celular. Nas amostras com mais AH, observamos células mais metacromáticas que nas demais amostras, quando coradas com AT em pH 4,0. Isso sugere uma maior atividade celular. Nossos dados parciais apontam que os QUI/AH parecem apresentar os melhores resultados. Novos experimentos serão conduzidos para confirmar esse resultado.

### 3. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que os hidrogéis sintetizados não apresentam citotoxicidade, podendo até favorecer o crescimento e proliferação celular, principalmente quando se adiciona ácido hialurônico na formulação. Dados citoquímicos mostram que as células acumulam grande quantidade de material proteico. Células metacromáticas indicam comumente grande quantidade de RNAr citoplasmático.

O MEV mostrou detalhes da arquitetura dos hidrogéis sintetizados com diferentes concentrações de QUI e AH assim como a interação celular com os materiais, onde, em alguns casos, é possível observar a formação de vesículas. Os hidrogéis apresentam potencial tanto para as aplicações propostas quanto para outras aplicações que estão sendo estudadas.

### AGRADECIMENTOS

À CAPES, à Universidade Federal do ABC e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

### REFERÊNCIAS

- Barbanti, S. H., Zavaglia, C. A. C. e Duek, E. A. R. (2005) “Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos”, *Polímeros*, 15, p. 13–21. doi: 10.1590/S0104-14282005000100006.
- Bhattarai, N., Gunn, J. e Zhang, M. (2010) “Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery”, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 62(1), p. 83–99. doi: 10.1016/j.addr.2009.07.019.
- Burdick, J. A. e Prestwich, G. D. (2011) “Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications”, *Advanced Materials*, 23(12), p. 41–56. doi: 10.1002/adma.201003963.
- Campos, D. F. D. *et al.* (2015) “The Stiffness and Structure of Three-Dimensional Printed Hydrogels Direct the Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells Toward Adipogenic and Osteogenic Lineages”, *Tissue Engineering Part A*, 21(3–4), p. 740–756. doi: 10.1089/ten.tea.2014.0231.
- Cao, Z., Dou, C. e Dong, S. (2014) “Scaffolding biomaterials for cartilage regeneration”, *Journal of*

*Nanomaterials*, 2014. doi: 10.1155/2014/489128.

Chenite, A. *et al.* (2000) “Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs”, 203, p. 89–98.

Choi, B. *et al.* (2014) “Cartilaginous extracellular matrix-modified chitosan hydrogels for cartilage tissue engineering”, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(22), p. 20110–20121. doi: 10.1021/am505723k.

Correia, C. R. *et al.* (2011) “Chitosan Scaffolds Containing Hyaluronic Acid for Cartilage Tissue Engineering”, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 17(7), p. 717–730. doi: 10.1089/ten.tec.2010.0467.

Demirtaş, T. T., Irmak, G. e Gümüşderelioğlu, M. (2017) “Bioprintable Form of Chitosan Hydrogel for Bone Tissue Engineering”, *Biofabrication*, 9(3), p. 0–15.

Hunziker, E. B. (2002) “Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects”, *Osteoarthritis and Cartilage*, 10(6), p. 432–463. doi: 10.1053/joca.2002.0801.

Ji, S. e Guvendiren, M. (2017) “Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5(April), p. 1–8. doi: 10.3389/fbioe.2017.00023.

Langer, R. e Vacanti, J. P. (1993) “Tissue Engineering”, *Science*, 260(May), p. 920–926. doi: 10.1126/science.8493529.

Lison, L. (1960) *Histochimie et Cytochimie Animales - Principes et Methodes*. Paris, France: Gauthier Villars.

Nascimento, M. H. M. do; e Lombello, C. B. (2016) “Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso Hyaluronic acid and chitosan based hydrogels for cartilage tissue engeneering”, *Polimeros*, 26(4), p. 360–370. doi: 10.1590/0104-1428.1987.

Oryan, A. e Sahviah, S. (2017) “Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing”, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 104, p. 1003–1011. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.124.

Ragetly, G. R. *et al.* (2010) “Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cell chondrogenesis”, *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc., 6(4), p. 1430–1436. doi: 10.1016/j.actbio.2009.10.040.

Reys, L. L. *et al.* (2017) “Influence of freezing temperature and deacetylation degree on the performance of freeze-dried chitosan scaffolds towards cartilage tissue engineering”, *European Polymer Journal*, 95, p. 232–240. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.08.017.

Santos Jr., A. R., Lombello, C. B. e Genari, S. . (2012) “Tissue Regeneration - From Basic Biology to Clinical Application”, in. doi: 10.5772/52807.

SOLCHAGA, L. A., PENICK, K. J. e WELTER, J. F. (2011) “Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks”, *Methods in Molecular Biology*, 698(5), p. 253–278. doi: 10.1007/978-1-60761-999-4\_1.

Souza, T. V. De, Maria, S. e Santos, A. R. (2018) “Bioprinting and stem cells : the new frontier of tissue engineering and regenerative medicine”, 4(3), p. 48–50. doi: 10.15406/jsrt.2018.04.00114.

Tan, H. *et al.* (2009) “Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering”, *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 30(13), p. 2499–2506. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.080.

Wu, Q. X., Lin, D. Q. e Yao, S. J. (2014) “Design of chitosan and its water soluble derivatives-based drug carriers with polyelectrolyte complexes”, *Marine Drugs*, 12(12), p. 6236–6253. doi: 10.3390/md12126236.

## **SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF THE CHITOSAN / HYALURONIC ACID BASED THERMOGEL APPLIED TO CARTILAGINOUS TISSUE ENGINEERING**

Vieira Souza, T.<sup>1</sup>, Malmonge, S.M.<sup>2</sup>, Santos Jr, A.R.<sup>1</sup>

*1Center for Natural and Human Sciences, Federal University of ABC, São Bernardo do Campo (SP),  
Brazil*

*2Center for Engineering, Modeling and Applied Social Sciences, Federal University of ABC, São  
Bernardo do Campo, SP, Brazil  
thais.souza@ufabc.edu.br*

**Abstract.** *Natural polymer-based hydrogels are known for their favorable biocompatible properties, providing an aqueous three-dimensional environment that mimics extracellular matrix (ECM). Cartilaginous tissue is a specialized type of rigid connective tissue. Because it is avascular and has limited proliferation capacity, cartilage damage is typically followed by necrosis. Chitosan (CHI) and hyaluronic acid (HA) are widely researched for biomedical applications. CHI and CHI + HA hydrogels were synthesized, neutralized with  $\beta$ -glycerophosphate (pH = 7.14) which form a gel at a temperature around biological (38 °C). Vero cells were inoculated on hydrogel droplets, cultured for 24h and 72h, fixed and stained with Violet Crystal, Xylidine Ponceau (pH = 2.5) and Toluidine Blue (pH = 2.5 and 4.0) to evaluate morphology, total proteins, glycosaminoglycans, DNA and RNA, respectively. Direct and extract cytotoxicity tests showed no cytotoxicity. Cells grew around and over the drops. Cytochemical data show that cells accumulate large amounts of protein material. It was found that when HA is added to the gel we observed a larger number of cells. These hydrogels have potential for both the proposed and other applications being studied.*

**Keywords:** *Biomaterials and tissue engineering, Cell Culture, Cytotoxicity, Chitosan, Hyaluronic Acid.*