



INCORPORAÇÃO DE β -SITOSTEROL EM *SCAFFOLD* BICAMADA CONSTITUÍDO DE POLICAPROLACTONA E QUITOSANA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEAS GUIADA PELO PERIÓSTEO

Shádia Abou Zeenni, Renata Francielle Bombaldi de Souza e Ângela Maria Moraes

Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos, Faculdade de Engenharia Química (FEQ/UNICAMP)

1. INTRODUÇÃO

O perióstio é um importante constituinte do tecido ósseo. Trata-se de uma membrana vascularizada e densa que envolve a maioria dos ossos, composta de duas camadas (Fan *et al.*, 2010). Quando o tecido ósseo é lesado, o perióstio fornece compostos celular e biológicos essenciais para sua regeneração (Dwek, 2010). Há casos em que a regeneração natural é insuficiente, sendo necessária intervenção cirúrgica, podendo-se utilizar técnicas de transplante de osso ou enxertos (Crha *et al.*, 2009). No entanto, essas abordagens apresentam desvantagens como morbidez da área doadora, disponibilidade limitada, possibilidade de infecção, dor, transmissão de doenças e rejeição pelo sistema imunológico (O'Keefe e Mao, 2011; Rao e Stegemann, 2013).

A engenharia de tecidos (ET) pode contribuir neste sentido, com o desenvolvimento de suportes (ou *scaffolds*) para a regeneração do tecido ósseo e sua integração com aquele já existente (Fan *et al.*, 2010). Apesar dos avanços obtidos, muitos dos *scaffolds* desenvolvidos possuem limitações como: vascularização limitada dos biomateriais, inadequada integração óssea com o tecido já existente, susceptibilidade a infecções, degradação e reabsorção em taxas diferentes daquela de formação do novo tecido ósseo, baixa resistência mecânica e porosidade inadequada para a proliferação celular (Yang *et al.*, 2001).

Para se obter melhores resultados, uma alternativa é o desenvolvimento de biomateriais que mimetizam o perióstio. Estes biomateriais são desenvolvidos na forma de membranas e possuem a capacidade de melhorar significativamente a regeneração óssea em lesões consideradas graves (Tejeda-Montes *et al.*, 2014). Dentre os polímeros comumente empregados na área de ET destacam-se a poli(caprolactona) (PCL), polímero sintético, degradável, hidrofóbico aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, e a quitosana, polissacarídeo biodegradável e biocompatível com estrutura química que mimetiza a de glicosaminoglicanos normalmente encontrados na matriz

extracelular. Adicionalmente, pode-se incorporar nestes biomateriais agentes bioativos, como por exemplo o β -sitosterol, um fitoesterol presente no extrato de *Aloe vera*, agente com atividade pró-angiogênica (capaz de estimular a formação de novos vasos sanguíneos) anti-inflamatória; bactericida e fungicida (Majewska e Gendaszewska-Damarch, 2011).

Este trabalho de iniciação científica teve por objetivo o desenvolvimento de materiais em dupla camada constituídos de PCL e quitosana pelo uso da técnica de moldagem, e a incorporação do β -sitosterol na camada constituída pelo polímero sintético. Com isso, teve-se por meta obter dispositivos porosos com potencial pró-angiogênico, anti-inflamatório e antimicrobiano para o uso como *scaffolds* bioativos no tratamento de lesões ósseas, visando a substituição do tecido periosteal afetado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os *scaffolds* foram produzidos pela técnica de moldagem por evaporação de solvente. Para a camada de PCL, 30 mL de solução de PCL 5% (m/v) em clorofórmio foi preparada em capela com auxílio de um agitador magnético (200rpm). Após a completa dissolução do polímero foram adicionadas partículas de cloreto de sódio (60% m/v), então a suspensão foi vertida em placa de Petri de vidro (12 cm de diâmetro) e permaneceu em capela de exaustão de gases até a evaporação total do solvente. A membrana resultante foi lavada em água deionizada enquanto imersa em banho ultrassônico para a remoção do sal. Quando desejado, membranas densas de PCL contendo β -sitosterol foram preparadas pela adição direta deste composto ao clorofórmio nas concentrações de 5% e 10% (m/m). As demais etapas foram realizadas similarmente. Em seguida, cerca de 33 mL de uma solução de quitosana (3% m/v em solução aquosa de ácido acético) foram depositados sobre a membrana e de PCL e o conjunto foi levado para à estufa para evaporação de solvente por 24h a 37°C. Em seguida o biomaterial foi neutralizado com 200 mL de NaOH 1 mol/L e lavado com 250 mL de água deionizada. A secagem foi realizada na temperatura ambiente.

A caracterização dos *scaffolds* foi feita pela análise do aspecto visual, da morfologia, da rugosidade, da espessura e das propriedades mecânicas, avaliando-se também a capacidade dos mesmos de absorver soluções aquosas e de se manter estáveis nas mesmas. A morfologia das membranas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura após recobrimento das amostras com uma fina camada de ouro. A rugosidade foi mensurada com base nos parâmetros Ra (média aritmética da altura) e Rq (raiz quadrada da média da rugosidade), utilizando-se *cutoff* de 0,8 mm e comprimento total de 5 mm, em diferentes posições ao longo da extensão de cada *scaffold*. A espessura de amostras seca e umedecidas por imersão em água destilada por no mínimo 10 minutos foi medida em seis posições ao longo da extensão de cada *scaffold*.

As propriedades mecânicas foram analisadas com base no método ASTM D882-95A para *scaffolds* de 2,5 cm x 8 cm previamente intumescidos em 20 ml de água por uma hora. Os corpos de prova tiveram sua espessura medida e foram fixados por garras pneumáticas distantes 5,0 cm entre si, uma das quais foi afastada a uma velocidade de 0,1 cm/s empregando-se uma célula de carga de 5,098 kgf. A resistência à tração e o alongamento na ruptura foram calculados.

A determinação da capacidade de absorção (após 24 hrs) e perda de massa (após 7 dias) foi realizada por análise gravimétrica de membranas incubadas com água ou tampão fosfato salino (PBS).

Para a análise da liberação do β -sitosterol, as amostras (2 x 1 cm²) foram inseridas, em duplicata, em frascos do tipo Falcon (50 mL) contendo 25 ml de etanol, água deionizada, PBS, PBS/etanol (80/20) e PBS/Tween (0,2%). Após 72 horas, as membranas foram removidas dos frascos, lavadas com água deionizada e transferidas para frascos contendo 25 ml de etanol, onde permaneceram por 4 h, para extrair o composto remanescente na membrana. A concentração do fitoesterol nas amostras alcoólicas foi determinada por espectrofotometria de absorção de luz a 208 nm e a quantidade de material liberado nos demais solventes foi calculada pela diferença com relação à concentração inicial.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfologia das membranas obtidas é mostrada na Figura 1.

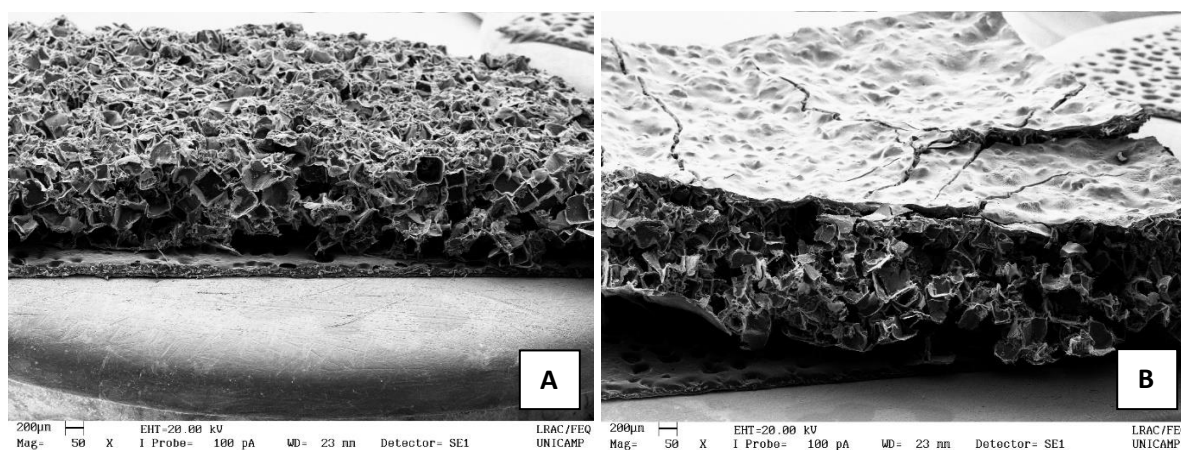


Figura 1: Morfologia da seção transversal das membranas de PCL (A) e Ch/PCL (B).

É possível observar na Figura 1 que a morfologia da membrana de PCL resulta da adição de NaCl ao material que, após ser lixiviado, gera poros de geometria correspondente à da partícula de sal. Esta camada altamente porosa possibilita que a permeação de meio nutriente e vascularização da região tratada, assemelhando-se à camada externa do perióstio. Já a membrana de quitosana apresenta-se fina e densa, assemelhando-se a camada interna do perióstio, representando a interface entre a camada externa e o osso.

A adição de quitosana na membrana resultou em um aumento médio de 0,3 mm da espessura da membrana seca, porém um menor aumento, em torno de 0,1 mm, na membrana úmida, resultando em um valor máximo de cerca de 1,7 mm de espessura total. Devido a isso, os *scaffolds* seriam mais apropriados para aplicação em ossos nasais, porém como o material pode sofrer compressão durante seu uso e se degrada no organismo, é possível aplicá-lo em ossos longos e no periósteo alveolar. Caso seja interessante reduzir ainda mais a espessura, pode-se depositar menor quantidade de material por área na placa de Petri.

Os parâmetros de rugosidade diminuíram mais de 12,5 μm com a adição de quitosana, apresentando um mínimo de 8,25 μm Ra e 9,14 μm Rq, o que evidencia que esta camada apresenta menos irregularidades. Como consequência disso, temos um aumento da resistência mecânica à deformação em mais de 100% em relação à membrana de PCL, com valor máximo de 263kPa na de quitosana frente a 140kPa na de PCL. Porém, devido ao fato do filme de quitosana se deformar menos em relação ao de PCL, observa-se uma diminuição em mais de 50% no alongamento na ruptura, apresentando um máximo de 22,5% frente a 49,5%. Já com relação a absorção de líquidos, não é observada diferença estatística entre as membranas com e sem quitosana, o que evidencia que a maior parte do líquido é retida nos poros da camada de PCL.

A adição de β -sitosterol na membrana de PCL resulta em um aspecto opaco e esbranquiçado desta; quanto maior a porcentagem deste composto, mais notável o efeito. Além disso, como observado na Figura 2, a concentração remanescente em etanol é a menor, o que já era esperado, visto que o composto é hidrofóbico e solúvel em etanol. Como não há diferença estatística entre a liberação do composto nos demais meios aquosos testados, seria possível definir o PBS como o meio de liberação para ensaios futuros, dado que a liberação neste meio, que melhor representa o meio fisiológico em comparação aos demais, foi de cerca de 7% no período estudado.

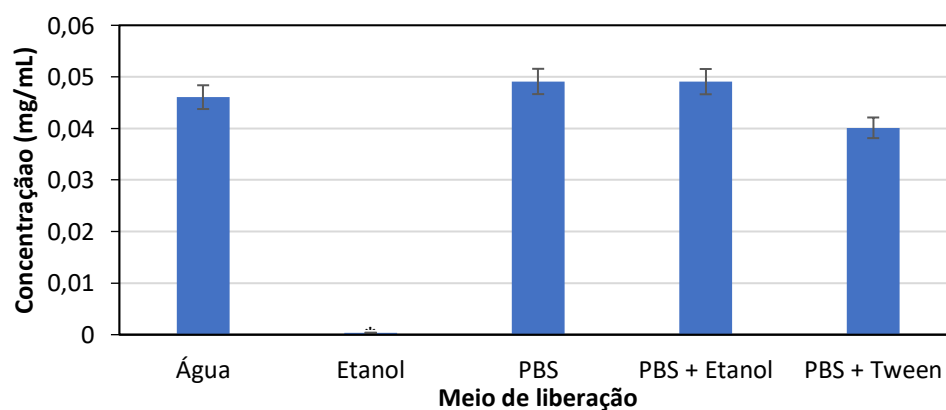


Figura 2: Concentração remanescente nos *scaffolds* PCL com 5% de β -sitosterol.

4. CONCLUSÃO

Os *scaffolds* apresentaram valores adequados de rugosidade, espessura e intumescimento, porém baixos valores de resistência mecânica. Ainda se faz necessária a realização da análise de parâmetros de caracterização da membrana, tais como morfologia, tamanho de fibras e de poros e porosidade.

A incorporação do β -sitosterol se deu de maneira satisfatória na membrana de PCL, acrescentando-lhe coloração esbranquiçada e opacidade. Já a sua liberação em diferentes meios resultou em menor concentração residual em meio etanólico, como previsto. Nos demais meios de liberação, foram observados valores semelhantes entre si indicando-se, portanto, o PBS como meio de liberação para ensaios futuros, já que este melhor representaria o meio fisiológico. É necessário realizar testes de liberação em membranas com 10% de β -sitosterol, para definir qual é a concentração mais adequada para dar continuidade ao projeto.

5. REFERÊNCIAS

- ASTM, ASTM D882-95A: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, Annu. B. ASTM Stand, 2012.
- Crha, M.; Nečas, A.; Srnec, R.; Janovec, J.; Stehlík, L.; Raušer, P.; Urbanová, L.; Plánka, L.; Jančář, J.; Amler, E. Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue Regeneration and Application to Bone Healing. *Acta Veterinaria Brno*, v. 78, p. 635-642, 2009.
- Dwek, J. R. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radiol*, v. 39, p. 319-323, 2010.
- Fan, W.; Crawford, R.; Xiao, Y. Enhancing in vivo vascularized bone formation by cobalt chloride-treated bone marrow stromal cells in a tissue engineered periosteum model. *Biomaterials*, v. 31, p. 3580-3589, 2010.
- Majewska, I.; Gendaszewska-Darmach, E. Proangiogenic activity of plant extracts in accelerating wound healing — a new face of old phytomedicines. *Acta Biochimica Polonica*, v. 58, p. 449-460, 2011.
- O'Keefe, R. J.; Mao, J. Bone Tissue Engineering and Regeneration: From Discovery to the Clinic - An Overview. *Tissue engineering part B: reviews*, v. 17, n. 6, p. 389-392, 2011.
- Rao, R. R.; Stegemann, J. P. Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytotherapy*, v. 15, p. 1309-1322, 2013.
- Tejeda-Montes, E.; Smith, K. H.; Rebollo, E.; Gómez, R.; Alonso, M.; Rodrigues-Cabello, J. C.; Engel, E.; Mata, A. Bioactive membranes for bone regeneration applications: Effect of physical and biomolecular signals on mesenchymal stem cell behavior. *Acta Biomaterialia Journal*, v. 10, p. 134-141, 2014.
- Yang, S.; Leong, K.; Du, Z.; Chua, C. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering*, v. 7, n. 6, p. 679-689, 2001.

Agradecimentos

As autoras agradecem às agências de fomento CAPES (código de financiamento 001) e ao CNPq (processos #307829/2018-9 e #452446/2019-8).