

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DIRETA E INDIRETA DE ARCABOUÇOS DE QUITOSANA NANOESTRUTURADOS COM TRIPOLIFOSFATO DE SÓDIO VISANDO SUA UTILIZAÇÃO COMO BIOCURATIVOS

G.G. Pessoa¹; J.M. Florez¹; M.B. Mathor²; C.F. da Silva¹; P.S. Lopes¹

¹Universidade de São Paulo, UNIFESP, Diadema-SP, Brasil

²Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN-SP, Brasil

Email: gabriela.glinglani@gmail.com

RESUMO

O desenvolvimento de curativos feitos de materiais biocompatíveis, biodegradáveis e bioativos, tem apresentado um grande potencial na bioengenharia de tecidos. A quitosana é um biomaterial com diversas propriedades biológicas que permite a elaboração de um biocurativo com qualidades satisfatórias. Devido à abundância, facilidade de obtenção e ação antimicrobiana, utilizou-se a quitosana reticulada com o tripolifosfato de sódio (TPP - $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), componente atóxico que oferece resistência através da interação iônica entre os compostos. O trabalho objetivou avaliar um curativo com a função auxiliar no reparo e regeneração pele. Foram realizados estudos com MEV, FT-IR e citotoxicidade direta e indireta. Para a citotoxicidade direta e indireta cada amostra foi cortada e esterilizada por exposição à lâmpada UV do fluxo laminar por 15 minutos cada lado. Em seguida, para a citotoxicidade indireta, as amostras foram colocadas separadamente em tubos estéreis para extração das possíveis substâncias tóxicas dos curativos. Os extratos foram filtrados, diluídos e adicionados a fibroblastos Balb/c 3T3 (20.000 células/poço), em microplacas de 96 poços, em oito diluições diferentes e após 24h foi determinado a citotoxicidade utilizando-se o método do Vermelho Neutro (NR) em 540 nm. Para o método direto, os curativos foram colocados em placas de 24 poços, onde foram adicionadas 25.000 células e após incubação as mesmas também foram avaliadas utilizando o NR. As células foram avaliadas e houve uma significativa perda da viabilidade à medida que a concentração do extrato aumentava. Para as amostras controle, não foi observada variação significativa. Este resultado é corroborado pela notável diferença que a reticulação proporcionou as estruturas. Algumas composições granulares foram observadas nas micrografias da amostra reticulada. Acredita-se que esses granulados sejam excesso de agente reticulante, o que influencia na citotoxicidade dos arcabouços. A análise com FTIR mostrou que com o pico encontrado por volta de 1330 cm^{-1} , tem-se a evidência das ligações iônicas entre TPP e quitosana. Os resultados apresentados indicam a continuação

dos estudos utilizando concentrações reduzidas de agente reticulante visando a redução da citotoxicidade apresentada e melhora das características do biocurativo.

Palavras-Chave: citotoxicidade, quitosana, tripolifosfato de sódio, biocurativo

1. Introdução

Scaffolds ou arcabouços, são estruturas que funcionam como suporte tridimensional, são feitos de polímeros e usados para restaurar ou reconstituir tecidos, em aplicações de substituição total ou parcial de órgãos ou tecidos danificados e em composições biodegradáveis adequadas para substituição temporária. Os requisitos físicos e químicos para esses são: biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência mecânica, porosidade com interconexão de poros e distribuição uniforme de poros. Assim polímeros que tenham essas características são usados, inclusive como curativos (SADER et al., 2006).

A engenharia de tecidos, bioengenharia de tecidos ou medicina regenerativa são termos que em geral significam um meio de substituição, reparação e/ou regeneração de tecidos e órgãos. Essa área visa imitar tecidos já existentes para aplicações e tratamentos clínicos (NEREM, 2006).

O objetivo final da engenharia de tecidos da pele é produzir rapidamente um substituto que ofereça a completa recuperação funcional da pele, incluindo todos os anexos da mesma (folículos pilosos, glândulas sudoríparas e os órgãos sensoriais) e camadas (epiderme e derme). Além disso, é importante o estabelecimento de redes vasculares funcionais e nervosas livres de cicatriz, oferecendo uma integração com o tecido circundante (METCALFE & FERGUSON, 2007).

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

A quitosana é um biopolímero proveniente da reação de desacetilação parcial da quitina, encontrada principalmente nas carapaças de crustáceos e insetos, por hidrólise dos grupos acetamida, com soluções muito concentradas de hidróxido de sódio e temperaturas superiores a 60°C (FREITAS et al., 2012).

Para aplicação da quitosana na produção de curativos, é necessário modificá-la tendo em vista a melhoria das propriedades mecânicas bem como a redução da solubilidade. Vários métodos, tanto físicos quanto químicos, têm sido utilizados para modificar a quitosana natural. A reticulação com um agente bifuncional pode ser citada como um exemplo de modificação química promovida sobre a quitosana. O tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) foi escolhido como agente reticulante, pois se

descobriu que o mesmo possui um potente efeito anticoagulante, devido à propriedade que tem de unir-se a íons metálicos como o cálcio (MATOS, 2009).

Sendo assim, o presente estudo visa a avaliação estrutural, físico-química e citotóxica de concentrações variadas (1%, 0,8% e 0,5%) dos biocurativos reticulados com tripolifosfato de sódio de arcabouços de quitosana, possibilitando seu uso como biocurativos de baixo custo e eficazes.

2. Materiais e Métodos

2.1 Preparo dos Curativos

A preparação do arcabouço consistiu em solubilizar Quitosana 2% (p/p) em água destilada. Em constante agitação, adicionou-se estequiometricamente o ácido acético, sendo calculado através do grau de acetilação da quitosana, até a solubilização total da mesma, tornando-a consistente. A solução foi colocada em agitador magnético por 2 horas sob 500 r.p.m. (Sébastien, 2006). Posteriormente, a solução foi dispersa uniformemente em placas de Petri de polipropileno de maneira a obter uma camada de 1 mm de espessura. A espessura foi controlada pelo volume adicionado 50g. As placas foram imediatamente submetidas à temperatura de -20°C. As placas, após o congelamento, foram liofilizadas em LIOTOP® L101 (Alizadeh et. al., 2013, Liu et. al., 2009), seguida da reticulação com três concentrações diferentes de tripolifosfato de sódio, sendo 1%, 0,8%, 0,5%. Para cada placa, adicionou-se 50 mL de cada diferente concentração, formando uma camada uniforme do arcabouço com o reticulante. Nas placas cuja finalidade é servirem como controle, em substituição ao reticulante, colocou-se água destilada em quantidade similar às primeiras. Após 24 horas de contato a solução reticulante foi removida, realizando lavagem das mesmas, sendo novamente submetidas ao congelamento a -20°C. Após o congelamento total das amostras, realiza-se, mais uma vez, a liofilização por 48 horas (Alizadeh et. al., 2013, Jiankang et. al., 2009, Seol, et. al., 2004).

2.2 Toxicidade *in vitro*

2.2.1 Citotoxicidade Indireta

De acordo com a Norma ISO 10993-5 (2009), foram cortadas frações dos curativos (2,0cm x 3,0cm), com peso padronizado a partir do valor encontrado para a amostra controle. O peso foi padronizado para todas as outras amostras reticuladas com TPP (1, 0,8 e 0,5%). Subsequentemente as mesmas foram expostas a luz UV por 15 minutos para descontaminação. As amostras foram submersas em 4mL de meio de cultura RPMI (Vitrocell Embriolife) suplementado com 10% de SFB (Vitrocell Embriolife), 1% L-Glutamina (Vitrocell Embriolife), 1% antibiótico (estreptomicina e

penicilina) e 0,1% anfotericina. Foram mantidos em banho-maria (37°C) por 72h e filtrados utilizando filtro de seringa 45 µm de porosidade média.

Foram utilizadas células CHO (células de Ovário de Hamster Chinês), semeadas em placas de 96 poços, com 2×10^4 cel/ poço, 24h antes das amostras serem adicionadas. Foram feitas diluições seriadas (1:2) dos extratos identificados de C1 a C7. O C8 correspondeu ao extrato filtrado, as placas foram mantidas na incubadora úmida por 24h. Todos os testes seguiram as Boas Normas de Cultura Celular (OECD, 1998).

2.2.2 Citotoxicidade Direta

Em uma placa de 24 poços foram adicionadas $2,5 \times 10^3$ células BALB/c 3T3 ATCC CCL-163 (Manassas, VA, USA), cultivadas com meio "D10": DMEM (Vitrocell Embriolife) suplementado com 10% de SFB (Vitrocell Embriolife), 1% L-Glutamina (Vitrocell Embriolife), 1% antibiótico (estreptomicina e penicilina) e 0,1% anfotericina. As células foram semeadas por 24h. As amostras de curativos foram adicionadas, dispostas de modo que fossem obtidos poços com arcabouços controle de quitosana, poços com arcabouços reticulados com TPP 1, 0,8 e 0,5 %, poços controles de células (onde não foram colocados arcabouços) e poços somente com arcabouços (sem cultivo de células). Foram recortados círculos de cada amostra de scaffold (Controle e TPP) de diâmetro 15,4mm (mesmo diâmetro dos poços da placa de 24 poços). As amostras foram expostas a luz UV por 15 minutos de cada lado antes de serem colocadas nos poços.

2.2.3 Avaliação da citotoxicidade

Após as 24 horas, adicionou-se Neutral Red (corante vital) aos poços e incubou-se por 3h. Posteriormente à retirada do mesmo e lavagem com solução salina, foi acrescentado 1,5 mL de solução *Dessorb*, colocando-o no agitador por 10 minutos. Os curativos foram transferidos para uma placa de 96 poços, sendo feita a leitura em leitor de microplacas (BIOTEK, Synergy HT), no comprimento de onda de 540 nm, possibilitando a avaliação da viabilidade celular (OECD, 2004).

2.3 Microscopia eletrônica de varredura

A avaliação da estrutura final da matriz foi feita na superfície longitudinal e na área transversal de ruptura, após resfriamento com nitrogênio líquido. As amostras foram previamente metalizadas através da deposição de uma camada de ouro em um Sputter Coater SC 7620 e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura com 10kV de voltagem, 100pA de corrente elétrica.

2.4 Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As modificações químicas dos arcabouços foram avaliadas por FTIR, utilizando o espectrofotômetro IR Prestige-21 da Shimadzu. As amostras foram preparadas com brometo de potássio (KBr) e foram realizadas 256 varreduras, a temperatura ambiente, na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

3. Resultados e Discussão

Para os *scaffolds* serem usados como curativos, eles não podem ser tóxicos às células que serão cultivadas. Em conformidade com a ISO 10993-5 (2009) aplicada à biomateriais, a biocompatibilidade e segurança do produto aplicado devem ser testadas. Com relação ao teste de citotoxicidade indireta, o limite máximo para o material ser considerado seguro é de 70 % de viabilidade celular.

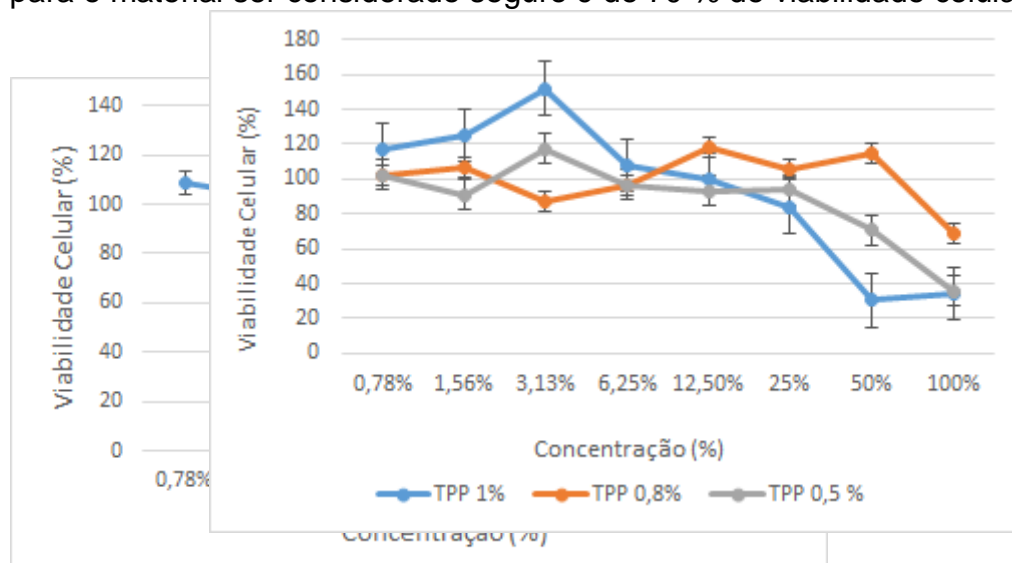


Figura 1. Gráfico representando a citotoxicidade indireta das amostras reticuladas com TPP nas concentrações 1, 0,8 e 0,5 % (v/v) em comparação com o curativo composto apenas por quitosana não reticulada (controle).

A viabilidade celular foi avaliada e comparada com as células cultivadas apenas com o meio. Os testes utilizando células CHO verificaram que os extratos dos biocurativos reticulados com TPP a 1, 0,8 e 0,5 % (v/v) causaram uma significativa perda da viabilidade celular em todas as concentrações de TPP testadas à medida que a concentração do extrato aumentava, especialmente em 50 e 100%. Para as amostras CONTROLE, não foi observada variação significativa (Figura 1). Resultados semelhantes já haviam sido verificados em teste de citotoxicidade

utilizando-se células fibroblastos BALB/c 3T3, em que a viabilidade manteve-se abaixo de 70% (dados não mostrados).

Os resultados da Citotoxicidade Direta foram inconclusivos, provavelmente devido a amostra liberar material que influenciou na leitura dos resultados por absorvância (dados não mostrados).

Para efeito de comparação no desenvolvimento e estrutura do material, fez-se necessário a visualização da estrutura dos curativos através das fotomicrografias, para que a forma, rugosidade e porosidade das mesmas pudessem ser avaliadas.

As microscopias eletrônicas dos *scaffolds* são apresentadas abaixo x250, x500, x1000 e x10000 respectivamente (figura 2). É notável a diferença que a reticulação proporcionou as estruturas. A amostra CONTROLE apresenta estrutura fibrosa, dispersa e espaçada. Já a amostra TPP possui estrutura contínua, lamelar, mas ainda sim, porosa. Essas figuras mostram que a reticulação induz a unificação e homogeneização das fibras filamentosas do CONTROLE em uma estrutura rugosa.

A técnica de liofilização também é responsável pela composição final, já que sob condição de alto vácuo, os materiais podem se tornar porosos e com interconectividade entre eles (Montanha, 2012). Essas características explicam resultados encontrados anteriormente, como o de porosidade (dados não mostrados). Bhumkar & Pokharkar (2008) obtiveram micrografias semelhantes em suas amostras de quitosana reticuladas com tripolifosfato de sódio.

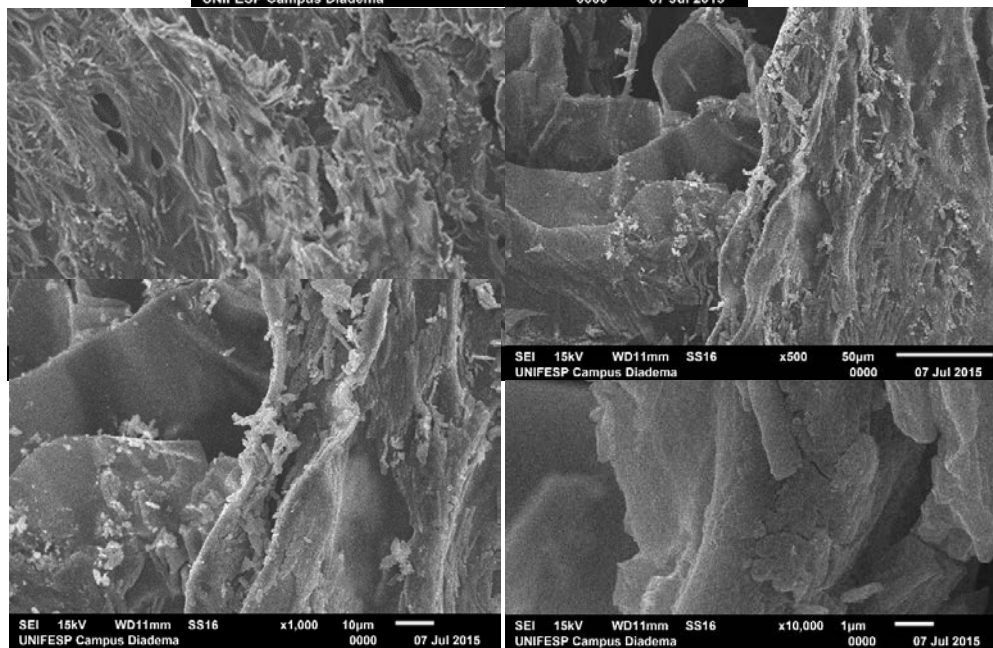
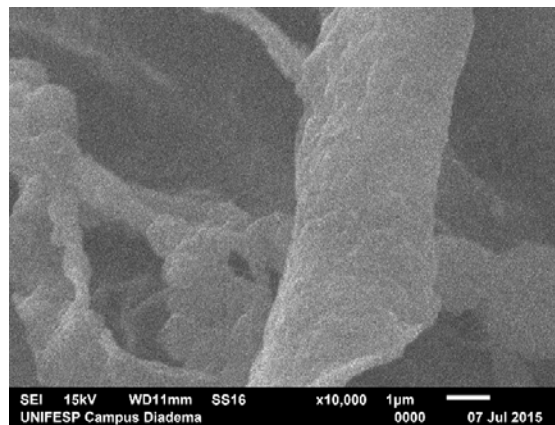


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura dos scaffolds CONTROLE e TPP, x250, x500, x1000 e x10000.

A figura 3 mostra o espectro FT-IR dos arcabouços de quitosana e daqueles reticulados com tripolifosfato de sódio.

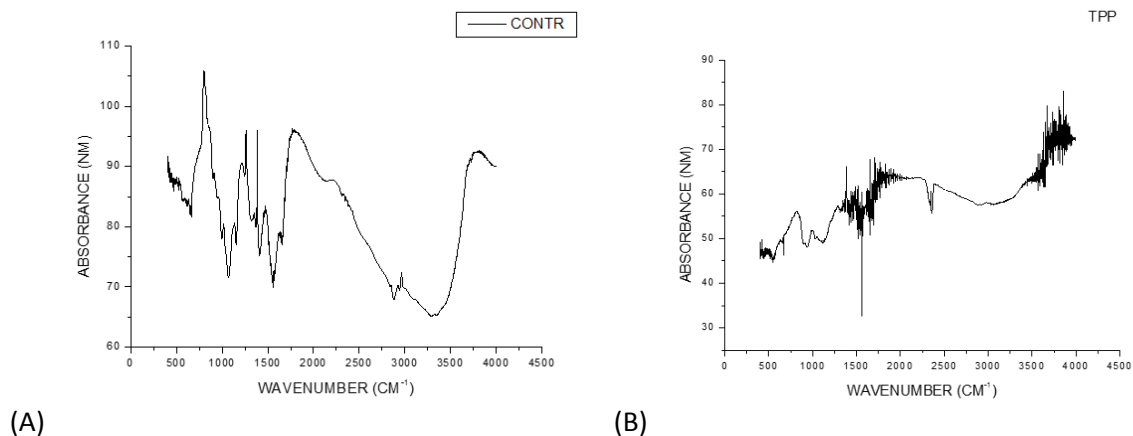


Figura 3: Espectro FT-IR das amostras (A) CONTROLE e (B) TPP.

As duas amostras apresentam picos por volta de 905, 1030 e 1170 cm^{-1} , que indica a glicosamina presente. O pico largo entre 3200 e 3450 cm^{-1} , aproximadamente, é condizente com a sobreposição do estiramento das ligações de hidrogênio do O-H, estiramento assimétrico do NH_2 e o estiramento NH envolvendo ligações de hidrogênio. Esse largo pico é mais bem visualizado na amostra com apenas quitosana. Na figura 3 (A), são apontadas as bandas de CONTROLE, incluindo a banda característica em torno de 1650 cm^{-1} que corresponde ao estiramento da amida C=O (amida I) e outra em torno de 1550 cm^{-1} que corresponde a deformações N-H de uma amida primária (amida II). A banda na faixa dos 1400 cm^{-1} indica que a quitosana não é 100% desacetilada, já que é C-H de um grupo metil ($-\text{CH}_3$) da acetamida. Em 1100 cm^{-1} , aproximadamente, tem-se a indicação de um estiramento C-O de um álcool primário. O pico que se aproxima de 2870 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-H. Na figura 3 (B) são apresentadas as bandas de TPP. O pico em 1650 cm^{-1} desaparece, o que pode ser atribuído à ligação entre os

íons fosfóricos e amônios e ligações de hidrogênio, e dois novos surgem em torno de 1640 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} . Em 1100 cm^{-1} existe um pico associado a $\text{P}=\text{O}$. Por volta de 1330 cm^{-1} , tem-se a evidência das ligações iônicas entre TPP e quitosana. Bhumkar & Pokharkar (2006), Pati et al. (2011), Tsai & Wang (2008) e Rahman et al. (2013) observaram resultados semelhantes em seus trabalhos.

4. Conclusão

Os curativos de Quitosana reticulados com TPP mostram-se hábeis para a utilização na engenharia de tecidos devido às suas características de maleabilidade, aderência à pele e sua ação antimicrobiana. Os resultados aparentam ser promissores. Como analisado, a citotoxicidade independe da concentração do reticulante TPP. Para conclusões futuras, os ciclos de lavagem serão aumentados, visando o melhoramento nos resultados da citotoxicidade e, conseqüentemente, na viabilidade celular.

5. Agradecimentos

Agradeço aos meus amigos e parceiros de laboratório Fúlvio Gabriel, Raquel, Julia Vaz e Julia Florez que sempre estiveram ao meu lado, ajudando e contribuindo para a composição do projeto em questão. E à todos que direta, ou indiretamente, colaboraram para a elaboração deste trabalho.

6. Referências

- 1- ALIZADEH, M., ABBASI, F., KHOSHFETRAT, A.B., GHALEH, H., Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitonsan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method. *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 3958-3967.
- 2- BHUMKAR, D., POKHARKAR V. B. Studies on Effect of pH on Crosslinking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech* 7.2 (2006) E138-E143
- 3- FREITAS, P.A.B.; BARBOSA, R.C.; GONZAGA, H.G.; CARDOSO, M.J.B.; FOOK, M.V.L. Estudo Físico-Químico e Térmico de Blendas Quitosana-Aloe Vera. 7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2012.
- 4- JIANKANG, H., DICHEN, L., YAXIONG, L., BO, Y., HANXIANG, Z., QIN, L., BINGHENG, L., YI, L., Preparation of chitosan–gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 453–46.

- 5- METCALFE, A.D., FERGUSON, M.W.J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J. R. Soc. Interface*, v. 4, p. 413–437, 2007.
- 6- NEREM, R.M. Tissue Engineering: The Hope, the Hype, and the Future. *Tissue Eng.* v. 12, n. 5, 2006.
- 7- OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals 432: In vitro e 3T3 NRU phototoxicity test, abr. 2004.
- 8- OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance monitoring, n.1, jan. 1998.
- 9- PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S. Development of chitosan tripolyphosphate fibers through pH dependent ionotropic gelation. *Carbohydrate Research* 346 (2011) 2582–2588.
- 10- RAHMAN, M. M., PERVEZ, S., NESA, B., KHAN, M. A. Preparation and characterization of porous scaffold composite films by blending chitosan and gelatin solutions for skin tissue engineering. *Polymer International* 61 (1) (2013) 79-86
- 11- SADER, M.S., FERREIRA, M., DIAS, M.L. Preparação e Caracterização de Estruturas Porosas de Poli(3-hidroxi-butarato). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 16, nº 1, p. 12-18, 2006.
- 12- SÉBASTIEN, F.; STÉPHANE, G.; COPINET, A.; COMA, V., Novel biodegradable films made from chitosan and poly(lactic acid) with antifungal properties against mycotoxinogen strains. *Carbohydrate Polymers*, 65, (2006) 185–193.
- 13- SEOL, Y., LEE, J., PARK, Y., LEE, Y., KU, Y., RHYU, I., LEE, S., HAN, S., CHUNG, C. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation, *Biotechnology Letters*, Volume 26, Issue 13 (2004) 1037- 1041.
- 14- TSAI, H., WANG, Y. Properties of hydrophilic chitosan network membranes by introducing binary crosslink agents. *Polymer Bulletin* 60 (2008) 103-113.
- 15- YANNAS, Y.; BURKE, J.F. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J. Biomat. Res.*, v. 14, p. 65-81, 1980.
- 16- MONTANHA, V. C. Preparação e caracterização de micropartículas de colágeno ou fibroína como suporte para células-tronco. Dissertação (mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (2012)

DIRECT AND INDIRECT CYTOTOXICITY ASSESSMENT OF CHITOSAN BIODRESSING NANOSTRUCTURED WITH TRIPOLYPHOSPHATE

G.G. Pessoa¹; J.M. Florez¹; M.B. Mathor²; C.F. da Silva¹; P.S. Lopes¹

¹ University of São Paulo, UNIFESP, Diadema-SP, Brazil

² Institute of Energy and Nuclear Research, IPEN / CNEN-SP, Brazil

Email: gabriela.glinglani@gmail.com

ABSTRACT

The development of dressings made of biocompatible materials, biodegradable and bioactive, have shown great potential in tissue bioengineering. Chitosan is a biomaterial with diverse biological properties that allows the development of a biodressings with satisfactory qualities. Due to the abundance, easy to obtain and antimicrobial activity, we used the crosslinked chitosan with sodium tripolyphosphate (TPP - Na₅P₃O₁₀), non-toxic component that offers resistance by ionic interactions between the compounds. The study aimed to evaluate a dressing with the auxiliary function in the repair and regeneration skin. Studies were performed with SEM, FT-IR and direct and indirect cytotoxicity. For the direct and indirect cytotoxicity each sample was cut and sterilized by exposure to UV lamp laminar flow for 15 minutes on each side. Then, for the indirect cytotoxicity, samples were separately placed into sterile tubes for extraction of possible toxic substances in dressings. Extracts were filtered, diluted and added to Balb fibroblasts / c 3T3 cells (20,000 cells / well) in 96 well microtiter plates, eight different dilutions and after 24h was determined by cytotoxicity using the method of Neutral Red (NR) in 540 nm. For the direct method, the dressings were placed in 24-well plates, where 25,000 cells were added and after incubation, they were also evaluated using NR. Cells were evaluated and there was significant loss of viability as the extract concentration increased. For control samples, there was no significant variation. This result is supported by the notable difference that the crosslinking gave structures. Some granular compositions were observed in micrographs of the crosslinked sample. It is believed that these granules are excessive cross-linking agent, which affects the cytotoxicity of scaffolds. The FTIR analysis showed that found with the peak around 1330 cm⁻¹, there is evidence of ionic bonds between chitosan and TPP. The results presented indicate the continuation of studies using low concentrations of crosslinking agent in order to reduce the cytotoxicity presented and improved biodressings characteristics.

Keywords: cytotoxicity, chitosan, sodium tripolyphosphate, biodressings