

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DAS NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA EM PLA: CARACTERIZAÇÃO DOS COMPÓSITOS E SCAFFOLDS IMPRESSOS

Arthur João Reis Lima Rodovalho¹; Willams TelesBarbosa²; Caio Athayde De Oliva²; Ana Paula Bispo Gonçalves³; Jaqueline Leite Vieira²; Milena Botelho Pereira Soares²; Josiane Dantas Viana Barbosa³

¹ Graduando em engenharia mecânica; Iniciação Científica-FAPESB; rodovalhoarthur13@gmail.com

² Instituto Moniz Gonçalo, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador-BA

³ Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador - BA: josianedantas@fieb.org.br

RESUMO

Scaffolds obtidos a partir de biocompósitos têm sido largamente utilizados na área de engenharia de tecidos, como alternativa de reparo de lesões e/ou tratamento de algumas doenças crônicas. O uso da técnica de bioimpressão 3D para a produção de *scaffolds* tem se apresentado como uma alternativa que permite a combinação de estruturas que atuam como matrizes extracelulares e auxiliam na proliferação, diferenciação e biossíntese da matriz natural de células na sua superfície. Estudos demonstram que a incorporação de biocerâmicas, como a nano hidroxiapatita (nHA) (fosfato de cálcio hidratado, razão Ca/P = 1,67) em matrizes biopoliméricas, como PLA (Poliácido láctico) promovem osteocondutividade, bioatividade e osteoindutividade, acelerando o processo de regeneração tecidual. Portanto, esse estudo teve como objetivo analisar se os diferentes tamanhos de partículas de nHA influenciam na afinidade superficial do material, na degradação e na bioatividade do *scaffold*.

PALAVRAS-CHAVE: PLA; nHA; *scaffold*; compósito.

1. INTRODUÇÃO

A regeneração e reparo de grandes lesões no tecido ósseo ainda é um grande desafio para a engenharia de tecidos. Com isso, a impressão 3D é uma técnica de produção alternativa aplicada a este campo cujo o objetivo é sanar essas lesões utilizando a manufatura aditiva por possibilitar alta precisão e maior grau de liberdade para customizar geometrias de matrizes extracelulares, *scaffolds*.¹ Portanto, há muitos estudos de materiais para aplicação como implante ósseo, como por exemplo, metais, cerâmicas e polímeros, porém estes têm baixa atividade osteogênese, baixa biocompatibilidade e baixa taxa de degradação, não obtendo resultados satisfatórios.¹⁻² Com isso, a combinação de materiais biocompatíveis é necessário para mimetizar o tecido ósseo.¹ Para esse estudo, foi utilizado o biopolímero PLA e biocerâmicas a base de nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) para fabricar *scaffolds* biocompósitos de PLA/nHA. A nHA possui as propriedades e características semelhantes a fase mineral do tecido ósseo, tais como osteocondutividade, osteoindutividade e bioatividade.¹ Portanto, este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar *scaffolds* produzidos de biocompósitos de PLA/nHA com diferentes tamanhos de partículas de nHA e de cristalinidade utilizando a bioimpressão 3D. Os *scaffolds* impressos foram caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão (MET), teste de molhabilidade da superfície do compósito, degradação e bioatividade *in vitro* do *scaffold*.

2. METODOLOGIA

Os materiais utilizados para a síntese do compósito foram o polímero PLA e a biocerâmica hidroxiapatita (nHA), que proporcionam, respectivamente, propriedades mecânicas e biocompatibilidade ao compósito (PLA/nHA). Nesse estudo foram utilizados três tipos de hidroxiapatita que diferem em seu cristalito e cristalinidade², como pode observar na Tabela 1.

Tabela 1: Tamanho de partículas e cristalinidade da nHA.

nHA	Tamanho do Cristalito (nm)	Cristalinidade (%)
A1	6.06	39.46
A2	9.42	98.33
A3	13.30	99.63

Para a síntese de PLA/nHA, foi utilizado o método solvente *casting*. Com isso, verteu 10% (p/v) de clorofórmio num béquer e 10% p nHA na solução que foi submetida a agitação magnética por 10 minutos até a sua homogeneização. Para garantir que não houve aglomerado de partículas, a solução foi submetida a um banho de ultrassom, por 10 minutos e depois posta novamente no agitador magnético onde foi adicionado 10 g de PLA para ser dissolvido na solução. Após esse processo, a solução foi despejada em placas de petri e deixadas 24 horas numa capela para que o solvente evaporasse e formasse filmes sólidos do compósito.

A impressão dos *scaffolds*, foi feita na bioimpressora da marca 3D Biotechnology Solutions do modelo Octopus. Para a impressão cortou-se o filme de PLA/nHA em pedaços de aproximadamente de 5 x 5 mm² para colocar na extrusora da bioimpressora. Os parâmetros utilizados na impressão dos *scaffolds* estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: parâmetros de impressão.

Parâmetros	
Tempo de pré aquecimento	± 50 minutos
Temperatura	195 °C
Tamanho do scaffold	12 x 12 x 05 mm ³
Velocidade de impressão	45 mm/min
Preenchimento interno	90%

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi feita para verificar a distribuição do tamanho das partículas do pó de nHA. Foi analisado 100 partículas para a distribuição granulométrica e determinação do diâmetro médio das partículas considerando seus formatos esféricos.

A análise de ângulo de contato das amostras, foi realizada para determinar a molhabilidade superficial das amostras de PLA e compósitos (A1, A2 e A3). Para tal utilizou-se um goniômetro, modelo DSA-25 (Kruss, Hamburgo, Alemanha), no qual foi depositado uma gota, possuindo aproximadamente 5 µl, em diferentes superfícies das amostras.

O estudo de degradação do *scaffold* foi executado num período de 3 meses em que se consistia na pesagem a cada 7 dias. Para esse estudo as amostras foram postas em um tubo Falcon, possuindo Phosphate Buffered Saline, PBS, (pH 7,4 ± 0,2) em uma temperatura de 36°C sob agitação. O cálculo utilizado para determinar a perda de massa foi a Equação 1. Onde *m* é a massa total e *m*₁ é a massa degradada.

$$\text{Perda de massa} = \frac{m - m_1}{m} \cdot 100\% \quad (1)$$

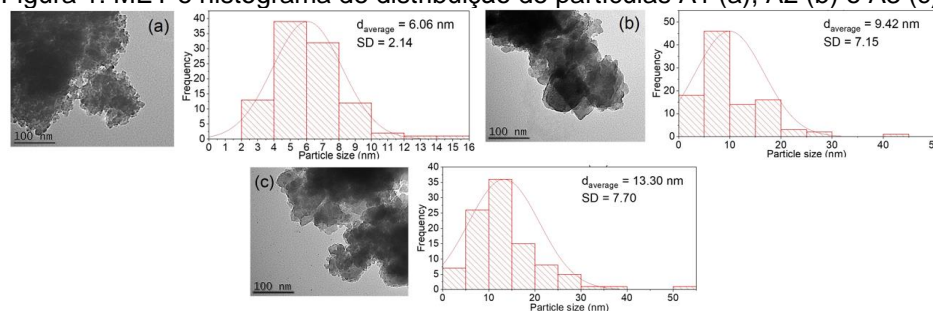
O estudo de bioatividade foi avaliado de acordo com a ISO 23317:20143. As amostras foram submersas em um simulated body fluid (SBF) em um tubo Falcon. O volume (*V*) de SBF foi calculado a partir da Equação 2, onde *S_a* é a área aparente do *scaffold*.

$$V = \frac{S_a}{10} \quad (2)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

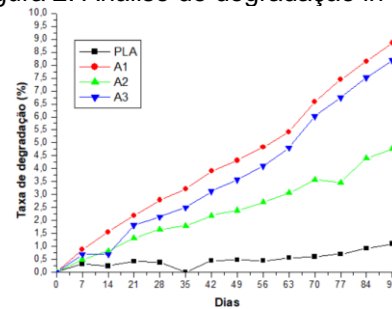
A Figura 1 mostra as MET e os histogramas de tamanho de partícula das amostras de nHA (A1, A2 e A3). Logo a Figura 1 (a), mostra que a amostra A1 possui uniformidade no formato, assim como granulometria com faixa de distribuição estreita de acordo com a curva de distribuição. A amostra A1 possui menor tamanho médio de partículas (6,06 nm), em relação as amostras A2 (9,42 nm) e A3 (13,30 nm).

Figura 1: MET e histograma de distribuição de partículas A1 (a), A2 (b) e A3 (c).



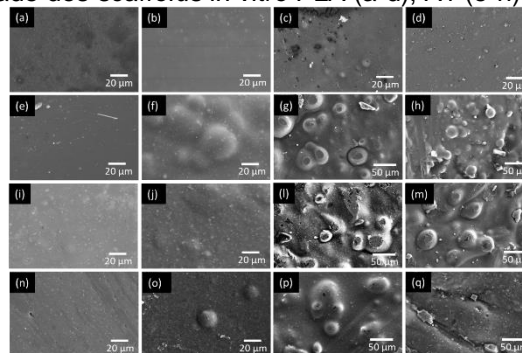
As amostras utilizadas para o teste de molhabilidade foram o PLA e os compósitos A1, A2 e A3. Esse teste consiste em determinar se as amostras são hidrofóbicas, possuem ângulo de contato maior que 90°, ou hidrofílicas, com ângulo de contato menor que 90°. De acordo com o gráfico 1, o PLA se comportou como um material hidrofóbico (95,8° ± 1,3°) e os compósitos A1, A2 e A3 se comportaram como materiais hidrofílicos gerando, respectivamente, os resultados 79,4° ± 2,5°, 78,6° ± 1,9° e 79,2° ± 1,6°.

A degradação das amostras pode ser observada de acordo com o Figura 2, o qual o eixo Y demonstra a porcentagem da perda de massa e o eixo X o tempo.

Figura 2: Análise de degradação *in vitro*.


Analisando a Figura 2, a amostra A1 teve maior perda de massa comparada as, demais. Isso acontece por conta do pequeno tamanho das nanopartículas (6,06 nm) e baixa cristalinidade, possibilitando maior superfície de contato com a solução. No entanto, o PLA apresentou baixa perda superficial de massa, possivelmente por conta do material ser hidrofóbico.

A análise do teste de bioatividade foi feita uma Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies dos *scaffolds* PLA (a-d), A1 (e-h), A2 (i-m) e A3 (n-q) após a imersão no SBF nos dias 7, 14 e 28 como mostrado, respectivamente, na Figura 3.

 Figura 3: Bioatividade dos *scaffolds in vitro* PLA (a-d), A1 (e-h), A2 (i-m) e A3 (n-q).


De acordo com a imagem, o PLA não apresentou características bioativas ao longo dos dias, isso pode ser observado por conta da falta de glóbulos em sua superfície. Já as amostras que contêm as nanopartículas de hidroxiapatita, é possível observar que a partir do dia 7 (Figura 3) que há formação de glóbulos na superfície dos *scaffolds* compostos ao longo dos dias 14 e 28 nota-se o aumento dos glóbulos na superfície dos. Além disso, a amostra A1 mostrou maior formação de glóbulos em sua superfície que as outras amostras.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, pode-se dizer que na análise de molhabilidade da superfície dos materiais, os compósitos tiveram características hidrofílicas, ângulo de contato menor que 90°, por conta da inserção da biocerâmica (nHA). O teste de degradação resultou em maior e taxas de degradação de massa dos *scaffolds* que tiveram a nHA adicionada a matrix de PLA, pois como analisado na molhabilidade da superfície do material, os compósitos tinham características hidrofílicas, possibilitando maior contato do PBS com as partículas do *scaffold*. A análise *in vitro* da bioatividade dos *scaffolds* mostrou que os compósitos (PLA/nHa) possuem maior bioatividade comparado ao PLA, porque esses materiais tem maior reatividade com o SBF, favorecendo a dissolução gradual da hidroxiapatita através da liberação de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} no fluido. Logo essa é uma característica fundamental da diferenciação e adesão celular. Portanto, os diferentes tamanhos de partículas, cristalitos e cristalinidades influenciam nas características e propriedade do material em relação ao PLA, porém não tem impacto expressivo entre si.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao SENAI CIMATEC por disponibilizar a estrutura para desenvolver a pesquisa. A FAPESB, CAPES e FIOCRUZ por financiarem o desenvolvimento da pesquisa. A Profª. Dra. Sabrina Acaro da UNESC por disponibilizar a Hidroxiapatita.

5. REFERÊNCIAS

- 1HEN, Xibao. 3D printed porous PLA/nHA composite *scaffolds* with enhanced osteogenesis and osteoconductivity in vivo for bone regeneration. *Biomedical Materials*. Republica da China: IOP, 2019.
- 2ARCARO, Sabrina. Nanostructured biological hydroxyapatite from Tilapia bone: A pathway to control crystallite size and crystallinity. Criciúma: Elsevier
- 3Organização internacional de padronização. ISO 23317:2014 - Implants for surgery surgery - In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials.