



PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS DE NANOCELULOSE E QUITOSANA PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

VIEIRA, S. R.¹; MIGUEL, I. R. J. B.¹; GALVÁN, K. L. P.²; MIGUEL, F. B.³; EBINUMA, V. C. S.⁴; CARDOSO, L.G.^{1,5}; SOUZA, C. O.⁶; RIGO, E. C. S.⁷; SILVA, J. B. A.^{1,8}; ASSIS, D. J.^{1,5}

¹ Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPEQ), Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia (UFBA), 40210-630, Salvador, Bahia, Brasil. suelleneng.alimentos@hotmail.com; izamir.resende.junior@gmail.com

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-Rede de Biotecnologia do Nordeste (RENORBIO), Universidade Federal da Bahia (UFBA), 40231-300, Salvador, Bahia, Brasil. pedrazagalvankarina@gmail.com

³ Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia (UFBA), 40110-902, Salvador, Bahia, Brasil fulviomiguel@yahoo.com.br

⁴ Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP 14800-903, Brasil. valeria.ebinuma@unesp.br

⁵ Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Salvador (UNIFACS), 41820-021, Salvador, Bahia, Brasil. guimaraes.lucas@animaeducacao.com.br; denilson.assis@unifacs.br

⁶ Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PGAl) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), 40110-100, Salvador, Bahia, Brasil e Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), 40110-100, Salvador, Bahia, Brasil. carolods@ufba.br

⁷ Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 13635-970, Pirassununga, São Paulo, Brasil. eliana.rigo@usp.br

⁸ Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. janiabetania@ufrb.edu.br

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar *scaffolds* à base de nanocelulose (NCs) e quitosana (CS), especialmente destinadas à regeneração óssea. As NCs foram obtidas por hidrólise da polpa de celulose com ácido sulfúrico (H₂SO₄ - 45%). Em seguida, os *scaffolds* foram preparados a partir da esterilização e posterior liofilização de uma formulação compostas por NC e CS (10% v/v), e outra composta por 100% de NCs. As amostras foram analisadas por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As micrografias obtidas, evidenciaram a formação de uma topografia esponjosa, altamente porosa, com distribuição de tamanho de poros na faixa de 0,7 a 22,6 µm para os *scaffolds* produzidos com NCs, e de 13,5 a 199,6 µm para os com NCs e CS. Os nanomateriais preparados apresentaram características desejadas para a aplicação pretendida, uma vez que pode favorecer a migração de diferentes células relacionadas ao processo de regeneração tecidual e, assim, responsáveis pelo desenvolvimento de um novo tecido ósseo.

Palavras-chave: Biomaterial, *scaffolds*, tecido ósseo, poros, regeneração.

INTRODUÇÃO

Biomateriais são substâncias, sintéticas ou naturais, desenvolvidas para tratar, substituir ou melhorar tecidos, órgãos ou funções do corpo, com o objetivo de manter ou melhorar a qualidade de vida dos pacientes [1].

Nos últimos anos, a busca por novos biomateriais tem ganhado notoriedade na medicina regenerativa, especialmente no desenvolvimento de *scaffolds* aplicáveis em terapias de regeneração tecidual óssea. Vale salientar que estes produtos precisam ser idealizados de acordo com as aplicações de interesse, ou seja, de forma a atender os requisitos biológicos, mecânicos e estruturais para executar adequadamente a função desejada com um desempenho biológico satisfatório [2].

Na engenharia de tecidos (ET), os polímeros de origem natural são mais utilizados devido a um conjunto de propriedades superiores aos sintéticos, como biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, biodegradabilidade ajustável para promoção o crescimento de novos tecidos. Na produção de *scaffolds* para engenharia tecidual, destaca-se a utilização polissacarídeos – por exemplo, quitina, quitosana,

celulose, amido, alginato e derivados do ácido hialurônico -, proteínas - por exemplo, colágeno, gelatina, seda, géis de fibrina e soja, e biofibras como a lignocelulose [3,4].

Vale ressaltar que a porosidade, a resistência mecânica e suporte a incorporação e liberação de aditivos, podem ser ajustadas por meio da variação da concentração do polímero e das condições de fabricação, o que, por sua vez, possibilita a obtenção de estruturas com características favoráveis a adesão de células relacionadas ao processo de regeneração tecidual óssea. No entanto, as limitações encontradas referem-se a dificuldade no controle da taxa de degradação e baixa estabilidade mecânica inerente aos biopolímeros [3,4,5].

Na ET, os polímeros naturais mais utilizados são quitosana (CS), celulose, seda, alginato e ácido hialurônico [6]. A quitosana e a celulose se destacam pela abundância, custo acessível e propriedades físico-químicas singulares.

A quitosana (CS) é um biopolímero especialmente atraente para aplicações em regeneração óssea devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, além de exibir propriedades antibacterianas e hemostáticas, por exemplo. Se, por um lado, a baixa resistência mecânica da molécula limita seu uso em aplicações que carecem da entrega e liberação controlada de fármacos [7], por outro lado, as características físico-química da superfície deste biopolímero possibilita a fixação e proliferação de células primordiais do processo de regeneração tecidual óssea. Estudos revelam que *scaffolds* formados por CS modificada favorecem a osteocondutividade em defeitos ósseos [5,8], porém, devido as propriedades reológicas limitadas e o por exibir um extenso inchaço na água, estas características restringem seu uso em aplicações biomédicas que necessitam de suporte de carga [9].

Nesse sentido, a CS e celulose são usadas para obtenção de compósitos aplicáveis a regeneração óssea, nos quais, para superar as limitações anteriormente apresentada, são incorporados celulose em escala nanométrica para viabilizar a melhoria das propriedades mecânicas, para que os *scaffolds* apresentem melhor desempenho durante o processo de regeneração tecidual. O desenvolvimento de compósitos de CS e nanocelulose (NCs) no formato de *scaffolds*, viabilizam a obtenção de um biomaterial tanto com um design biomimético, com interconexões físicas que facilitam a infiltração e proliferação celular, com a perspectiva de funcionalidade adequada para permitir a regeneração tecidual desejada [10]. No entanto, este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar *scaffolds* à base de NCs e CS, especialmente destinadas à regeneração óssea.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

As nanocelulose (NCs), foram produzidas e obtidas pelo mesmo grupo de pesquisa [11]. A quitosana (CS) de baixo peso molecular (50.000 a 190.000 daltons) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

Métodos

Preparação dos compósitos

As NCs foram obtidas por hidrólise da polpa de celulose com ácido sulfúrico (H_2SO_4 - 45%) [11]. Os compósitos de CS e NC, foram preparados utilizando o método, que consiste no congelamento e liofilização [12]. Inicialmente preparou-se uma solução de CS onde, 2% (m/v) de CS purificada foi dissolvida em ácido acético a 1% (v/v) e agitadas em uma placa magnética a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por 24 horas. Em seguida, os compósitos foram preparados em tubos de vidro com 1,2 cm de diâmetro para obtenção de um bloco 3D. Uma alíquota de 1mL da dispersão de NCs na concentração de 0,0092g/10mL foram misturadas na solução de CS na concentração de 10,0 % (v/v). As dispersões foram submetidas a esterilização na autoclave a 111°C por 15 min. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em banho ultrassônico por 10 min, congeladas (-40°C por 24 horas) e liofilizadas (-42°C por 48 horas). Os compósitos foram caracterizados quanto ao FTIR e MEV.

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para a obtenção do espectro de absorção dos compósitos, utilizou-se um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (IRPrestige -21, Shimadzu, Kuoto, JP), na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} .

Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Para investigação da morfologia e da porosidade superficial dos *scaffolds* foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (JSM-6610LV, JEOL, Tokyo, JP), operando em 1,00 kV. Para evitar o carregamento das amostras, as mesmas foram revestidas com ouro.

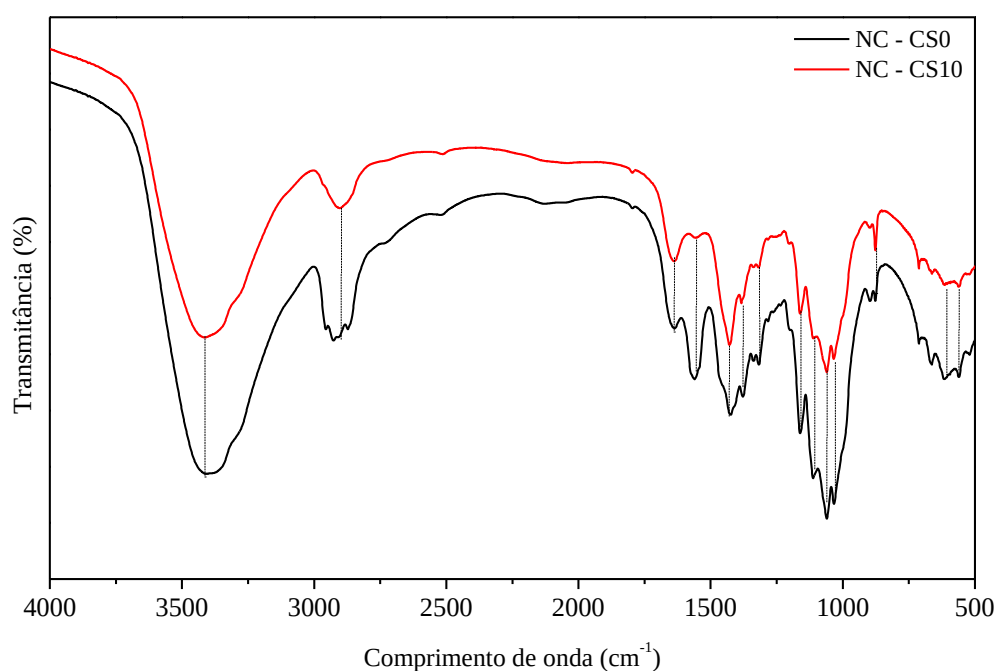
Distribuição de tamanho dos poros

A avaliação da distribuição e tamanho de poros ao longo dos scaffolds foi realizada pelo software *Image J*. No qual foram realizadas 100 medidas de forma aleatória ao longo das micrografias obtidas por MEV, a fim de determinar a distribuição e o diâmetro de poros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os espectros obtidos dos scaffolds de NCs (NC-CS0) e NCs com 10% (v/v) de CS (NC-CS10). Os espectros das amostras apresentaram similaridade, o que, de fato, sugere a mesma base estrutural para as composições estudadas.

Figura 1. Espectro de FTIR dos scaffolds de nanocelulose (NC-CS0) e nanocelulose com 10% de quitosana (NC-CS10)



Os scaffolds produzidos, apresentaram banda característica de absorção na região de 3559 a 3194 cm^{-1} , sendo atribuída ao alongamento das vibrações de O-H dos grupos OH [13,14,15]. A banda de absorção em 2913 cm^{-1} refere-se às vibrações de alongamento de C-H dos grupos CH_2 e CH_3 [11,14,15]. Em 1643 cm^{-1} , a banda é referente a flexão de O-H da absorção de água do polímero [14,16], em 1423 cm^{-1} são as deformações angulares e simétricas de grupos de metileno e 1374 cm^{-1} é a flexão

de C-H. A banda 1160 cm^{-1} é referente à vibração do grupo C-OH, a absorção em 1056 e 898 cm^{-1} consiste nas vibrações dos anéis presentes na celulose e 612 cm^{-1} é referente as ligações glicosídicas entre as unidades de glicose [13,17]. No espectro NC-CS10 pode-se detectar uma diminuição na intensidade da banda de deformação N-H de aminas (1560 cm^{-1}), também a permanência dos grupos C-O e C-H da celulose. Assim, o espectro comprova a forte interação entre os grupos sulfato das NCs e os grupos amino da CS [18].

Na Figura 2 está apresentada as imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos *scaffolds* produzidos (NC-CS0 e NC-CS10). Nota-se que em ambos, ocorreu a formação de poros, provavelmente durante o processo de evaporação do solvente na fase de liofilização, foi eficiente para gerar uma rede de percolação com estrutura porosa. Usualmente, esses *scaffolds* devem apresentar alta porosidade, tamanho de poro adequado, que possibilitam a inserção de fatores de crescimento e que mimetizam as características da matriz extracelular e facilitam a regeneração de vários tecidos, tornando um grande potencial para aplicações na ET, principalmente para células ósseas [5].

Figura 2. Micrografias dos *scaffolds* produzidos com nanocelulose (NC-CS0) (A) e nanocelulose com 10% (v/v) de quitosana (NC-CS10) (B).

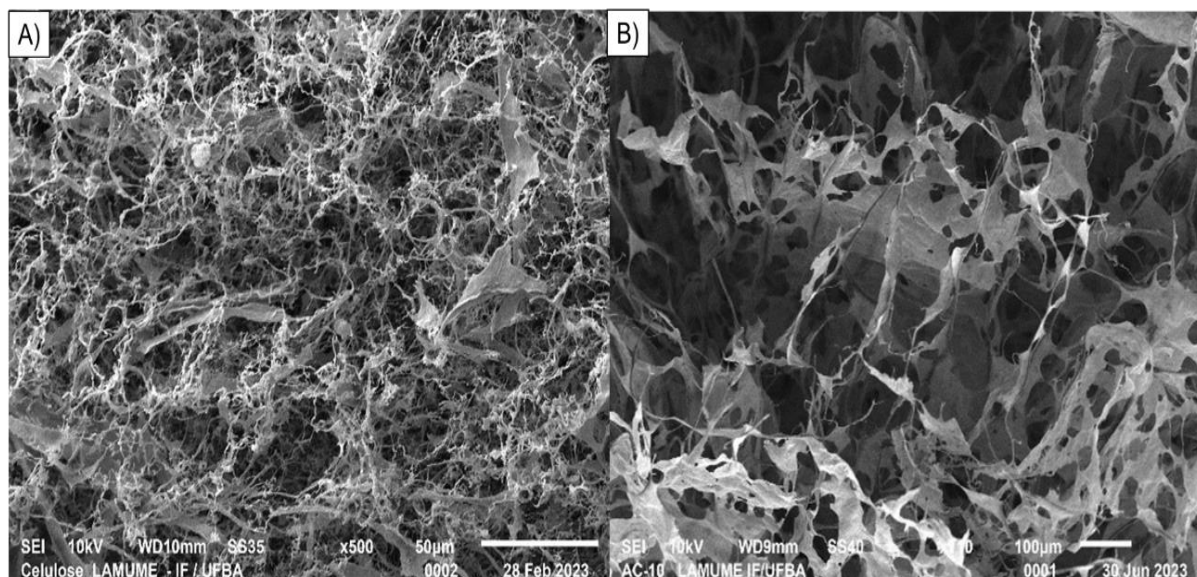
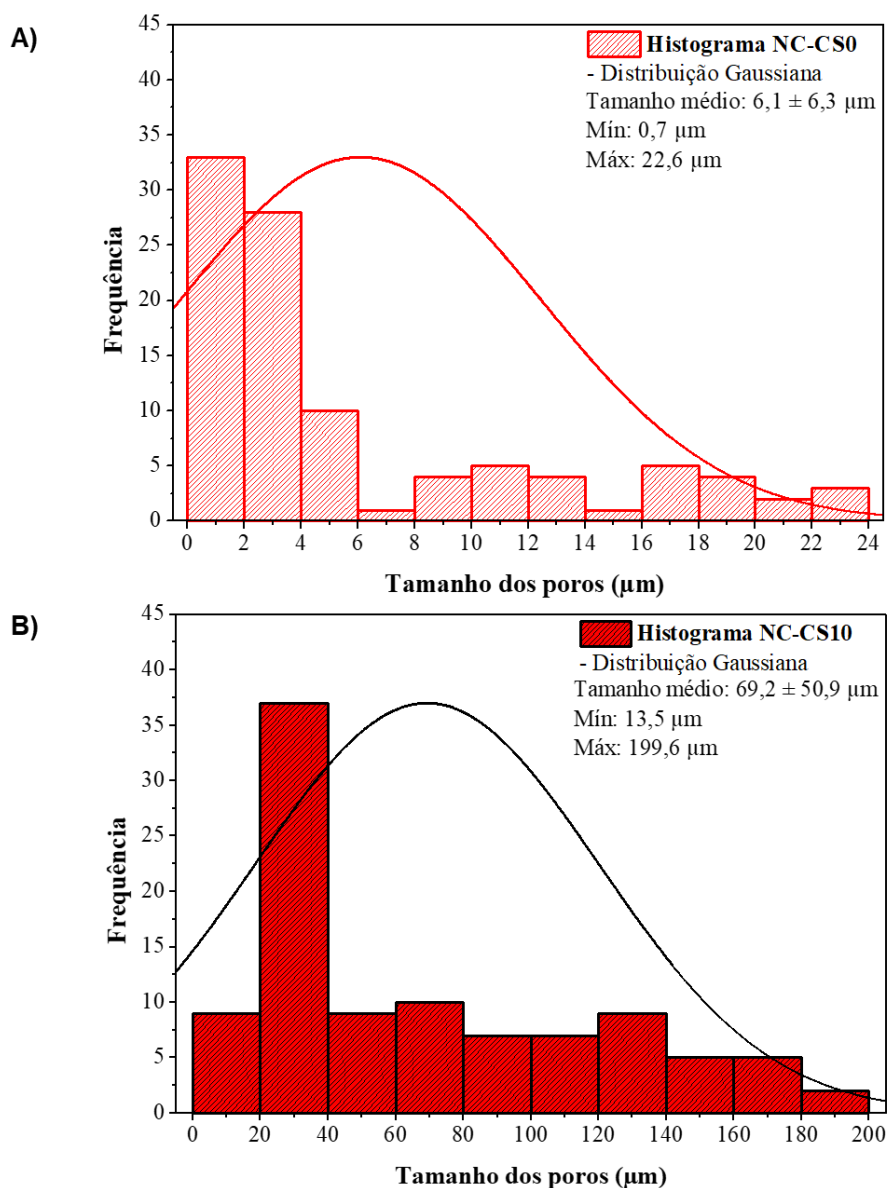


Figura 3. Histograma da distribuição de tamanho dos poros do *scaffold* obtido com nanocelulose (NC-CS0) (A) e nanocelulose com 10% (v/v) de quitosana (NC-CS10) (B).



A amostra NC-CS0 apresentaram tamanho dos poros de $0,7 \mu\text{m}$ a $22,6 \mu\text{m}$ (Figura 2-A). Já as NC-CS10 apresentaram tamanho na faixa de $13,5 \mu\text{m}$ a $199,6 \mu\text{m}$ (Figura 2-B). Mostrando que a micrografia do *scaffold* NC-CS10 foi melhorada com a incorporação de 10% (v/v) de CS, atribuindo esses resultados a boa dispersão na matriz. Além disso, a incorporação da CS proporcionou a formação de poros maiores e com diferentes tamanhos (Figura 3-B). Dessa forma, é válido ressaltar que a existência de poros na faixa de $40 - 100 \mu\text{m}$ possibilitam a migração de células e formação de tecido osteóide não mineralizado, já poros na faixa de $150 - 300 \mu\text{m}$ oferecem um microambiente que viabiliza a formação de um novo tecido ósseo

[20,21]. Portanto, scaffolds com uma variação de porosidade são biomateriais com características ideais para propiciar a ocorrência dos eventos celulares relacionados ao processo de regeneração tecidual óssea.

CONCLUSÃO

A obtenção de compósitos baseados em NCs e CS por meio da técnica utilizada, revelou-se um método eficaz e eficiente para o desenvolvimento de arcabouços que conciliam tanto as propriedades físicas-químicas atraentes destes polímeros utilizados, como também, a formação de *scaffolds* com porosidade adequada para oportunizar a adesão, migração e proliferação de células. Deste modo, estes biomateriais porosos apresentam grande potencial para aplicação na regeneração tecidual, especialmente na formação de um novo tecido ósseo.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a CAPES pelo financiamento do projeto (nº 88887.699278/2022-00) a indústria Bahiapulp – Bahia, ao grupo de pesquisa Bioppul pelas doações e ao Laboratório multiusuário de microscopia da UFBA (LAMUME) pelas análises de microscopia.

REFERÊNCIAS

1. Grand View Research. **World market for biomaterials**, 2022. Disponível em: [Grandviewresearch.com/press-release/global-biomaterials-Market](https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-biomaterials-Market) [Mordorintelligence.com/industry-reports/biomaterials-market](https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/biomaterials-market). Acessado em outubro de 2022.
2. TORGBO, S.; SUKYAI, P. Biodegradation and thermal stability of bacterial cellulose as biomaterial: The relevance in biomedical applications. **Polymer Degradation and Stability**, v. 179, 109232, 2020.
3. WITTE, T. M.; FRATILA-APACHITEI, L. E.; ZADPOOR, A. A.; PEPPAS, N. A. Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. **Regenerative Biomaterials**, v. 5, n. 4, p. 197–211, 2018.
4. SATHIYAVIMAL, S.; VASANTHARAJ, S.; OSMAR, F. L.; SELVARAJ, R.; BRINDHADEVI, K.; PUGAZHENDHI, A. Natural organic and inorganic–

- hydroxyapatite biopolymer composite for biomedical applications. **Progress in Organic Coatings**, v. 147, 105858, 2020.
5. OKAMOTO, M.; JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering Scaffolds. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1487– 1503, 2013.
 6. GUO, L.; LIANG, Z.; YANG, L.; DU, W.; TANG, H.; LI, C.; QIU, H. The role of natural polymers in bone tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 338, p. 571–582, 2021.
 7. KANWAR, S.; VIJAYAVENKATARAMAN, S. Design of 3D printed scaffolds for bone tissue engineering: A review. **Bioprinting**, v. 24, e00167, 2021.
 8. COJOCARU, F. D.; BALAN, V.; POPA, M. I.; LOBIUC, A.; ANTONIAC, A.; ANTONIAC, I. V.; VERESTIUC, L. Biopolymers – Calcium phosphates composites with inclusions of magnetic nanoparticles for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 612–620, 2019.
 9. MUTUTUVARI, T. M.; HARKINS, A. L.; TRAN, C. D. Facile synthesis, characterization, and antimicrobial activity of cellulose–chitosan–hydroxyapatite composite material: A potential material for bone tissue engineering. **Journal of biomedical materials research**, v. 101, 2013.
 10. HASSAN, M.; DAVE, K.; CHANDRAWATI, R.; DEHGHANI, F.; GOMES, V. G. 3D printing of biopolymer nanocomposites for tissue engineering: Nanomaterials, processing and structure-function relation. **European Polymer Journal**, v. 121, 109340, 2019.
 11. VIEIRA, S. R.; SILVA, J. B. A.; DRUZIAN, J. I.; ASSIS, D. J.; MUSSAGY, C. U.; PEREIRA, J. F. B.; EBINUMA, V. C. S.; LEMOS, P. V. F.; CORREIA, P. R.; FERREIRA, E. S.; SOUZA, C. O. Cellulose Nanoparticles Prepared by Ionic Liquid-Assisted Method Improve the Properties of Bionanocomposite Films. **Journal of Polymers and the Environment**, 2022.
 12. ALMEIDA, R. S. **Compósitos de Quitosana e Hidroxiapatita Nanoestruturada como Biomateriais para o Reparo de Defeito Ósseo Crítico**. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) - Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2018, 62p.

13. DEEPA, B.; ABRAHAM, E.; CORDEIRO, N.; MOZETIC, M.; MATHEW, A. P.; OKSMAN, K.; FARIA, M.; THOMAS, S.; POTHAN, L. A. Utilization of various lignocellulosic biomass for the production of nanocellulose: a comparative study. **Cellulose**, v. 22, n. 2, p. 1075–1090, 2015.
14. LOW, F. W.; SAMSUDIN, N. A.; YUSOFF, Y.; TAN, X. Y.; LAI, C. W.; AMIN, N.; TIONG, S. K. Hydrolytic Cleavage of Glycosidic Bonds for Cellulose Nanoparticles (CNPs) Production by BmimHSO₄ Ionic Liquid Catalyst. **Thermochimica Acta**, v. 684, 178484, 2020.
15. TAHERI, P.; JAHANMARDI, R.; KOOSHA, M.; ABDI, S. Physical, mechanical and wound healing properties of chitosan/gelatin blend films containing tannic acid and/or bacterial nanocellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 421–432, 2020.
16. MAN, Z.; MUHAMMAD, N.; SARWONO, A.; BUSTAM, M. A.; VIGNESH KUMAR, M.; RAFIQ, S. Preparation of Cellulose Nanocrystals Using an Ionic Liquid. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 19, n. 3, p. 726–731, 2011.
17. GONÇALVES, A. P.; OLIVEIRA, E.; MATTEDI, S.; JOSÉ, N. M. Separation of cellulose nanowhiskers from microcrystalline cellulose with an aqueous protic ionic liquid based on ammonium and hydrogensulphate. **Separation and Purification Technology**, v. 196, p. 200–207, 2018.
18. COSTA J.R.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Quimica Nova**, v. 31, n. 6, p.1460-1466, 2008.
19. DOUSTDAR, F.; OLAD, A.; GHORBANI, M. Effect of glutaraldehyde and calcium chloride as different crosslinking agents on the characteristics of chitosan/cellulose nanocrystals scaffold. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 208, p. 912-924, 2022.
20. IVIGLIA, G.; KARGOZAR, S.; BAINO, F. Biomaterials, current strategies, and novel nano-technological approaches for periodontal regeneration. **Journal of functional biomaterials**, v. 10, n. 1, p. 3, 2019.
21. ABBASI, N. et al. Porous scaffolds for bone regeneration. **Journal of science: advanced materials and devices**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2020.

PRODUCTION OF NANOCELLULOSE AND CHITOSAN SCAFFOLDS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

ABSTRACT

This study aimed to produce and characterize scaffolds based on NCs and chitosan, especially designed for bone regeneration. The NCs were obtained by hydrolysis of cellulose pulp with sulfuric acid (H_2SO_4 - 45%). Then, the scaffolds were prepared from the sterilization and subsequent lyophilization of a formulation composed of NC and chitosan (10% w/w), and another composed of 100% NCs. The samples were analyzed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The micrographs obtained showed the formation of a highly porous, spongy topography, with pore size distribution ranging from 0.7 to 22.6 μm for scaffolds produced with NCs, and from 13.5 to 199.6 μm for those with NCs and chitosan. The prepared nanomaterials presented desired characteristics for the intended application, since they can favor the migration of different cells related to the tissue regeneration process and, thus, responsible for the development of new bone tissue.

Keywords: Biomaterial, scaffolds, bone tissue, pores, regeneration.