



ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO NAS CARACTERÍSTICAS DE MEMBRANAS DE BIOPOLÍMEROS COM AS CARGAS BIOATIVAS: FOSFATO DE CÁLCIO E ÓXIDO DE ZINCO

Palavras-Chave: QUITOSANA, ACETATO DE CELULOSE, *SCAFFOLDS*, ELETROFIAÇÃO, CARGAS BIOATIVAS

Autores(as):

LUANA TESSAROLI DA SILVA, FEQ – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). ANA RITA MORALES, FEQ - UNICAMP

INTRODUÇÃO

O osso humano é um tecido altamente vascularizado e dinâmico capaz de crescer e se auto-regenerar. Trata-se de um tecido ativo responsável por diversas funcionalidades no organismo humano, atuando na proteção de órgãos vitais e na promoção da estabilidade do corpo (MORENO, 2014). Diante de sua importância, fraturas e defeitos nos ossos provenientes de traumas e patologias constituem um problema de saúde global devido aos altos custos dos enxertos ósseos, majoritariamente utilizados nos tratamentos. Além do mais, o elevado risco de infecções e a possibilidade de rejeição são fatores também limitantes ao uso dos enxertos (VALLEJO, 2014).

Nesse cenário, a engenharia de tecidos surgiu como uma alternativa capaz de propor soluções para estes problemas através do desenvolvimento de *scaffolds*. Tais estruturas viabilizam a fixação e proliferação celular, além de proverem suporte mecânico para o desenvolvimento do tecido lesado. Dentre os diversos materiais utilizados na produção de *scaffolds* voltados à regeneração óssea, destacam-se os polímeros, tanto naturais quanto sintéticos, e as cerâmicas (VALLEJO, 2014).

Esses materiais podem ser obtidos por meio de diversas técnicas, sendo a eletrofiação um procedimento bastante utilizado devido à sua capacidade de produzir fibras de diâmetro controlado e fornecer estruturas porosas de elevada área superficial (RAYMUNDO, 2017).

Especificamente para a regeneração óssea, o emprego de cargas bioativas faz-se necessário para promover a formação e desenvolvimento do tecido. Os materiais utilizados para este fim são, principalmente, as cerâmicas bioativas, como hidroxapatita (HA), fosfato de cálcio, biovidro (*bioglass*) e suas combinações com polímeros biodegradáveis. Estes materiais promovem a formação de uma camada de HA que é biologicamente ativa e similar à porção inorgânica do tecido ósseo, agindo como regiões de interface entre os tecidos (REZWAN et al., 2006).

Uma questão relevante a ser considerada é a necessidade de produzir *scaffolds* com ação antibacteriana e o material selecionado para conferir esta característica para este trabalho é o ZnO. A propriedade antisséptica do ZnO é amplamente conhecida de modo que o mesmo é aplicado em pomadas (MOORER et al., 1982; WEI et al., 2011) e em várias áreas da medicina (YAMAMOTO, 2001; RAGHUPATHI et al., 2011).

O presente projeto tem como objetivo a colaboração no desenvolvimento de *scaffolds* pela técnica de eletrofiação com a incorporação de cargas bioativas e suas combinações em quitosana (CH) e acetato de celulose (CA), visando avaliar a microestrutura obtida e seu potencial para uso em regeneração de tecidos ósseos. Busca-se também estudar a viabilidade da obtenção *scaffolds* de CH pura a partir da técnica da eletrofiação.

METODOLOGIA

MATERIAIS

Foi utilizada CH de baixa massa molar: $M = 50,000-190,000$ g/mol e grau de desacetilação $DD \geq 75\%$ adquirida da Sigma Aldrich. Ademais, foi empregado CA com massa molar igual a 30,000 g/mol, também proveniente da Sigma Aldrich. Como solvente, foram utilizados ácido acético glacial e acetona fornecidos pela Êxodo Científica e água deionizada. Como cargas bioativas, utilizou-se hidroxapatita liofilizada (HA), β -trifosfato de cálcio (β -TCP) comprado da Sigma Aldrich e óxido de zinco (ZnO) adquirido da Synth.

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Visando à obtenção de membranas eletrofiadas de CH pura, foram preparadas três diferentes soluções de CH dissolvida em ácido acético aquoso 90 % (v/v) nas quais a concentração do polímero foi variada entre 2,5%, 3% e 3,5 % (m/v). O preparo de todas as soluções foi realizado à temperatura ambiente (23 ± 2 °C) e sob agitação constante por aproximadamente 20 h com o auxílio de um agitador magnético e uma barra magnética.

Para as membranas contendo CH e CA, utilizou-se como solvente uma mistura composta por 17 g de acetona e 3 g de água deionizada. No preparo destas soluções, dissolveu-se inicialmente o CA no solvente mediante agitação constante durante 3 h. Posteriormente, adicionou-se CH à solução e o produto foi mantido sob agitação por 2 h até a dispersão completa do biopolímero. A incorporação das cargas bioativas foi feita através da adição das mesmas às soluções de CH e CA previamente preparadas. Tal procedimento também foi realizado à temperatura ambiente e mediante agitação por 2 h.

PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS POR ELETROFIAÇÃO

Para a confecção das membranas, uma fonte de alta tensão do modelo FA+30 kV, fabricada por Faíscas - Eletrônica e Alta Tensão, foi responsável pela manutenção da voltagem constante em 20 kV. O coletor foi revestido com uma folha de papel alumínio e posicionado a 10 cm da agulha. Cada procedimento foi realizado à temperatura ambiente sem um controle rigoroso das condições ambientais, com uma taxa de injeção igual a 1 mL/h.

Na produção das membranas de CH pura, visando a estudar a viabilidade da eletrofiação deste biopolímero, cada procedimento durou cerca de 4 h. No caso da solução com 3,5% (m/v) de CH, utilizou-se uma agulha com diâmetro igual a 1,2 mm, ao passo que nas demais soluções foram empregadas agulhas de 0,8 mm de diâmetro. O uso da agulha de maior diâmetro no primeiro caso deveu-se ao fato de que o entupimento da agulha de 0,8 mm impossibilitou a eletrofiação.

Por outro lado, na eletrofiação das membranas com CH e CA e suas combinações com as cargas bioativas, foram empregadas apenas agulhas com 1,2 mm de diâmetro. Para estudar a influência do tempo de eletrofiação nas características estruturais das fibras, cada solução foi eletrofiada durante 2 intervalos de tempo distintos compreendidos entre 15 min e 1h.

CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS E CARGAS EMPREGADOS POR MEIO DA TÉCNICA DE DIFRAÇÃO A LASER

Visando analisar o tamanho das partículas constituintes das cargas bioativas, bem como dos polímeros, utilizou-se o Analisador de Tamanho de Partículas por Difração à Laser MAZ3000, com os acessórios HYDRO EV e AERO S, da marca MALVERN INSTRUMENTS. Cada amostra exigiu um preparo diferente, de maneira que, para o CA, dispersou-se previamente a amostra em um béquer contendo água destilada e 3 gotas de Tween 80. Posteriormente, transferiu-se a amostra para a cuba de análise com uso de pipeta Pasteur. No caso do ZnO, a amostra foi dispersa em um béquer com água destilada e levada a ultrassom externo por 10 minutos. As outras amostras, por sua vez, foram diretamente adicionadas à cuba de análise com auxílio de espátula. Nos ensaios foi empregada água destilada como meio dispersante e foram obtidas 5 leituras em cada replicata.

CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ALTA RESOLUÇÃO E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

A morfologia das membranas resultantes foi analisada por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG) realizada com o microscópio eletrônico Quattro S da marca TermoFisher Scientific. As amostras foram previamente fixadas nos porta amostras com fita adesiva dupla face de carbono e metalizadas com ouro com o auxílio do equipamento Sputter Coater K450 da marca EMITECH. A partir das imagens fornecidas, foram realizadas cerca de 100 medições dos diâmetros das fibras para cada amostra e calculou-se a porosidade através do *software* ImageJ.

Dado que o polímero pode apresentar alterações nas características térmicas devido à presença das biocargas, as amostras foram submetidas à técnica denominada calorimetria exploratória diferencial (DSC). Para tal, utilizou-se um calorímetro DSC1 da marca METTLER TOLEDO. No preparo das amostras, coletou-se aproximadamente 5 mg do material com auxílio de microespátula metálica e pinça metálica e pesou-se em cadinho de alumínio utilizando balança microanalítica XPR2 da METTLER TOLEDO. Realizou-se a prensagem com um pistão apropriado e em seguida o cadinho foi selado com sua tampa furada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

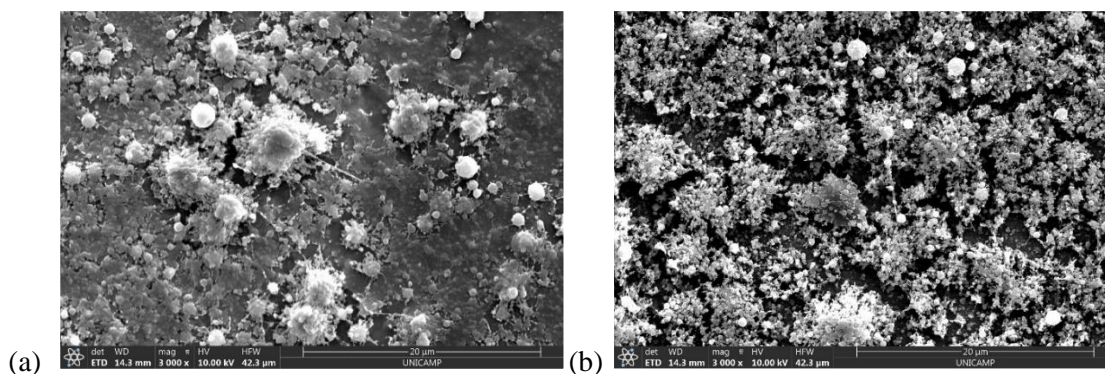
A difração a laser permite fazer a análise granulométrica das amostras, ou seja, conhecer a distribuição de tamanhos das partículas de cada material estudado. Tal caracterização é de extrema importância visto que muitas propriedades dos materiais dependem do tamanho das partículas. Sendo assim, a Tabela 1 mostra os resultados médios obtidos. Nota-se que os compostos poliméricos apresentam partículas muito maiores do que as cargas, visto que seu diâmetro médio de Sauter é mais elevado. Ademais, o valor indicado pelo Span indica a largura da distribuição, o que indica que o ZnO possui uma distribuição larga e, portanto, partículas com valores bastante variados.

Tabela 1 – Diâmetro de Sauter, D_{50} , D_{90} , Span e uniformidade médios para cada composto estudado.

Composto	D Sauter	D_{50}	D_{90}	Span	Uniformidade
CA	116,56	219,05	454,80	1,79	0,55
CH	82,14	151,67	285,39	1,49	0,46
ZnO	1,22	1,56	7,21	4,41	1,33
β -TCP	7,40	15,64	34,07	1,88	0,58
HA	6,78	34,01	99,24	2,84	0,89

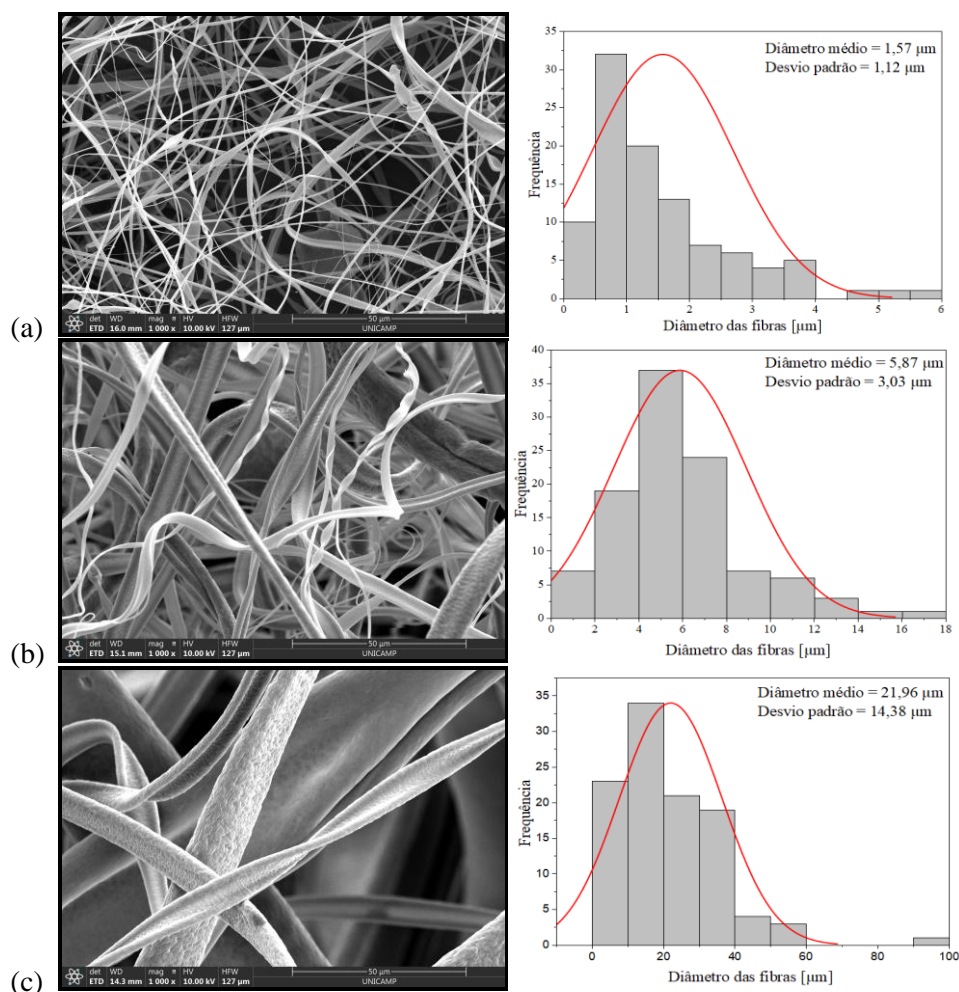
A partir das imagens fornecidas pelo MEV-FEG de cada amostra, foi possível não somente estudar o formato das fibras, como encontrar o diâmetro médio das mesmas em cada composição e determinar a porosidade de cada membrana. A Figura 1 evidencia que nenhuma fibra foi formada ao eletrofiar as soluções que continham apenas CH. Dado que os parâmetros utilizados no preparo das soluções e na eletrofiação desse polímero foram aqueles considerados ótimos por Vrieze et al. (2007), acredita-se que o grau de desacetilação e a baixa massa molar da CH sejam responsáveis pelo resultado obtido, uma vez que tais propriedades afetam diretamente as demais características do polímero, como sua solubilidade e viscosidade. Os parâmetros ambientais, tais quais a umidade do ar, também podem ter sido responsáveis pela não obtenção de fibras.

Figura 1 - Imagens obtidas através da técnica MEV-FEG das amostras com concentrações de CH iguais a (a) 2,5% e (b) 3%.



Quanto à eletrofiação das blendas compostas por CA e CH, inicialmente analisou-se a influência da variação da concentração dos polímeros nas características das fibras. Foram avaliadas três composições, sendo estas 11% de CA com 5% de CH, 13% de CA com 3% de CH e 15% de CA com 1% de CH. A Figura 2 evidencia que o diâmetro médio das fibras aumentou conforme a concentração de CH foi diminuída. Além disso, nota-se que as fibras produzidas possuem formato de fita, fato que está relacionado à evaporação do solvente durante o trajeto até o coletor. Ao utilizar solventes voláteis, uma fina película de polímero é formada pela rápida evaporação do solvente na superfície do jato, resultando em uma estrutura tubular com uma superfície sólida e um interior líquido. Em função da pressão atmosférica, quando o solvente presente no interior da fibra evapora, a estrutura colapsa, se tornando inicialmente elíptica e posteriormente adquirindo formato de fita (KOOMBHONGSE et al., 2001).

Figura 2 - Imagens obtidas através da técnica MEV-FEG das amostras com (a) 11% de CA com 5% de CH, (b) 13% de CA com 3% de CH e (c) 15% CA com 1% de CH.

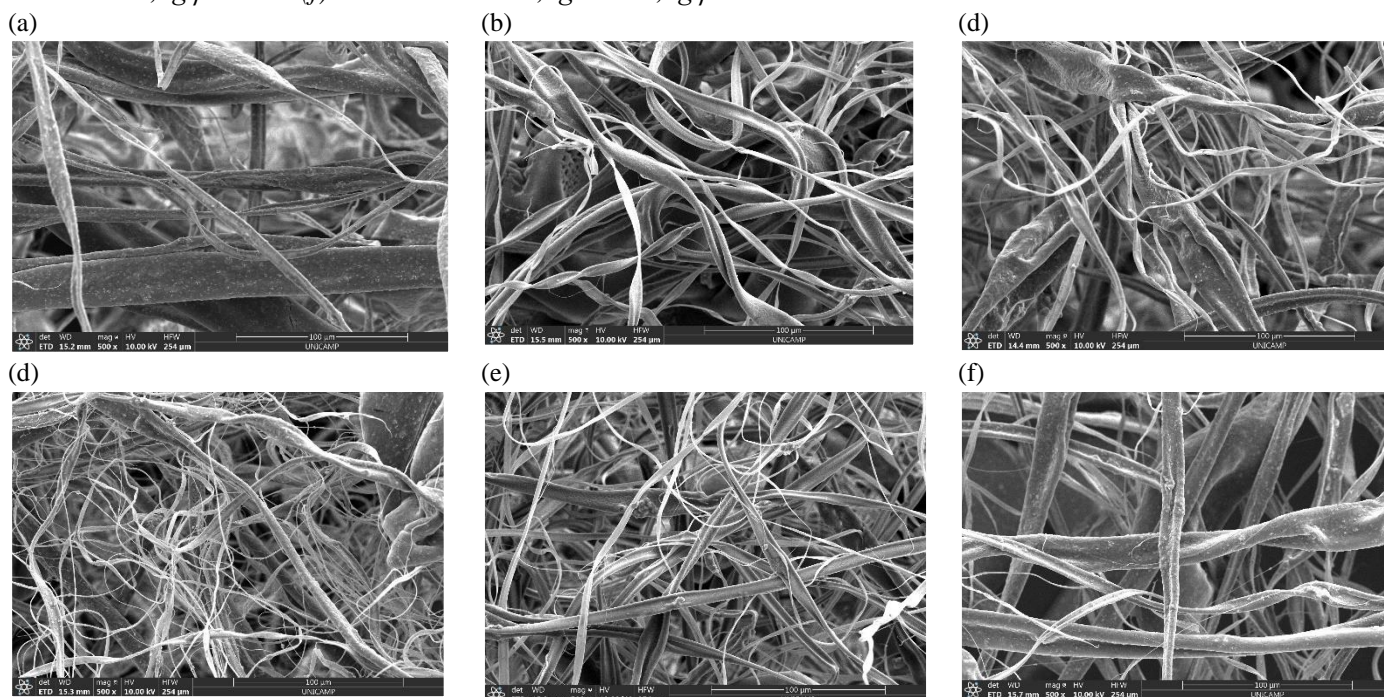


Dentre as composições analisadas, aquela com 15% CA e 1% de CH foi eletrofiada mais facilmente, sem que a agulha entupisse. Dessa maneira, tal combinação foi selecionada para a incorporação das cargas bioativas e a Figura 3 ilustra as fibras obtidas. É possível notar que as amostras que continham ZnO produziram fibras com pequenos grânulos em sua superfície, o que pode ser relacionado ao tamanho muito menor das partículas de ZnO em relação aos demais compostos.

Ao analisar o diâmetro das fibras, é possível constatar que em todas as amostras obteve-se uma ampla distribuição de diâmetros de fibras, o que significa que foram obtidas fibras com diâmetros não uniformizados. Além disso, pode-se observar que as fibras se encontram distribuídas de forma randômica, com a presença de imperfeições denominadas *beads*.

Quanto às análises por DSC, em todas as amostras notou-se a existência de dois picos endotérmicos, sendo o primeiro e maior deles entre 75 °C e 90 °C, possivelmente associados à evaporação de água adsorvida na amostra. O outro pico situa-se próximo de 240 °C e esse pode ser associado à fusão do material. A existência de picos adicionais nas amostras de diferentes composições evidencia que as membranas possuem comportamentos térmicos distintos diante da incorporação de cargas ou da alteração das concentrações.

Figura 3 – Micrografias das amostras (a) 15%CA/1%CH/1g ZnO, (b) 15%CA/1%CH/1g HA, (c) 15%CA/1%CH/0,33g HA/0,33g β -TCP/0,33g ZnO, (d)15%CA/1%CH/0,5g HA/0,5g ZnO, (e) 15%CA/1%CH/0,5g HA/0,5g β -TCP e (f) 15%CA/1%CH/0,5g ZnO/0,5g β -TCP.



CONCLUSÕES

Diante dos resultados conclui-se que não foi possível obter fibras por eletrofiação da CH pura utilizada neste projeto e com os parâmetros ambientais empregados. Entretanto, as blends formadas por CA e CH formaram fibras em formato de fita e possibilitaram a incorporação da HA, ZnO e β -TCP, o que revela seu potencial na produção de *scaffolds*. Além disso, a adição das cargas e mudança das concentrações dos polímeros influenciam não somente no diâmetro médio das fibras, como nas propriedades térmicas das amostras. A aplicação das membranas de CA e CH requer ainda testes de bioatividade, citotoxicidade, resistência mecânica e aplicabilidade, análises que devem ser feitas em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KOOMBHONGSE, S., LIU, W., RENEKER, D. H. **Flat Polymer Ribbons and Other Shapes by Electrospinning**. Department of Polymer Science, 2001.
- MOORER, W. R.; GENET, J. M. **Antibacterial activity of gutta-percha cones attributed to the zinc oxide component**. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 1982.
- MORENO, M. S. **Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo**. Porto, 2014.
- RAGHUPATHI, K.R.; KODALI, R.T.; MANNA, A.C. **Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of Zinc Oxide nanoparticles**. Langmuir, 2011.
- RAYMUNDO, A. J. V., JUNIOR, L. F. R., HOEZEL, S. C. S., VOLKMER, T. M. **Obtenção de Scaffolds por Electrospinning para Uso em Engenharia de Tecidos**. *Disciplinarum Scientia*. Série: Naturais e Tecnológicas, Santa Maria, 2017.
- REZWAN, K.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J.J.; BOCCACCINI, A. R. **Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering**. Biomaterials, 2006
- VALLEJO, M. C. S. **A influência do processo de produção de scaffolds na regeneração óssea**. Covilhã, 2014.
- VRIEZER, S., WESTBROEK, P., CAMP, T. V., LANGENHOVE, L. V. **Electrospinning of chitosan nanofibrous structures: feasibility study**. Polymer Fibers 2006, 2007.
- WEI, S.; ZHOU, M.; DU, W. **Improved acetone sensing properties of ZnO hollow nanofibers by single capillary electrospinning**. Sensors and Actuators B, 2011.
- YAMAMOTO, O. **Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide**. International Journal of Inorganic Materials, 2001.