

Estudo das condições de processo na obtenção de membranas de biopolímeros com as cargas bioativas: fosfato de cálcio, hidroxiapatita e óxido de zinco

Palavras-Chave: ELETROFIAÇÃO, CARGAS BIOATIVAS, *SCAFFOLDS*

Autores(as):

LUANA TESSAROLI DA SILVA, FEQ – UNICAMP

RENATO CARAJELES COV NONATO - UNICAMP

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

INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar que atua no desenvolvimento de materiais empregados na regeneração de tecidos. Nesse contexto, os *scaffolds* representam alternativas aos tratamentos convencionalmente utilizados na área médica. Tais materiais consistem em estruturas tridimensionais capazes de mimetizar a matriz extracelular, fornecendo suporte mecânico para a fixação das células e criando um microambiente favorável para sua proliferação (RAHMATI et al., 2021).

Os *scaffolds* podem ser obtidos através de diversas técnicas, dentre as quais se destaca a eletrofiação devido à sua capacidade de produzir fibras de elevada área superficial e com diâmetros em escala nanométrica ou micrométrica (RAHMATI et al., 2021). Tal método baseia-se no estiramento de gotas de uma solução polimérica eletricamente carregadas através da ação de um campo eletrostático. Nesse processo, uma solução polimérica é ejetada de uma seringa a uma vazão controlada por uma bomba infusora. Em função da força eletrostática, as gotas tornam-se eletricamente carregadas e são estiradas, formando fibras no trajeto até o coletor metálico (AHMADI e RODRIGUE, 2021).

Para a regeneração de tecidos ósseos, faz-se necessário o emprego de cargas bioativas capazes de estimular o crescimento das células ósseas e o desenvolvimento do tecido. Os principais materiais utilizados para esse fim são cerâmicas bioativas, como a hidroxiapatita, fosfatos de cálcio e biovidro (*bioglass*). As biocerâmicas são capazes de promover a formação de uma camada de hidroxiapatita similar à fase inorgânica do tecido ósseo (REZWAN et al., 2006). Além disso, é desejável que os *scaffolds* apresentem ação antibacteriana para inibir o crescimento de agentes infecciosos. Desse modo, o óxido de zinco (ZnO) foi selecionado neste projeto para conferir propriedades antissépticas às membranas, visto que tal composto é amplamente utilizado em pomadas e outras áreas da medicina (EL-FALLAL et al., 2023).

Dessa maneira, o presente projeto tem como objetivo o desenvolvimento de *scaffolds* através da técnica de eletrofiação com a incorporação de cargas bioativas e suas combinações com quitosana (CH), acetato de celulose (CA) e poli (ácido lático) (PLA). Para avaliar o potencial da aplicação das membranas eletrofiadas na regeneração de tecidos ósseos, busca-se avaliar a microestrutura das fibras obtidas através da microscopia eletrônica de varredura acoplada a espectroscopia por dispersão de raios-X (MEV-EDS) e estudar as propriedades térmicas das amostras por calorimetria diferencial exploratória (DSC).

METODOLOGIA

MATERIAIS

Utilizou-se CA com massa molar igual a 30.000 g/mol e CH de baixa massa molar (50.000-190.000 g/mol) e grau de desacetilação $DD \geq 75\%$, ambos adquiridos da Sigma Aldrich. Além disso, empregou-se o PLA Ingeo 4042D da Natureworks, composto por 92% de unidades de L-Lactídeo e 8% de D-Lactídeo. No preparo das soluções, os solventes utilizados foram acetona com 99% de pureza comprada da ACS Científica, clorofórmio da marca Êxodo Científica com pureza igual a 99,8% e água deionizada. As cargas bioativas utilizadas foram hidroxiapatita liofilizada (HA) gentilmente fornecida pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba, β -trifosfato de cálcio (β -TCP) da marca Sigma Aldrich e óxido de zinco (ZnO) adquirido da Synth.

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Para as membranas contendo CA e CH, utilizou-se como solvente uma mistura 85/15% (m/m) de acetona e água deionizada. No preparo das soluções, dissolveu-se inicialmente o CA no solvente mediante agitação magnética constante durante 1 h. Posteriormente, adicionou-se CH à solução e a mistura foi mantida sob agitação por 30 min até a dispersão completa da CH. A incorporação das cargas bioativas foi feita por meio da adição das mesmas à solução de CA e CH mantendo o sistema em agitação durante 30 min.

No preparo das soluções de PLA e CH, empregou-se uma solução composta por 60/40% (v/v) de clorofórmio e acetona. Para que o PLA fosse completamente dissolvido, o polímero foi adicionado gradativamente ao clorofórmio puro em agitação promovida por uma placa magnética durante 40 min. Posteriormente, a acetona foi adicionada ao sistema, o qual foi agitado por 30 min adicionais. A dispersão da CH, bem como a incorporação das cargas, foi feita pela adição da mesma à solução mantendo-se constante a agitação por 20 min.

PRODUÇÃO DE MEMBRANAS POR ELETROFIAÇÃO

Nas eletrofiações das blendas de CA/CH, utilizou-se uma fonte de alta tensão do modelo FA +30 kV, adquirida de Faíscas- Eletrônica e Alta Tensão, visando à manutenção da voltagem constante em 21 kV. Ademais, fez-se necessário revestir o coletor metálico com uma folha de papel alumínio e posicioná-lo a 10 cm da agulha em cada procedimento. Em todos os ensaios, empregou-se uma bomba infusora responsável pela taxa de injeção da solução igual a 8 mL/h e agulhas de 1,2 mm de diâmetro. Salienta-se que não houve controle rigoroso dos parâmetros ambientais, de maneira que as eletrofiações foram realizadas em temperatura ambiente e umidade local. Para obtenção das membranas de PLA/CH a mesma fonte foi utilizada e a voltagem foi mantida em 21 kV e a solução polimérica foi injetada a uma taxa de 2 mL/h. O diâmetro da agulha e a distância entre a mesma e o coletor metálico, bem como na eletrofiação das demais membranas, foram 1,2 mm e 10 cm, respectivamente.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDS)

A análise da morfologia das membranas foi feita por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), na qual empregou-se um microscópio eletrônico de varredura (modelo Leo 440i, Leo Electron Microscopy) com detector de energia dispersiva de raios X (modelo 6070, Leo Electron Microscopy). No preparo das amostras para a microscopia, fixou-se o material a ser analisado em um porta amostras com fita dupla face de carbono e a amostra foi metalizada com ouro com o auxílio do equipamento *Sputter Coater* (modelo K450, EMITECH). Para a obtenção do diâmetro médio de cada composição, foram realizadas aproximadamente 100 medições dos diâmetros das fibras de cada amostra a partir das imagens obtidas via microscopia. Para tanto, utilizou-se o *software* ImageJ, o qual também permitiu a obtenção da porosidade das membranas.

CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Visando avaliar as propriedades térmicas das fibras eletrofiadas e analisar a influência das cargas bioativas nas características térmicas das amostras, as membranas foram submetidas à calorimetria exploratória diferencial (DSC). No preparo das amostras, uma porção de aproximadamente 5 mg do material aderido à folha de papel alumínio foi coletada com micro espátula e pinça metálicas e transferida a um cadinho de alumínio. Tal recipiente contendo a amostra foi pesado em uma balança micro analítica (XPR2, METTLER TOLEDO) e prensado com um micro pistão. O cadinho foi então selado com um furo na tampa para garantir o equilíbrio de pressão. Finalmente, cada amostra foi aquecida de 0 °C a 250 °C a uma taxa de 10 °C/min em um calorímetro exploratório diferencial (modelo DSC1, METTLER TOLEDO).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS FIBRAS ELETROFIADAS

A partir das imagens obtidas por MEV, foi possível não somente obter o diâmetro médio das fibras de cada composição, mas também estudar seu formato e distribuição nas membranas. Ao comparar as Figuras 1.a), 1.b) e 1.c), nota-se que as fibras eletrofiadas a partir das soluções de CA/CH exibiram diâmetros maiores do que aquelas obtidas a partir das soluções com PLA/CH. Além disso, as fibras de CA e CH possuem formato de fita (*ribbon shape*), característica que está associada à velocidade de evaporação do solvente durante a trajetória da gota até o coletor (KOOMBHONGSE et al., 2001). As fibras obtidas a partir das blendas de PLA/CH, por sua vez, exibem formato cilíndrico.

Para avaliar a influência da concentração de CH na morfologia das fibras com PLA, foram analisadas duas composições nas quais as porcentagens de CH em solução foram iguais a 1% e 3%. As Figuras 1.b) e 1.c) evidenciam que fibras com diâmetros ligeiramente maiores são obtidas quando se aumenta a concentração de CH

na solução. Além disso, pode-se identificar pequenas imperfeições (*beads*) possivelmente associadas à instabilidade do jato de solução polimérica (MERCANTE et al., 2021).

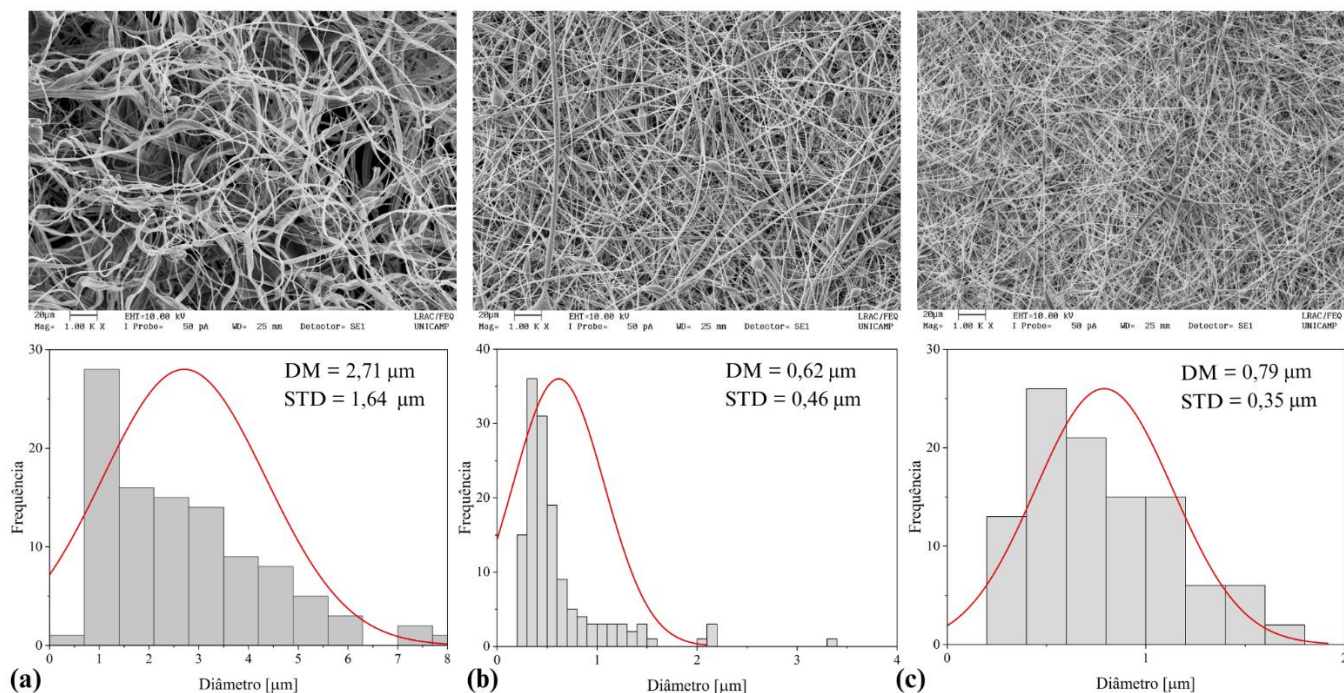


Figura 1 - Imagens de MEV-FEG das membranas eletrofiadas a partir das soluções com (a) 11% de CA com 5% de CH e (b) 10% PLA e 1% CH e (c) 10% PLA e 3% CH

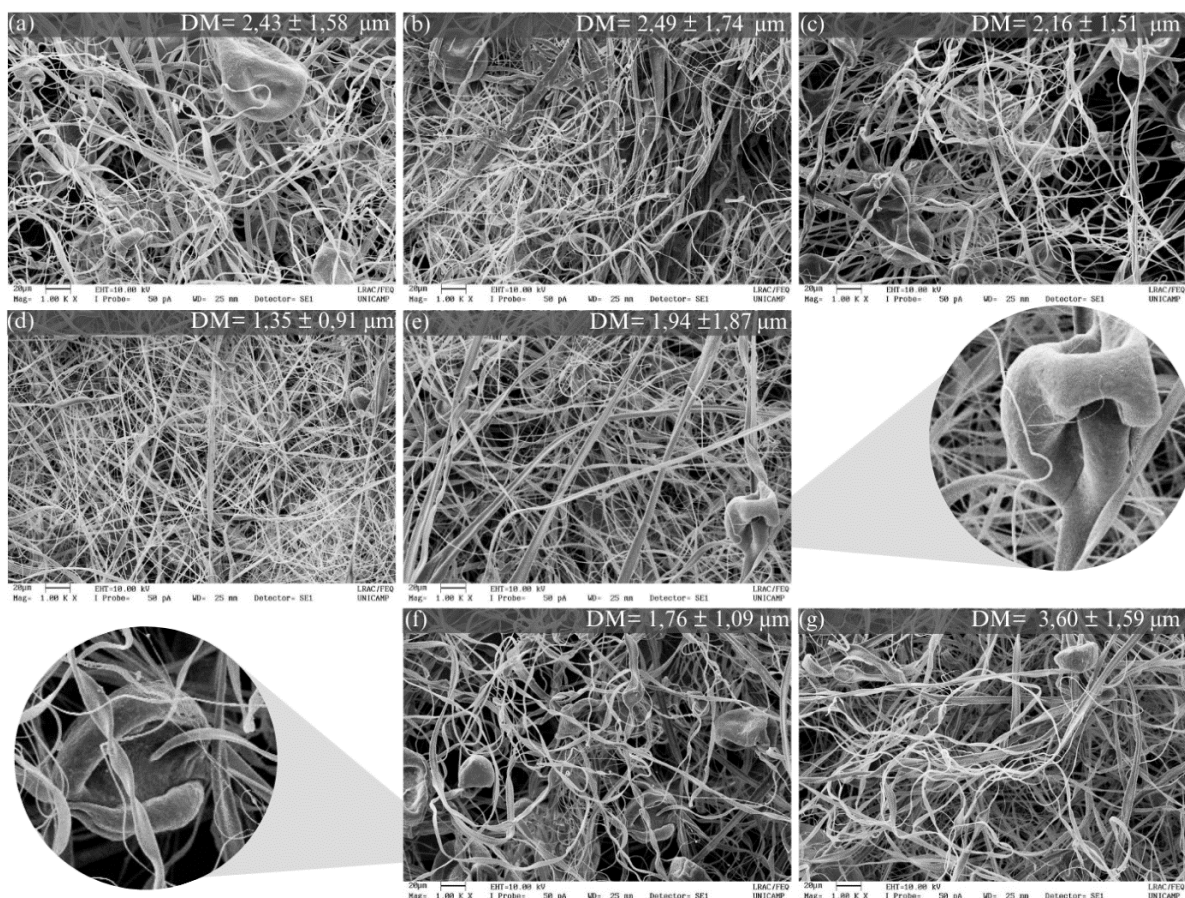


Figura 2- Imagens de MEV-FEG das membranas eletrofiadas a partir das soluções de composições (a) CA/CH/1% HA, (b) CA/CH/1% ZnO, (c) CA/CH/1% β -TCP, (d) CA/CH/0,5% ZnO/0,5% β -TCP, (e) CA/CH/0,5% HA/0,5% β -TCP, (f) CA/CH/0,5% ZnO/0,5% HA e (g) CA/CH/0,33% HA/0,33% β -TCP/0,33% ZnO

A incorporação das cargas bioativas nas blendas de CA/CH resultou nas fibras ilustradas pela Figura 2. A análise das imagens permite constatar que as fibras obtidas possuem uma ampla distribuição de diâmetros, caracterizando fibras não uniformes. Além disso, pode-se observar que as fibras se distribuem de forma randômica nas membranas e há a presença de grandes imperfeições em todas as amostras. As fibras obtidas a partir das blendas de PLA/CH, por sua vez, exibiram diâmetros menores e distribuições mais uniformes, como mostra a Figura 3. Ainda assim, pode-se visualizar a presença de uma grande quantidade de *beads* nas fibras.

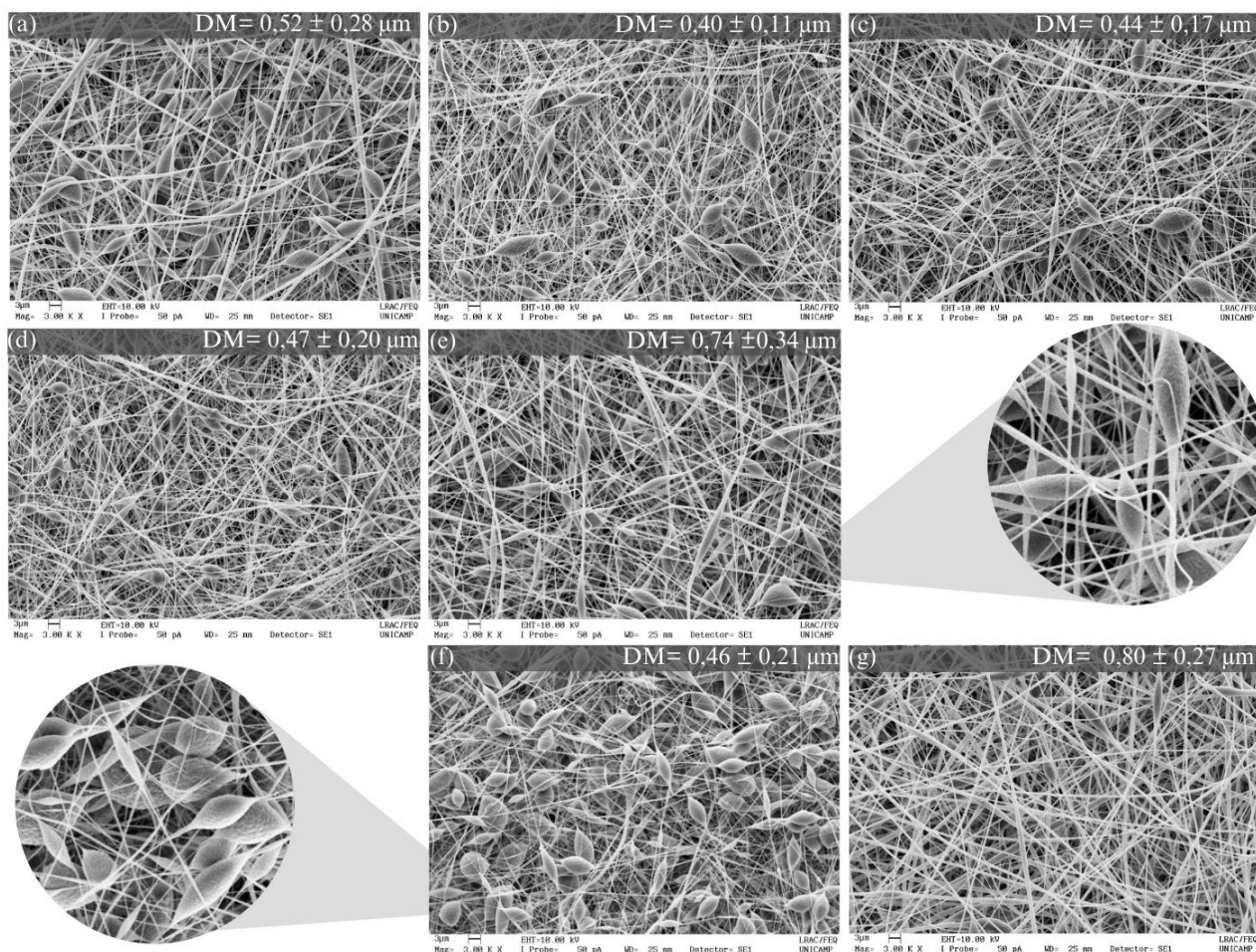


Figura 3 - Imagens de MEV-FEG das membranas eletrofiadas a partir das soluções com composições (a) PLA/CH/1% HA, (b) PLA/CH/1% ZnO, (c) PLA/CH/1% β -TCP, (d) PLA/CH/0,5% ZnO/0,5% HA, (e) PLA/CH/0,5% HA/0,5% β -TCP, (f) PLA/CH/0,5%ZnO/0,5% β -TCP e (g) PLA/CH/0,33%HA/0,33% β -TCP/0,33% ZnO

PROPRIEDADES TÉRMICAS DAS MEMBRANAS

A análise da Figura 4.a) evidencia a existência de dois picos endotérmicos em todas as amostras que possuem CA e CH. O primeiro deles, situado entre 83 °C e 87 °C, pode ser associado à evaporação de moléculas de água adsorvidas nas membranas. O outro pico encontra-se próximo de 227 °C e refere-se à temperatura de fusão (T_m) das amostras.

Bem como nas amostras constituídas por CA e CH, a Figura 4.b) permite a identificação de dois eventos endotérmicos nas membranas obtidas a partir das blendas de PLA/CH, sendo o primeiro deles entre 63 °C e 64 °C relacionado à temperatura de transição vítrea (T_g) das amostras. O segundo pico encontra-se na faixa entre 149 °C e 155°C e corresponde à temperatura de fusão das amostras. Ademais, pode-se notar a existência de uma transição exotérmica entre 102 °C e 112°C, a qual pode ser relacionada à temperatura de cristalização a frio do PLA (T_c).

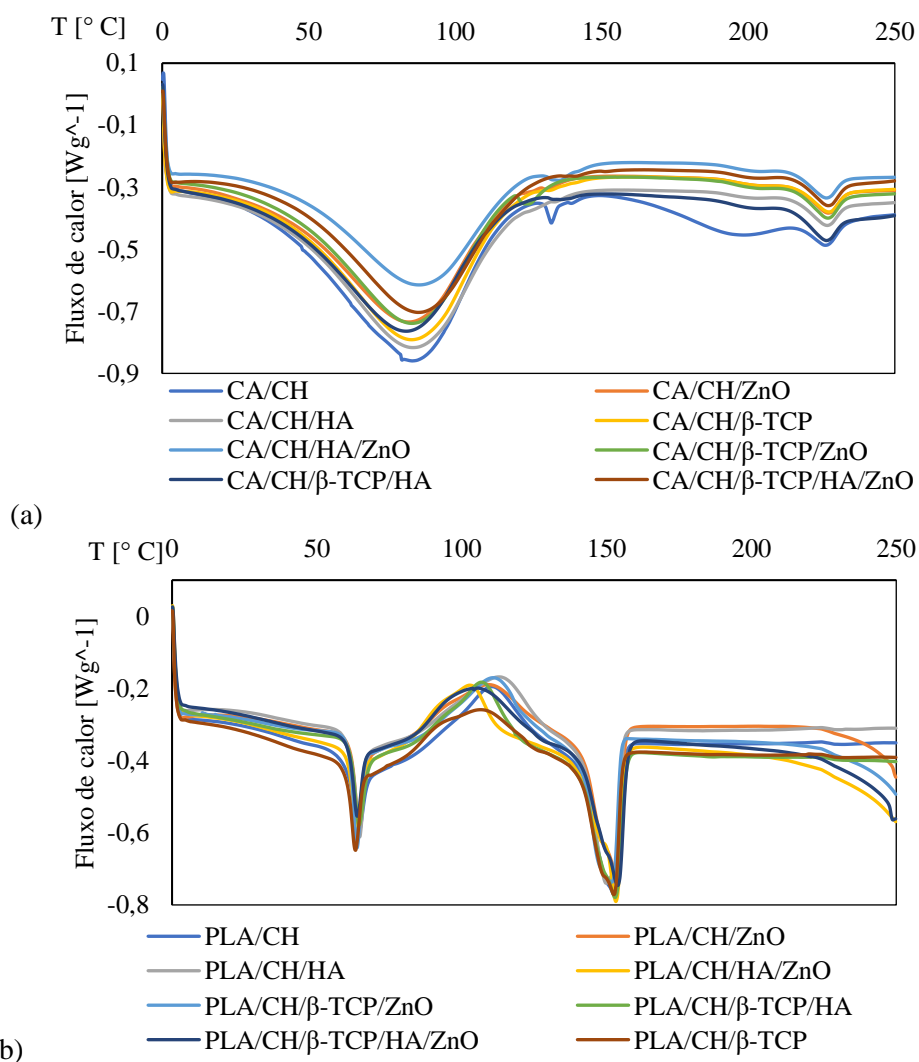


Figura 4 - Gráficos de DSC das amostras eletrofiadas das blendas de (a) CA/CH e (b) PLA/CH e as cargas bioativas

CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram obtidas membranas eletrofiadas a partir dos biopolímeros CA, CH e PLA, bem como suas composições com as cargas bioativas (hidroxiapatita, óxido de zinco e β -TCP). As fibras obtidas a partir das blendas de CA/CH exibiram formato de fita e uma ampla distribuição de diâmetros. A eletrofiação das blendas de PLA/CH, entretanto, resultou em fibras de formato cilíndrico com menores diâmetros e com distribuição mais estreita. Pode-se observar que a incorporação de cargas e a variação da concentração dos polímeros são fatores que influenciam nas características morfológicas e térmicas das fibras. Cabe mencionar que a aplicação das membranas desenvolvidas na regeneração de tecidos ósseos ainda requer estudos de bioatividade, citotoxicidade e resistência mecânica, análises reservadas a projetos futuros.

BIBLIOGRAFIA

- [1] AHMADI BONAKDAR, M.; RODRIGUE, D. **Electrospinning: Processes, Structures, and Materials**. *Macromol*, v. 4, n. 1, p. 58–103, mar. 2024.
- [2] EL-FALLAL, A. A.; ELFAYOUMY, R. A.; EL-ZAHED, M. M. **Antibacterial activity of biosynthesized zinc oxide nanoparticles using Kombucha extract**. *SN Applied Sciences*, v. 5, n. 12, p. 332, 14 nov. 2023.
- [3] KOOMBHONGSE, S.; LIU, W.; RENEKER, D. H. Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, v. 39, n. 21, p. 2598–2606, 2001.
- [4] MERCANTE, L. A. et al. Nanofibras eletrofiadas e suas aplicações: avanços na última década. *Química Nova*, v. 44, p. 717–736, 11 ago. 2021.
- [5] RAHMATI, M. et al. Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*, v. 117, p. 100721, 1 abr. 2021.
- [6] REZWAN, K.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J.J.; BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering *Biomaterials* v.27, p.3413–3431, 2006