

## SCAFFOLDS DE QUITOSANA PARA ENGENHARIA TECIDUAL NEURAL

D. A. Kakazu, S. M. Malmonge

Engenharia Biomédica, Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, Brasil  
e-mail: danilo.kakazu@gmail.com

**Resumo:** Atualmente, o emprego da engenharia tecidual tem sido uma das alternativas estudadas como procedimento para auxiliar a regeneração de tecido nervoso lesionado. Engenharia tecidual envolve a utilização de biomaterial como matriz tridimensional (*scaffold*) associada a biomoléculas para estabelecer um microambiente tecidual semelhante ao natural e assim favorecer o recrutamento, adesão, proliferação e atividade celular com consequente regeneração tecidual. No caso de tecido nervoso, os *scaffolds* devem ter formato de tubo e atuar como guia para a restauração do tecido neural. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de *scaffolds* de quitosana. A quitosana utilizada como matéria prima apresentou grau de desacetilação de 80,21%, temperatura de degradação térmica na faixa de 250 – 300°C e foi verificado que a mesma apresenta grande teor de impurezas. O método empregado permitiu a obtenção de *scaffolds* de quitosana na forma de tubos, com dimensões adequadas, porém o método deve ser aprimorado para possibilitar a obtenção de tubos com maior resistência mecânica.

**Palavras-chave:** Biomaterial, Quitosana, Engenharia tecidual neural

**Abstract:** *Currently, the use of tissue engineering has been studied as one of the alternative procedure to assist the regeneration of damaged nerve tissue. Tissue engineering involves the use of a biomaterial scaffold, that is a three-dimensional matrix associated to biomolecules in view to establishing a microenvironment similar to natural extracellular matrix of the tissue and thus promote the recruitment, adhesion, proliferation and cellular activity with consequent tissue regeneration. In the case of nerve tissue scaffolds must have tube format and act as a guide for the restoration of neural tissue. This study aimed to obtain chitosan scaffolds in the form of tube guide for nerve repair. The chitosan used as the raw material shows a 80,21% desacetylation degree, thermal degradation temperature in the range of 250 – 300°C and it was found that the presence of large content of impurities in the material. The method allowed to obtain chitosan scaffolds in the form of tube with adequated dimensions, but the method should be improved in view to obtain tubes with improved mechanical strength.*

**Keywords:** Biomaterial, Chitosan, Neural tissue engineering

### Introdução

Recuperar tecidos nervosos, caso ocorra alguma lesão é raro, visto que as células nervosas não têm a capacidade natural de se regenerar. Contudo, sob certas condições, a autorregeneração do tecido pode ser atingida, através da reconexão do tecido nervoso e consequente restabelecimento das conexões nervosas [1]. Uma das alternativas para promover a regeneração de tecido nervoso é a utilização de técnicas da engenharia tecidual. Tais técnicas envolvem a utilização de biomateriais como matrizes tridimensionais (*scaffolds*) associadas à biomoléculas para estabelecer um microambiente tecidual semelhante ao natural para assim favorecer o recrutamento, adesão, proliferação e atividade celular com consequente regeneração tecidual [2].

No caso de tecido nervoso, os *scaffolds* devem ter formato de tubo e atuar como guia para a restauração do tecido neural. Para a produção de *scaffolds* na forma de tubos guia (o formato mais encontrado na literatura), muitos biomateriais vêm sendo pesquisados, dentre os quais se destacam os materiais bioreabsorvíveis. É desejado que o *scaffold*, apresente resistência estrutural adequada, que seja capaz de manter a integridade das paredes as quais normalmente sofrem colapso devido à falta de suporte interno e apresente pequena espessura da parede, além de ser capaz de suportar as forças de contração muscular [2,3].

Kim et al (2008) apresentam uma revisão bibliográfica sobre o emprego do biopolímero quitosana em engenharia tecidual. Segundo os autores, a quitosana e seus derivados apresentam grande potencial para uso como material suporte em engenharia tecidual, devido à facilidade de obtenção de estrutura porosa, possibilitar formação géis, associação com outros materiais, ser bioreabsorvível, além de apresentar atividade antibacteriana [3].

A quitosana é um polissacarídeo natural, que pode ser obtida através da desacetilação da quitina, esta por sua vez é um dos biopolímeros mais abundantes no mundo e pode ser encontrada em exoesqueletos de artrópodes e crustáceos. A quitosana é composta por unidades aleatórias de D-glucosamina (unidade desacetilada) e N-acetil-glucosamina (unidade acetilada), que são ligadas por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  [4]. Sabe-se que a quitosana é degradada *in vivo* principalmente por hidrólises enzimáticas. Essa degradabilidade é desejada pois, o material deve se degradar depois que o tecido esteja formado, e até que isso ocorra, deve manter uma resistência mecânica parecida com a do tecido original. Já foi observado que a taxa de degradação é inversamente proporcional a cristalinidade que é controlada principalmente pelo grau

de desacetilação [5,6,7]. Além dessas propriedades inerentes ao material em questão, seu processamento pode ser modificado com o intuito de obter-se materiais com uma estrutura porosa, ou então hidrogéis, bem como pode-se associá-la com outros materiais a fim de se obter melhores propriedades. Somando todas essas propriedades e facilidade de processamento, Kim *et al* em 2008 afirmaram que a quitosana apresenta um grande potencial para uso como material suporte na engenharia de tecido [3,8]. Este trabalho visa a obtenção de *scaffolds* de quitosana, partindo dada matéria prima empregada.

## Materiais e métodos

Inicialmente foi realizado a caracterização da quitosana utilizada como matéria prima - quitosana da marca *Polymer*®. Foi realizado também o preparo e caracterização de filmes de quitosana para determinação da capacidade de intumescimento. Numa segunda etapa foram preparados e caracterizados *scaffolds* em formato de tubos.

**Caracterização** – O material foi caracterizado quanto o seu grau de desacetilação, intumescimento. Foi realizado também uma análise termogravimétrica. Foram propostos métodos para a obtenção de tubos e filmes de quitosana.

**Grau de desacetilação** – Determinou-se o grau de desacetilação utilizando a técnica da titulação potenciométrica. Para isso, dissolveu-se 0,2g de quitosana em pó a uma solução de ácido clorídrico 0,02M. A solução foi agitada por 24h utilizando um agitador magnético com rotação de 600rpm. Sob agitação, foi-se adicionando 1mL da solução de NaOH 0,2M à solução. A cada mL de NaOH adicionado, foi realizada a medição do pH. Os dados foram coletados e um gráfico do pH em função do volume do titulante foi gerado utilizando o *software Origin Pro 9.0 64bits*. Os dois pontos de inflexão foram obtidos e com isso, pode-se calcular o grau médio de desacetilação utilizando a seguinte equação:

$$GD = \frac{M(v_2 - v_1) \times 161}{W} \times 100\% \quad (1)$$

Onde,  $M$  é a concentração molar do titulante,  $v_1$  e  $v_2$  o volume do titulante necessário para neutralizar o ácido e desprotonar o grupamento amino, respectivamente.  $W$  a massa de quitosana utilizada e 161 é a massa do monômero glicosídico [9].

**Análise Termogravimétrica (TGA)** - Para determinar a temperatura de degradação térmica, bem como o teor de impurezas no material, foi empregada a análise termogravimétrica (TGA) empregando um equipamento da TA Instruments, modelo TA 500. Foram analisadas duas amostras de: quitosana em pó, filme de

quitosana filtrada (filtro 42µm) e filme de quitosana não filtrada. As análises foram realizadas em atmosfera inerte ( $N_2$ ) e atmosfera natural. A taxa de aumento da temperatura, em ambas as condições, utilizada foi de 10°C por minuto. Os dados foram coletados e os gráficos do percentual de massa em função da temperatura e respectivas derivadas foram gerados utilizando o *software Origin Pro 9.0 64bits*.

**Preparo de filmes** – Para a preparação dos filmes, foram vertidos cerca de 5mL de solução de quitosana 4%(m/v) em uma placa de *petri*. Esta foi levada à estufa e mantida em seu interior por 48 horas sob a temperatura de 50°C. Após esse período, foi retirada e imersa em solução de NaOH 0,25M por 30 minutos. O filme formado foi retirado da placa e lavado em água destilada. E novamente colocado na estufa nas mesmas condições já mencionadas.

**Grau de intumescimento** – A partir dos filmes formados, foram cortadas 4 amostras de cada tipo. As massas das amostras foram determinadas e em seguida foram imersas em tubos *Falcon* contendo 5mL de água destilada. Após 4 dias, as amostras foram retiradas, tiveram o excesso de água superficial removidos com papel macio e suas massas foram determinadas novamente.

Para realizar o cálculo do grau de intumescimento, foi utilizada a seguinte equação:

$$GI = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100\% \quad (2)$$

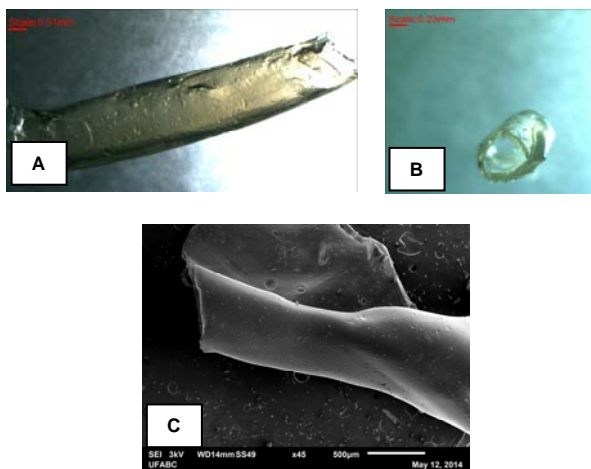
Sendo  $W_s$  a massa da amostra após a imersão e  $W_d$  a massa da amostra antes da imersão [10].

**Preparo de scaffolds** – Para a obtenção do tubo, foram utilizadas agulhas para seringas com diâmetro externo de (1,2956±0,0191)mm. Foi aplicado na superfície de cada agulha uma fina camada de óleo de silicone. Após a aplicação da camada, as agulhas foram levadas à estufa e lá permaneceram por um período de 10 minutos sob a temperatura de 60°C. As agulhas foram então retiradas da estufa e imersas em solução de quitosana 4%(m/v). Após este procedimento, as agulhas foram imersas em solução de NaOH 0,25M por um período de 30 minutos. As agulhas foram então colocadas na estufa por um período de 30 minutos sob a temperatura de 60°C. Algumas amostras foram cortadas utilizando o bisturi, colocadas em uma placa de *petri* e novamente levadas para a estufa sob 60°C e por um período de 1 hora. As amostras foram analisadas quanto a sua morfologia e para isso, utilizou-se o estereomicroscópio e o microscópio eletrônico de varredura (MEV).

## Resultados e Discussão

Pôde-se obter filmes íntegros, através do método empregado. Já, no caso dos *scaffolds* foi possível a

obtenção de tubos com diâmetro interno aproximado de 0,532mm e espessura de parede entre 0,086mm região mais fina e 0,201mm região mais espessa (Figura 1).

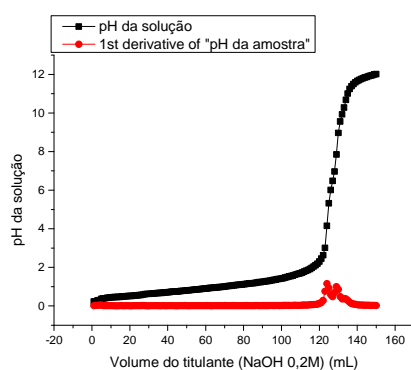


**Figura 1.** *Scaffolds* de quitosana. a) vista lateral do *scaffold*; b) vista frontal do *scaffold*; c) imagem adquirida MEV.

Porém não foi possível a obtenção de tubos de grande comprimento, devido à dificuldade de remoção da agulha, já que o hidrogel formado não apresenta boa resistência mecânica. Mesmo com o emprego de silicone como desmoldante, o tubo formado fica fortemente aderido na superfície da agulha, dificultando a manutenção da estrutura física do *scaffold* durante a sua retirada.

### Grau de desacetilação

A partir dos dados coletados, foi elaborado um gráfico do pH em função do volume do titulante. Para garantir uma melhor precisão a respeito dos pontos de inflexão da curva, foi plotado no gráfico também a derivada da curva, como se pode observar na Figura 1.

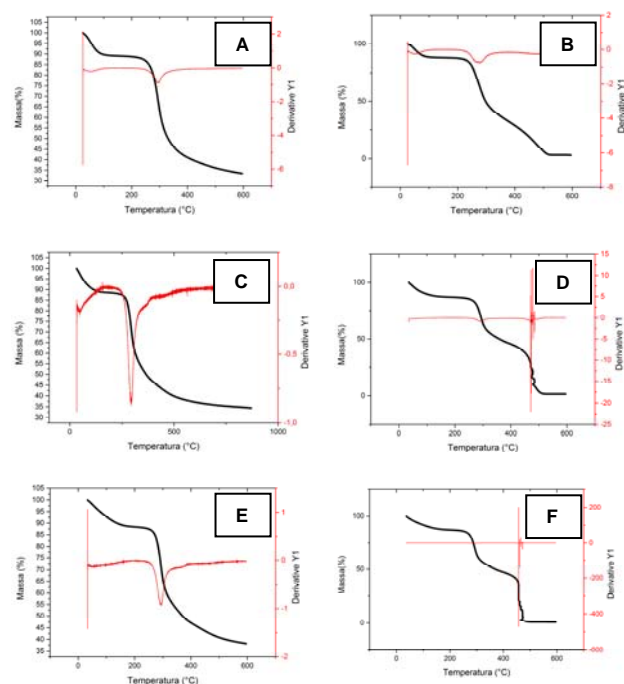


**Figura 2.** Titulação potenciométrica da quitosana para determinação do grau de desacetilação.

Assim, com os valores obtidos e utilizando a equação (1), o grau de desacetilação da quitosana utilizada é de 80,21%. O valor obtido é condizente com os valores encontrados na literatura [11].

### Análise Termogravimétrica

A partir dos dados obtidos foram plotados os gráficos que podem ser observados na Figura 3.



**Figura 3.** TGA das amostras de: a) quitosana em pó atmosfera inerte; b) quitosana em pó atmosfera oxidante; c) filme de quitosana filtrada em atmosfera inerte; d) filme de quitosana filtrada em atmosfera oxidante; e) filme de quitosana não filtrada atmosfera inerte; f) filme de quitosana não filtrada atmosfera oxidante.

Pôde-se observar que há uma perda de massa gradual em temperatura próxima a 100°C, que está associada à perda de moléculas de água presentes nas amostras mesmo após a secagem do biopolímero que é muito hidrofílico. Essas moléculas de água estariam ligadas por ligações de hidrogênio com os grupamentos amino e hidroxila do material. Por volta de 250°C a 300°C pôde-se observar uma queda brusca do percentual de massa. Assume-se então que neste intervalo de temperatura há a degradação do material. Ao realizar o ensaio em atmosferas diferentes notou-se que em atmosfera inerte, o material apresentou apenas um pico de degradação, contudo, em atmosfera oxidante, notou-se a presença de outros picos menos intensos em temperaturas próximas entre 450°C e 500°C.

Notou-se também que em atmosfera inerte, ao final da análise, nem todo o material havia se degradado, cerca de 30% da amostra ainda não havia se degradado, contudo, em atmosfera oxidante, praticamente toda a amostra foi degradada, exceto na amostra da quitosana em pó. Os resquícios presentes na amostra do material em pó sob atmosfera oxidante são decorrentes das impurezas advindas da obtenção e processamento do material, os mesmos também poderiam ser observados na amostra contendo o filme de quitosana não filtrada, contudo, não foram detectados, provavelmente devido ao fato das impurezas se decantarem durante o processo de preparo do filme.

### Grau de intumescimento

A partir dos dados coletados, fez-se o cálculo do grau de intumescimento do material, bem como a média e desvio padrão e o resultado obtido foi de  $(124 \pm 20)\%$ . O valor encontrado é baixo se comparado a outros valores encontrados na literatura [12], contudo, isso pode ser explicado devido ao fato do resfriamento ter ocorrido de forma lenta, permitindo então uma melhor cristalização do polímero. A reticulação após a cristalização do material faz com que a estrutura tridimensional fique mais fechada e rígida, fazendo com que o volume livre que poderia ser ocupado pelas moléculas de água diminua e consequentemente diminua o intumescimento do material.

### Conclusão

O método empregado permitiu a obtenção de *scaffolds* de quitosana na forma de tubos, contudo, notou-se a dificuldade ao retirar o tubo do molde. O estudo terá continuidade visando o aprimoramento do método e obtenção de tubos com resistência mecânica adequada para que os mesmos sejam submetidos a testes de cultivo celular *in vitro*.

### Agradecimentos

Ao PIBIC/CNPq pela bolsa de IC.

### Referências

- [1] Hsu SH, Kuo WC, Chen YT, Yen CT, Chen YF, Chen KS, Huang WC, Cheng H. New nerve regeneration strategy combining laminin-coated chitosan conduits and stem cell therapy. Elsevier-Acta Biomaterialia. 2013; 9(5) 6606-6615.
- [2] Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. Polímeros: Ciência e Tecnologia. 2005; 15(1):13-21.
- [3] Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC, Cho CS. Chitosan and its derivatives for tissue engineering application. Biotechnology Advances. 2008; 26(1):1-21.
- [4] Milosavljevic NB, Klajajevic LM, Popovic IG, Filipovic JM, Krusic MTK. Chitosan, itaconic acid and poly(vinyl alcohol) hybrid polymers networks of high degree of swelling and good mechanical strength. Polymer International. 2010; 59(5):686-694.
- [5] Paradossi G, Chiessi E, Venanzi M, Pispisa B, Palleschi A. Branched chain analogues of linear polysaccharides: a spectroscopic and conformational investigation of chitosan derivatives. Int J Biol Macromol. 1992; 14(2):73-80.
- [6] Kamiyama K, Onishi H, Machida Y. Biodisposition characteristics of N-succinyl-chitosan and glycol-chitosan in normal and tumorbearing mice. Biol Pharm Bull. 1999; 22(2):179-86.
- [7] Lee KY, Ha WS, Park WH. Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. Biomaterials. 1995; 16(16):1211-6.
- [8] Bozkurt A, Lassner F, O'Dey D, Deumens R, Böcker A, Schwendt T, Janzen C, Suschek C, Tolba R, Kobayashi E, Selhaus B, Tholl S, Eummelen L, Schügner F, Damink LO, Weis J, Brook GA, Pallua N. The role of microstructured and interconnected pore channels in a collagen-based nerve guide on axonal regeneration in peripheral nerves. Biomaterials. 2012; 33(5): 1363-1375.
- [9] Abreu FOMS, Cavalcante LG, Doudement PV, Castro AM, Nascimento AP, Matos JEX. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. Polímeros. 2013; 23(5):630-635.
- [10] Zhu J, Xiong Y, Zeng C, Qiang N, Quan D, Wan J. Elastic chitosan conduits with multiple channels and well defined microstructure. International Journal of Biological Macromolecules. 2012; 51(1-2):105-112.
- [11] Rege PR, Block LH. Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of processing sequence on the resultant chitosan's properties. Carbohydrate Research. 1999; 321(3-4):235-245.
- [12] Assis OBG. Alteração do caráter hidrofílico de filmes de quitosana por tratamento de plasma de HMDS. Química Nova. 2010; 33(3):603-606.