

## AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE ESPONJA DE COLÁGENO E QUITOSANA

J. S. Crusca\*, A. C. B. Oliveira\*, J. R. Perussi\* \*\* e A. M. G. Plepis\* \*\*

\*Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia - EESC/FMRP/IQSC - USP, São Carlos, Brasil

\*\* Instituto de Química de São Carlos - IQSC - USP, São Carlos, Brasil  
e-mail: jscrusca@hotmail.com

**Resumo.** Este trabalho tem por objetivo desenvolver um material na forma de esponja composta de colágeno e quitosana, com potencial para ser usado como equivalente dérmico. As esponjas foram preparadas em três camadas, externamente de quitosana e internamente de colágeno, liofilizadas e neutralizadas. As esponjas foram analisadas por DSC, MEV, ensaio de absorção em PBS e ensaios de citotoxicidade. As curvas DSC permitiram a obtenção da temperatura de desnaturação do colágeno (61,5°C). Nas fotomicrografias por MEV observou-se a superfície com característica porosa e na secção transversal as três camadas. A absorção em PBS foi rápida no início e atingiu um valor de 1263,5±35,7 em 4 h. Tanto o método de difusão em ágar quanto à atividade metabólica celular mostraram que o material não é citotóxico.

**Palavras-chave:** Colágeno, quitosana, esponja, equivalente dérmico.

**Abstract.** The aim of this study is to develop a material in a sponge form composed of collagen and chitosan, with potential to be used as dermic equivalent. The sponges were prepared in three layers, outside composed of chitosan and inside by collagen, lyophilized and neutralized. They were analyzed by DSC, SEM, absorption test in PBS and cytotoxicity tests. DSC curves allowed to obtain the temperature of collagen denaturation (61,5°C). In photomicrographs using MEV it was observed that the surface presented pores. The absorption in PBS was very fast in the beginning, reaching a value of 1263,5±35,7 in 4 hours. Obtained results for diffusion in agar method and metabolic cellular activity indicated that the sponge is not a cytotoxic material.

**Keywords.** Collagen, chitosan, spongy, dermic equivalent.

### Introdução

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa abordam novos métodos de tratamento de saúde, entre eles a fabricação de arcabouços compreendendo suporte mecânico e estrutural adequado e capacidade de controlar a adesão, migração, proliferação e diferenciação destas células [1].

Os polímeros naturais são muito estudados na produção de biomateriais destinados à engenharia de tecidos, dentre eles destaca-se o colágeno, pela

semelhança com a matriz extracelular [2].

O colágeno apresenta biodegradabilidade, biocompatibilidade e algumas de suas principais funções como biomaterial são de proporcionar suporte mecânico, adesão e migração celular [3, 4]. No entanto esse polímero tem rápida degradação quando usado como material regenerativo [5]. Por isso, a adição de outros materiais, como a quitosana pode diminuir a taxa de degradação [6]. A quitosana é biocompatível, biodegradável, não tóxica e antimicrobiana, promovendo efeitos positivos sobre a cicatrização de feridas [7].

O desenvolvimento de um biomaterial poroso constituído por colágeno e quitosana, unindo as características de ambos, apresenta grande potencial para ser usado como equivalente dérmico.

O objetivo deste trabalho foi preparar uma esponja constituída de colágeno e quitosana em camadas e avaliar quantitativa e qualitativamente a sua citotoxicidade. Neste estudo os testes de citotoxicidade *in vitro* utilizados foram o método de difusão de ágar e avaliação da atividade metabólica celular através de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbrometo de tetrazólio (MTT).

### Materiais e Métodos

**Obtenção de colágeno** – Foi utilizado tendão bovino, que foi limpo, picotado e imerso por 24 horas em uma solução alcalina na presença de cloretos e sulfatos de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> e Ca<sup>++</sup> a 25°C. Após esse período essa solução foi removida e adicionada uma segunda solução contendo cloretos e sulfatos de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> e Ca<sup>++</sup> por 6 horas sendo em seguida de lavado com ácido bórico 3%, EDTA 0,3% a pH 11 e água desionizada até pH constante [8]. O colágeno foi então extraído com solução de ácido acético pH 3,0. A concentração do gel resultante foi determinada por liofilização, realizada em triplicata.

**Obtenção de quitosana** - A quitosana foi obtida do gládio da lula da espécie *Loligo sp*, consistindo resumidamente de desmineralização com HCl 0,55M a 25°C por 2 horas, desproteíntização por tratamento com NaOH por 1 hora a 80°C e desacetilação em solução aquosa de NaOH 40% , 80°C por 3 horas sob fluxo de nitrogênio [9]. A solução de quitosana foi preparada na concentração de 1% em ácido acético 1%.

**Preparação das esponjas** - Após a obtenção dos

polímeros as esponjas foram preparadas em três camadas, em um molde de Teflon. A 1ª camada, de quitosana foi colocada no molde e congelada. Sobre ela, foi adicionado o gel de colágeno e novamente congelada. A 3ª camada foi de quitosana e a seguir o material foi congelado, liofilizado, neutralizado com bicarbonato de sódio 1 molL<sup>-1</sup>, liofilizado novamente e esterilizado com óxido de etileno.

**Caracterização** - As esponjas foram analisadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaio de absorção em PBS. Curvas DSC foram obtidas em um equipamento TA *Instruments*, modelo DSC 2010 calibrado com padrão de índio. A razão de aquecimento foi de 10°C min<sup>-1</sup>, na faixa de 5 a 120°C, em atmosfera de N<sub>2</sub>. Foram utilizadas massas com cerca de 15 mg, em suportes de alumínio herméticos. Os valores da temperatura de desnaturação (Td) foram obtidos pela inflexão da curva. As fotomicrografias foram obtidas das esponjas tanto da superfície quanto da secção transversal, previamente recobertas com uma camada de 20 nm de ouro. O equipamento utilizado foi LEO 440 operando com feixe de elétrons de 20 keV. O tamanho dos poros da superfície das esponjas foi obtido por média de 40 determinações em fotomicrografias, através do software UTHSCSA Image Tool para Windows versão 3.00. No ensaio de absorção em tampão fosfato salino (PBS) as esponjas foram pesadas em balança de precisão e colocadas em frascos contendo 10 mL de PBS. Em intervalos de tempo pré-determinados foram retiradas do frasco, removido o excesso de solução com papel filtro, realizada a pesagem e retornadas aos frascos para novas medidas de tempo. Esse processo foi feito em quintuplicata, e calculou-se a quantidade de tampão absorvido pela esponja usando a equação 1:

$$\% \text{ Absorção} = \frac{(\mu - ms)}{ms} \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

- ✓  $\mu$  (massa úmida)
- ✓  $ms$  (massa seca)

**Cultura Celular** – Foi utilizada a linhagem celular VERO (CCL-81 ATCC-USA), células epiteliais de rim de macaco. Esta linhagem foi cultivada em meio Iscoves suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos mantidas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando uma associação de tripsina com meio e a suspensão celular foi semeada em quantidades adequadas e em recipiente próprios para cada metodologia.

**Citotoxicidade pelo método de difusão em ágar** – A linhagem celular VERO, na concentração de 3,0 x 10<sup>5</sup> células/mL foi semeada em placa de Petri (15x55 mm), no volume de 10 mL e incubada durante 48 h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período com a monocamada de células já formada o meio de cultura foi desprezado e adicionado em cada placa 5 mL do meio composto de partes iguais de mínimo de Eagle

(MEM) e ágar a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro. No momento do uso, o ágar foi fundido e misturado com o MEM, ambos a uma temperatura de 44°C. As esponjas com 1,2 cm de diâmetro de superfície foram colocadas sobre o ágar antes de sua solidificação completa, em torno de 25°C, que é uma temperatura baixa suficiente para não desnaturar o colágeno presente. As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 h [10].

Foram utilizados discos de látex estéril (controle positivo-CP) e discos de papel filtro autoclavados (controle negativo-CN), respeitando a dimensão da área superficial utilizada no biomaterial. As placas foram analisadas macroscopicamente quanto à presença de halo.

**Viabilidade de Metabolismo Celular** [11] – As esponjas foram cortadas em 4 partes utilizando bisturi estéril e as amostras de látex estéril com as mesmas dimensões da superfície do material (CP). As amostras foram entumescidas com PBS e mantidas a 37°C. Após 24 h, foram removidas do PBS e distribuídas em poços de uma placa de cultura de 24 poços. Em seguida, suspendeu-se 1x10<sup>6</sup> células em 20  $\mu$ L de meio de cultura, que foram pipetados sobre cada amostra e em um poço vazio (CN) mantidos a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 15 minutos, adicionou-se 20  $\mu$ L de meio de cultura para manter as células úmidas. Ao completar 30 minutos acrescentou-se 2000  $\mu$ L de meio de cultura e o mesmo foi trocado todos os dias. Foram preparadas 7 placas, sendo avaliada a atividade metabólica celular 1 Placa a cada 24 h (tempo total – 168 h). Para fazer a leitura foi retirado todo o líquido e acrescentou-se 2000  $\mu$ L de MTT. Após 3 h o MTT foi aspirado e colocou-se 2000  $\mu$ L de DMSO (Dimetilsulfóxido) e agitou-se por 30 min a 30°C. As amostras foram transferidas em triplicata (200  $\mu$ L) para a placa de 96 poços. A absorbância foi determinada em 570 nm em leitor de microplacas (Versa Max, Molecular Devices). A viabilidade celular foi calculada por:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{absorbância esponja} \times 100}{\text{absorbância CN}} \quad (2)$$

## Resultados

**Caracterização** - A temperatura de desnaturação (Td) do colágeno obtida por DSC foi de 61,5°C.

A fotomicrografia da secção transversal por MEV é mostrada na Figura 1A onde é possível observar a presença das três camadas. A fotomicrografia por MEV da superfície da esponja (Figura 1B) mostra poros interconectados, de vários tamanhos.

Nas fotomicrografias por MEV do corte transversal o tamanho médio dos poros na camada de colágeno foi 50,1±8,9 e na camada de quitosana foi 61,3±11,1. O tamanho médio dos poros da superfície foi medido nas fotomicrografias por MEV no qual apresentou tamanho médio de 74,9±11,4.

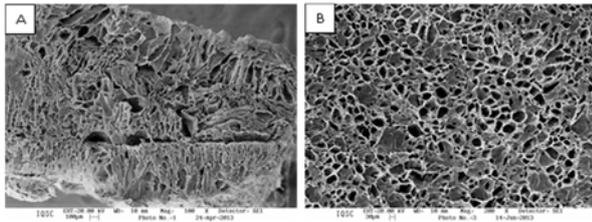


Figura 1: Fotomicrografia por MEV do corte transversal da esponja (A) (100x) e da superfície (B) (200x).

A Figura 2 mostra os resultados obtidos com o uso da equação 1, para a absorção em PBS, que se mostrou rápida no início e a partir de 4 h chegou a mais de 1200%.

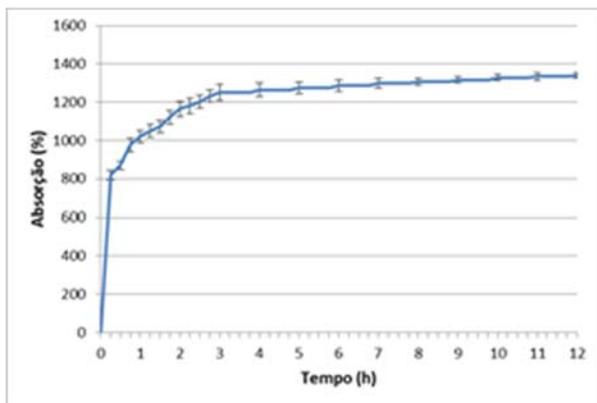


Figura 2: Porcentagem de absorção em PBS em função do tempo (h).

**Método de difusão em ágar** - No método de difusão em ágar não foi observado halo de toxicidade ao redor da esponja, comportamento idêntico ao controle negativo (Figura 3). O halo foi observado ao redor da amostra do controle positivo (3B).

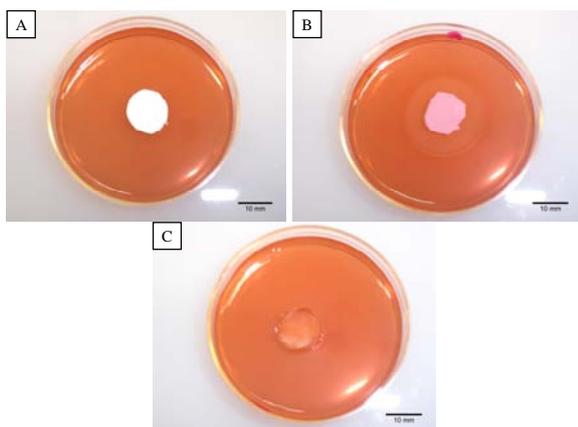


Figura 3: CN (A), CP (B) e esponja (C).

**Viabilidade Metabólica Celular** – A Figura 4 mostra a densidade óptica obtida com o teste de MTT para a esponja, controle negativo e controle positivo. A atividade metabólica celular aumentou

progressivamente nos grupos esponja e CN no período de 1 a 7 dias após o contato celular, em ambas tendendo para a saturação. No grupo CP foi observado um decréscimo celular, caracterizando morte celular.

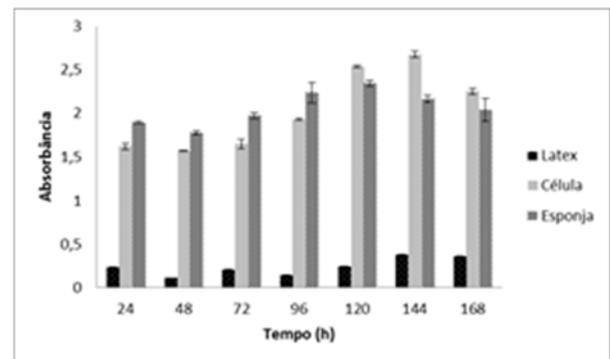


Figura 4: Valores de absorbância em função do tempo para Látex (CP), Célula (CN) e esponja.

A Figura 5 mostra a viabilidade celular da esponja em relação ao CN, que apresentou valores entre 81% e 120%.

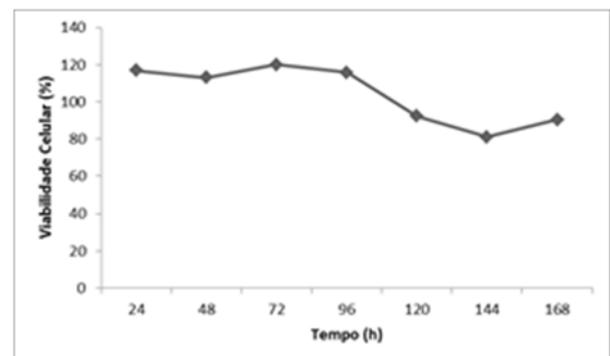


Figura 5: Viabilidade celular (%) da esponja em relação ao CN, em função do tempo (h).

## Discussão

A curva DSC (não mostrada) para a esponja contendo colágeno mostrou a desnaturação da proteína, ou seja, a transição da hélice tripla para uma forma desordenada (gelatina). Isso mostra que o tratamento alcalino usado para a extração do colágeno não alterou sua estrutura.

As esponjas apresentam tamanho de poros com uma variação de 50 a 75  $\mu\text{m}$  o que permite a proliferação celular. Biomateriais com poros que variam entre 50 e 150  $\mu\text{m}$  de diâmetro favorecem a colonização homogênea de fibroblastos [12]. As esponjas fornecem uma estrutura 3D para adesão, proliferação e diferenciação celular e secreção de matriz extracelular para guiar a formação de novos tecidos. Uma estrutura de poros abertos e interconectados é necessária para semear as células e distribuí-las uniformemente.

As esponjas apresentam uma rápida absorção de PBS nos primeiros 15 minutos ( $819,3 \pm 23,6$ ) e a partir

de 4 h apresentaram mais de 1200% de absorção ( $1263,5 \pm 35,7$ ), sendo mais que suficiente para proporcionar um ambiente propício para a adesão e diferenciação celular.

O halo de toxicidade ao redor do látex (CP) indica morte das células, liberando o corante vermelho neutro incorporado nas células, dando um aspecto transparente ao local [10]. Este halo não foi observado ao redor da esponja e tampouco do controle negativo, confirmando não serem tóxicos.

A esponja, por apresentar estrutura 3D, tem uma área de contato para as células aderirem maior que somente no poço (CN), permitindo maior proliferação celular, o que justifica os valores de 120% de viabilidade celular quando comparado ao CN que é considerado 100%. Este aumento da atividade metabólica celular é visível nos primeiros 5 dias, quando ocorre a saturação, levando a uma queda da viabilidade. O crescimento celular elevado tende à saturação e conseqüente morte celular [11]. As células VERO que foram utilizadas tendem a saturação em 7 dias como observado no CN. No entanto o comportamento da viabilidade celular na esponja manteve-se próxima do CN com variação de 81% a 120%, mostrando não ser citotóxica.

## Conclusão

As características apresentadas pelo arcabouço poroso de colágeno e quitosana nos testes realizados neste trabalho mostraram que este biomaterial apresentou comportamento adequado *in vitro*, pois quando em contato com as células, pode ser observada ausência de citotoxicidade.

## Agradecimentos

JSC é bolsista CAPES.

## Referências

- [1] George A, Ravindran S. Protein templates in hard tissue engineering. *Nano Today*. 2010; 5: p. 254–266.
- [2] Sun LP, Wang S, Zhang ZW, Wang XY, Zhang QQ. Biological evaluation of collagen-chitosan scaffolds for dermis tissue engineering. *Biomedical Materials*. 2009; 4.
- [3] Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001; 221: p. 01-22.
- [4] Kadler, KE.; Baldock, C.; Bella, J.; Boot-Handford, R. P. Collagens at a glance. *Journal of Cell Science*. 2007; 120: p. 1955–1958.
- [5] Mulder, G.; Wallin, K.; Tenenhaus, M. Regenerative materials that facilitate wound healing. *Clinics in Plastic Surgery*. 2012; 39: p. 249-267.
- [6] Rodrigues FT, Martins VCA, Plepis A MG, Crusca, JS, Silva Junior, NF, Parizotto NA. Patches de pericárdio porcino revestida com quitosana. V Simpósio Ibero-americano de Quitina. Santiago, Chile. 2010.
- [7] Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar, PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*. 2009; 29: p. 322-337.
- [8] Bet MR, Goissis G, Lacerda CA. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagines and glutamine carboxamide side chains. *Biomacromolecules*. 2001; 2 (4): p. 1074-1079.
- [9] Horn MM, Martins VCA, Plepis AMG. Determinação da energia de ativação em hidrogéis poliméricos a partir de dados termogravimétricos. *Revista Polímeros*. 2010; 20 (3): p. 201-204.
- [10] Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*. 2003; 6 (3): p. 317-320.
- [11] Hofmann S, Stok KS, Kohler T, Meinel AJ, Müller R. Effect of sterilization on structural and material properties of 3-D silk fibroin scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 2014; 10: p. 308-317.
- [12] Berthod, F.; Hayek, D.; Damour, O.; Collombel, C. Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials*. 1993; 14 (10): p. 749-754.