



MEMBRANAS ELETROFIADAS IMPREGNADAS COM BIOCARGAS ATIVAS: SCAFFOLDS PARA RECUPERAÇÃO DE TECIDOS ÓSSEOS

Palavras-Chave: *scaffolds*, eletrofiação, acetato de celulose, tecido ósseo, hidroxiapatita, trifosfato de cálcio, óxido de zinco

Autores(as):

GUILHERME TEODORO DE CILLO, FEQ - UNICAMP

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

INTRODUÇÃO:

Fraturas ósseas são o tipo de lesão em tecidos mais comum nas pessoas com ocorrência de cerca de 9 milhões ao ano ao redor do mundo (GIACONIA et al., 2022). Defeitos ósseos são difíceis de serem curados e em alguns casos, usam-se enxertos. Porém, é um recurso pouco disponível, considerando que acaba gerando defeitos no local de onde foi retirado e, quando oriundo de outro doador, está sujeito à rejeição pelo organismo do paciente (BAHRAMINASAB et al., 2021). Assim sendo, a engenharia de tecidos é uma área de estudos que visa ao uso da engenharia para a regeneração de tecidos vivos. Um dos métodos usados é a produção de *scaffolds* nanoporosos, que mimetizam a matriz extracelular e facilitam a adesão, crescimento e diferenciação de células do tecido desejado (PERANIDZE; SAFRONOVA; KILDEEVA, 2021).

Dos métodos para produzir *scaffolds* nanoporosos, um dos mais utilizados é a eletrofiação (do inglês, *electrospinning*), capaz de produzir nanofibras com diâmetro, porosidade e morfologia ajustáveis para mimetizar a matriz extracelular (SHABAN et al., 2021). Entretanto, esse processo depende de diversas variáveis, como viscosidade, condutividade elétrica e tensão superficial da solução, tensão elétrica, distância entre agulha e coletor, vazão, temperatura e umidade (KERWALD et al., 2021).

A técnica consiste na aplicação de um campo elétrico entre uma agulha, na ponta de uma seringa na qual se encontra uma solução do polímero e uma placa coletora (SON et al., 2004). As gotas da solução são deformadas, formando um jato fino que é ejetado em direção ao coletor. Neste trajeto, o solvente é rapidamente evaporado, gerando fibras que se solidificam e são depositadas umas sobre as outras, formando uma membrana porosa (PERANIDZE; SAFRONOVA; KILDEEVA, 2021).

Vários polímeros podem ser usados nesse processo, como policaprolactona (PCL) (KIM et al., 2017), poli(L-ácido láctico) (PLLA) (YAN et al., 2016), nylon 6 (ABDAL-HAY et al., 2014), quitosana (BALAGANGADHARAN; DHIVYA; SELVAMURUGAN, 2017) e poliididas (TOPUZ et al., 2021). O acetato de celulose (CA) é facilmente obtido, biocompatível, biodegradável e barato, além de suas fibras

eletrofiadas serem capazes de apresentar alta porosidade e grande área superficial (MAJUMDER et al., 2019).

Devido à base mineral do tecido ósseo ser constituída principalmente de fosfatos de cálcio, a adição de biocargas como hidroxiapatita (HAp) e fosfato tricálcico (TCP) levam à formação de *scaffolds* similares à matriz extracelular óssea, além da melhora da resistência mecânica. A proliferação celular é melhorada pela adição desses reforços, bem como de outros, tais quais nanopartículas de biovidros e carbonato de cálcio (PERANIDZE; SAFRONOVA; KILDEEVA, 2021). Entretanto, a taxa de degradação da HAp é menor do que a de regeneração do tecido ósseo, enquanto a do TCP é maior. Por isso, pode-se combinar ambos para obter a taxa de degradação desejada (FÉLIX et al., 2017). O ZnO é responsável pelo aumento da vascularização na região do *scaffold* (AUGUSTINE et al., 2014). O ZnO também tem ação bactericida, importante para compensar o aumento da adesão e proliferação de microorganismos pela adição de HAp e TCP (PADILLA-GAINZA et al., 2022).

O objetivo deste trabalho é estudar o efeito das biocargas ativas hidroxiapatita (HAp), fosfato tricálcico (TCP) e óxido de zinco (ZnO) e suas combinações em membranas eletrofiadas de acetato de celulose.

METODOLOGIA:

O acetato de celulose com $M_n \approx 30.000$ g/mol e o β -TCP foram comprados da Sigma- Aldrich. O óxido de zinco foi comprado da Synth. A acetona usada como solvente foi comprada da Êxodo Científica. Foi usada hidroxiapatita liofilizada gentilmente produzida e fornecida pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Inicialmente, foram adicionados a um béquer 3 mL de água e 17 mL de acetona (água/acetona em proporção 15:85), que é a proporção ótima para essa combinação de solventes (SON et al., 2004). Foram adicionados então 3,2 g de acetato de celulose (CA), resultando na concentração de 16%. A solução foi deixada em repouso por cerca de 24 h para solubilizar. Foi usado um agitador magnético por 5 min para dispersar as biocargas na solução antes da eletrofiação. Foram preparadas 8 soluções conforme Tabela 1.

Cada solução foi transferida para uma seringa de 10 mL, na ponta da qual foi usada uma agulha de 1,2 mm de diâmetro, cuja ponta foi lixada com uma esmerilhadeira (Dremel Stylo+) para obter uma ponta reta e uniforme. A seringa foi posicionada na bomba de infusão (Samtronic 670) e ligada à fonte de tensão. Os parâmetros usados foram baseados inicialmente nos de Nista et al. (2012) para concentração de 16% de CA, mas como não ocorreu eletrofiação, foram alterados empiricamente para tensão de 19 kV, vazão de 6 mL/h e distância do coletor de 11 cm.

Tabela 1: Soluções de acetato de celulose para produzir *scaffolds*

Amostra	CA (%) (m/m)	HAp (%) (m/v)	ZnO (%) (m/v)	TCP (%) (m/v)
CA puro	16	0	0	0
CA/HAp	16	1,0	0	0
CA/ZnO	16	0	1,0	0
CA/TCP	16	0	0	1,0
CA/HAp/ZnO	16	0,5	0,5	0
CA/HAp/TCP	16	0,5	0	0,5
CA/ZnO/TCP	16	0	0,5	0,5
CA/HAp/ZnO/TCP	16	0,33	0,33	0,33

Para analisar a morfologia e o diâmetro das fibras foi realizada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em equipamento Quattro S da ThermoFisher Scientific. Foi realizado EDS em equipamento ANAX-60P- B da Thermo Scientific UltraDry.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 Eletrofição

Durante o processo de eletrofição, a agulha entupiu frequentemente e teve de ser limpa para que o processo prosseguisse. Uma das razões possíveis é a alta volatilidade da acetona, componente majoritário do solvente (MAJUMDER et al., 2019).

5.2 Análises dos *Scaffolds* por MEV

Nas imagens de MEV para as amostras com as biocargas, exibidas na Figura 1, pode-se observar a morfologia de fitas nas fibras. Segundo Majumder et al. (2019) o uso de um solvente muito volátil (nesse caso, a acetona), causa essa morfologia. A rápida evaporação faz com que o filme na superfície da fibra colapse sobre si mesmo, resultando na morfologia achatada. Segundo Topuz e Uyar (2017), tensões altas também levam à formação de nanofibras em forma de fitas. O aumento da tensão leva a um maior valor de campo elétrico, o que facilita a evaporação do solvente (RAMAKRISHNA, 2005).

Na Figura 1 também se observa variação de diâmetro entre as nanofibras. Comparando-se as micrografias obtidas neste projeto com as obtidas no trabalho de Son et al. (2004), uma das possibilidades é a de que a concentração de polímero esteja logo abaixo do mínimo para estabilizar o jato.

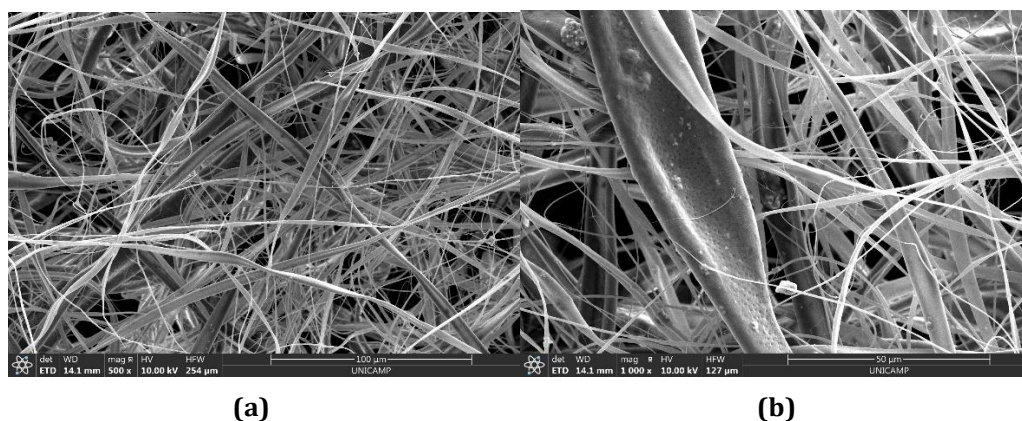


Figura 1: Micrografias obtidas por MEV para as membranas de 16% de CA em acetona/água 85:15 (v/v) com HAp/ZnO com ampliação de (a) 500 x (b) 1000 x

CONCLUSÕES:

A partir das análises realizadas, é possível entender que a eletrofiação pode ser feita usando biocargas ativas em conjunto com o polímero. As condições de eletrofiação ainda precisam ser ajustadas para proporcionar membranas mais uniformes e reprodutíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDAL-HAY, A.; MOUSA, H. M.; KHAN, A.; VANEGAS, P.; LIM, J. H. Tio₂ nanorods coated onto nylon 6 nanofibers using hydrothermal treatment with improved mechanical properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Elsevier, v. 457, p. 275–281, 2014.
- AUGUSTINE, R.; DOMINIC, E. A.; REJU, I.; KAIMAL, B.; KALARIKKAL, N.; THOMAS, S. Investigation of angiogenesis and its mechanism using zinc oxide nanoparticle-loaded electrospun tissue engineering scaffolds. **Rsc Advances**, Royal Society of Chemistry, v. 4, n. 93, p. 51528–51536, 2014.
- BAHRAMINASAB, M.; JANMOHAMMADI, M.; ARAB, S.; TALEBI, A.; NOOSHABADI, V. T.; KOOHSARIAN, P.; NOURBAKHSH, M. S. Bone scaffolds: an incorporation of biomaterials, cells, and biofactors. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, ACS Publications, v. 7, n. 12, p. 5397–5431, 2021.
- BALAGANGADHARAN, K.; DHIVYA, S.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, Elsevier, v. 104, p. 1372–1382, 2017.
- FÉLIX, F. T.; MARINHO, J. P. N.; SILVA, S. N.; AZEVEDO, D. M. d. F. S. Síntese e caracterização de compósitos de fosfato de cálcio e nanofibras de celulose visando aplicação no reparo de tecidos ósseos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 8, p. 1209–1226, 2017.
- GIACONIA, M. A.; RAMOS, S. dos P.; ARAÚJO, T. A.; CRUZ, M. de A.; RENNO, A. C.; BRAGA, A. R. C. S Scaffold production and bone tissue healing using electrospinning: Trends and gap of knowledge. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, Springer, p. 1–17, 2022.

- KERWALD, J.; JUNIOR, C. F. de M.; FREITAS, E. D.; SEGUNDO, J. d. D. P. de M.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M. Cellulose-based electrospun nanofibers: a review. **Cellulose**, Springer, p. 1–30, 2021.
- KIM, J.; MOUSA, H. M.; PARK, C. H.; KIM, C. S. E. Enhanced corrosion resistance and biocompatibility of az31 mg alloy using pcl/zno nps via electrospinning. **Applied Surface Science**, Elsevier, v. 396, p. 249–258, 2017.
- MAJUMDER, S.; MATIN, M. A.; SHARIF, A.; ARAFAT, M. T. Understanding solubility, spinnability and electrospinning behaviour of cellulose acetate using different solvent systems. **Bulletin of Materials Science**, Springer, v. 42, n. 4, p. 1–9, 2019.
- NISTA, S. V. G.; PERES, L.; D'ÁVILA, M. A.; SCHMIDT, F. L.; MEI, L. H. I. Nanostructured membranes based on cellulose acetate obtained by electrospinning, part 1: Study of the best solvents and conditions by design of experiments. **Journal of Applied Polymer Science**, Wiley Online Library, v. 126, n. S1, p. E70–E78, 2012.
- PADILLA-GAINZA, V.; RODRÍGUEZ-TOBIÁS, H.; MORALES, G.; LEDEZMA- PÉREZ, A.; LVARADO-CANCHÉ, C.; LOERA-VALENCIA, R.; RODRÍGUEZ, C.; GILKERSON, R.; LEO, C. T. D.; LOZANO, K. Development of zinc oxide/hydroxyapatite/poly (d, l-lactic acid) fibrous scaffold for tissue engineering applications. **Biomaterials Advances**, Elsevier, v. 133, p. 112594, 2022.
- PERANIDZE, K.; SAFRONOVA, T. V.; KILDEEVA, N. R. F. Fibrous polymer-based composites obtained by electrospinning for bone tissue engineering. **Polymers**, MDPI, v. 14, n. 1, p. 96, 2021.
- RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W.-E.; LIM, T.-C.; MA, Z. **An introduction to electrospinning and nanofibers**. [S.l.]:World scientific, 2005.
- SHABAN, N. Z.; KENAWY, M. Y.; TAHA, N. A.; EL-LATIF, M. M. A.; GHAREEB, D. A. Cellulose acetate nanofibers: Incorporating hydroxyapatite (ha), ha/berberine or ha/moghat composites, as scaffolds to enhance in vitro osteoporotic boneregeneration. **Polymers**, MDPI, v. 13, n. 23, p. 4140, 2021.
- SON, W. K.; YOUK, J. H.; LEE, T. S.; PARK, W. H. Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fibers. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, Wiley Online Library, v. 42, n. 1, p. 5–11, 2004.
- TOPUZ, F.; ABDULHAMID, M. A.; HOLTZL, T.; SZEKELY, G. N Nanofiber engineering of microporous polyimides through electrospinning: Influence of electrospinning parameters and salt addition. **Materials & Design**, Elsevier, v. 198, p. 109280, 2021.
- TOPUZ, F.; UYAR, T. Electrospinning of gelatin with tunable fiber morphology from round to flat/ribbon. **Materials Science and Engineering: C**, Elsevier, v. 80, p. 371–378, 2017.
- YAN, W.; ZHANG, C.; XIA, L.; ZHANG, T.; FANG, Q. In vitro investigation of nanohydroxyapatite/poly (l-lactic acid) spindle composites used for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Springer, v. 27, n. 8, p. 1–7, 2016.
- ZHANG, H.; LIU, Y.; CUI, K.; ZHAO, Q.; HUANG, J.; MAO, S.; JIANG, T.; MA, Z. Electrospun ribbon-like microfiber films of a novel guanidine- based aba triblock copolymer: Fabrication, antibacterial activity, and cytotoxicity. **Macromolecular Chemistry and Physics**, Wiley Online Library, v. 220, n. 13, p. 1900138, 2019.