



International Conference for
Academia and Industry Co-operation

08/11/2021 – 12/11/2021

São Luís - Maranhão - Brasil



2nd International Meeting in Materials
Science and Engineering of Maranhão

HIDROGEL INTELIGENTE A BASE DE QUITOSANA ENRIQUECIDO COM PÓ DE OSSO DESMINERALIZADO PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL

CHITOSAN-BASED SMART HYDROGEL ENRICHED WITH DEMINERALIZED BONE POWDER FOR TISSUE REGENERATION

Thiago F. C. L. Verde ^{1*}, Luana C. G. Lima¹, Moises V. Santana¹, Gabriely G. Lima¹
Bruno P. S. Neto¹ e Anderson O. Lobo¹

1 - LIMAV- Laboratório interdisciplinar de materiais avançados, BioMatLab, UFPI - Universidade
Federal do Piauí, Teresina, PI, 64049-550, Brasil.
thiagonalantysor@gmail.com

RESUMO

Bioimpressão é uma das mais recentes inovações na engenharia de tecidos ósseos. Porém, ainda é um desafio encontrar um material com biocompatibilidade e características semelhantes ao osso humano e, ao mesmo tempo, com capacidade de permitir uma bioimpressão favorável. Assim, foram desenvolvidos hidrogéis à base de quitosana com dispersão de pó de osso desmineralizado (POD) em diferentes concentrações para a fabricação de scaffold usados para regeneração óssea. As estruturas foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (ftir), microscopia óptica (mo), viabilidade celular (mtt assay), grau de intumescimento em tampão fosfato-salino e degradação em tampão fosfato-salino. Foi possível a obtenção de scaffolds homogêneos, como observado na microscopia ótica. Pela técnica de FTIR tornou-se possível observar a conformidade da quitosana com o descrito na literatura e verificar a presença de grupos colágeno no pó de osso desmineralizado bem como a interação de ambos os materiais nas sobreposições de picos e deslocamento dos mesmos, graças a presença desses grupos. Com o MTT observou-se um aumento substancial da viabilidade celular. Conclui-se também que o aumento de POD gera uma melhora nas propriedades de absorção de exsudados de feridas, como demonstrado no teste de intumescência, e um melhora nas características degenerativas do scaffold, ou seja, um aumento na biodegradação do mesmo como visto nos testes de degradação o que reforça seu uso em curativos bioabsorvíveis.

Palavras-chave: Engenharia de Tecidos, Bioimpressão, Regeneração Óssea, Quitosana.

ABSTRACT

Bioprinting is one of the latest innovations in bone tissue engineering. However, it is still a challenge to find a material with biocompatibility and characteristics similar to human bone and, at the same time, capable of allowing a favorable bioprint. Thus, hydrogels based on chitosan were developed with dispersion of demineralized bone powder (DBP) in different uses for the manufacture of scaffolds used for bone regeneration. The structures were characterized by fourier transform infrared spectroscopy (ftir), optical microscopy (mo), cell viability (mtt assay), degree of swelling in phosphate buffer saline and degradation in phosphate buffer saline. It was possible to obtain homogeneous scaffolds, as observed in optical microscopy. The

FTIR technique made it possible to observe the compliance of chitosan with what is described in the literature and to verify the presence of collagen groups in the demineralized bone powder as well as an interaction of both materials in the peaks overlapping and their displacement, thanks to the presence these groups. With MTT, a substantial increase in cell viability was observed. It is also concluded that the increase in DBP generates an improvement in the absorption properties of wound exudates, as characterized in the tumescence test, and an improvement in the scaffold's degenerative characteristics, that is, an increase in its biodegradation as seen in the swell degradation tests which reinforces its use in bioabsorbable dressings.

Keywords: *Tissue Engineering, Bioprinting, Bone Regeneration, Chitosan.*

INTRODUÇÃO

Desenvolvimentos recentes em técnicas de prototipagem rápida e impressão 3D nos permitam obter facilmente esses *scaffolds* de polímeros sintéticos ^[1]. Novas fronteiras em biomateriais visam o desenvolvimento de *scaffolds* bioativos derivados de tecidos e órgãos biológicos. Um *scaffold* é uma estrutura que permite que células específicas se propaguem e proliferem e, ao mesmo tempo, é biodegradada pelo hospedeiro e substituída por novo tecido ^[1].

A impressão 3D é a mais nova técnica para trabalhar com biomateriais e construir *scaffolds* celulares úmidos. A técnica permite que os materiais sejam dispensados de maneira controlada, repetível e relativamente rápida; além disso, permite adicionar células autólogas do paciente a ser tratado ^[2]. O processo de bioimpressão 3D envolve três etapas: geração de arquivo CAD para STL de formas a serem impressas - que podem ser configuradas a partir de imagens médicas, fornecendo *scaffolds* personalizados, em seguida a dispensação de células e biomateriais e, finalmente, o pós-processamento impresso. Este último passo envolve métodos de reticulação e a avaliação da viabilidade e funcionalidade celular ^[2].

Para a bioimpressão uma variedade limitada de polímeros naturais é adequada para uso, destacando-se colágeno, alginato, ácido hialurônico, quitosana, fibrina e sulfato de condroitina ^[3].

Ainda há escassez de estudos vislumbrando o uso de quitosana como *bioinks* (biotintas). A quitosana foi relatada como apresentando comportamento de pseudo-desbaste em soluções diluídas ^[4]. Assim, a viscosidade nas taxas de cisalhamento nas tensões aplicadas durante a extrusão se torna relevante, uma vez que influencia a precisão da impressão. Nesse sentido, uma faixa de viscosidade adequada para a extrusão é entre 0,30 e 30 Pa/s, uma vez que valores mais altos trazem grande pressão à extrusão de hidrogel para fora do bico, e o processo se torna instável ^[4,5].

Resta uma necessidade clínica não atendida de tratamentos seguros e eficazes para defeitos ósseos maciços devido a lesão traumática, ressecção de tumor ou doenças congênitas, e para melhorar a cicatrização em casos de fraturas não consolidadas ou com consolidação retardada, o enxerto de materiais biocompatíveis esta sendo cada vez mais consolidado como para sanar essa necessidade ^[6].

O enxerto é um tratamento comum utilizado para a perda óssea. Apesar da ampla aplicação de autoenxertos e aloenxertos, a indisponibilidade de tecido doador e a morbidade do local do defeito são as principais desvantagens desse método ^[7].

O pó de osso bovino é muito usado para enriquecimento de hidrogéis para uso em enxertos com fins de recuperação óssea e cartilaginosa, sendo constituído principalmente pelas fases mineral ou inorgânica e orgânica. A hidroxiapatita (HAp) é o principal componente

inorgânico, enquanto as fibras de colágeno tipo I (Col) são o principal componente orgânico. Alguns estudos mostram a incorporação de Col ou HAp no design de biomateriais ; para melhorar algumas propriedades físico-químicas ou biológicas ^[8]. Alguns aspectos interessantes desse material são seu baixo custo e grande disponibilidade sendo uma boa escolha para o enriquecimento de biomateriais ^[9].

Portanto o objetivo do presente trabalho foi produzir e caracterizar *scaffolds* feitos de hidrogel a base de quitosana enriquecidos com pó osseo desmineralizado (POD) para uso em recuperação óssea e cartilaginosa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do hidrogel de quitosana com POD

A solução de hidrogel de quitosana foi preparada a partir da dissolução de 2 gramas de quitosana em 30 ml de ácido acético, sendo a mesma mantida em agitação magnética constante por 1 hora. Ao final, foram misturados ao hidrogel o pó de osso sob agitação magnética por 30 min para homogeneização. Os hidrogéis preparados possuíam proporção de 0%; 2,5% e 5% de pó de osso desmineralizado.

Obtenção das membranas (scaffolds)

As estruturas tridimensionais foram construídas usando uma bioimpressora 3D (*ALLEVI 2*). Um modelo 3D do hidrogel foi criado no programa *SolidWorks* e exportado como um arquivo STL para o programa de fatiamento em camadas *Slic3r*; o arquivo foi adaptado para impressão de camada única com 100% de preenchimento. Posteriormente, o arquivo foi exportado no formato GCODE e carregado no programa da bioimpressora.

Caracterização das membranas (scaffolds)

Os scaffolds obtidos foram caracterizados por: Microscopia óptica, Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Teste de viabilidade celular (*MTT assay*), Grau de intumescimento em tampão fosfato-salino e Degradação em tampão fosfato-salino .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microscopia ótica

A superfície dos hidrogéis reticulados (após fabricação dos *scaffold*) apresentam aspecto de micropilares; como mostra as micrografias apresentadas na figura 1A e 1B. Para aplicação na engenharia de tecidos, uma das propriedades mais importantes de um *scaffold* diz respeito à sua morfologia, pois esses devem apresentar uma estrutura com alta porosidade e poros interligados, para assegurar a adesão celular e a difusão de nutrientes entre as células e a matriz extracelular a serem formadas ^[10]. Além disso, os poros presentes nas estruturas, são importantes para o crescimento celular. RAJABI et al. (2020) demonstrou em seus resultados que as células cresceram ao longo dos poros para formar um tecido 3D, resultando em uma estrutura adequada para a regeneração do tecido ósseo ^[11].

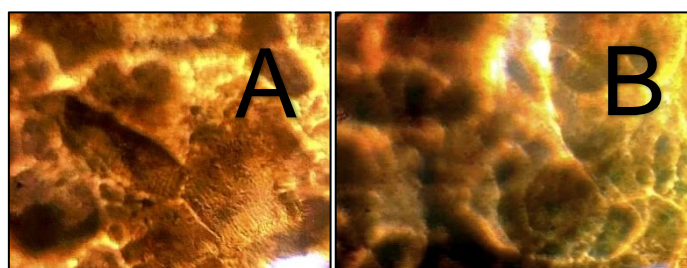


Fig. 1 – A – Microscopia ótica hidrogel de quitosana com pó de osso desmineralizado com aumento de 70x após reticulação (fabricação do *scaffold*). A – Hidrogel com 2,5% de POD; B – Hidrogel com 5% de POD. Fonte: Autor (2021).

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Na figura 2A pode-se observar os picos típicos do POD, em 1450cm^{-1} encontra-se carbonato, em 1050cm^{-1} encontra-se um pico evidente relacionado aos grupos fosfatos; ambos são típicos de POD, a literatura menciona que os principais picos de POD se encontram entre $500\text{-}2000\text{cm}^{-1}$ acima disso a uma variação muito grande dependendo do tipo de ossos usados e como os mesmos foram processados [12, 13].

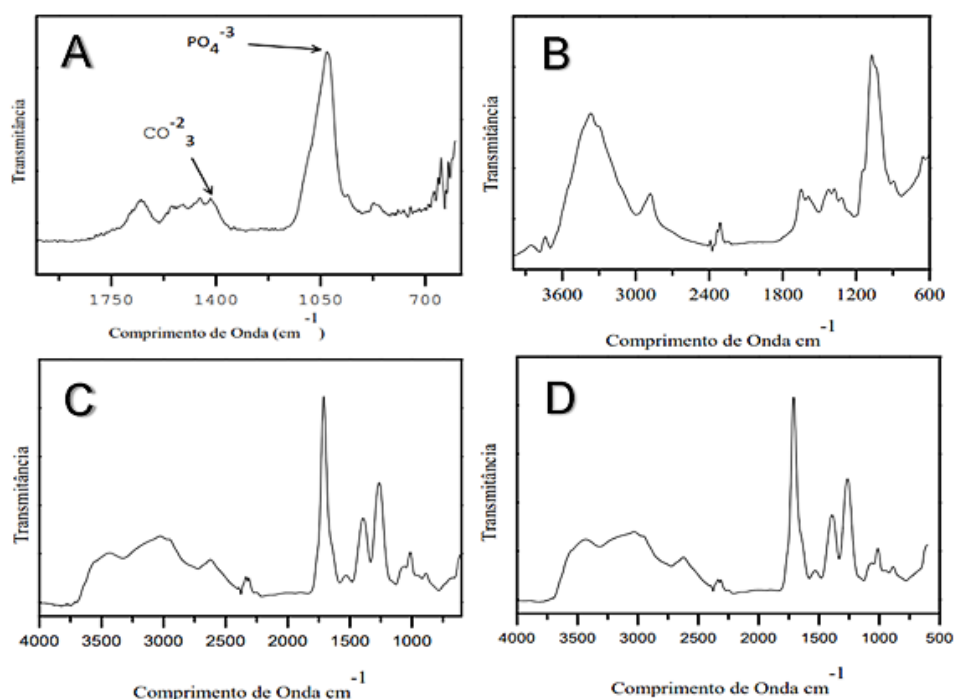


Fig. 2 – A – FTIR pó de osso liofilizado, B – FTIR quitosana pura, C – FTIR *scaffold* com POD 2,5%, D – *Scaffold* POD 5%. Fonte: Autor (2021).

Na figura 2B se encontra-se o FTIR da quitosana pura (estado sólido antes de virar hidrogel); A banda com máximo em 3383cm^{-1} está associada à ligação O-H, correspondente aos grupos C-OH e à água fisicamente adsorvida. Nota-se um ombro, em 3294cm^{-1} , atribuído às ligações N-H, dos grupos NH_2 . Entre $2975 - 2832\text{cm}^{-1}$ encontram-se os picos correspondentes às ligações C-H, sendo o pico em 2930cm^{-1} atribuído à vibração assimétrica e em 2876cm^{-1} à vibração simétrica. Além disso, banda característica da deformação angular do CH_2 (tesoura) aparece em 1420cm^{-1} [13]. Grupos amida são caracterizados pelas vibrações das ligações C=O, N-H e C-N e podem ser observados nos picos: 1658cm^{-1} , característico dos

estiramentos C=O (amida I); 1568 cm^{-1} , está relacionado aos dobramentos NH₂ (amida II); 1380 cm^{-1} , principalmente ao estiramento C-N. A banda entre $1070\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ está associada aos estiramentos C-O cíclico. Além disso, também se nota os picos em 1158 e 892 cm^{-1} , correspondentes aos estiramentos C-O-C da cadeia da quitosana [13, 14, 15].

Na figura 2C e 2D pode-se observar que houve interação de ambos POD e quitosana devido ao aparecimento dos picos principais de ambos. Pode-se também observar uma elevação discreta do platô em 3500 cm^{-1} devido à elevação dos grupos colágeno existentes no POD. Houve um deslocamento de alguns picos devido ao acúmulo de solvente nas amostras [13, 14, 15].

Teste de viabilidade celular (MTT assay)

O MTT é um método colorimétrico que analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula, baseado na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. A solução amarela do MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo, o que torna o MTT um teste rápido e sensível [16].

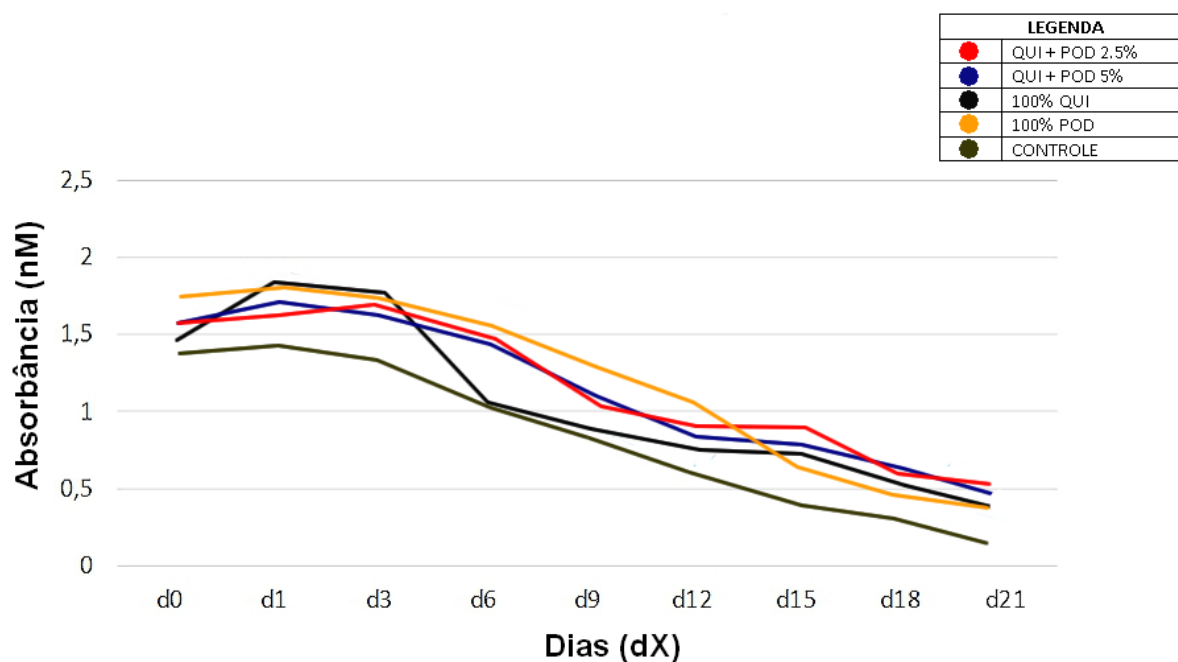


Fig. 3 – MTT assay. Fonte: Autor (2021).

A Figura 3 apresenta a curva de MTT (absorbância x dias) das amostras, é possível observar que houve um aumento substancial da viabilidade celular com o acréscimo de POD – o que já era esperado devido aos traços de fatores de crescimento, colágeno, minerais entre outros que ainda devem estar contidos no POD. Todas as amostras tiveram seus pontos de exaustão (declive) bem diferenciadas, a quitosana pura apresenta o seu maior declive no sexto dia (d6), já as amostras com acréscimo de POD tiveram seus declives por volta do décimo segundo dia (d12), já o POD puro possui seu declive no décimo quinto dia (d15) o que ressalta o aumento da viabilidade celular da quitosana com o aumento de POD.

Grau de intumescimento em tampão fosfato-salino

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos do teste de intumescimento em PBS (pH 7,4). Esse teste é importante para evidencia a capacidade do hidrogel em acumular líquidos, quanto maior a capacidade de acumulo melhor será seu uso em cicatrizes e feridas recentes pois maior será sua capacidade em absorver os exsudado da ferida ^[11].

Tabela1: Ganho percentual de peso em relação ao peso inicial. Fonte: Autor (2021).

COMPOSIÇÃO	GANHO PERCENTUAL DE MASSA (% 00,0)			
	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas
Quitosana Pura	628,3	643,6	598,1	460,4
Quitosana Pura	650,1	688,0	510,6	450,3
Quitosana + POD (2,5%)	635,3	545,7	550,3	550,0
Quitosana + POD (2,5%)	641,8	542,6	530,2	520,8
Quitosana + POD (5%)	635,1	550,3	543,2	542,1
Quitosana + POD (5%)	640,7	549,2	545,3	541,6

Observa-se que todas as amostras obtiveram um grau de intumescimento muito parecido na primeira hora, porém as amostras com POD se mantiveram com poucas variações após a segunda hora enquanto as com quitosana pura continuaram a decair.

Degradação em tampão fosfato-salino

Como pode ser observado na Tabela 2 as amostras enriquecidas com POD se degradaram de forma mais rápida. Uma possível explicação seria aos poros criados pelo POD na superfície dos *scaffolds* fazendo com que estes aumentem sua superfície de contato e consequentemente se fragmentem mais rápido.

Tabela 2: Perda percentual em peso em relação ao peso inicial. Fonte: Autor (2021).

COMPOSIÇÃO	PERDA DE MASSA EM % (00,0)			
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 28
Quitosana Pura	14,0	16,7	30,0	40,1
Quitosana Pura	16,5	18,3	31,1	50,3
Quitosana + POD (2,5%)	38,2	40,6	67,6	*
Quitosana + POD (2,5%)	30,3	32,7	59,5	*
Quitosana + POD (5%)	35,2	38,0	60,4	*
Quitosana + POD (5%)	40,6	42,4	65,0	*

Morgado *et al.*, (2014) em seus estudos sobre membranas assimétricas de quitosana para uso como curativos, observaram nos testes de degradação ao longo de 21 dias, que uma maior perda de massa aconteceu nos primeiros 7 dias, em pH 8, mantendo-se estável nos tempos subsequentes tendo assim uso em curativos temporários bioabsorvíveis ^[17].

CONCLUSÕES

Foi possível a obtenção de *scaffolds* homogêneos, como observado na microscopia ótica. Pela técnica de FTIR tornou-se possível observar a conformidade da quitosana com o descrito na literatura e a presença de grupos colágeno no pó de osso desmineralizado bem como a interação de ambos os materiais nas sobreposições de picos e deslocamento dos mesmos, graças a presença desses grupos colágenos. Com o MTT observou-se um aumento substancial da viabilidade celular. Conclui-se também que o aumento de POD gera uma melhora nas propriedades de absorção de exsudados de feridas, como demonstrado no teste de

intumescência, e um melhora nas características degenerativas do scaffold, ou seja, um aumento na biodegradação do mesmo como visto nos testes de degradação o que reforça seu uso em curativos bioabsorvíveis.

REFERÊNCIAS

- [1] MIRDAMADI, Elnaz Sadat et al. Liver tissue engineering as an emerging alternative for liver disease treatment. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 26, n. 2, p. 145-163, 2020.
- [2] REIS, Lewis A. et al. A peptide-modified chitosan–collagen hydrogel for cardiac cell culture and delivery. *Acta biomaterialia*, v. 8, n. 3, p. 1022-1036, 2012.
- [3] MOREIRA, Cheisy DF et al. Thermogelling chitosan–collagen–bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, v. 58, p. 1207-1216, 2016.
- [4] DEB, Payel et al. Scaffold development using biomaterials: a review. *Materials Today: Proceedings*, v. 5, n. 5, p. 12909-12919, 2018.
- [5] GUNGOR-OZKERIM, P. Selcan et al. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials science*, v. 6, n. 5, p. 915-946, 2018.
- [6] COLLINS, Maurice N. et al. Scaffold fabrication technologies and structure/function properties in bone tissue engineering. *Advanced Functional Materials*, v. 31, n. 21, p. 2010609, 2021.
- [7] SOHN, Hoon-Sang; OH, Jong-Keon. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomaterials research*, v. 23, n. 1, p. 1-7, 2019.
- [8] OUYANG, Liliang et al. Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*, v. 8, n. 3, p. 035020, 2016.
- [9] CHATTOPADHYAY, Sayani; RAINES, Ronald T. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, v. 101, n. 8, p. 821-833, 2014.
- [10] MALLICK, Kajal K.; COX, Sophie C. Biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Front Biosci*, v. 5, n. 341, p. e60, 2013.
- [11] RAJABI, Negar et al. An adhesive and injectable nanocomposite hydrogel of thiolated gelatin/gelatin methacrylate/Laponite® as a potential surgical sealant. *Journal of colloid and interface science*, v. 564, p. 155-169, 2020.
- [12] REDDI, A. Hari; ANDERSON, Winston A. Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification hemopoiesis. *Journal of Cell Biology*, v. 69, n. 3, p. 557-572, 1976.
- [13] OLIVEIRA, Maria Zillene Franklin da Silva; FERNANDES, Tatiana Sainara Maia; CARVALHO, Tecia Vieira. Síntese e caracterização de beads de quitosana comercial reticulados com glutaraldeído. *Matéria (Rio de Janeiro)*, v. 26, 2021.
- [14] CONTRERAS-CORTÉS, Ana Gabriela et al. Toxicological assessment of cross-linked beads of chitosan-alginate and *Aspergillus australensis* biomass, with efficiency as biosorbent for copper removal. *Polymers*, v. 11, n. 2, p. 222, 2019.
- [15] LU, Huigen et al. Fabrication of graphene/gelatin/chitosan/tricalcium phosphate 3D printed scaffolds for bone tissue regeneration applications. *Applied Nanoscience*, v. 11, n. 2, p. 335-346, 2021.
- [16] VAN DE LOOSDRECHT, Arjan A. et al. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay: a methodological study. *Journal of immunological methods*, v. 141, n. 1, p. 15-22, 1991.
- [17] MORGADO, Patrícia I. et al. Poly (vinyl alcohol)/chitosan asymmetrical membranes: Highly controlled morphology toward the ideal wound dressing. *Journal of membrane science*, v. 469, p. 262-271, 2014.