

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE ESPONJAS DE
QUITOSANA/POLICAPROLACTONA PARA USO
EM ODONTOLOGIA**

Isis de Araújo Ferreira Muniz

SAPIENTIA AEDIFICAT

2018

Isis de Araújo Ferreira Muniz

**DESENVOLVIMENTO DE ESPONJAS DE QUITOSANA/
POLICAPROLACTONA PARA USO EM ODONTOLOGIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof(a). Dr^a. Sabrina Garcia de Aquino

João Pessoa

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

BIBLIOTECÁRIO:

M966d Muniz, Isis de Araujo Ferreira.

Desenvolvimento de esponjas de
quitosana/policaprolactona para uso em odontologia /
Isis de Araujo Ferreira Muniz. - João Pessoa, 2020.
52 f. : il.

Orientação: Drª Sabrina Garcia Aquino.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Odontologia. 2. Quitosana. 3. Engenharia tecidual.
4. Materiais biocompatíveis. I. Aquino, Sabrina Garcia.
II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.314(043)

ISIS DE ARAÚJO FERREIRA MUNIZ

**DESENVOLVIMENTO DE ESPONJAS DE QUITOSANA/
POLICAPROLACTONA PARA USO EM ODONTOLOGIA**

Banca Examinadora



Profª. Drª. Sabrina Garcia de Aquino
Orientadora - UFPB



Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra
Examinador - UFPB



Profa. Dra. Diana Gabriela Soares dos Passos
Examinador - UFPB

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria da Guia e Carlos César, minha irmã Iris e minhas tias Iolanda e Vanda por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu marido, Garry Lynyk, que me incentiva e me dá forças para seguir.

À Isabela Passos que tem orientado meu caminho desde que nossa relação de professora e aluna se tornou uma grande amizade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas graças alcançadas;

Aos meus pais, Maria da Guia e Carlos César, pela educação que me proporcionaram e por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida;

Às minhas mães de coração, Iolanda e Vanda, por também participarem da minha educação;

Ao meu marido, Garry Lynyk, que não mediu esforços para que eu entrasse no mestrado e esteve ao meu lado me incentivando e apoiando em todos os momentos;

À minha irmã Iris por ter sido meu porto seguro sempre;

À Professora Isabela Passos, a grande incentivadora para que essa conquista se tornasse possível;

Minha profunda gratidão a Tereza Vieira, uma grande amiga que esteve sempre presente nessa trajetória e fez de tudo para me ajudar sempre que precisei;

À Faumana Câmara e Débora Campos, por todo apoio durante esse período e pela amizade construída que se transformou em irmandade;

À Carol, minha parceira na pesquisa, por todos os experimentos realizados e por compartilhar seus conhecimentos;

À Ana Cláudia e a Rebeca Dantas, as primeiras pessoas que dividiram comigo seus aprendizados com muito carinho;

À Rebecca Ruanny, pelo apoio e por trazer alegria ao laboratório; aos colegas de turma, Pâmela, Joyce, Eugênia, Sara, e todos aqueles que de alguma forma estiveram presentes nesses dois anos;

À minha orientadora, Professora Sabrina, por toda dedicação, paciência e ensinamentos compartilhados. Sempre esteve disposta a me ajudar e tornou a minha caminhada mais leve com seu jeito delicado;

Ao Professor Ricardo Castro, um exemplo de profissional a ser seguido por toda sua humildade e dedicação. Agradeço por todo apoio na pesquisa;

Ao Professor Eliton Medeiros por todas as contribuições dadas à pesquisa, e por sanar as minhas dúvidas sempre com um sorriso no rosto;

Ao Professor André Ulisses que tem sido minha referência de profissional por toda sua competência e dedicação, além de ter me estendido à mão sempre que precisei;

À Professora Diana Soares por sua colaboração na metodologia do estudo;

Ao técnico do Lamab, Lucas Figueiredo pelas contribuições relevantes dadas a esse trabalho. Assim como ao doutorando, Igor, pelo auxílio com o UV-VIS;

A Rebeca Tibau, técnica do Labio, por tantos ensinamentos, compreensão e apoio;

A Patrícia, que em pouco tempo conseguiu auxiliar bastante no laboratório;

Ao Alexandre, por contribuir com seus conhecimentos de microbiologia;

Agradeço também a Renan Braga por contribuir com seus ensinamentos na estatística;

Aos Professores: Luciana Barbosa pelos conhecimentos compartilhados no Projeto de extensão; Ennyo Sobral por todos os ensinamentos obtidos no estágio docência, além de ter tornado essa experiência bastante agradável; a todos os professores do programa, Frederico Barbosa, Leopoldina de Almeida, Yuri Wanderley, Bianca Santiago, Paulo Bonan, Lúcio Castellano, Fábio Sampaio e Thiago Farias, por fornecerem todos os conhecimentos necessários à minha formação.

EPÍGRAFE

“Nosso maior limite não é aquilo que queremos e não podemos fazer. É aquilo que nunca consideramos sermos capazes de fazer.”

Richard Bandler

RESUMO

Introdução: A engenharia de tecidos permite combinar biomateriais, células, fatores de crescimento e diferenciação com o objetivo de melhorar ou restaurar as funções de tecidos ou órgãos. Dentre esses biomateriais, a quitosana é um possível candidato para aplicação no tratamento de doenças orais infecto-inflamatórias, por ser um biopolímero biocompatível com ação anti-inflamatória e antimicrobiana.

Objetivo: Caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana de esponjas à base de quitosana e policaprolactona (PCL). **Metodologia:** As esponjas foram previamente preparadas nas seguintes proporções (v/v): 100% quitosana (Q pura); 75% de quitosana e 25% de PCL (75/25); 50% de quitosana e 50% de PCL (50/50), 25% quitosana e 75% PCL (25/75) e posterior liofilização. As amostras foram caracterizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfilometria, ângulo de contato, degradação em PBS e espectroscopia UV-VIS. Para avaliação do efeito antimicrobiano foi realizado o teste do halo de inibição e de macrodiluição para as cepas *S. mutans* (ATCCUA159) e *S. sanguinis* (ATCCBAA1455).

Resultados: As análises por MEV mostraram a interconectividade dos poros, bem como o grau de porosidade das esponjas avaliadas, o qual aumentou conforme a maior proporção de PCL. Na perfilometria, através do parâmetro Ra, foi observada diferença estatisticamente significativa de todos os grupos em relação à esponja 25/75 ($p < 0,05$), que apresentou a maior rugosidade. As amostras apresentaram caráter altamente hidrofílico de modo que não foi possível mensurar o ângulo de contato. As esponjas apresentaram degradação após 28 dias de imersão em PBS, e através do UV-VIS, foi possível detectar o espectro da quitosana, comprovando a sua liberação. No ensaio de macrodiluição foi observada a redução da contagem de UFCs para o *S. mutans*, nas proporções de 75/25 e 50/50 e, para o *S. sanguinis*, para todas as proporções em relação ao controle. **Conclusão:** A caracterização das esponjas à base de PCL e quitosana demonstrou a existência de porosidade, rugosidade e hidrofiliabilidade, em especial da proporção (50/50), com ação antimicrobiana. Novos estudos para a incorporação de substâncias bioativas ou com potencial antimicrobiano e/ou anti-inflamatório devem ser realizados para o desenvolvimento desses *scaffolds* e futura aplicação em infecções orais.

Palavras-chave: Quitosana; Engenharia Tecidual; Materiais Biocompatíveis.

ABSTRACT

Introduction: Tissue engineering allows combining biomaterials, cells, growth factors, and differentiation with the goal of improving or even restoring tissue or organ functions. Among these biomaterials, chitosan is a possible candidate for application in the treatment of infectious-inflammatory oral diseases, because of its biocompatibility, anti-inflammatory and antimicrobial properties. **Objective:** To characterize and evaluate the antimicrobial activity of sponges based on chitosan and polycaprolactone (PCL). **Method:** The sponges were previously prepared in the following proportions (v / v): 100% chitosan (pure Q); 75% chitosan and 25% PCL (75/25); 50% chitosan and 50% PCL (50/50), 25% chitosan and 75% PCL (25/75) and subsequent lyophilization. The samples were characterized by scanning electron microscopy (SEM), perfilometry, contact angle, degradation in PBS and UV-VIS spectroscopy. Evaluation of antimicrobial effect was performed using halo inhibition or macrodilution test for *S. mutans* (ATCCUA159) and *S. sanguinis* (ATCCBAA1455). **Results:** SEM analysis showed the interconnectivity of the pores, as well as the degree of porosity, which increased the higher the proportion of PCL in the sponges. In the perfilometry, through the Ra parameter, a significant difference of all groups was observed in relation to 25/75 ($p < 0.05$), which presented the greatest roughness. The samples presented a highly hydrophilic character, so the contact angle was not measured. The sponges presented degradation after 28 days of immersion in PBS, and the UV-VIS detected the chitosan spectrum proving its release. In the macrodilution analysis, a reduction in the counts of CFUs was observed for *S. mutans* in the proportions of 75/25 and 50/50, and for *S. sanguinis* for all proportions in relation to the control. **Conclusion:** The characterization of PCL and chitosan sponges showed porosity, roughness and hydrophilicity, especially the proportion (50/50), with antimicrobial action. New studies for the incorporation of bioactive substances or antimicrobial and/or anti-inflammatory potential should be performed for the development of these *scaffolds* and future application in oral infections.

Keywords: Chitosan; Tissue Engineering; Biocompatible Materials.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC = American Type Culture Collection
- BHI = Brain Heart Infusion
- CIM = Concentração Inibitória Mínima
- CBM = Concentração Bactericida Mínima
- Fig. = figura
- h = hora
- kV = quilovolt
- kDa = quilo Dalton
- mL = mililitro
- μ L = microlitro
- mm = milímetros
- μ m = micrômetros
- nm = nanômetros
- MEV = Microscopia eletrônica de varredura
- t = tempo
- °C = graus Celsius
- PCL = policaprolactona
- PLLA = poli(ácido L-lático)
- PBS = solução salina de fosfato
- UFC = unidades formadoras de colônias
- UV-VIS = luz ultra-violeta visível
- v/v = volume/volume
- 100 quitosana = 100% de quitosana
- 75/25 = 75% de quitosana e 25% de PCL
- 50/50 = 50% de quitosana e 50% de PCL
- 25/75 = 25% de quitosana e 75% de PCL

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Capítulo 1	16
RESUMO	16
INTRODUÇÃO	18
MATERIAIS E MÉTODOS	20
Caracterização das esponjas	20
Microscopia eletrônica de varredura	20
Perfilometria	21
Ângulo de contato	21
Degradação em PBS	21
Espectroscopia UV-VIS	22
Atividade antimicrobiana	22
Teste do halo de inibição	22
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
3. Considerações gerais	48
4. Conclusão	49
5. Referências	50

1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos permite combinar biomateriais, células, fatores de crescimento e diferenciação com o objetivo de melhorar ou até mesmo restaurar as funções de tecidos ou órgãos. Neste contexto, tem crescido o interesse no desenvolvimento de *scaffolds* para uso em Odontologia, os quais são utilizados como arcabouço para permitir que as células possam aderir, crescer e se organizar em sua superfície. Desse modo, um *scaffold* ideal deve permitir a migração, proliferação e organização celular tridimensional. Além disso, a biodegradabilidade também é necessária, uma vez que facilita a degradação desses arcabouços para que ocorra a infiltração celular, vascularização, diferenciação e consequentemente substituição dos *scaffolds* pelos tecidos apropriados. Diversos biomateriais têm sido investigados visando estratégias regenerativas, incluindo-se: o colágeno, fibrina, celulose, policaprolactona (PCL) e a quitosana¹.

Dentre estes biomateriais, a quitosana é um biopolímero natural, extremamente versátil, podendo ser fabricada em diferentes apresentações como: nanopartículas, filmes, tubos, *whiskers*, membranas e esponjas. Além disso, a natureza catiônica da quitosana permite a sua associação com um agente bioativo negativo, favorece o crescimento, proliferação, diferenciação e adesão celular, assim como a retenção e adsorção à mucosa oral (bioadesividade)^{2,3}. Esse polímero apresenta ainda uma diversidade de aplicações, como sistema de liberação de drogas, curativos, enxertos de pele e tecidos⁴.

A quitosana é derivada da quitina, que é um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos e paredes celulares de fungos após sofrer desacetilação alcalina. Com isso, a distinção entre quitosana e quitina é dada através do número de unidades de N-glucosamina e isso interfere na aplicabilidade desses materiais, uma vez que a utilização da quitina é limitada por ser quimicamente inerte e insolúvel tanto em água quanto em ácido. Os parâmetros relevantes com capacidade de interferir na solubilidade, assim como na degradação da quitosana são: a massa molar, que pode variar entre 300 a 1000 kDa, e o grau de desacetilação entre 30% e 95%⁵. Isso significa que, para uma maior biodegradabilidade, a massa molar deve ser menor, uma vez que essas são grandezas inversamente proporcionais⁶.

Dentre as propriedades biológicas da quitosana destaca-se a sua atividade antimicrobiana intrínseca. Embora o mecanismo não esteja completamente elucidado, é proposto que este seja pela associação do seu grupo catiônico com ânions presentes na parede celular bacteriana, suprimindo a biossíntese⁷. Outra potencial atividade da quitosana descrita na literatura é seu efeito anti-inflamatório, o que a torna, juntamente com sua ação antimicrobiana, um potencial alvo para prevenção e tratamento de infecções orais, entre estas, as doenças periodontais. Neste contexto, o estudo de Pavez et al.⁸, associou os efeitos antimicrobiano e anti-inflamatório do triclosan e da quitosana com a produção de nanopartículas à base desses agentes e mostrou a capacidade dessas partículas em modular a resposta inflamatória em fibroblastos gengivais, o que seria interessante no tratamento da inflamação na doença periodontal.

No que se refere à ação antimicrobiana, Costa et al.⁹ avaliaram a atividade da solução de quitosana em ácido acético contra bactérias anaeróbicas: *Prevotella buccae*, *Tannarella forsythia*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* e confirmaram o efeito bactericida rápido e eficiente contra estes microrganismos, atribuído possivelmente à natureza catiônica da quitosana que permite a interação com a parede celular bacteriana (carga aniônica), ocasionando a lise celular. Com isso, os autores expõem a possibilidade de utilizar a quitosana como antimicrobiano natural, principalmente contra bactérias anaeróbicas (principais patógenos periodontais). Neste sentido, dentro da periodontia, o uso da quitosana na forma de *scaffold* seria interessante para sua ação no ambiente subgengival onde se localiza a microbiota anaeróbica, bem como para a ação na redução do processo inflamatório e cicatrização tecidual^{10,11}. Isso porque a periodontite é uma infecção polimicrobiana de caráter inflamatório crônico e sua progressão é resultante da interação entre o biofilme disbiótico (em especial anaeróbios Gram-negativos) e uma exacerbada resposta imuno-inflamatória do hospedeiro, que causa destruição do tecido^{12,13}.

Recentemente um enfoque significativo tem sido dado à fabricação de *scaffolds* poliméricos tridimensionais, os quais funcionam como um modelo que orienta a formação de um novo tecido. Neste contexto, a fabricação e a caracterização de esponjas à base de quitosana têm sido reportadas na literatura por apresentarem propriedades capazes de serem utilizadas como *scaffold*⁵.

Apesar de suas propriedades biológicas interessantes é possível aprimorar os biomateriais compostos por quitosana com o intuito de aperfeiçoar suas aplicações¹⁴. Neste sentido, há a possibilidade deste biopolímero ser moldado em uma estrutura porosa e associado a outros materiais como: alginato, hidroxiapatita, ácido hialurônico, fosfato de cálcio, poli(ácido L-lático) (PLLA), fatores de crescimento e ao policaprolactona (PCL). O PCL é um polímero sintético, derivado da síntese química do petróleo, que apresenta baixa temperatura de fusão e viscosidade, além de uma taxa de degradação lenta. Embora o PCL apresente desvantagens, como ausência de reconhecimento celular, hidrofobicidade, contribuição de carga neutra, é um polímero sintético, biodegradável, biocompatível, não tóxico e de fácil processamento¹⁵. Desse modo, a união das características bioativas que a quitosana apresenta, às boas propriedades do PCL em um mesmo material pode apresentar um grande potencial de aplicação na engenharia de tecidos.

A potencial utilização de *scaffolds* com a finalidade de neoformação tecidual é o foco da odontologia regenerativa, em que o objetivo é associar biomateriais, incluindo a quitosana, a substâncias que tenham capacidade de induzir células-tronco-mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos ou odontoblastos aumentando o potencial osteogênico, por exemplo, para a mineralização da dentina, nos casos de infecções que envolvam o complexo dentino-pulpar, como a cárie e as infecções endodônticas¹⁶. Uma vantagem dos *scaffolds* de quitosana para sua aplicação na engenharia de tecido ósseo é a presença de poros interconectados, com possibilidade de formação óssea *in vitro* e *in vivo*¹⁷. Tsuchiya et al.¹⁸ afirmam que, além deste potencial osteocondutor da quitosana, esta também é capaz de carrear e regular a liberação de agentes bioativos, como fatores de crescimento, uma vez que demonstraram uma maior formação óssea em modelo de calvária de ratos que receberam a esponja de quitosana impregnada com o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).

Dessa forma, através da engenharia tecidual, podemos observar as consequências de diversas infecções orais sob outras perspectivas, pois se torna possível combinar biomateriais, células, fatores de crescimento e de diferenciação com o objetivo de melhorar ou até mesmo restaurar as funções de tecidos ou órgãos¹.

No presente estudo, foram desenvolvidas esponjas em diferentes proporções de quitosana e PCL com o objetivo de caracterizá-las e avaliar sua atividade antimicrobiana e o potencial dessas blendas poliméricas para utilização como *scaffold* no tratamento de infecções orais.

CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir será submetido à revista Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.

Título: Caracterização e atividade antimicrobiana de esponjas a base de quitosana/policaprolactona para aplicação em Odontologia

Autores: Isis de Araújo Ferreira Muniz¹; Carolina Lima de Almeida²; Eliton Souto de Medeiros³; Ricardo Dias de Castro⁴; Sabrina Garcia de Aquino⁴.

Filiação: ¹Mestranda em Ciências Odontológicas – UFPB; ²Mestranda em Ciência e Engenharia de Materiais – UFRN; ³Prof. Dr. De Engenharia de Materiais – UFPB; ⁴Prof. Dr. do Programa de Mestrado em Ciências Odontológicas – UFPB.

RESUMO

Introdução: A engenharia de tecidos permite combinar biomateriais, células, fatores de crescimento e diferenciação com o objetivo de melhorar ou até mesmo restaurar as funções de tecidos ou órgãos. Dentre esses biomateriais a quitosana é um possível candidato para aplicação no tratamento de doenças orais de caráter infecto-inflamatório, por ser um biopolímero biocompatível com propriedades anti-inflamatória e antimicrobiana. **Objetivo:** Caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana de esponjas à base de quitosana e policaprolactona (PCL). **Metodologia:** As esponjas foram previamente preparadas nas seguintes proporções (v/v): 100% quitosana (Q pura); 75% de quitosana e 25% de PCL (75/25); 50% de quitosana e 50% de PCL (50/50), 25% quitosana e 75% PCL (25/75) e posterior liofilização. As amostras foram caracterizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfilometria, ângulo de contato, degradação em PBS e espectroscopia UV-VIS. Para avaliação do efeito antimicrobiano foi realizado o teste do halo de inibição ou de macrodiluição, para as cepas *S. mutans* (ATCCUA159) e *S. sanguinis* (ATCCBAA1455). **Resultados:** As análises por MEV mostraram a interconectividade dos poros das esponjas avaliadas, bem como o grau de porosidade, que aumentou quanto maior a proporção de PCL. Na perfilometria, através do parâmetro Ra, foi observada diferença estatisticamente significativa de todos os grupos em relação à proporção 25/75 ($p < 0,05$), a qual apresentou a maior rugosidade. As amostras apresentaram caráter altamente hidrofílico de modo que não foi possível mensurar o ângulo de

contato. As esponjas apresentaram degradação após 28 dias de imersão em PBS, e através do UV-VIS foi possível detectar o espectro da quitosana no PBS, comprovando a sua liberação. Na avaliação da atividade antimicrobiana das amostras através da macrodiluição, foi observada a redução da contagem de UFCs para o *S. mutans*, nas proporções de 75/25 e 50/50 e, para o *S. sanguinis*, para todas as proporções em relação ao controle. **Conclusão:** A caracterização das esponjas à base de PCL e quitosana demonstrou porosidade, rugosidade e hidrofobicidade, em especial da proporção (50/50), com ação antimicrobiana. Novos estudos para a incorporação de substâncias bioativas ou com potencial antimicrobiano e/ou anti-inflamatório devem ser realizados para o desenvolvimento desses *scaffolds* e futura aplicação em infecções orais.

Palavras-chave: Quitosana; Engenharia Tecidual; Materiais Biocompatíveis.

INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos permite combinar biomateriais, células, fatores de crescimento e diferenciação com o objetivo de melhorar ou até mesmo restaurar as funções de tecidos ou órgãos. Neste contexto, tem crescido o interesse no desenvolvimento de *scaffolds* para uso em Odontologia, os quais são utilizados como arcabouço para permitir que as células possam aderir, crescer e se organizar em sua superfície. Desse modo, um *scaffold* ideal deve permitir a migração, proliferação e organização celular tridimensional. Além disso, a biodegradabilidade também é necessária, uma vez que facilita a degradação desses arcabouços para que ocorra a infiltração celular, vascularização, diferenciação e consequentemente substituição dos *scaffolds* pelos tecidos apropriados. Diversos biomateriais têm sido investigados visando estratégias regenerativas, incluindo-se: o colágeno, fibrina, celulose, policaprolactona (PCL) e a quitosana¹.

A quitosana é um biopolímero natural, extremamente versátil, podendo ser fabricada em diferentes apresentações como: nanopartículas, filmes, tubos, *whiskers*, membranas e esponjas. Além disso, sua natureza catiônica permite a associação a um agente bioativo negativo, favorece o crescimento, proliferação, diferenciação e adesão celular, assim como a retenção e adsorção à mucosa oral (bioadesividade)^{2,3}. Esse polímero apresenta ainda uma diversidade de aplicações, como: sistema de liberação de drogas, curativos, enxertos de pele e tecidos⁴.

Apesar de suas propriedades biológicas interessantes é possível aprimorar os biomateriais compostos por quitosana com o intuito de aperfeiçoar sua utilização⁵. Neste sentido, há a possibilidade deste biopolímero ser moldado em uma estrutura porosa e associado a outros materiais como: alginato, hidroxiapatita, ácido hialurônico, fosfato de cálcio, poli(ácido L-lático) (PLLA), fatores de crescimento e ao policaprolactona (PCL). O PCL é um polímero sintético, derivado da síntese química do petróleo, que apresenta baixa temperatura de fusão e viscosidade, além de uma taxa de degradação lenta. Embora o PCL apresente desvantagens, como ausência de reconhecimento celular, hidrofobicidade, contribuição de carga neutra, é um polímero sintético, biodegradável, biocompatível, não tóxico e de fácil processamento⁶. Desse modo, a união das características bioativas que a quitosana apresenta às boas propriedades do PCL

em um mesmo material pode apresentar um grande potencial de aplicação na engenharia de tecidos.

Através da engenharia tecidual, podemos observar as consequências de diversas infecções orais sob outras perspectivas, pois se torna possível combinar biomateriais, células, fatores de crescimento e de diferenciação com o objetivo de melhorar ou até mesmo restaurar as funções de tecidos ou órgãos¹.

A potencial utilização de *scaffolds* com esta finalidade de neoformação tecidual é o foco da odontologia regenerativa, em que o objetivo é associar biomateriais, incluindo a quitosana, a substâncias que tenham capacidade de induzir células-tronco mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos ou odontoblastos aumentando o potencial osteogênico, por exemplo, para a mineralização da dentina, nos casos de infecções que envolvam o complexo dentino-pulpar, como a cárie e as infecções endodônticas. Dessa forma, esses scaffolds podem ser capazes de atuar como agentes de capeamento pulpar direto⁷.

No presente estudo, foram desenvolvidas esponjas em diferentes proporções de quitosana e PCL com o objetivo de caracterizá-las e avaliar sua atividade antimicrobiana com o intuito de analisar o potencial dessas blendas poliméricas para utilização como *scaffold* no tratamento de infecções orais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a fabricação das esponjas foram preparadas inicialmente as soluções de quitosana e PCL. Para obtenção da solução de quitosana em ácido acético a 1%, 0,250 g de quitosana (baixa massa molar: 106 g.mol^{-1} ; grau de desacetilação 85% - Sigma Aldrich (St. Louis, MO) foram dissolvidos em 0,5 mL de ácido acético e 49,5 mL de água destilada sob agitação constante por 24 horas para total solubilização. A solução de PCL foi preparada na concentração de 3,7 mg/mL de PCL dissolvidos em 27 mL de acetona sob agitação em uma temperatura entre 40 e 55°C até a dissolução total do polímero. Em seguida, foram adicionados, sob agitação, 72 μL de Polisorbato 80 (tensoativo). A solução obtida foi então gotejada em 53 mL de água destilada, com taxa de gotejamento de 330 $\mu\text{L}/\text{min}$ e mantida sob agitação à temperatura ambiente para a total evaporação da acetona e o volume perdido nesse processo foi completado com água destilada.

Posteriormente, foi realizado o ajuste do pH de cada solução para 6,5 e as soluções de quitosana e PCL misturadas em diferentes proporções (v/v: 100:0; 75:25; 50:50; 25:75), congeladas à -80°C em placas de 48 poços e então liofilizadas (Liofilizador Terroni, modelo Enterprise II) por 24 horas. Todas as amostras utilizadas nos experimentos subsequentes foram fabricadas em único momento.

I. Caracterização das esponjas:

1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das esponjas foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura, modelo Leo 1430 Zeiss, operado a 10 kV. Previamente às análises, as amostras foram metalizadas com duas camadas de ouro, com 90 segundos para cada recobrimento, em um "Sputter Coater" da Emitech, modelo KSSOX, em atmosfera de argônio. Foram obtidas imagens da superfície e internamente à secção transversal de cada amostra, a qual foi realizada com bisturi lâmina número 12. Não foi obtida imagem da secção transversal da esponja 25/75, pois não foi possível cortá-la. Além da distribuição, os diâmetros dos poros das diferentes proporções de esponjas foram medidos através do software analisador de imagens (Image J, *National Institutes of Health, USA*). Foram realizadas 100 medidas aleatórias para cada amostra. Foram obtidas também micrografias da superfície

das amostras após o período de 28 dias de imersão em PBS com os mesmos parâmetros descritos.

2. Perfilometria

A análise da rugosidade foi realizada no aparelho de Perfilometria óptica sem contato (CCI MP, Taylor Hobson, Inglaterra) conectado a uma unidade computadorizada contendo o software Talysurf CCI (Taylor Hobson, Inglaterra) para obtenção dos dados. Foi utilizado um *cutoff* de 200 μm , com uma lente 20x e velocidade de escaneamento de 1x no modo xyz. Foram obtidas imagens da superfície, assim como internamente à secção transversal de cada amostra, a qual foi realizada com bisturi lâmina 12, após o congelamento com nitrogênio.

3. Ângulo de contato

O ângulo de contato (θ), que corresponde à média dos ângulos formados entre a superfície da esponja e a tangente da superfície da gota nos lados direito e esquerdo, foi medido através do gotejamento de 10 μL de água deionizada por uma pipeta sobre a superfície das amostras, as quais possuíam o mesmo volume de 250 μL . Foram obtidas fotografias contínuas, através da padronização com uma câmera digital (CANON EOS REBEL T3i, lente Vivitar 100 mm autofocus Macro, no modo contínuo, ISO 100, regulagem de obturador 1/125 e diafragma f22) em um tripé, horizontalmente à superfície das amostras, nos seguintes momentos: antes do gotejamento, imediatamente ao contato da gota com a amostra e após a absorção da gota, resultando em 3 fotos por amostra⁸.

4. Degradação em PBS

O perfil de degradação das esponjas de diferentes proporções de quitosana e PCL foi avaliado *in vitro* em PBS. Para isto, as esponjas foram incubadas em placas de 24 poços na presença de 1 mL de PBS (pH 7,4) a temperatura ambiente por 28 dias. Nos tempos de 24 h, 48h, 72h, 1 semana e 4 semanas, as amostras

foram pesadas em balança analítica, em que os pesos de cada tempo participaram da equação para o cálculo da porcentagem de intumescimento de acordo com a seguinte fórmula: $[\%] = \left(\frac{Mt - Mi}{Mi} \right)$, em que Mt corresponde ao peso após o tempo de imersão e Mi, ao peso úmido inicial⁹. Para a pesagem foram utilizados papéis para apoiar as esponjas, sendo um para cada amostra, o qual era pesado antes de receber a esponja, para não interferir na pesagem. A perda de massa ou o grau de intumescimento foi avaliado através dos sinais + ou -, a depender dos resultados dos cálculos.

5. Espectroscopia UV-VIS

A caracterização da liberação da quitosana da esponja foi determinada pela espectroscopia de luz ultra-violeta visível, após 28 dias de imersão em PBS para a avaliação da degradação. Foi obtido o espectro da solução de quitosana e do PCL, e posteriormente das alíquotas do PBS, diluídas em 20 mL de água destilada de cada proporção das esponjas: 100Q, 75/25, 50/50 e 25/75, os quais foram determinados em um espectro entre 190 e 600 nm, utilizando-se o equipamento SHIMADZU-UV-2550.

II. Atividade antimicrobiana:

1. Teste do halo de inibição

A atividade antimicrobiana das esponjas sobre patógenos orais foi avaliada pelo método clássico de difusão em ágar. Nesta etapa, foram utilizadas cepas de referência: *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) - ATCC - BAA1455, *Streptococcus oralis* (*S. oralis*) - ATCC - 10557 e *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) - ATCC - 6715. Assim, essas cepas bacterianas foram reativadas em meio BHI suplementado com 5% de sacarose, por 24 horas em estufa 37°C em microaerofilia, ajustadas e padronizadas em espectrofotômetro, 530 nm, abs 0,08–0,1, para um valor de $2,5 \times 10^3$ unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Após este período, 5 mL de cada inóculo foi vertido em cada placa de Petri (90x15mm) correspondente por inundação, sendo o excesso descartado.

Posteriormente, as esponjas testes de acordo com as composições previamente mencionadas, após serem esterilizadas por luz ultravioleta por 15 minutos de cada lado, foram colocadas nas placas de ágar com o inóculo, as quais foram mantidas por 24 horas a 37°C em microaerofilia. Os diâmetros dos halos de inibição foram determinados com auxílio de um paquímetro, obtendo-se três medidas do maior diâmetro de cada amostra. Discos de papel de filtro de 5 mm de diâmetro contendo solução de digluconato de clorexidina a 0,12% foram utilizados como controle. Este respectivo teste foi realizado em triplicata e os dados apresentados a partir do cálculo da média dos halos de inibição¹⁰.

2. Macrodiluição

Para esse experimento, as esponjas foram esterilizadas previamente por óxido de etileno. Em placas de 48 poços, contendo as esponjas de diferentes proporções, foram adicionados 800 µL de meio BHI suplementado com 5% de sacarose em cada poço. As esponjas ficaram incubadas à temperatura ambiente por 1 semana, período necessário para a degradação da amostra e consequente liberação da quitosana, como observado no teste da degradação em PBS. As cepas bacterianas *S. sanguinis* (ATCC - BAA1455) e *S. mutans* (UA159) foram então reativadas em meio BHI suplementado a 5% de sacarose por 24 horas em estufa a 37°C e em microaerofilia. Após o tempo de incubação, adicionou-se em cada poço 200 µL do inóculo de cada suspensão bacteriana em triplicata contendo a concentração final de $2,5 \times 10^3$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24-48h, em microaerofilia. Após este período a CIM foi determinada visualmente e uma alíquota de 20 µL de cada subcultivo foi plaqueada em meio BHI ágar suplementado a 5% de sacarose e incubada nas condições previamente descritas. Além disso, as esponjas foram colocadas em *ependorf* e agitadas em vortex, com a retirada de 20 µL do meio para plaqueamento nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de UFC/mL¹¹.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA), adotando-se o estudo como bicaudal com nível de significância de 5%.

A análise estatística dos diâmetros dos poros avaliados em MEV foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, para medidas não paramétricas. Na Perfilometria foi realizado o One-way ANOVA para os dados de Ra, seguido do pós-teste de Tukey para medidas paramétricas.

A análise estatística da macrodiluição, através do plaqueamento do meio contendo o inóculo, foi realizada pelo One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey para medidas paramétricas.

RESULTADOS

I. Caracterização das esponjas:

1. Microscopia eletrônica de varredura

Através das micrografias da MEV foi possível observar, de forma qualitativa, a superfície e a secção transversal das amostras. A morfologia da superfície de cada esponja diferiu significativamente de acordo com as diferentes proporções de quitosana e PCL (Figura 1). À medida que a proporção de PCL aumenta, maior é a porosidade das esponjas, de tal modo que a proporção de 25/75 não permitiu o corte transversal. Além disso, observa-se que as células encontram-se abertas nas imagens da secção transversal, conforme pode se observar na Figura 2.

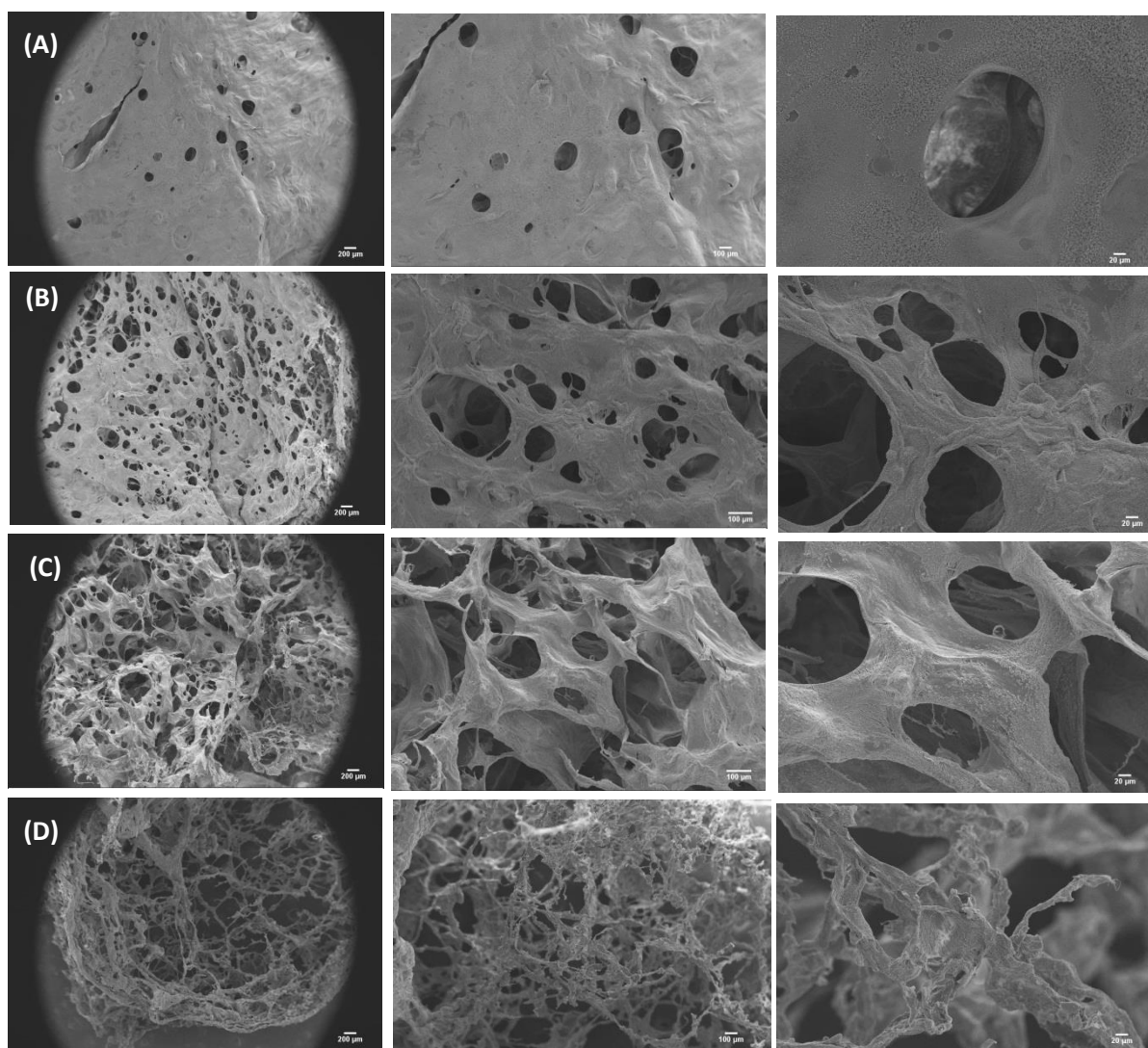


Figura 1: Imagens da MEV da superfície em diferentes aumentos, respectivamente das amostras (A) 100Q, (B) 75/25, (C) 50/50 e (D) 25/75.

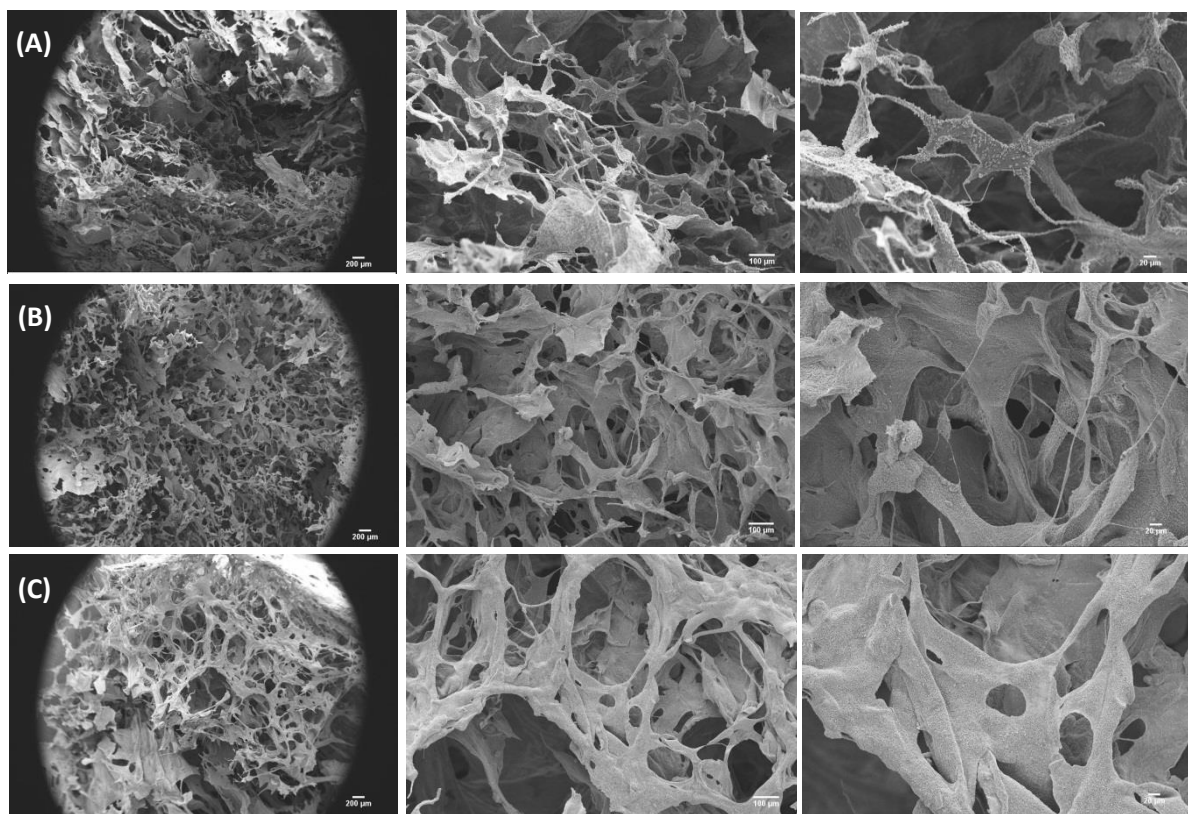


Figura 2: Imagens da MEV da secção transversal em diferentes aumentos, respectivamente das amostras: (A) 100Q, (B) 75/25 e (C) 50/50.

A avaliação microscópica da morfologia das esponjas por MEV também foi realizada após o período de 28 dias de imersão em PBS. Nesta análise constatou-se que, após este período de imersão, as amostras perdem seu aspecto poroso homogêneo na medida em que ocorre sua degradação com o tempo (Figura 3).

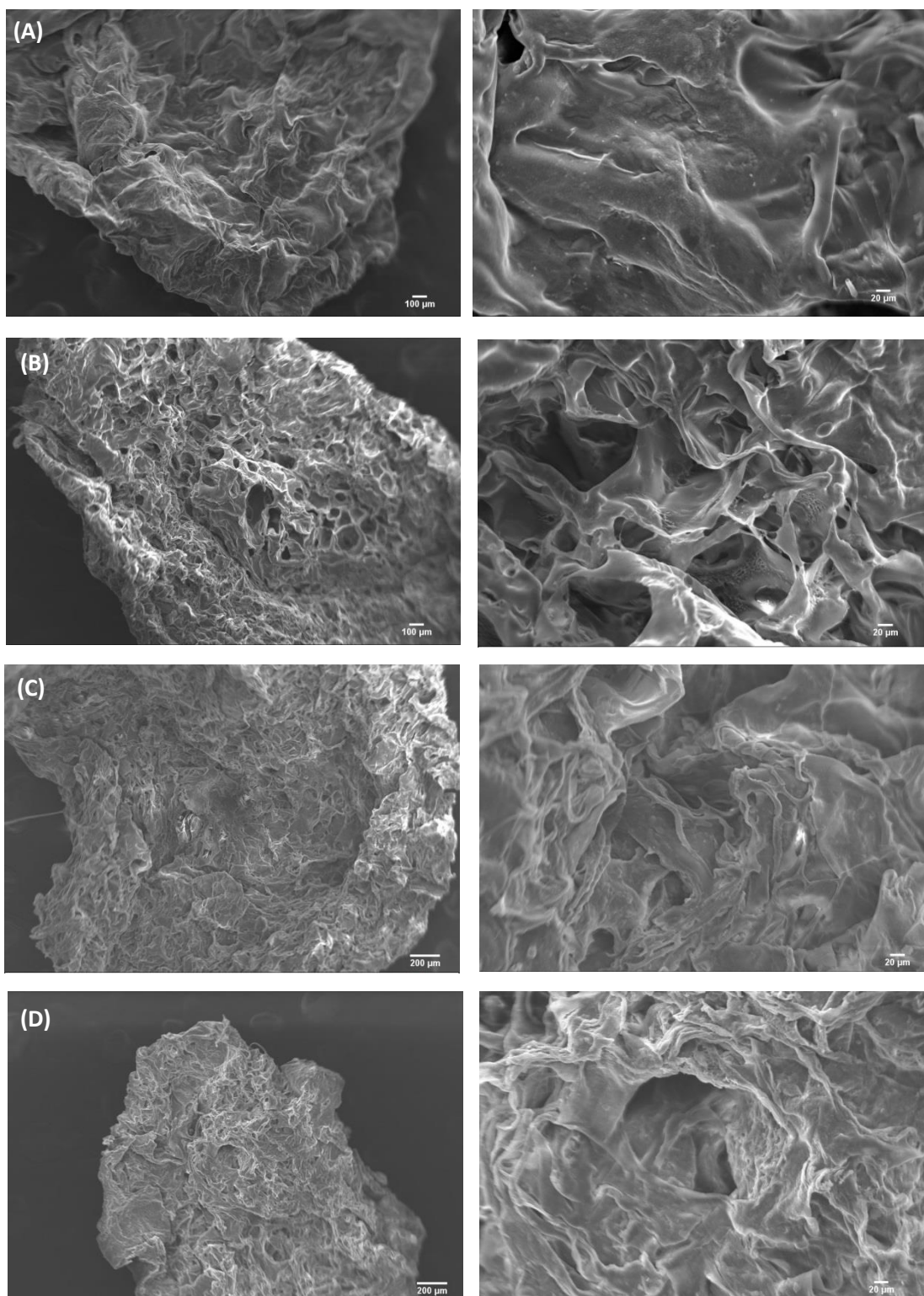


Figura 3: Imagens da MEV da superfície após 28 dias imersão em PBS, em diferentes aumentos das amostras, respectivamente (A) 100Q, (B) 75/25, (C) 50/50 e (D) 25/75.

Avaliação do grau de porosidade das esponjas

A análise do grau de porosidade das esponjas contendo diferentes proporções de quitosana e PCL foi avaliada a partir da mensuração do diâmetro dos poros¹². Pode-se verificar que houve diferença estatisticamente significativa nas proporções de 100Q e 75/25 em relação à 50/50, mostrando que esta proporção obteve os maiores valores de diâmetro dos poros (Figura 4).

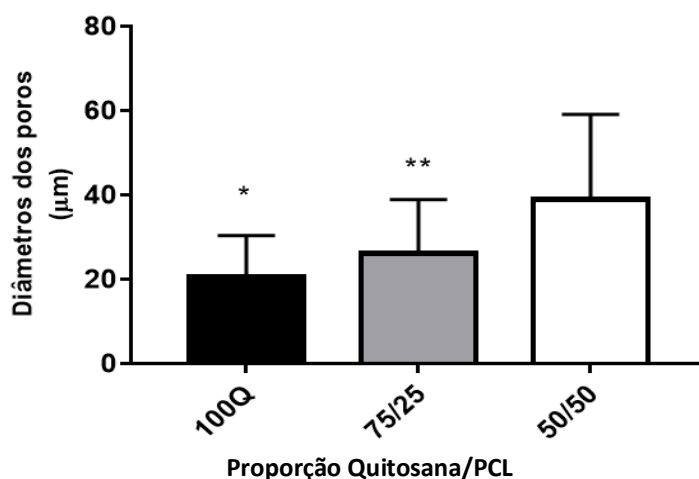


Figura 4 – Mensuração do diâmetro dos poros: valores de acordo com as diferentes proporções de esponjas: $p^* < 0,0001$; $p^{**} < 0,0001$ versus 50/50. (Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn, para medidas não paramétricas).

Além das médias, também foram avaliadas a frequência dos diâmetros dos poros para cada amostra¹³. Para as esponjas de 100Q há um maior número de poros medindo entre 5,22 e 25,22 μm. Na proporção de 75/25 há uma maior predominância de poros medindo entre 12,10 e 32,10 μm, enquanto as de 50/50 obtiveram a maior porcentagem para diâmetros entre 11,47 e 31,47 μm (Figura 5).

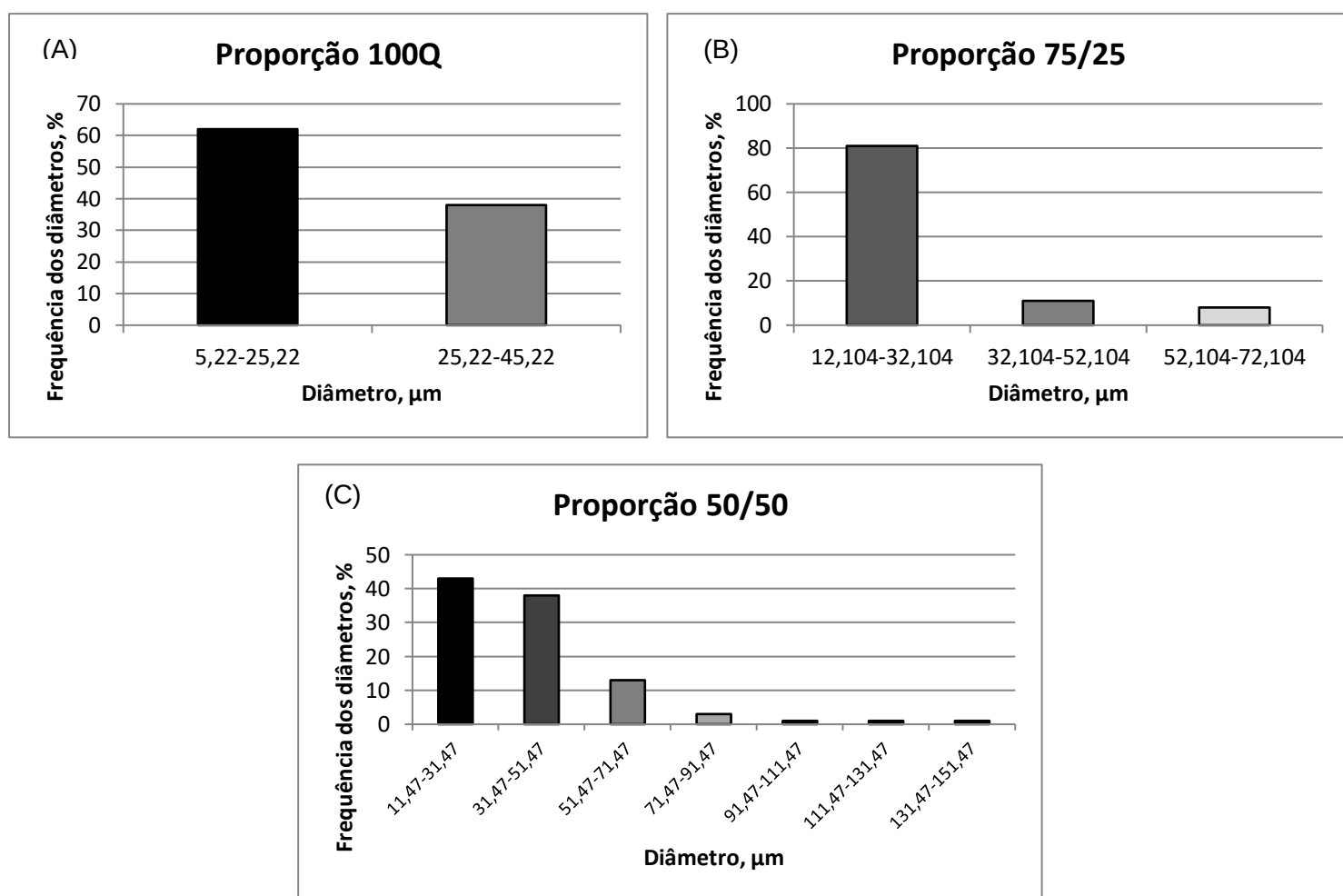


Figura 5: Frequência dos diâmetros dos poros das esponjas contendo diferentes proporções de quitosana/PCL: (A) 100Q, (B) 75/25 e (C) 50/50.

2. Perfilometria

A avaliação do perfil morfológico (análise perfilométrica) baseou-se no parâmetro Ra, que corresponde às médias dos picos e vales da rugosidade horizontal. Comparando-se os valores de Ra, observou-se uma diferença estatisticamente significativa das proporções (100Q; 75/25 e 50/50) em relação à 25/75, tanto na superfície íntegra como seccionada. Essa diferença também foi verificada entre as proporções 100Q e 75/25, assim como entre as amostras 75/25 e 50/50 apenas para as amostras seccionadas, indicando uma maior rugosidade para a esponja 25/75 (Figura 6A e 6B).

Na análise da topografia superficial, foram observadas as medidas de Sa, referente à média dos picos e vales da superfície. Nesta avaliação é possível observar uma tendência de esses valores serem maiores na amostra seccionada do que na superfície da amostra íntegra (Figuras 7 e 8). Com isso, a análise da perfilometria confirma a rugosidade da esponja.

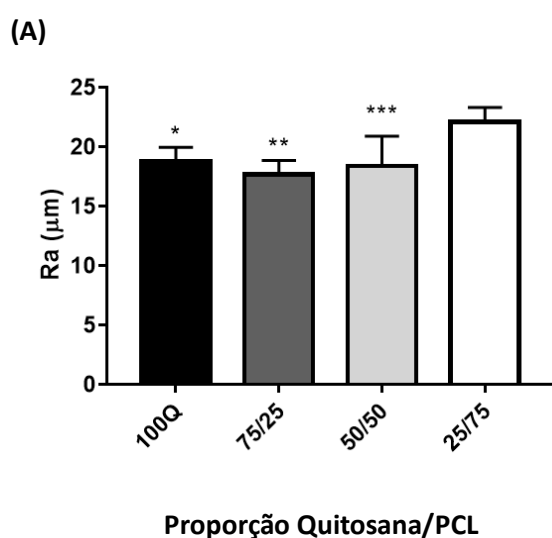


Figura 6A – Perfilometria: valores do Ra de acordo com as diferentes proporções de esponjas íntegras: $p^* = 0,010$; $p^{**} = 0,0007$; $p^{***} = 0,003$ versus 25/75. (one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey)

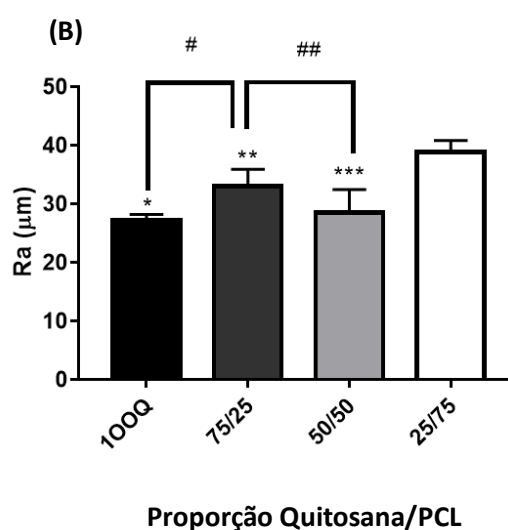


Figura 6B – Perfilometria: valores de Ra de acordo com as diferentes proporções de esponjas seccionadas: $p^* < 0,0001$; $p^{**} = 0,0058$; $p^{***} < 0,0001$ versus 25/75. $p^{\#} = 0,0067$ versus 75/25; $p^{\#\#} = 0,0427$ versus 50/50. (one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey).

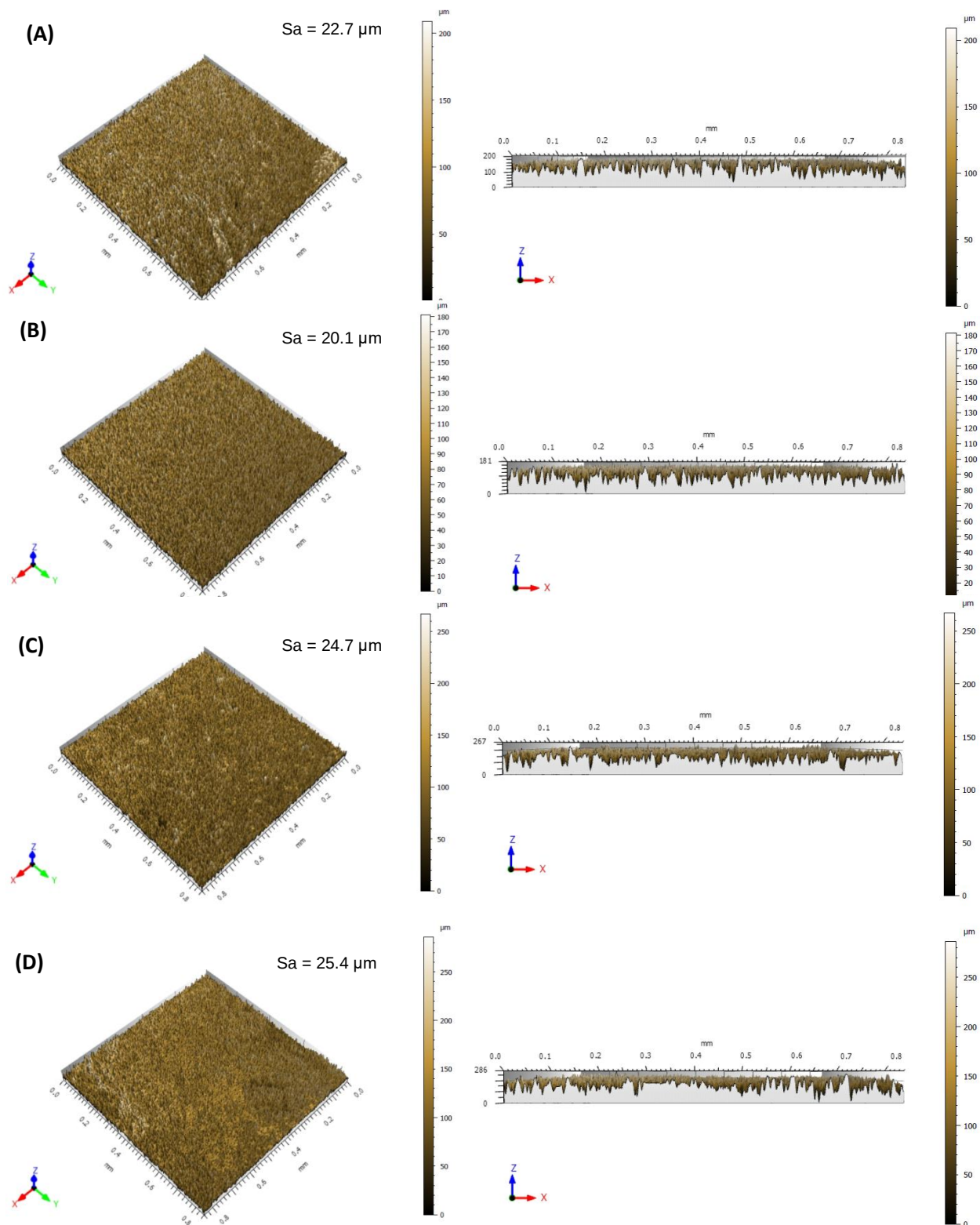


Figura 7: Imagens da perfilometria mostrando o aspecto da superfície e o perfil morfológico das esponjas íntegras nas diferentes proporções de quitosana/PCL: (A) 100 Q; (B) 75/25; (C) 50/50

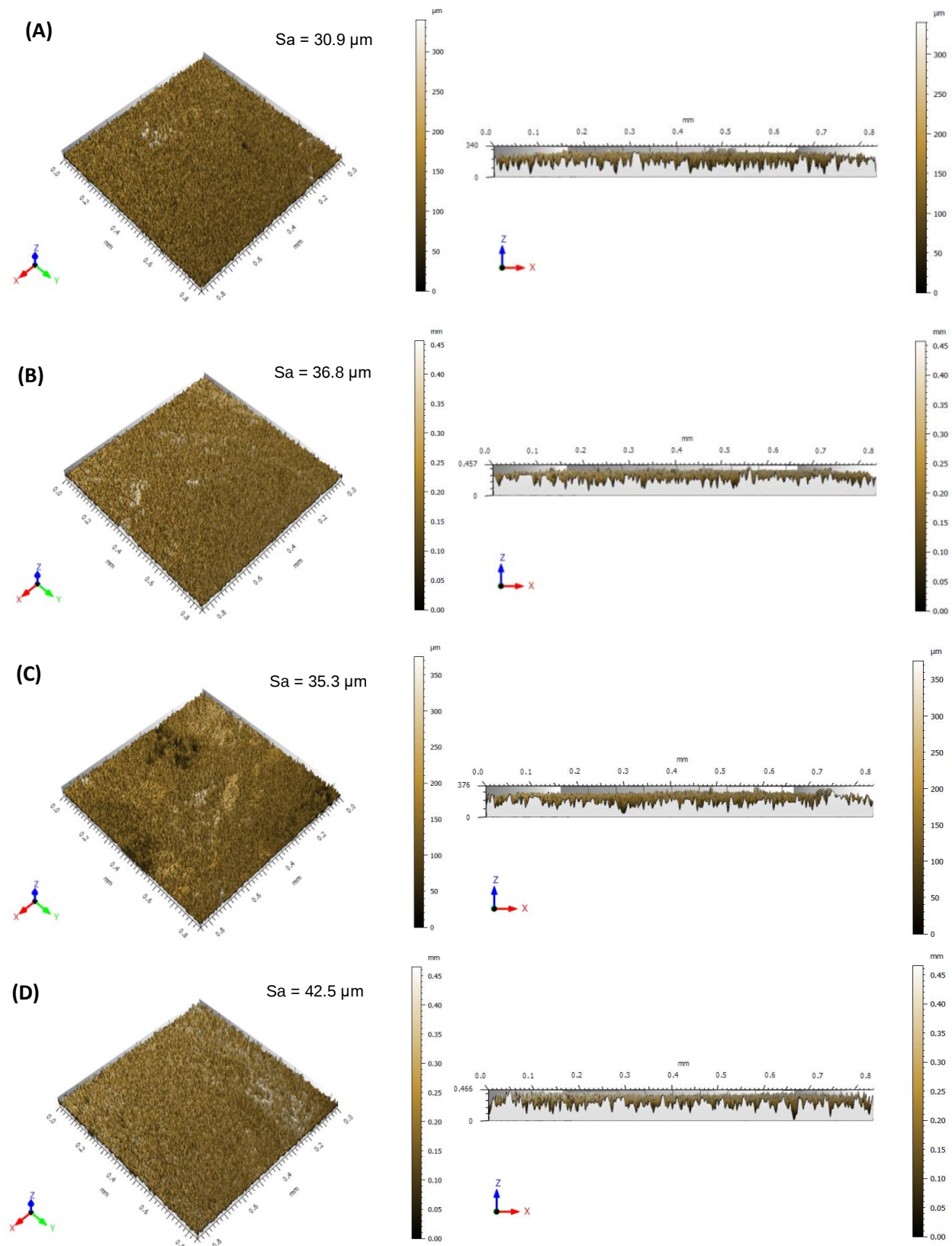


Figura 8: Imagens da perfilometria mostrando o aspecto da superfície e o perfil morfológico da secção transversal das esponjas nas diferentes proporções de quitosana/PCL: (A) 100 Q; (B) 75/25; (C) 50/50 e (D) 25/75.

3. Ângulo de contato

Na avaliação do ângulo de contato, as amostras se apresentaram altamente hidrofílicas de modo que não foi possível mensurar o ângulo entre a gota de água e a superfície das esponjas, em todas as amostras avaliadas. A Figura 9 mostra as imagens anteriores ao gotejamento, imediatamente após o contato e posterior à absorção da gota pelas esponjas de diferentes proporções de quitosana/PCL: 100 quitosana, 75/25, 50/50 e 25/75.

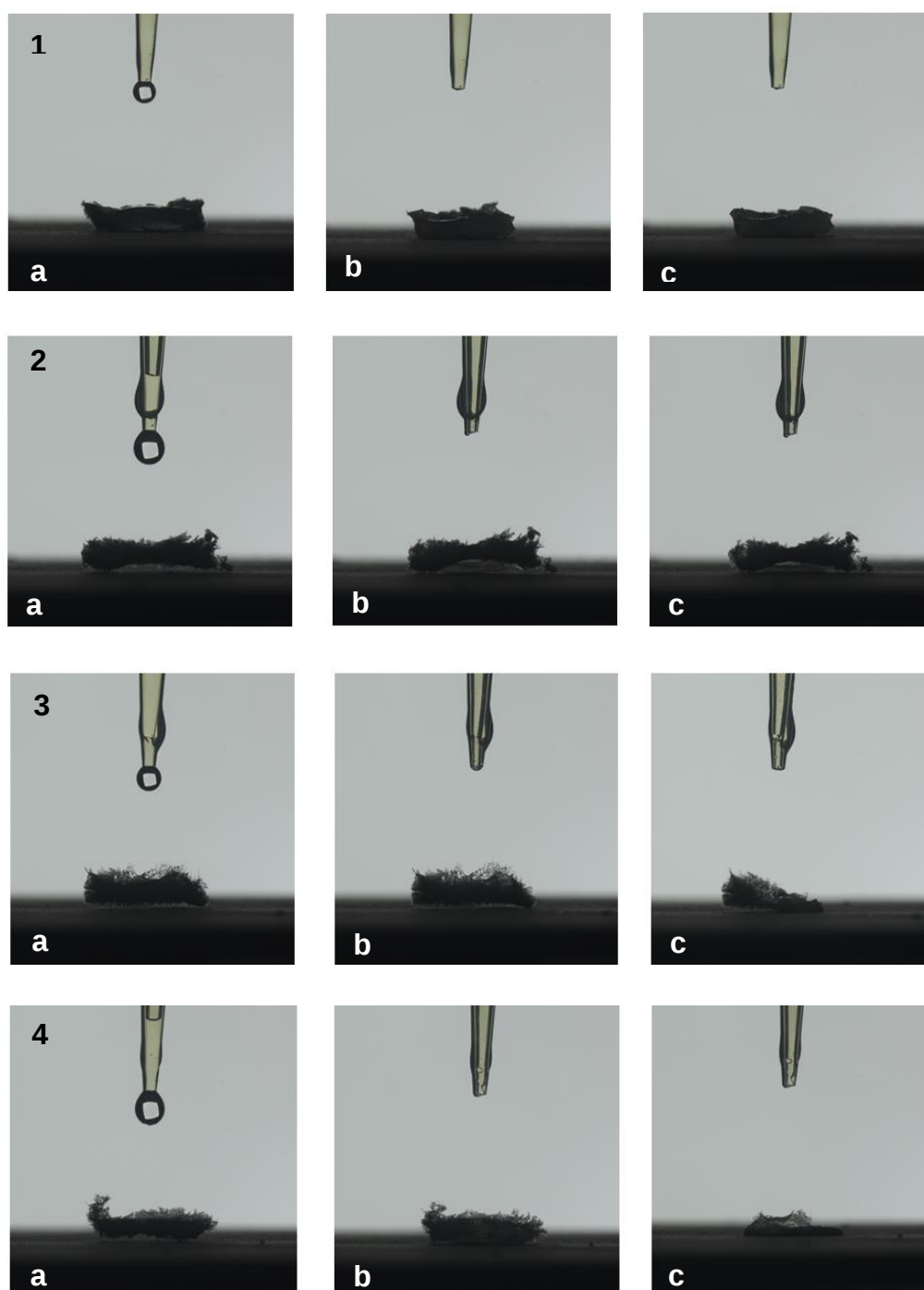


Figura 9: Avaliação do ângulo de contato: Painei 1: 100Q; Painei 2: 75/25; Painei 3: 50/50; Painei 4: 25/75. (a) Imagem antes do gotejamento; (b) Imagem imediatamente ao contato; (c) Imagem após absorção.

4. Degradação em PBS

A perda de massa ou o intumescimento das esponjas indicaram que, para os tempos de imersão de 24h, 48h, 72h e 1 semana, apenas a proporção de 25/75 apresentou um comportamento de intumescimento, enquanto as demais sofreram degradação. O mesmo não foi observado para o tempo de 4 semanas, em que as proporções de 100Q e 50/50 se mantiveram degradando e as de 75/25 e 25/75 intumesceram, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Grau de intumescimento das esponjas contendo diferentes proporções de quitosana/PCL: 100 quitosana (100Q), 75/25, 50/50 e 25/75 de acordo com o período de imersão em PBS.

Amostras	Tempo de imersão				
	t = 24h	t = 48h	t = 72h	t = 1 semana	t = 4 semanas
100Q	-3,9%	-3,91%	-13,64%	-14,84%	-24,18%
75/25	-13,1%	-20,09%	-10,14%	-15,48%	+15,86%
50/50	-28,22%	-16,1%	-23,96%	-6,57%	-6,18%
25/75	+52,08%	+75%	+1,55%	+58,33%	+58,33%

5. Espectroscopia UV-VIS

Na espectroscopia UV-VIS foi encontrado, inicialmente, o comprimento de onda em que ocorre a absorbância de cada constituinte: 195nm para a quitosana e 270nm para o PCL, utilizados como parâmetros na avaliação das alíquotas de PBS em que as esponjas estavam imersas. Nessas amostras, foram encontrados espectros correspondentes à quitosana para todas as proporções avaliadas, indicando que houve liberação desse componente no meio durante o período em que ficaram imersas, como mostram os gráficos abaixo (Figura 10).

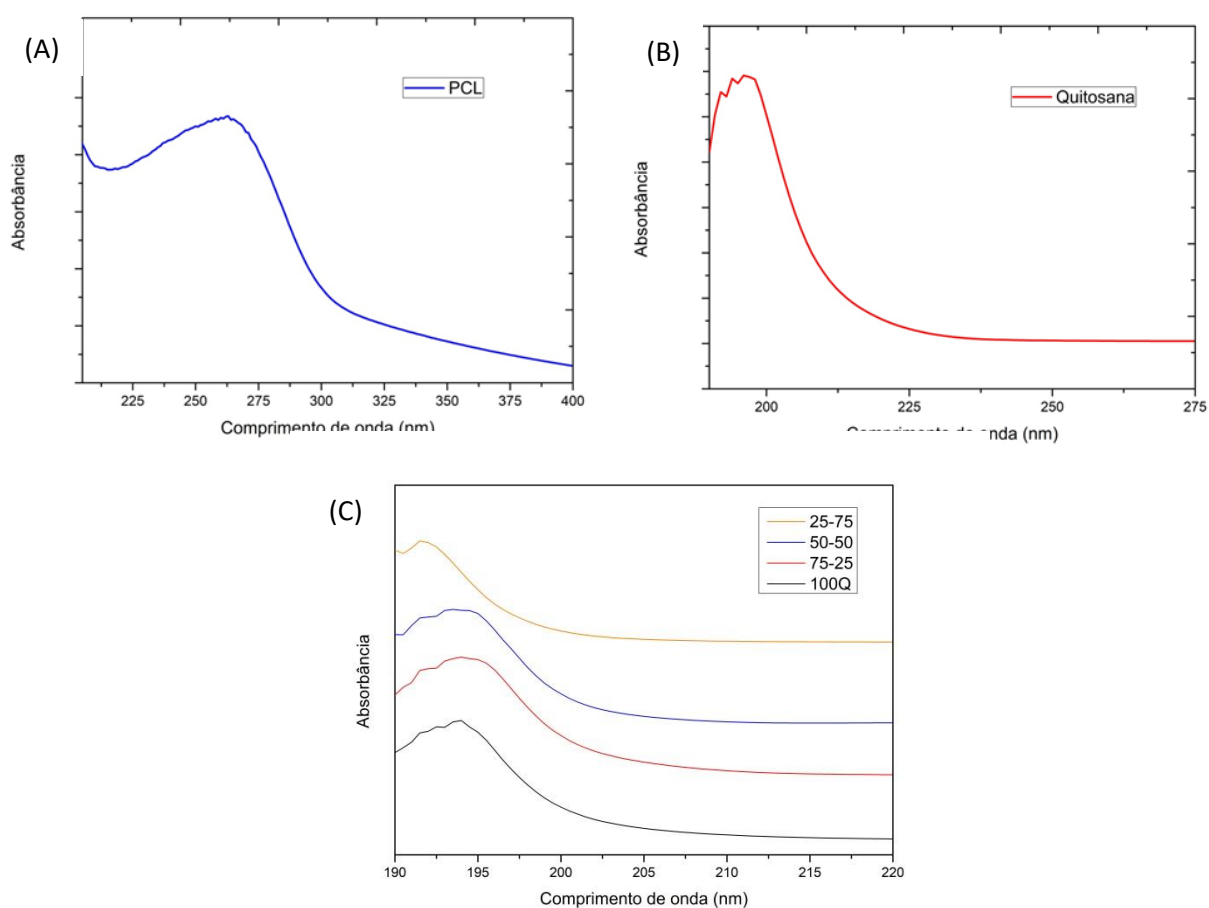


Figura 10: Comprimento de onda do PCL (A); Comprimento de onda da quitosana (B); gráfico referente aos espectros das amostras contendo diferentes proporções de quitosana/PCL: 100Q, 75/25, 50/50 e 25/75 (C).

6. Teste do halo de inibição

A proporção de 25/75 foi excluída da avaliação antimicrobiana, uma vez que os resultados da caracterização, através do MEV e da perfilometria, mostraram um excesso de porosidade, rugosidade, com consequente dificuldade de manipulação da amostra, além de apresentar pequena quantidade de quitosana, o polímero que apresenta bioatividade.

Através da formação do halo de inibição verificou-se atividade antimicrobiana das amostras sobre a cepa de *S. sobrinus*, obtendo-se as seguintes médias dos halos para cada proporção de esponja: 9,75 mm para 100Q; 9,57 mm para a proporção 75/25 e 9,83 mm para as esponjas do grupo 50/50. Para o controle positivo, observou-se a média de 21,6 mm do halo de inibição.

Essa mesma atividade não foi observada para as cepas *S. sanguinis* e *S. oralis*, pois não ocorreu a formação de halo de inibição em nenhuma das proporções de esponjas avaliadas. No entanto, observou-se formação de halo de inibição nas placas do controle com a clorexidina (Figuras 11A e 11B).

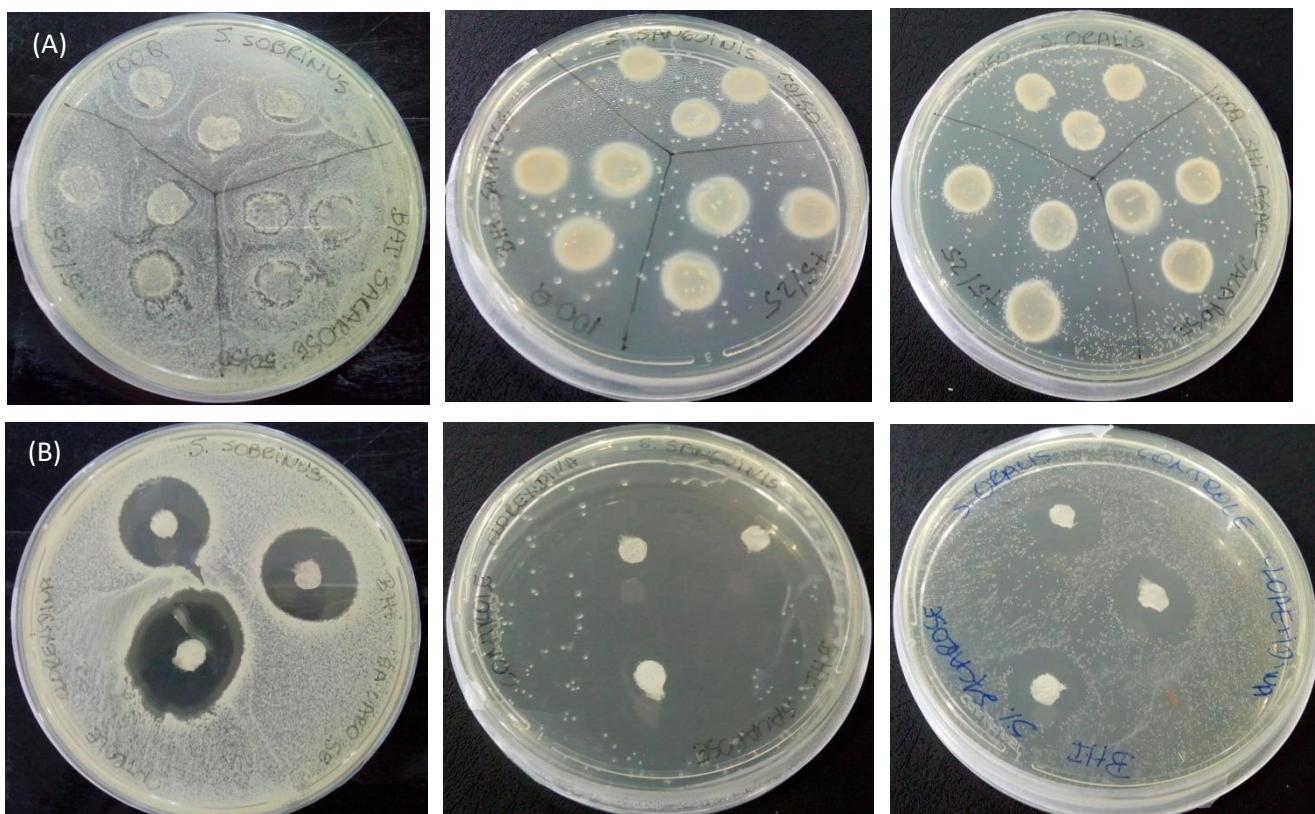


Figura 11: (A) Teste do halo de inibição com esponjas em diferentes proporções, com as cepas, *S. sobrinus*, *S. sanguinis* e *S. oralis*, respectivamente. (B) Controle positivo (clorexidina) com as respectivas cepas.

7. Macrodiluição

A macrodiluição avaliou a inibição do crescimento no meio e a seguir na própria esponja. Dentre os micro-organismos testados na análise do meio, observa-se que houve diferença estatisticamente significativa para o *S. mutans* entre 75/25 e 50/50 em relação ao controle, indicando que estas proporções foram capazes de reduzir as UFCs, e para o *S. sanguinis* todas as proporções avaliadas apresentaram redução das UFC/mL comparado ao controle (Figura 12A e 12B).

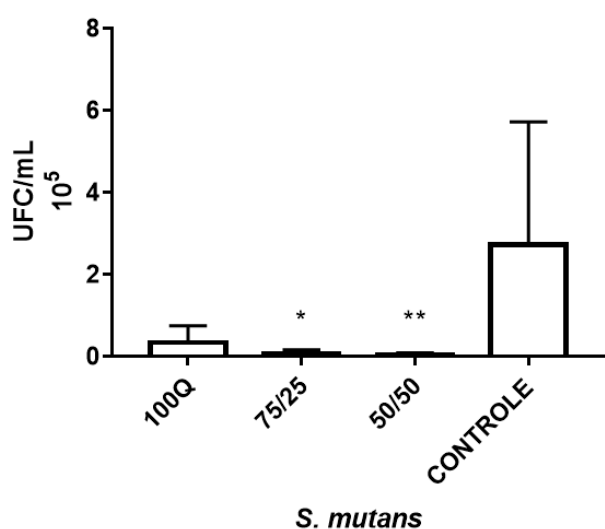


Figura 12A – Macrodiluição: valores de UFC/mL para *S. mutans* de acordo com as diferentes proporções de esponjas: $p^* = 0,0293$; $p^{**} = 0,0270$ vs controle (one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey).

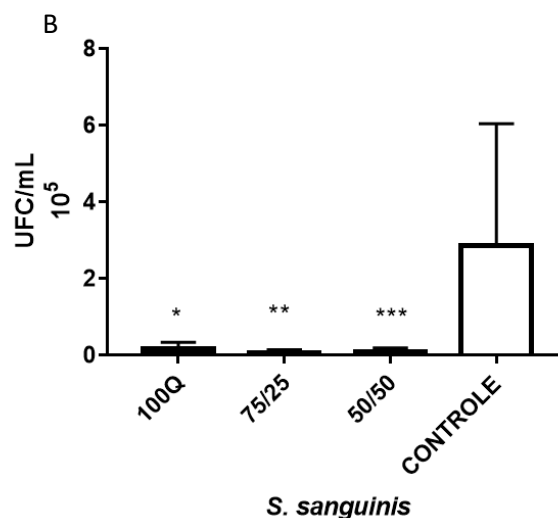


Figura 12B – Macrodiluição: valores de UFC/mL para *S. sanguinis* de acordo com as diferentes proporções de esponjas: $p^* = 0,0388$; $p^{**} = 0,0315$; $p^{***} = 0,0330$ vs controle. (one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey).

Para a análise da inibição do crescimento dos inóculos nas esponjas foi observado que houve diminuição das UFC/mL para o *S. mutans* em todas as proporções avaliadas, sendo verificada na de 100Q a maior inibição. Para o *S. sanguinis*, houve redução para as proporções de 100Q e 75/25, com exceção da proporção 50/50, a qual apresentou crescimento exacerbado na esponja, apesar de no meio ter ocorrido redução (Figura 13).

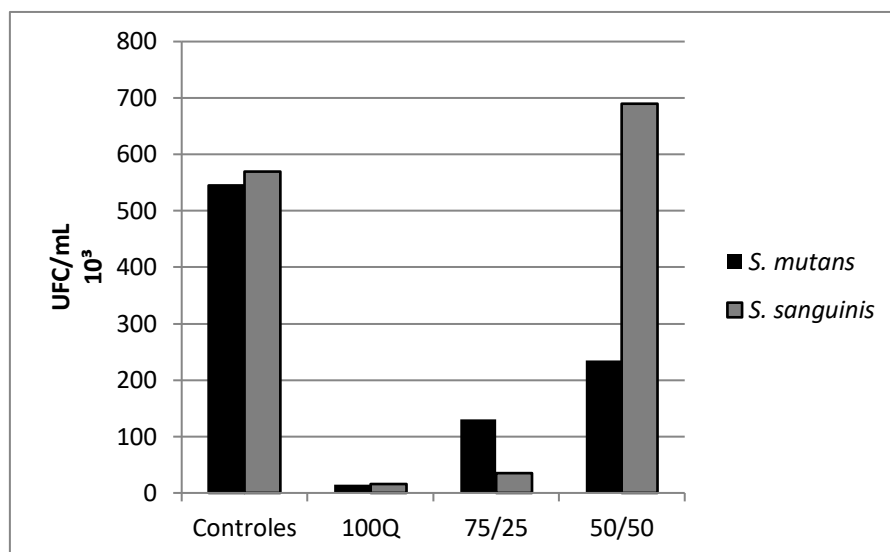


Figura 13: Gráfico da UFC/mL dos controles dos micro-organismos *S. mutans* e *S. sanguinis* e das diferentes proporções 100Q, 75/25 e 50/50.

DISCUSSÃO

O presente estudo realizou a caracterização de esponjas de diferentes proporções de quitosana/PCL e, através do MEV, perfilometria e ângulo de contato, demonstrou aspectos como porosidade, rugosidade, hidrofiliicidade e perfil de liberação suficientes para sua utilização como *scaffold*.

A MEV (Figuras 1 e 2) demonstra uma relação entre o aumento na quantidade de poros e o aumento da proporção de PCL nas amostras. Além disso, a incorporação de PCL induziu também o aumento da dimensão desses poros, como observado na proporção de 50/50, a qual obteve a maior média de diâmetro (Figura 4). Este aumento da porosidade com a adição de PCL deve ser avaliado com cautela, uma vez que é preciso ter uma quantidade de quitosana na amostra que apresente bioatividade, ao mesmo tempo em que a quantidade de poros também seja suficiente para melhorar as propriedades do *scaffold*, mas não aumente sua fragilidade e dificulte sua manipulação (situação observada na esponja de 25/75).

Também foi possível observar a morfologia da superfície mais densa na amostra 100Q, como mencionado também no estudo de Ikeda et al.¹², o qual avaliou esponjas de quitosana nas concentrações de 1, 2 ou 4% em peso como *scaffolds* e observou uma tendência de diminuição dos poros com o aumento da concentração de quitosana e uma predisposição à drástica redução da porosidade no acréscimo de até 10% em peso devido à elevada viscosidade da solução.

Xing et al.¹⁴ caracterizaram esponjas de quitosana micro-nano-fibrosas com e sem solvente ternário (THF) para adsorção de corantes e obtiveram como resultado uma estrutura em camadas lamelares nas amostras compostas apenas por quitosana, verificando-se que a introdução de THF induziu a desorganização da estrutura, impedindo a formação de camadas contínuas. Esse mesmo padrão lamelar na esponja de quitosana pura, mas de baixa massa molar, foi observado em nosso estudo, onde a adição de PCL reduziu as camadas lamelares e induziu a formação de uma maior quantidade de poros mais definidos.

Neste sentido, a adição de PCL à esponja é vantajosa considerando que, para o material ser considerado um *scaffold*, este deve apresentar como característica marcante a interconectividade dos poros para que seja possível a infiltração celular, assim como a troca de nutrientes e gases¹². Além disso, é

necessário também que ocorra adesão celular às esponjas, para que seja possível uma futura aplicação deste biomaterial na engenharia tecidual, o que deve ser avaliado em estudos futuros.

Na avaliação da rugosidade das esponjas observou-se uma predisposição de os valores de S_a aumentarem de acordo com o acréscimo de PCL nas amostras, com os maiores valores de R_a encontrados nas amostras de superfícies seccionadas (Figuras 6, 7 e 8) indicando que a porção interna das esponjas apresenta maior rugosidade comparada à superfície. Há indícios de que o aumento da rugosidade, visualizada com a presença de picos e vales, esteja relacionado à porosidade observada através do MEV, assim como a presença de PCL nas amostras. Valores de referência desses parâmetros em esponjas de quitosana/PCL não foram encontrados na literatura, o que inviabiliza a comparação dos achados encontrados no presente estudo.

A hidrofiliidade é um aspecto relevante para um biomaterial com aplicação na engenharia tecidual, pois interfere na adesão celular, proliferação, assim como na interação com os tecidos⁴. O parâmetro utilizado para avaliar essa característica é a medida do ângulo de contato, o qual é inversamente proporcional à hidrofiliidade. A ausência de ângulo de contato foi observada em todas as proporções de esponjas avaliadas, refletindo o caráter altamente hidrofílico das amostras, característica que amplia sua interação com os tecidos, em futura aplicação como *scaffold* (Figura 9). Essa hidrofiliidade elevada pode ser atribuída tanto à quantidade de poros, observada no MEV, como também à presença de grupos aminos hidrofílicos da quitosana, conforme demonstrado por Li et al.¹⁵. Neste estudo, nanofibras de dupla camada de quitosana/PCL foram sintetizadas para aplicações em curativos multifuncionais. Observou-se nessas fibras um alto valor de ângulo de contato para a primeira camada composta de PCL, refletindo seu caráter hidrofóbico e baixo valor para a quitosana e confirmando seu comportamento hidrofílico devido à presença de grupos aminos, os quais lhe conferem essa característica.

Além disso, Yodkhum, Phaechamud¹⁶ desenvolveram esponjas hidrofóbicas de quitosana modificadas por monoestearato de alumínio para liberação controlada de drogas. Com isso, avaliaram a velocidade da penetração da água em função do tempo e perceberam que o caráter hidrofílico ou hidrofóbico dos materiais influenciava nesse movimento. A estrutura porosa ocasionou o decréscimo do

ângulo de contato, embora na esponja de quitosana hidrofílica a penetração da água tenha sido mais rápida quando comparada ao sistema hidrofóbico com monoestearato de alumínio. Isso demonstra que a porosidade pode estar associada à redução do ângulo de contato e a hidrofilicidade tanto à redução como à velocidade em ela ocorre.

A análise da degradação permite avaliar se a quitosana presente na amostra é liberada no meio. Esta foi calculada como porcentagem de intumescimento baseada nos pesos das esponjas de acordo com o tempo de imersão no PBS (Tabela 1). A utilização desse cálculo é descrita na literatura para os materiais poliméricos, uma vez que o intumescimento é uma propriedade dos materiais porosos e hidrofílicos^{17,18}. O peso inicial foi obtido através do peso úmido, imergindo rapidamente a amostra em PBS, pois o peso seco não foi detectado na balança analítica. Esse fato indica que há para todas as esponjas um intumescimento rápido. Além do intumescimento inicial, foi verificado também o ganho de peso para a proporção de 25/75 em todos os tempos avaliados, além das amostras 75/25 e 25/75 apresentarem esse mesmo comportamento no período final de 4 semanas.

Dessa forma, além da porosidade aumentada através da incorporação do PCL nas esponjas, que determina a elevada capacidade de intumescer, a quitosana apresenta alta hidrofilicidade, aumentando sua capacidade de absorver água, além da molhabilidade por solventes polares como o PBS. Estes são, portanto, aspectos importantes para o fluxo de nutrientes cruciais na proliferação celular necessária para aplicação na engenharia de tecidos⁹. Isso justifica o intumescimento apresentado na proporção de 25/75 para todos os tempos (esponja que possui a maior porosidade). Esta observação também confirma a ausência de ângulo de contato, o qual demonstra o caráter altamente poroso e hidrofílico das esponjas avaliadas. As demais proporções apresentaram perda de peso com o tempo, sugerindo uma possível degradação, avaliada através do UV-VIS.

Já o espectro do PBS em que as amostras ficaram imersas (avaliado no UV-VIS) foi semelhante ao comprimento de onda em que ocorre a absorbância da quitosana (Figura 10). Isso demonstra que ocorreu a liberação deste polímero no meio no tempo avaliado de 28 dias. O perfil de liberação observado nesse estudo condiz com o encontrado por Banerjee et al.⁴, que afirmam que o pico característico da quitosana de 200nm é devido à porção glucosamina, embora seja divergente ao encontrar um pico extra próximo a 300nm (explicado pela oxidação ocasionada pela

exposição à radiação ultra-violeta, formando cromóforos como carbonila e grupos amino), o qual não foi encontrado em nossa análise.

A atividade antimicrobiana da quitosana é bem relatada na literatura, sobretudo na forma de nanopartículas em solução^{19,20,21}. Li et al.¹⁵, através do método do halo de inibição por esgotamento para as cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* conseguiram essa atividade com a incorporação da mupirocina, um antibacteriano, na primeira camada da fibra, assim como na segunda camada contendo quitosana.

De forma semelhante, esponjas de quitosana com e sem adição de tetraciclina ou extrato de aloe vera para curativos foram testadas contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* por difusão em ágar. Como resultado, foram observados menores halos de inibição nas amostras compostas apenas por quitosana em comparação às demais contendo tetraciclina, um antibacteriano bem estabelecido, o qual contribuiu significativamente para a potencialização da atividade antimicrobiana¹⁰. Do mesmo modo, em nosso estudo, observou-se uma pequena inibição apenas para a cepa *S. sobrinus* usando metodologia semelhante por inundação (Figura 11).

Entretanto, no teste de macrodiluição realizado após incubação das esponjas por sete dias observou-se uma melhor ação antimicrobiana, com forte inibição do crescimento de *S. mutans* e *S. sanguinis*. Isso significa que, para que ocorra atividade antimicrobiana da quitosana, esta deve ser liberada no meio através da degradação temporal da esponja (conforme visualizado no teste de degradação em PBS). A menor inibição dos micro-organismos no teste do halo de inibição provavelmente se deve ao fato de a quitosana encontrar-se aprisionada na estrutura da esponja. Nesta condição, o uso destas esponjas seria favorável como um dispositivo de liberação da quitosana e outra droga que venha a ser incorporada para melhorar sua bioatividade.

Neste contexto, é importante ressaltar que alguns fatores afetam na eficácia da ação bactericida da quitosana, como: a espécie de micro-organismo, a concentração e a hidrofiliidade da quitosana, o peso molecular, pH e a temperatura do meio, bem com sua forma de apresentação²². Pode-se, dessa forma, inferir que alguma dessas condições tenha influenciado a atividade das esponjas, possivelmente a concentração da quitosana e a forma de apresentação, uma vez que esse polímero em solução apresenta maior eficácia na inibição do crescimento

bacteriano, quando comparado ao seu estado sólido (como fibras, filmes, membranas e esponjas) que apresentam uma menor superfície de contato com o meio.

Diante disso, embora a literatura relate o efeito antimicrobiano da quitosana, observa-se nos estudos a inserção de algum agente antibacteriano para potencializar esse efeito desejado nos biomateriais. Portanto, apesar de a esponja a base de PCL e quitosana apresentar características morfológicas interessantes para seu uso como *scaffold*, se faz necessária a incorporação de uma substância com ação antimicrobiana e/ou anti-inflamatória, bem como a realização de maiores testes *in vitro* e *in vivo* confirmando estas atividades, visando sua futura aplicação na odontologia, como material capeador.

CONCLUSÃO

A caracterização das esponjas contendo diferentes proporções de quitosana e PCL demonstrou aspectos como: porosidade, conectividade entre os poros, rugosidade, hidrofiliicidade e perfil de liberação de quitosana satisfatórios para a sua utilização como *scaffold*. Dentre as esponjas avaliadas, a proporção de 50/50 apresentou melhor distribuição da porosidade, maior diâmetro dos poros, altos valores de rugosidade, maior degradação no período de uma semana. Uma melhor ação antimicrobiana foi observada no teste de macrodiluição realizado após incubação prévia das esponjas para liberação da quitosana da blenda polimérica, sugerindo sua efetividade como dispositivo de liberação da quitosana. Novos estudos com intuito de incorporar fatores com potencial antimicrobiano e/ou anti-inflamatório são necessários para o aprimoramento desses *scaffolds* visando futura aplicação no tratamento e regeneração tecidual em infecções orais.

REFERÊNCIAS

1. Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for Dental Pulp Tissue Engineering. *Adv Dent Res*. 2011; 23(3): 333–339.
2. Jiang T, Kumbar SG, Nair LS, Laurencin CT. Biologically Active Chitosan Systems for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2008; 8(4): 354–364.
3. Upadhyaya L, Singh J, Agarwal V, Tewari RP. The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications. *J Control Release*, 2014.
4. Banerjee S, Bagchia B, Bhandary S, Kool A, Hoque NA, Biswas P, et al. Antimicrobial and biocompatible fluorescent hydroxyapatite-chitosan nanocomposite films for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018; 171: 300–307.
5. Di Martino A, Sittlinger M, Risbud MV. Chitosan : A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 2005; 26: 5983–5990.
6. Wan Y, Xiao B, Dalai S, Cao X, Wu Q. Development of polycaprolactone /chitosan blend porous scaffolds. *J Mater Sci: Mater Med*. 2009; 20: 719–724.
7. Soares DG, Anovazzi G, Bordini EAF, Zuta UO, Leite MLAS, Basso FG, et al. Biological Analysis of Simvastatin-releasing Chitosan Scaffold as a Cell-free System for Pulp-dentin Regeneration. *Basic Research—Biology*. 2018.
8. Straioto FG, Filho APR, Neto AJF, Cury AADB. Polytetrafluoroethylene added to acrylic resin: surface properties and *Candida albicans* adherence. *Am J Dent*. 2010;23(4):201–4.
9. Kaczmarek B, Sionkowska A, Kozłowska J, Osyczka, AM. New composite materials prepared by calcium phosphate precipitation in chitosan/collagen/hyaluronic acid sponge cross-linked by EDC/NHS. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017; 107: 247–253.
10. Anbazhagan S, Thangavelu KP. Application of tetracycline hydrochloride loaded-fungal chitosan and Aloe vera extract based composite sponges for wound dressing. *Journal of Advanced Research*. 2018; 14: 63–71.
11. CLSI. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically; Approved Standard – Tenth Edition. 2015; 35(2):1-87.

12. Ikeda T, Ikeda K, Yamamoto K, Ishizaki H, Yoshizawa Y, Yanagiguchi K, et al. Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a TissueEngineering Scaffold. *BioMed Research International*. 2014.
13. Rodrigues SC, Salgado CL, Sahu A, Garcia MP, Fernandes MH, Monteiro FJ. Preparation and characterization of collagen-nanohydroxyapatite biocomposite scaffolds by cryogelation method for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res Part A*. 2012:00A.
14. Xing J, Wang X, Xun J, Peng J, Xu Q, Zhang W, et al. Preparation of micro-nanofibrous chitosan sponges with ternary solvents for dye adsorption. *Carbohydrate Polymers*. 2018; 198: 69–75.
15. Li X, Wang C, Yang S, Liu P, Zhang B. Electrospun PCL/mupirocin and chitosan/lidocaine hydrochloride multifunctional double layer nanofibrous scaffolds for wound dressing applications. *International Journal of Nanomedicine*. 2018; 13: 5287–5299.
16. Yodkhum K, Phaechamud T. Hydrophobic chitosan sponges modified by aluminum monostearate and dehydrothermal treatment as sustained drug delivery system. *Materials Science and Engineering C*. 2014; 42: 715–725.
17. Shi Q, Qian Z, Liu D, Sun J, Wang X, Liu H, et al. GMSC-Derived Exosomes Combined with a Chitosan/Silk Hydrogel Sponge Accelerates Wound Healing in a Diabetic Rat Skin Defect Model. *Front Physiol*. 2017; 8.
18. Farias S, Boateng JS. Development and functional characterization of composite freeze dried wafers for potential delivery of low dose aspirin for elderly people with dysphagia. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018.
19. Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*. 2009; 2(2): 186–201.
20. El-Sherbiny I, Salih E, Reicha F. New trimethyl chitosan-based composite nanoparticles as promising antibacterial agents. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015; 42(5): 720–729.
21. Shariatnia Z. Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018; 120: 1406–1419.
22. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 144: 51–63.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A caracterização das esponjas de quitosana/PCL, através do MEV, perfilometria e ângulo de contato, demonstrou aspectos como porosidade, rugosidade, hidrofiliabilidade e perfil de liberação suficientes para a sua utilização como *scaffold*.

Dentre as proporções de esponjas analisadas, constatou-se que a de 25/75 apresentou porosidade excessiva e fragilidade para a sua utilização nos experimentos, sendo por isso, descartada. A amostra de 100Q, embora contenha a maior concentração do polímero com bioatividade, apresentou poros irregulares e baixa porosidade em sua superfície. As esponjas de 75/25 apresentaram boa associação das características físicas com a atividade antimicrobiana (apesar de reduzida), embora a proporção de 50/50 possua a maior regularidade nos poros, o maior diâmetro e uma maior degradação, com potencial por ter apresentado redução das UFCs nos micro-organismos testados. Essa maior inibição dos micro-organismos na macrodiluição se deve ao fato de a quitosana ser liberada no meio após a incubação prévia das amostras, enquanto no teste do halo de inibição, a quitosana encontra-se aprisionada na estrutura da esponja. Muitos estudos mostram a associação de fibras ou esponjas à base de quitosana a drogas com comprovada ação antimicrobiana, potencializando sua efetividade.

Neste contexto, serão necessárias novas pesquisas para incorporação de uma substância que confira atividade antimicrobiana e/ou anti-inflamatória, assim como fatores determinantes no reparo tecidual para a aplicação clínica. Além disso, devem ser realizados estudos *in vitro* para avaliar a citotoxicidade, capacidade de adesão e proliferação celular, bem como a produção de mediadores inflamatórios, em diferentes tipos celulares (como: células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos e fibroblastos) na presença das esponjas, para posterior realização de estudos *in vivo* e possível avanço para uso clínico em odontologia.

2. CONCLUSÃO

Dessa forma, as esponjas caracterizadas nessa pesquisa obtiveram aspectos como, porosidade, rugosidade, hidrofiliicidade e perfil de liberação de quitosana relevantes para a sua utilização como *scaffold*. Dentre as esponjas avaliadas, a proporção de 50/50 se destacou das demais, por apresentar melhor distribuição da porosidade, maior diâmetro dos poros, altos valores de rugosidade e a maior degradação no período de uma semana. Uma melhor ação antimicrobiana foi observada no teste de macrodiluição realizado após incubação prévia das esponjas para liberação da quitosana da blenda polimérica. Novos estudos com intuito de incorporar fatores com potencial antimicrobiano e/ou anti-inflamatório são necessários para o aprimoramento desses *scaffolds* visando futura aplicação no tratamento e regeneração tecidual em infecções orais.

3. REFERÊNCIAS

1. Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for Dental Pulp Tissue Engineering. *Adv Dent Res*. 2011; 23(3): 333–339.
2. Jiang T, Kumbar SG, Nair LS, Laurencin CT. Biologically Active Chitosan Systems for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2008; 8(4): 354–364.
3. Upadhyaya L, Singh J, Agarwal V, Tewari RP. The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications. *J Control Release*, 2014.
4. Banerjee S, Bagchia B, Bhandary S, Kool A, Hoque NA, Biswas P, et al. Antimicrobial and biocompatible fluorescent hydroxyapatite-chitosan nanocomposite films for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018; 171: 300–307.
5. Ikeda T, Ikeda K, Yamamoto K, Ishizaki H, Yoshizawa Y, Yanagiguchi K, et al. Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a TissueEngineering Scaffold. *BioMed Research International*. 2014.
6. Anitha A, Sowmya S, Kumar PTS, Deepthi S, Chennazhi KP, Ehrlich H, et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2014.
7. Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T. Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. *Journal of Surgical Research*. 2006; 133(2): 185–192.
8. Pavez L, Tobar N, Chacón C, Arancibia R, Martínez C, Tapia C, et al. Chitosan-triclosan particles modulate inflammatory signaling in gingival fibroblasts. *J Periodont Res*. 2017: 1–8.
9. Costa PF, Vaquette C, Zhang Q, Reis RL, Ivanovski S, Hutmacher DW. Advanced tissue engineering scaffold design for regeneration of the complex hierarchical periodontal structure. *J Clin Periodontol*. 2014; 41(3): 283–294.
10. Suarato G, Bertorelli R, Athanassiou A. Borrowing From Nature: Biopolymers and Biocomposites as Smart Wound Care Materials. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2018; 6(137).
11. Rasool, A., Ata, S., & Islam, A. Stimuli responsive biopolymer (chitosan) based blend hydrogels for wound healing application. *Carbohydrate Polymers*. 2018.
12. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its

- relationship with community biomass and inflammation. *The ISME Journal*. 2013; 7: 1016–1025.
13. Bartold PM, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontology 2000*. 2017; 75: 317–329.
 14. Di Martino A, Sittlinger M, Risbud MV. Chitosan : A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 2005; 26: 5983–5990.
 15. Wan Y, Xiao B, Dalai S, Cao X, Wu Q. Development of polycaprolactone /chitosan blend porous scaffolds. *J Mater Sci: Mater Med*. 2009; 20: 719–724.
 16. Soares DG, Anovazzi G, Bordini EAF, Zuta UO, Leite MLAS, Basso FG, et al. Biological Analysis of Simvastatin-releasing Chitosan Scaffold as a Cell-free System for Pulp-dentin Regeneration. *Basic Research—Biology*. 2018.
 17. Thein-Han WW, Misra RDK. Biomimetic chitosan – nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2009; 5(4): 1182–1197.
 18. Tsuchiya N, Sato S, Kigami R, Kawano E, Takane M, Arai Y, et al. Effect of a chitosan sponge impregnated with platelet-derived growth factor on bone augmentation beyond the skeletal envelope in rat calvaria. *Journal of Oral Science*. 2014; 56(1): 23-28.