

CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAS DE SCAFFOLDS QUITOSANA/HIDROXIAPATITA: UMA CONTRIBUIÇÃO A CIRURGIA DE ENXERTO ÓSSEO

Rosemary Cunha de Oliveira Ponciano¹
Marcus Vinícius Lia Fook²
Polyana Tarciana Araujo Santos³
Hudson de Araújo Batista⁴
Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa⁵

RESUMO

O processo reparatório do osso natural, dentre outros mecanismos fisiológicos, ocorre de maneira harmônica em todo organismo. Entretanto, a presença de alguns fatores deletérios como cirurgia, trauma ou patologia, pode interferir na fisiologia da remodelação óssea. Sabendo-se que a ação sinérgica entre biomateriais poderá auxiliar e favorecer a osteogênese após cirurgia de enxertia, que a biocompatibilidade é avaliada, dentre outros fatores, pela reação do osso ao biomaterial em sua união físico químico e que a energia de superfície relacionada ao grau de molhabilidade da superfície do corpo pelo sangue definirá o tipo e quantidade de contato entre o novo tecido e o enxerto. Este trabalho tem como objetivo desenvolver *scaffolds* de quitosana/hidroxiapatita e caracterizar sua estrutura com foco para reparação óssea na cavidade bucal. Para isto, foram selecionadas hidroxiapatitas, obtidas por três rotas diferentes, para avaliação quanto à dispersibilidade dos pós em solução quitosana a 3% (m/v). A partir da dispersão foi selecionada a hidroxiapatita que apresentou maior tempo de sedimentação e/ou apresentou maior turbidez após o período de 5:00h. Em seguida, foram confeccionados, *scaffolds* pelo processo de liofilização, e caracterizados por MO e teste de Intumescimento. As características estruturais dos *scaffolds* analisados mostraram-se compatíveis as propriedades desejadas aos *scaffolds* destinadas às cirurgias de implantes ósseos.

Palavras- chaves: Hidroxiapatita, Quitosana, *Scaffolds*, Intumescimento, Reparação óssea.

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido vivo altamente especializado, metabolicamente ativo e em equilíbrio dinâmico, que promove a regulação e deposição mineral permanente no organismo. O tecido ósseo é dividido em unidades básicas multicelulares, composto de aproximadamente 10% de células, 60% de cristais minerais: hidroxiapatita cristalina (cálcio e fósforo), e 30% de

¹Pós Graduando pelo Curso de Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, rosemarycop@yahoo.com

²Professor Doutor no Curso de Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, marcus.fook@pq.cnpq.br

³Doutora pelo Curso de Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, HUDSONB@live.com

⁴Pós Graduando pelo Curso de Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, polyanaquimica@yahoo.com.br

⁵Professora orientadora: Doutora pelo Curso de Ciência e Engenharia de Materiais- UFCG, ana.costa@ufcg.edu.br

matriz orgânica. Esta possui principalmente colágeno tipo I que representa 88% de toda a matriz; outras proteínas representam 10%. Na matriz orgânica protéica, além do colágeno do tipo I, tem-se a substância fundamental, fração orgânica não colágena do tecido ósseo (Rogina *et al.*, 2016).

Pode-se dividir o tecido ósseo ainda em dois tipos principais: osso cortical e osso trabecular. O osso cortical, ou compacto, constitui a camada exterior de todos os ossos, representa cerca de 80% da massa óssea total e é composto por mineral ósseo e elementos da matriz extracelular. Este tipo de osso possui em seu interior apenas vasos sanguíneos penetrantes e osteócitos. Este tecido proporciona proteção, suporte, e ajuda os ossos longos a resistirem à tensão aplicada pelo peso do corpo (Tortora *et al.*, 2012).

Por sua vez, o osso trabecular, ou esponjoso, constitui cerca de 20% da massa óssea total. Que ao contrário do osso cortical, possui uma aparência esponjosa, ou seja, é um entrelaçado irregular de finas colunas de osso, revestido em várias áreas por osteoblastos e osteoclastos, que fazem com que este osso esteja constantemente renovado, em um ritmo muito superior ao do osso cortical. Esta remodelação óssea exige a ação coordenada de células ósseas dentro da unidade básica multicelular, também conhecida como compartimento de remodelação óssea. Nos seres humanos adultos saudáveis, o ciclo de remodelação óssea dura de 6 a 9 meses (Dinopoulos *et al.*, 2012).

A remodelação óssea é mediada pelas células osteogênicas que se encontram na porção interna do perióstio e no endóstio. Os osteoblastos são responsáveis pela formação do osso e estão localizados na superfície deste, sintetizando colágenos e outros componentes orgânicos necessários para construir o tecido ósseo; os osteócitos são as células mais abundantes no osso e são responsáveis pela manutenção do metabolismo diário do osso e troca de nutrientes e produtos catabólicos com o sangue. Por sua vez, os osteoclastos são células de grandes dimensões que possuem enzimas lisossômicas que participam na reabsorção da matriz óssea, durante a remodelação óssea. Processo que pode ser dividido em etapas como a osteogênese, osteoindução e osteocondução que ocorre fisiologicamente (Tortora *et al.*, 2012).

Em condições de equilíbrio o osso dos maxilares funciona como um tecido ativo que sofre remodelações em um processo cinético, contínuo e equilibrado; envolvendo formação, reabsorção e manutenção óssea que são baseados na atividade de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, respectivamente (Rogina *et al.*, 2016). Em contrapartida após infecções, lesões por cirurgias com perda da estrutura óssea, traumas ou doença, a reparação é iniciada em resposta

aos mecanismos regulatórios fisiológicos associados à inflamação e a resposta imunológica do paciente. Para o reestabelecimento das funções normais alteradas muitos biomateriais da engenharia de tecidos têm sido investigados na tentativa de auxiliar e proteger, por exemplo, reparações ósseas em regiões lesionadas ou cirurgiadas (Shu *et al.*, 2018).

Biomateriais como alternativa aos enxertos autógenos e heterógenos têm sido desenvolvidos e aplicados na engenharia de tecido, com propriedades desejáveis às aplicações, como resistência mecânica para suportar a tensão exercida evitando a sua migração da região de atuação cirúrgica ou lesionada, favorecendo a bioatividade na diferenciação e proliferação das células. Além de permitir a formação de microestruturas com poros interconectados e dispersos em seu volume possibilitando o suprimento sanguíneo da região em reparação (Zhang, 2014; Atak *et al.*, 2017).

A engenharia de tecido vem desenvolvendo terapias alternativas pela combinação de biomateriais, células ou fatores de crescimento que possam substituir os tecidos ósseos em traumas, cirurgias e ou patologias. O osso autógeno normalmente tem sido usado como "padrão-ouro" nestas situações. No entanto, esta metodologia requer segunda cirurgia, levando à morbidade do sítio doador, danos aos nervos, inflamação e hematomas. Situações assim têm justificado o grande interesse em pesquisa por materiais sintéticos a exemplo da hidroxiapatita (HAp), que tem se tornado substituto do osso humano em enxertos (Kloster, 2011).

A hidroxiapatita possui afinidade com os tecidos ósseos, alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas e tem sido utilizado como suporte em liberação controlada de drogas, como antibióticos ou anticancerígenos no tratamento de tumores ósseos. Contudo, a hidroxiapatita sintética não possui osteoindutividade. Estudos mostram algumas estratégias desenvolvidas para melhorar a capacidade osteogênica deste biomaterial, entre estas, a adição de citocinas, de fatores de crescimento vascular endotelial e de plaquetas e substituição de oligoelementos bioativos por íons terapêuticos incluindo Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} e Si^{4+} . Uma outra alternativa é a produção de biocompositos de hidroxiapatita e quitosana que combinados possuem uma ação sinérgica na aceleração da angiogênese, favorecendo a osteogênese e a diferenciação das células mesenquimais (Chaves, 2015; Lei *et al.*, 2017).

A quitosana é derivada da quitina que é um polissacarídeo linear com elevada densidade de carga, de grupos reativos, assim como, de ligações de hidrogênio. É, portanto, um biopolímero que apresenta características como biocompatibilidade, propriedade antibacteriana intrínseca, biodegradabilidade e capacidade de acelerar a formação óssea. A

constatação deste potencial bioativo conduziu à utilização da quitosana em combinação com a hidroxiapatita em muitas aplicações na área biomédica e odontológica, por exemplo, na reparação óssea (Rebelo, 2015; Xu *et al.*, 2015).

Os biomateriais compósitos para substituição do tecido ósseo devem atender a vários requisitos: apresentar uma superfície com rugosidade superficial e molhabilidade, somados a uma microestrutura com porosidade interconectada. A presença destes fatores influenciam a adesão e atividade celular, neovascularização e angiogênese (Rebelo, 2015).

Portanto, a combinação de quitosana associada a cargas inorgânicas como os fosfatos de cálcio, em particular a hidroxiapatita, em forma de *scaffolds* pode potencializar e melhorar as propriedades, principalmente as biológicas da união quitosana e hidroxiapatita. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo desenvolver scaffolds de quitosana/hidroxiapatita e caracterizar sua microestrutura.

2 METODOLOGIA

2.1 Materiais

- Quitosana, fornecida pelo CERTBIO, com grau de desacetilação variando de 85,7% e 90% e peso molecular médio entre 50-150 KDa;
- Ácido acético glacial P.A de 99,9% (C₂H₄O₂) - Vetec® Química Fina Ltda com grau analítico;
- Hidroxiapatita, fornecida pelo LabSMac, obtida pelos métodos de co-precipitação e reação de combustão via fase líquida;
- Hidroxiapatita comercial, Sigma-Aldrich;
- Amoxicilina em drágeas, obtida no comércio local;
- *Phosphate Buffered Saline* (PBS) - Sigma Aldrich®, pH = 7,4;
- Lisozima – Sigma Aldrich®;
- Hidróxido de Sódio - Vetec® Química Fina Ltda com grau analítico;
- Cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC10557) e *Candida albicans* (ATCC289065), cedidas pelo CERTBIO.

2.2 Métodos

Scaffolds foram produzidos a partir da solução usada para dispersão e seleção das hidroxiapatitas obtidas por co-precipitação, combustão e comercial.

Para a produção dos *scaffolds*, foi preparado 300mL de solução de quitosana a 3% (m/v), colocando o pó da quitosana em solução de ácido acético a 1% (v/v) sob agitação mecânica durante 2h a temperatura ambiente. Em seguida, fracionou-se o volume em três soluções de 100mL nas quais foram imersos 0,45 g (15%) de cada amostra das hidroxiapatitas. Em seguida as soluções foram submetidas às 1h no ultrassom para retiradas das bolhas de ar. Em seguida, 30mL de cada solução foi vertida em placas de Petri com 6cm de diâmetro, levadas imediatamente para o ultra freezer por 24h e em seguida submetidas ao processo de liofilização por 72h. Após a liofilização os *scaffolds* foram imersos em solução de hidróxido de sódio a 1M por 1h para neutralização e na sequência lavados com água destilada para retirada do excesso de hidróxido de sódio, intumescidos, congelados e novamente liofilizados para manutenção da estrutura porosa. A Figura 3 ilustra o fluxograma simplificado dos procedimentos adotados.

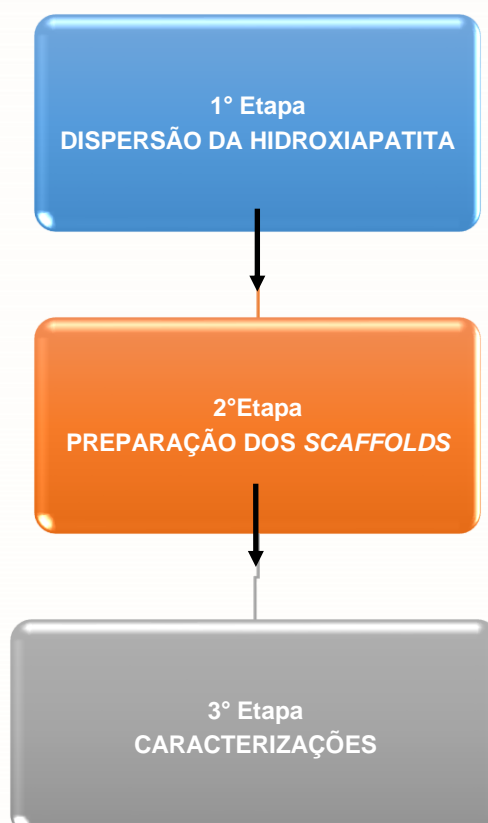


Figura 2 - Fluxograma simplificado da metodologia dos procedimentos experimentais.

2.3 Caracterização

Microscopia Óptica (MO)

Os *scaffolds* foram analisados em microscópio óptico Hirox, modelo KH-13000, operando no modo reflexão utilizando ampliações 60X e 120X. Esta caracterização foi realizada no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

Grau de Intumescimento

Este ensaio foi realizado no intuito de investigar o comportamento do material durante a imersão e permanência em solução aquosa semelhante ao meio interno do organismo. A absorção de líquido pelo material pode ser um fator importante na liberação de fármaco e para neovascularização e consequente neo formação óssea. Para realização deste ensaio foram preparadas dez amostras com diâmetro de 1,0 x 1,0 cm. As amostras foram colocadas em estufa a 40°C, por 24 horas, em seguida pesada em balança analítica de precisão digital antes da imersão em 7.5 mL de solução tampão fosfato (PBS) (pH 7,4) e em seguida colocadas em uma estufa bacteriológica a 37 °C. As amostras foram pesadas após 24 horas. No ato da pesagem, elas eram removidas da solução, secas ligeiramente em papel absorvente para eliminar o excesso da solução, e o peso úmido de cada fragmento era medido na mesma balança. O grau de intumescimento (em percentagem) foi determinado pela Equação 1.

$$\text{Grau de Intumescimento} = \frac{M_f - M_o}{M_o} \times 100 (\%)$$

Equação 1

Onde:

M_f - Massa intumescimento

M_o - Massa seca

DESENVOLVIMENTO

Enxertos

O osso é um tecido conjuntivo especializado, vascularizado e dinâmico que se modifica ao longo da vida do organismo. Quando lesado, possui uma capacidade única de regeneração e reparação sem a presença de cicatrizes, mas em algumas situações, o tecido ósseo não se regenera por completo, por exemplo, em grandes perdas ósseas (Tortora *et al.*, (2012).

Para suprir esta deficiência na regeneração óssea diferentes pesquisas nas áreas médico odontológica têm sido realizadas a procura de substâncias naturais ou sintéticas que possam substituir tecidos ósseos perdidos. Em cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial, o osso é o tecido mais comumente requerido nas cirurgias pré-protéticas, no tratamento de defeitos congênitos e deformidades dentofaciais, afim de promover união de fraturas em locais de osteotomias e para prevenir colapso de segmentos ósseos dentro de defeitos iatrogênicos, contribuindo para a função e a estética de regiões ósseas lesadas (Coelho, 2016).

A falta de osso nos rebordos alveolares tem sido um grande problema na recuperação estético-funcional em pacientes que sofrem traumatismos dentoalveolares, extrações dentárias traumáticas, ausência dentária congênita e ou patologias que envolvam maxila e mandíbula. A perda óssea pode ocorrer também por doença periodontal, cirurgias traumáticas, ou até mesmo por razões fisiológicas devido à falta de função do rebordo ou carga protética inadequada (Fardin, 2010).

Na odontologia, nos casos de perdas ósseas, é de conhecimento geral que o melhor material de enxerto é o osso autógeno, particularmente enxerto de medula óssea, devido às suas propriedades biológicas e a ausência de rejeição. O osso autógeno mostrou-se mais eficaz no processo de neoformação óssea quando comparado ao β -fosfato-tricálcio e ao osso orgânico bovino por meio de análise histológica e histomorfométrica. Contudo, nem sempre o osso do próprio indivíduo pode ser passível de utilização, principalmente, em grandes extensões de área danificada que necessita ser reparada (Fardin, 2010; Coelho, 2016).

Nesse sentido, existe uma busca por biomateriais cada vez mais especializados na tentativa de reparar grandes áreas e de influenciar seletivamente a resposta tecidual do leito receptor, como as biocerâmicas, as quais devem induzir a neoformação óssea, controlando a qualidade e quantidade de osso no interior da área receptora. Contudo, a pesquisa do material

de implante ideal para substituição do enxerto autógeno ainda persiste como um desafio da odontologia moderna (Lei *et al.*, 2017).

A procura por substitutos ósseos que apresentem propriedades compatíveis ao osso autógeno, fez com que as pesquisas desenvolvessem materiais sintéticos com o objetivo de reduzir a morbidade de áreas doadoras em procedimentos cirúrgicos, ao mesmo tempo em que os bancos de ossos passaram a ser mais confiáveis. Vários materiais foram desenvolvidos, entre eles: enxertos homogêneos, xenógenos, membranas biológicas, vidros bioativos e derivados da hidroxiapatita (Rogina *et al.*, 2016).

O material de enxerto ideal deve obedecer aos seguintes requisitos: tamanho adequado para reparação da área receptora sem comprometer a área doadora; promover a osteogênese; não apresentar resposta imunológica do hospedeiro; revascularizar rapidamente; estimular a osteoindução; promover a osteocondução; ser substituído gradativamente por osso do hospedeiro em quantidade e com qualidade semelhante (Coelho, 2016).

Apesar de os enxertos ósseos autógenos serem amplamente aceitos como padrão para o tratamento de defeitos ósseos, os implantes homogêneos e heterogêneos, e os substitutos ósseos sintéticos têm sido amplamente estudados como uma alternativa. Os ossos homogêneos e heterogêneos não contêm células vivas, mas podem apresentar características osteocondutoras ou osteoindutoras na sua integração aos sítios receptores. Ainda dispensam segunda cirurgia de área doadora, assim necessitam de menor tempo cirúrgico para realização (Fardin, 2010).

Outros tipos de substitutos ósseos têm sido estudados como biomateriais, dentre eles destacam-se os materiais sintéticos e ou aloplásticos, pela grande disponibilidade e por dispensarem o procedimento cirúrgico de um sítio doador. Por exemplo, biocerâmicas (hidroxiapatita) juntamente, com a quitosana, polietileno poroso (Lei *et al.*, 2017).

Biomateriais

Por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizada em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, tratando, aumentando ou substituindo quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo. Metais, cerâmicos, polímeros, compósitos e semicondutores quando biocompatíveis podem ser aplicados como biomaterial. Estes devem apresentar um conjunto de propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam desempenhar a função

desejada, além de estimular uma resposta adequada dos tecidos vivos (Guastaldi, 2010; Callister, 2010).

Biomateriais têm sido desenvolvidos e estudados para implantes médicos e odontológicos, bem como, as reações que ocorrem na interface tecido-implante. Inicialmente, utilizavam-se materiais inertes como os aços inoxidáveis e a alumina. A utilização de cerâmicas como biomateriais remonta a 1894, quando foi usado gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como um possível substituto para ossos. Este material apresenta uma resistência mecânica muito baixa e é completamente reabsorvido pelo organismo, resultando em uma rápida fragmentação e degradação. Tais propriedades pouco atrativas praticamente o excluíram como biomaterial. A década de 70 marcou o início do uso mais intenso de materiais cerâmicos com propriedades que possibilitam a sua classificação como biocerâmicas (Silva, 2006).

A primeira biocerâmica com uso muito difundido nos anos 70 foi à alumina densa (Al_2O_3), que se apresenta como bioinerte. Este material, devido a sua resistência, vem sendo usado com frequência até hoje em próteses ortopédicas para substituir o osso ou parte deles e são submetidos, na sua atividade funcional, a esforços elevados. Além da alumina outras cerâmicas como a zircônia (ZrO_2), o dióxido de titânio (TiO_2), os fosfatos de cálcio e as vitrocerâmicas de sílica/fosfato de cálcio, são utilizadas (Oréfice *et al.*, 2012).

Hidroxiapatita

A hidroxiapatita está presente em uma porcentagem em torno de 70% e é o principal constituinte da fase inorgânica da massa dos ossos e dos dentes. Originalmente, todas as apatitas terrestres estavam presentes em rochas ígneas e em alguns esqueletos de espécies marinhas. Alguns autores acreditam que depósitos de apatitas podem também ser formados por precipitação direta da água do mar, e alguns dos depósitos de carbonatos de cálcio são convertidos em apatita pela reação direta com fosfato dissolvido. Esta precipitação de fosfato de cálcio dos oceanos, mares e lagos produzem apatitas formadas por cristais de tamanho muito pequeno e com propriedades dependente da sua alta área superficial por unidade de massa (Mavropoulos, 1999).

Os primeiros estudos sobre a utilização de materiais cerâmicos como biomateriais foram registrados em 1930. Nesta ocasião, um fosfato tricálcio foi utilizado para regenerar um defeito ósseo. Mas, só em 1980, ou seja, só 50 anos estes materiais foram aplicados na

medicina e odontologia. A grande aceitação das biocerâmicas a base de sais de fosfato de cálcio deve-se a similaridade química ao tecido ósseo (Davies, 2009).

Dentro deste universo, a hidroxiapatita vem ganhando destaque em várias aplicações, seja na medicina, engenharia, química, bioquímica. As denominadas cerâmicas de fosfatos de cálcio possuem uma relação cálcio/fósforo de 1,67, a qual possibilita propriedades semelhantes ao osso humano. Por isto, este material tem ganhado destaque, principalmente para aplicações tecnológicas na área de saúde, voltada ao uso clínico, com o intuito de substituir enxerto ósseo autógeno em cirurgias ortopédicas e odontológicas (Oréfice *et al*, 2012).

Na área odontológica a hidroxiapatita é utilizada para manter e/ou recuperar o volume e a forma após extrações dentárias e conjugadas com enxertos ósseos autógenos em áreas destinadas a posterior instalação de implante em titânio. Além disto, pode ser aplicada em sítios ósseos que sofreram reabsorções pela presença de cistos ou outra lesões (Zhang *et al.*, 2014) Figura 2. Entretanto, apresenta algumas limitações em suas aplicações. Por exemplo, em odontológica o uso da hidroxiapatita de forma particulada deve ser realizado com a utilização de barreiras, como observado na Figura 3, para evitar sua dispersão para zona de tecidos moles o que causaria inflamação e a perda das partículas entre outros problemas (Carmo *et al.*, 2017).

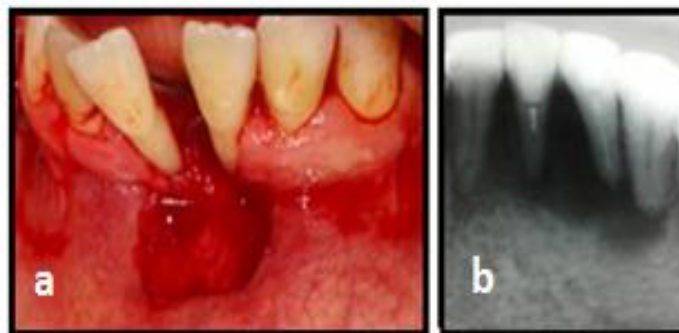


Figura 1 - Perdas ósseas por trauma (a) e por lesão cística (b)

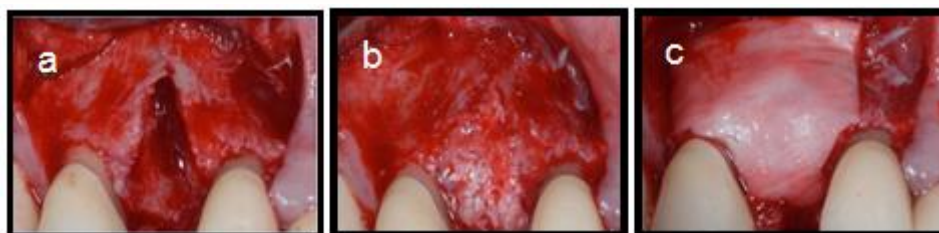


Figura 2 - Perdas ósseas por extração dentária (a), inserção de substituto ósseo particulado (b) e inserção de barreira de colágeno (c)

Além desta restrição, o aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica da hidroxiapatita quando usada isoladamente, limitando seu uso a regiões que requeiram sustentação. Apesar de não apresentar osteoindução a hidroxiapatita possui a osteocondução, além da habilidade de se ligar diretamente ao osso. Ainda apresenta uma resposta tecidual favorável ao tratamento, visto que em enxertos ósseos, tanto os íons cálcio quanto os íons fosfato não interferem na função celular e fisiológica dos tecidos adjacentes (Oréfice *et al.*, 2012). Como solução para a necessidade de produção de materiais bioativos com propriedades mecânicas mais comparáveis à dos tecidos ósseos, pode ser citada a produção de compósitos envolvendo a fase bioativa (cerâmica) e um segundo componente como a quitosana (Lei *et al.*, 2017).

Quitosana

A quitosana polissacarídeo resultante da desacetilação alcalina da quitina tem sido amplamente utilizada na área odontológica por ser atóxica e possuir propriedades biológicas antioxidante, antiinflamatória, cicatrizante e antimicrobiana *in vitro* contra vários microorganismos patogênicos bucais tais como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans* e *Porphyromonas gingivalis*. Atribuições de polímero bioadesivo, excelente biocompatibilidade, propriedades hemostáticas, biodegradabilidade e a capacidade de melhorar a nova formação óssea, têm sido relacionadas também a quitosana e impulsionado aplicações na área médica (Ponciano, 2010).

Quanto as propriedades antimicrobiana, apesar de alguns autores concordarem com a ação bactericida e bacteriostática a Quitosana caracteriza-se como sendo mais bacteriostática do que bactericida tendo maior eficácia contra bactérias gram-positivas em detrimento da ação contra bactérias gram-negativas. Acrescentando que isto pode conduzir ao aparecimento de sub-populações mais resistentes a quitosana após a adaptação fisiológica das células a sua presença (Oliveira *et al.*, 2011).

Segundo Rebelo *et al.* (2003) a ação antimicrobiana da quitosana deve-se a interação das cargas positivas das moléculas de quitina/quitosana com as cargas negativas da membrana microbiana. Neste modelo a interação é mediada pelas forças eletrostáticas entre o grupo protonado NH^3^+ e os resíduos carregados negativamente, competindo com os íons Ca^{2+} pelos locais eletronegativos na superfície da membrana. Mesmo em baixas concentrações, a quitosana liga-se à superfície celular negativamente carregada, perturba a célula e provoca sua

morte induzindo vazamento de componentes intracelulares. Enquanto que, em concentrações mais elevadas, a quitosana protonada pode revestir a superfície celular e evitar a fuga dos componentes intracelulares (Xu *et al.*, 2015). Estudos, ainda, relatam que superfícies hidrofílicas são comparativamente mais favoráveis para as funções das células ósseas, por exemplo: adesão, espalhamento, morfologia, proliferação, diferenciação e consequente regeneração do osso em comparação com as superfícies hidrofóbicas (Lei *et al.*, 2017)

Apesar das várias aplicações da quitosana nas diversas áreas: agricultura, tratamento de águas, indústria alimentar, cosmética e biofarmacêutica. Sua maior aplicação dá-se na área biomédica: suturas cirúrgicas, coadjuvante na instalação de implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada de medicamentos, encapsulamento de materiais (Azevedo *et al.*, 2007).

Na área da odontologia as aplicações da quitosana e seus derivados devem-se essencialmente às suas propriedades bioadesivas, viscosidade, permeabilidade, antimicrobianas e anticariogênicas que promovem a liberação prolongada de medicamentos na cavidade oral mostrando eficácia e potencial no tratamento de doenças periodontais, candidíases orais, mobilidade dentária e na redução da placa dentária (Decker *et al.*; 2005).

Apesar das inúmeras aplicações associadas à quitosana terem conduzido ao crescente número de estudos, existem algumas limitações associadas ao seu uso. No caso de aplicações biomédicas, questões relacionadas com a sua segurança, especificamente com a sua genotoxicidade, tem sido alvo de contestação e de investigação. Ao avaliar a citocompatibilidade da quitosana e de um derivado (quaternário) usando o teste de brometo de 3-(4,5)-dimetilialzólil -2,5 difeniltetrazólio (MTT) e a microscopia eletrônica de transmissão Ji *et al.* (2009), concluíram que os grupos quaternários no derivado em altas concentrações tornam o ambiente extremamente catiônico e produzem uma forte atração eletrostática com os grupos carregados negativamente na superfície de células do ligamento periodontal conduzindo à destruição das células, causando assim um efeito citotóxico acentuado. Também foi demonstrada citotoxicidade no trabalho de (Panasopit *et al.* 2007).

Todavia outros estudos não mostraram indícios de mutagenicidade nem de genotoxicidade no teste de Ames, micronúcleo e no teste de alteração de esperma quando administrados oralmente. Ratificando assim, a característica atóxica da quitosana, e indicando seu uso em associações com outros biomateriais em *scaffolds* (Qin *et al.*, 2006; Ishihara *et al.*; 2002).

Scaffold

Tecidos orgânicos lesionados ou doentes podem ser reparados ou substituídos por cirurgia reconstrutiva. No entanto, os procedimentos cirúrgicos com esta finalidade enfrentam obstáculos que limitam sua aplicação, entre esses, escassez de doadores, dispositivos biomédicos pouco eficientes e a necessidade do uso de imunossupressores para evitar rejeição do tecido ou órgão implantado. Desta forma, o desafio é projetar e desenvolver sistemas tridimensionais, biologicamente compatíveis, que favoreçam o transporte de nutrientes, a estabilidade mecânica, a coordenação de processos multicelulares e microambiente específico que preserve e estimule a proliferação da fenotipagem celular (Chaves, 2015).

Scaffolds são matrizes ou suportes tridimensionais porosos, temporários, biodegradáveis usados na engenharia de tecidos para mimetizar a estrutura da matriz extracelular e estimular respostas celulares específicas em nível molecular. Este modelo de dispositivo biológico fornece condições biofísicas e bioquímicas adequadas, tanto para propagação celular ou molecular de sinalização específica, como para manter-se integrado ao tecido hospedeiro, sem risco de rejeição pelo tecido original (Rebelo, 2015).

Os biomateriais que compõem os *scaffolds* conferem requisitos químicos e arquitetônicos necessários para a manutenção da estabilidade física e química, resultando em uma estrutura com resistência mecânica adequada, biocompatível e biodegradável. Além de porosidade que influencia o desenvolvimento das células osteoblásticas e, em combinação com as condições de cultura para a funcionalidade dos tecidos formados, facilitando a chegada de células indiferenciadas desde o periósteo, endósteo e matriz óssea, que se localizam entre as trabéculas do implante e se diferenciam em osteoblastos, formando novo osso (Coelho, 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microscopia Óptica

A morfologia da superfície dos *scaffolds* liofilizados e neutralizados foi avaliada por MO, conforme ilustra a Figura 4(a) face externa apresenta-se com poros distribuídos em toda a superfície; 4(b) base apresenta-se rugosa, com sulcos paralelos, poucos profundos e 4(c)

superfície de corte transversal que se apresenta com formação lamelares sobrepostas no sentido horizontal e paralelas no verticalmente.

O congelamento seguido de liofilização realizado pode ter alterado a morfologia dos *scaffolds*, pois no congelamento, a água possui a tendência de se concentrar em cristais desordenados na estrutura. Também foi identificada a hidroxiapatita que se apresentou como partículas de tamanhos diferentes, dispersas, esbranquiçadas.

Na superfície de corte transversal identificam-se estruturas lamelares, com poros interconectados, em concordância com os estudos de (Ponciano, 2010; Tomaz, 2017). A presença de poros é extremamente importante em um biomaterial para reparação óssea pois ajuda na neoformação óssea, neovascularização, além de permite a penetração de fluidos biológicos que são indispensáveis aos enxertos.

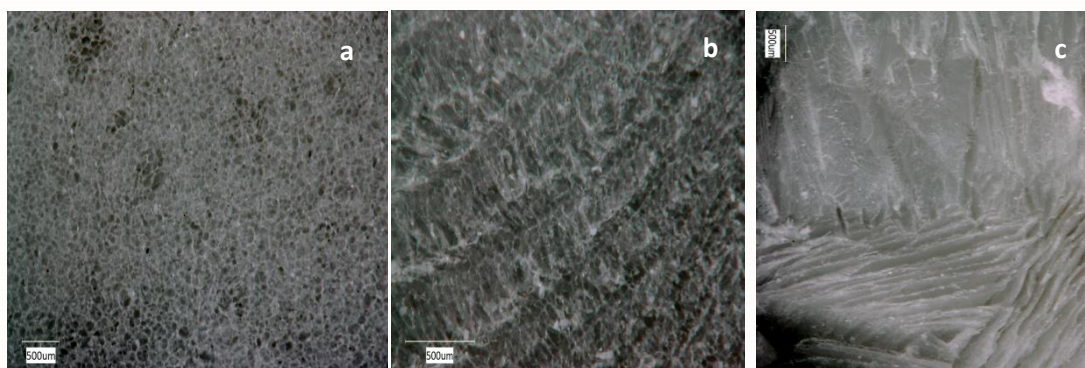


Figura 3- Microfotografias das superfícies dos scaffolds, (a) superfície externa, (b) base, (c) superfície de corte transversal.

Grau de Intumescimento

Na propriedade de intumescimento dos *scaffolds* simulada e medida em resposta às condições fisiológicas, observa-se um ganho de massa em todos os 10 (dez) *scaffolds* chegando, a maioria a 1100%, demonstrando um alto poder de absorção. Os valores do grau de intumescimento foram equivalentes, mostrando que as características estruturais são bastante semelhantes e reproduzíveis, ou seja, o intumescimento da rede polimérica e as neutralizações são equivalentes nos *scaffolds*. Segundo (Tomaz, 2017) a água é absorvida nos *scaffolds* por dois processos: ligação de água ao próprio material e água sendo mantida no espaço dos poros dos *scaffolds*. A Tabela 1 apresenta os resultados do grau de intumescimento para os *scaffolds* de quitosana/ hidroxiapatita imersos em 7.5 mL de solução

tampão fosfato (PBS) (pH 7,4) por 24 horas. Os valores estão expostos a partir do cálculo da equação 1.

Tabela 1- Grau de intumescimento dos scaffolds de quitosana/hidroxiapatita.

Massa inicial	Massa final	Grau de intumescimento
$M_o=0.0512$	$M_f=0.5812$	1035%
$M_o=0.0492$	$M_f=0.5218$	9605
$M_o=0.0369$	$M_f=0.4946$	1240%
$M_o=0.0514$	$M_f=0.6654$	1194%
$M_o=0.0472$	$M_f=0.5647$	1096%
$M_o=0.0409$	$M_f=0.5839$	1094%
$M_o=0.0330$	$M_f=0.3664$	1010%
$M_o= 0.0285$	$M_f=0.3573$	1153%
$M_o=0.0299$	$M_f=0.3433$	1048%
$M_o=0.0240$	$M_f=0.3099$	1191%

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estruturalmente os *scaffolds* apresentam-se semelhantes;

As superfícies dos *scaffolds* apresentam grande poder de absorção;

Pode-se concluir que os *scaffolds* estudados apresentam características promissoras para reparação óssea na cavidade bucal, de acordo com a finalidade proposta neste trabalho.

REFERÊNCIAS

ATAK, B. H.; BUYUK, B.; HUYSAL, M.; ISIK, S.; SENEL, M.; METZGER, W.; CETIN, G. Preparation and characterization of amine functional nano-hydroxyapatite/chitosan bionanocomposite for bone tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 200-213, 2017.

CHAVES, A. V. Hidroxiapatita e Magnetita Associadas a Scaffolds de Quitosana para Regeneração Óssea., 2015.

COÊLHO, J. D. C. A. Fisiologia da Remodelação Óssea Revisão da Literatura. 2016.

FARDIN, A. C. Enxerto ósseo em odontologia revisão de literatura. 2010.

LEI, Y.; XU, Z.; KE, Q.; YIN, W.; CHEN, Y.; ZHANG, C.; GUO, Y. Strontium hydroxyapatite/chitosan nanohybrid scaffolds with enhanced osteoinductivity for bone tissue engineering. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 72, p. 134-142, 2017.

OLIVEIRA, A.; FONTANA, A.; NEGRINI, T.; NOGUEIRA, M.; BEDRAN, T.; ANDRADE, C.; SPOLIDORIO, L.; SPOLIDORIO, D. Emprego do óleo de Melaleuca alternifolia Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Rev. bras. plantas med**, v. 13, n. 4, p. 492-499, 2011.

PONCIANO, J. J. **Desenvolvimento de membranas bioabsorvíveis com variado nível de orientação molecular para aplicação como biomaterial**. 2010. 72f. Mestrado (Em Ciências e Engenharia de Materiais). Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande Campina Grande- PB.

REBELO, M. D. A. Scaffold de Quitosana Alginato de Sódio e Hidroxiapatita com Potencial de Aplicação para Regeneração Óssea. 2015.

ROGINA, A.; RICO, P.; FERRER, G. G.; IVANKOVIC, M.; IVANKOVIC, H. In situ hydroxyapatite content affects the cell differentiation on porous chitosan/hydroxyapatite scaffolds. **Biomedical Engineering**, v. 44v, p. 12f, 2016.

SHU, Y.; YU, Y.; ZHANG, S.; WANG, J.; XIAO, Y.; LIU, A. C. The immunomodulatory role of sulfated chitosan on BMP-2- mediated bone regeneration. **Biomaterials Science**, p. 11, 2018.

TOMAZ, A. F. **Desenvolvimento de Membrana de Quitosana/1,4 Naftoquinona para Liberação Controlada: Curativo para Feridas Oncológicas**. 2017. 144f. Tese (em Ciência e Engenharia de Materiais). Programa de Pós- Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, Campina Grande-PB.

XU, J.; STRANDMAN, S.; ZHU, J. X.; BARRALET, J.; CERRUTI, M. Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery. **Biomaterials**, v. 37, p. 395-404, 2015.

ZHANG, D. A bioactive self-fitting shape memory polymer scaffold with potential to treat cranio-maxillo facial bone defects. **Acta Biomaterialia**, 2014.