

PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS DE POLI (BUTILENO ADIPATO CO-TEREFTALATO) COM NANOHIIDROXIAPATITA INCORPORADA

A. S. Silva¹, F. R. Marciano¹ e A. O. Lobo^{1*}

¹ Laboratório de Nanotecnologia Biomédica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, Brasil
e-mail: aolobo@pq.cnpq.br e lobo.aol@gmail.com

Resumo: A técnica de eletrospinning vem sendo largamente utilizada para a produção de mantas de nanofibras para a engenharia tecidual. A nanohidroxiapatita (nHAp) trata-se de um biomaterial cerâmico utilizado para a reconstrução óssea. A produção de nanocompósitos à base de nanofibras poliméricas com nHAp incorporadas visa a melhoria nas propriedades mecânicas associadas à bioatividade da nHAp, sendo estas propriedades interessantes na regeneração de tecido ósseo. Foram preparadas nanofibras poliméricas de poli(butileno adipato co-tereftalo (PBAT) pela técnica de eletrospinning com diferentes concentrações de nHAp incorporadas. Ao mesmo tempo estudou-se os efeitos das proporções dos solventes poliméricos juntamente com as razões massa/volume da nHAp. O processo de dispersão da nHAp utilizando irradiação ultrassônica foram também avaliados, tais como: tempo e temperatura. Foram também estudados as proporções, densidade e tensão superficial dos solventes. O parâmetro de eletrospinning foi conduzido em uma tensão e distância do contra-eletrodo fixas. As mantas de nanofibras foram caracterizadas utilizando microscopia eletrônica de varredura. Espera-se obter um novo nanobiomaterial compósito à base de PBAT/nHAp que possa ser utilizado na engenharia tecidual visando a regeneração óssea.

Palavras-chave: Polímeros; Nanopartículas; Eletrospinning.

Abstract: The electrospinning have been widely used for the production of nanofiber mats tissue engineering. The nanohydroxyapatite (nHAp) it is a ceramic biomaterial used for bone reconstruction. The production of nanocomposites based on polymer nanofibers with incorporated nHAp aims to improve the mechanical properties associated with bioactivity nHAp, and these interesting properties in the regeneration of bone tissue. We prepared butylene adipate-co tereftalo (PBAT) polymer nanofibers with diferente concentrations nHAp using electrospinning. Also, we studied the polymeric solvents concentration and different concentration of nHAp nanoparticles (w/v). We evaluated de nHAp dispersion using ultrasonic irradiation, such as: time and temperature. We studied the solvent proportions, density and superficial tension. We fixed the electrospinning

process, such as: applied voltage and distance from the counter electrode. The nanofibers mats are characterized using scanning electron microscopy. We will be expect to produce a new composite nanobiomaterial based on PBAT / nHAp that can be used in tissue engineering to bone regeneration.

Keywords: Polymers; nanoparticles; Electrospinning.

Introdução

O crescimento da expectativa de vida da população em termos mundiais tornou doenças relacionadas à estrutura óssea um problema de saúde pública, a partir disto, busca-se formas para solucionar tais problemáticas. Um dos grandes desafios da medicina regenerativa é projetar e fabricar um arcabouço adequado que permita que as células se multipliquem, diferenciem e originem tecidos e órgãos. A fim de atingir a funcionalidade desejada do tecido ou órgão a ser substituído, este arcabouço deve ser cuidadosamente projetado. Com uma compreensão cada vez maior das interações complexas entre as células e seus microambientes nos tecidos, mais atenção tem sido dada à fabricação de arcabouços capazes de mimetizar as principais características da matriz extracelular (MEC) que controlam migração, proliferação e diferenciação celular [1]. Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para a fabricação de suportes a serem utilizados como análogos dos arcabouços de MEC [5].

As nanofibras são um dos materiais que mais se assemelham às estruturas fibrosas da MEC nativa e podem ser sintetizadas a partir de vários tipos de polímeros naturais como proteínas de MEC (colágeno, elastina e fibronectina) e polímeros sintéticos tais como poli ϵ -caprolactona (PCL) e ácido poli láctico-glicólico (PLGA) [3].

O PBAT é um polímero biodegradável que se pode degradar sob a ação de microrganismo natural. Apresenta na sua cadeia polimérica uma estrutura aromática, porém, a existência dos heteroátomos, carbonila e cadeia alifática favorecem a ação de degradação [4]. A incorporação de nanopartículas em sua matriz visa melhorar as propriedades mecânicas dos filmes desse polímero para aumentar o seu tempo de vida útil em aplicações que vão desde sacolas plásticas até envoltórios biomédicos.

A nanohidroxiapatita (nHAp) que trata-se de um material cerâmico bioativo de alta proeminência para aplicações como biomateriais devido à sua estrutura química e estrutural semelhante ao material encontrado na parte inorgânica de tecido ósseo [2]. Nanobiomateriais compósitos tornam-se emergentes devidos a similaridades físicas as constituintes da matriz extracelular e por apresentarem propriedades mecânicas e de bioatividade que possam auxiliar o processo de regeneração óssea. Nanocompósitos produzidos a partir de PBAT com nHAp tornam-se atrativos para a regeneração de tecido ósseo.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para o processamento de nanobiomateriais compósitos, visando à associação de polímeros e cerâmicos. Dentre essas, o processo de eletrofiação para a produção de mantas poliméricas, que apesar de ser considerado como novo, tem como vantagem o fato de agregar as partículas nanométricas aos polímeros para à melhora substancial das propriedades mecânicas aumentando taxa de biodegradabilidade. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a produção de mantas de PBAT/nHAp com o intuito de aplicações do mesmo para a reconstrução óssea, ou seja, para fins biomédicos.

Materiais e métodos

Preparação e caracterização da solução polimérica com nanopartículas de nanohidroxiapatita

Foram utilizados os solventes dimetilformamida e clorofórmio (Synth). A nHAp foi preparada utilizando o método sol-gel utilizando o ultrassom [5]. Conforme descrito foram avaliados as relações volume/volume dos solventes, bem como surfactante anfifílico para a melhor dispersão da nHAp em um dos solventes orgânicos. Foi avaliada a razão m/v da solução polimérica de PBAT a 12%. Analisaram-se as propriedades físico-químicas dos solventes poliméricas, tais como: densidades e tensões superficiais dos solventes, utilizando o equipamento Easy Dyne da KRUSS.

A tabela 1 demonstra as características físico-químicas dos solventes utilizados [6].

Tabela 1: Caracterização dos solventes

Solventes	Parâmetro de Solubilidade (Nmpa ^{1/2})	Constante Dielétrica	Densidade relativa a 20 °C	Temperatura de Ebulição (°C)	Temperatura de Fusão (°C)	Tensão Superficial
Clorofórmio	18,84	4,80	1,48	61,7	-63,50	6,90
DMF	24,83	38,3	0,950	153	-61	23,50

As proporções dos solventes clorofórmio/DMF foram realizadas na condição: 60/40. Foi avaliada a razão m/v da solução polimérica de PBAT a 12%.

Foram avaliadas diferentes concentrações de nHAp, sendo de 1 a 6%. As pastilhas de PBAT foram dispersas em clorofórmio em sistema fechado. Este foi mantido sob agitação magnética constante até sua total dissolu-

ção (aproximadamente 120 minutos). Separadamente, a nHAp foi dispersa em DMF sendo a solução submetida ao ultrassom (VCS Series SONICS). Após a dispersão da nanopartícula no DMF, misturou a solução PBAT/Clorofórmio deixando sob agitação por 20 horas, num agitador magnético em 150 rpm.

Para a dispersão da nanopartícula nHAp, verificou que cada porcentagem necessitava de um tempo e de uma temperatura maior para a dispersão total da mesma, sem ultrapassar o seu ponto de dispersão.

Sendo que tais análises foram dadas a partir de tentativas para a dispersão completa da nanopartícula utilizando para cada porcentagem a mesma quantidade de DMF, no caso 5 mL. Com isso, foram observados as temperaturas e o tempo como é demonstrado pela tabela 2.

Tabela 2: Dispersão da nHAp.

Porcentagem de nanohidroxiapatita	Temperatura (°C)	Tempo (Minutos)
1	35	30
2	45	48
3	55	59
4	65	68
5	75	80
6	80	90

Processo de eletrofiação

A figura 1 ilustra o processo de eletrofiação, nota-se que basicamente utiliza-se: (i) uma fonte de alta tensão, que aplica uma diferença de potencial entre a solução inserida em uma seringa de vidro com uma agulha metálica e (ii) um alvo metálico aterrado para que seja guiado o fluxo do polímero eletrofiado.

O processo de eletrofiação foi conduzido a diferentes tensões aplicadas entre 10 a 15 kV para todas as proporções. A distância entre o coletor e aponta da agulha (distância de trabalho) foi ajustada a 10 cm. A temperatura e umidade foram também controladas, sendo mantidas entre 21 - 23°C e umidade em 46%.

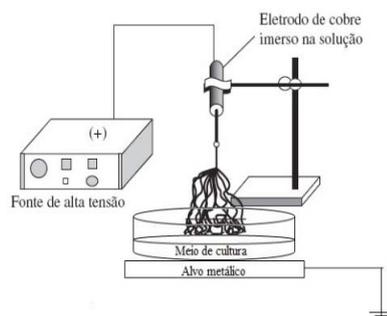


Figura 1: Esquema da montagem do sistema de eletrofiação via solução montado em uma capela de exaustão.

A tabela 3 descreve as soluções de PBAT/nHAp com detalhes da proporção de solventes, porcentagens, tensão de trabalho e distância do coletor.

Tabela 3: Nanofibras de PBAT/nHAp produzidas.

Amostra	PBAT %	nHAP%	Tensão (kV)	Distância do Coletor (cm)	Proporção Clorofórmio/ DMF
1	12	1	12	10	60/40
2	12	2	12	10	60/40
3	12	3	12	10	60/40
4	12	4	12	10	60/40
5	12	5	12	10	60/40
6	12	6	12	10	60/40

Utilizou-se o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV, Zeiss EVOMA10) para avaliar a morfologia das nanofibras de PBAT com nHAp incorporada na porcentagem de 1 a 6 % na forma de mantas produzidas. Para isso, realizou-se a deposição de uma fina camada de ouro utilizando uma evaporadora (Emitech K550X). Sendo que o ouro estava sobre uma corrente de 50 mÅ, durante um tempo de 30 segundos. Foram também avaliados a presença da nHAp incorporada na estrutura das mantas de nanofibras de PBAT.

Resultados

A tabela 4 mostra os valores medidos de densidade e tensão superficial das misturas dos solventes utilizado para a eletrofição.

Tabela 4: Proporção dos Solventes

Proporção Clorofórmio/ DMF	Densidade (g/L)	Tensão Superficial (mN/m)
50/50	1.288	28.7
60/40	1.269	10.6

A partir dos dados obtidos, pode observar que apesar dos valores de densidade ser próximas, as proporções se distingue extremamente na tensão superficial. Para que um processo de eletrofição seja conduzido de forma efetiva, deve-se utilizar uma menor tensão superficial, com o intuito de melhor formação do cone de Taylor [7]. Ao ocorrer à quebra da tensão superficial da solução, formam-se as fibras, sendo que sua estrutura de formação é denominada de Cone de Taylor. Contudo, para o rompimento da tensão superficial, é fundamental a corrente elétrica exercida, pois ela faz com que se rompe mais facilmente essa tensão para a extrusão das fibras. [8]

A figura 2 mostra a morfologia das nanofibras de PBAT/nHAp nas diferentes concentrações. Sendo que cada amostra, possui um par de micrografias, diferenciadas pelo aumento de sua resolução.

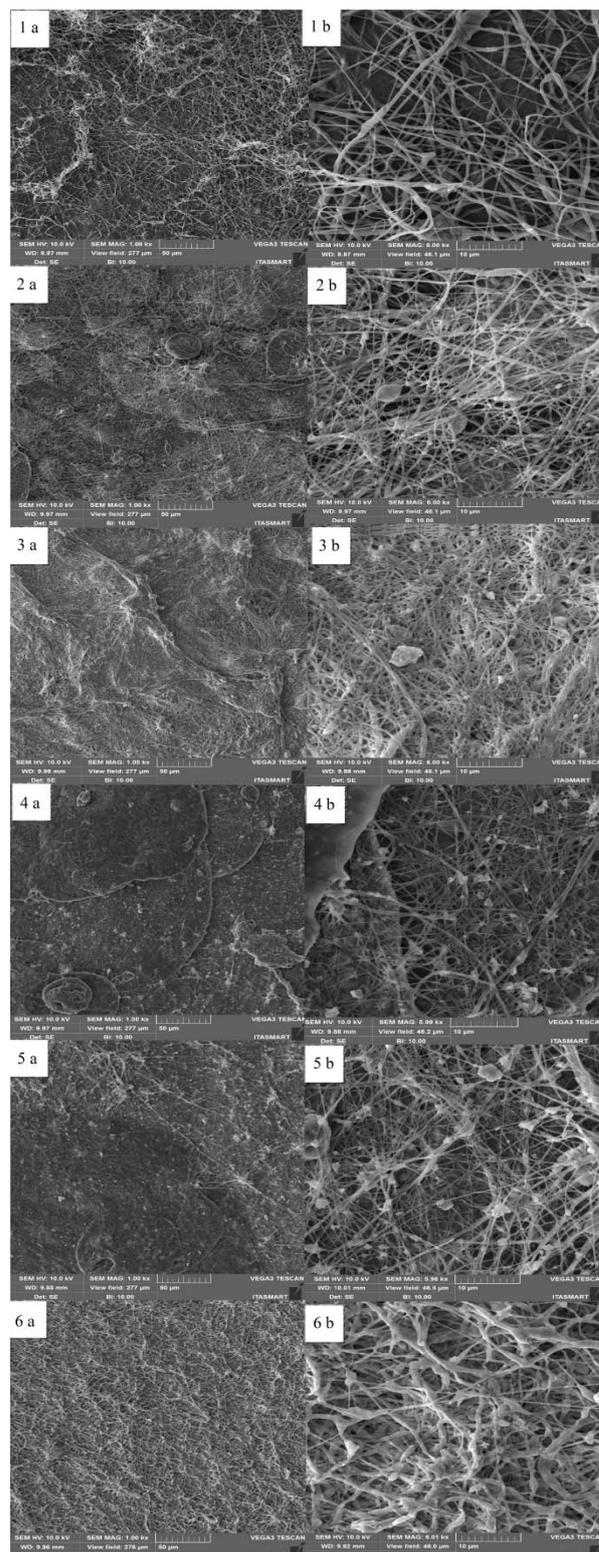


Figura 2: 1) Manta de PBAT/nHAp 1%; 2) Manta de PBAT/nHAp 2%; 3) Manta de PBAT/nHAp 3%; 4) Manta de PBAT/nHAp 4%; 5) Manta de PBAT/nHAp 5%; 6) Manta de PBAT/nHAp 6%;

Nas micrografias 1a e 1b (PBAT/nHAp 1%) observa-se a presença de uma manta de PBAT/nHAp homogênea sem a presença de contas. Tendo como diâmetro médio, por volta dos 0,5 μm e possuindo

formação de pequena de *beads*. Apresentando desta forma, uma melhor desenvoltura.

Contudo, observaram-se nas demais micrografias, exceto na 1a e 1b (PBAT/nHAp 1%), 6a e 6b (PBAT/nHAp 6%), índices de gotejamento. Na micrografia 2a e 2b apresentou, devido ao gotejamento, a formação de placas sob as fibras, dificultando, em determinados pontos, a formação das mantas. A micrografia 3a e 3b (PBAT/nHAp 3%) foi a que ocorreu uma maior formação das placas, devido ao gotejamento e também apresenta a formação de contas [8]. Os diâmetros destas fibras variaram, porém em sua maioria prevaleceu em torno de 0,25 μm . Sendo que as nHAp variaram entre 0,5 μm à 1,5 μm .

Nas micrografias 4a, 4b (PBAT/nHAp 4%), 5a e 5b (PBAT/nHAp 5%) apresentaram uma morfologia semelhante às mostradas em 3a e 3b (PBAT/nHAp 3%), obtendo porém um menor índice de gotejamento. Nestas micrografias a diversificação dos diâmetros se reduziu prevalecendo entre 0,25 μm a 0,5 μm . Já as nanopartículas se tornaram mais aglomeradas obtendo um tamanho entre 0,5 μm a 2 μm . Nas micrografias 6a e 6b (PBAT/nHAp 6%) ocorreu, apesar dos *beads*, a não formação de placas. Também obteve uma melhor distribuição da nHAp, sendo que seu diâmetro prevaleceu entre 0,12 μm a 0,5 μm . Todavia, os diâmetros das fibras, em geral, aumentaram estando entre 0,5 μm a 1 μm .

Discussão

Devido à grande versatilidade da técnica de eletrofiação é possível obter além de excelentes propriedades, os mais diversos tipos de fibras através de simples ajuste nas variáveis do processo [1]. Sendo que, também existem muitos fatores que afetam a formação das contas nas nanofibras, como a tensão aplicada, a viscoelasticidade da solução, a densidade de cargas elétricas e a tensão superficial da solução [2]. Investigou que misturas de solventes alteram na morfologia de fibras de PBAT. E foi observado, também pela literatura, a relação entre o solvente ou mistura de solventes empregados e a formação de contas [3]. Existem muitos fatores prováveis que afetam a morfologia das fibras em diferentes solventes como taxa de evaporação, polaridade, condutividade, tensão superficial, viscoelasticidade, massa molar, grau de emaranhamento das cadeias em solução e condições ambientais[3]. Do mesmo modo, como pode ser observado, a umidade e a temperatura, tanto referente a dispersão da nHAp como para o processo de eletrofiação, se fez bastante necessário para a elaboração das fibras. Sendo que caso não possuir um controle das mesmas, pode ocasionar uma interferência negativa para o processo [5]. Fong [4] descreve a formação das fibras com defeitos em forma de contas como sendo uma instabilidade capilar do jato devido ao desequilíbrio causado pelas flutuações na forma e densidade de cargas elétricas do jato. Em seus trabalhos o autor afirma que a tensão superficial e a viscoelasticidade da solução são os parâmetros mais

importantes no controle da morfologia das fibras com defeitos em forma de contas. Como pode se observar, a quantidade de rpm ao dispersar a solução também interfere, assim como a proporção dos solventes, para o controle das contas, pois altera a viscosidade da solução. Todavia, a incorporação da nanopartícula, modifica a morfologia da solução, deixando-a desde mais densa até em sua forma menos densa, no qual resulta nos gotejamentos, além de modificar sua estrutura. Contudo, como o intuito das mantas é para o uso de reconstrução óssea, a incorporação da nanohidroxiapatita é fundamental.

Conclusão

Com isso, concluiu-se que a eletrofiação de mantas de PBAT com 1% e 6% de nHAp incorporada apresenta-se mais homogêneas e sem a presença de contas, o que consequentemente torna-as mais aptas para aplicações como arcabouços visando o estudo com cultura de células *in vitro* e ensaios *in vivo*. Espera-se que ao final deste estudo, consiga direcionar quais os parâmetros ideais de razão de solventes e porcentagens de nHAp que poderão ser incorporadas na estrutura das nanofibras de PBAT, vislumbrando a aplicabilidade deste novo nanobiomaterial para a regeneração óssea.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP (2011/17877-7 e 2011/20345-7), CNPq (474090/2013-2) e FINEP pelo suporte financeiro.

Referências

- [1] COSTA ACFM., Lima MG, Lima LHMA, Cordeiro VV, Viana KMS, Souza V, Lira HL, Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações, Revista Eletrônica de Materiais e Processos, 2009; 4(3) 29-38.
- [2] DVIR T, TIMKO BP, KOHANE DS, LANGER R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotech.* 2011; 6:13.
- [3] FONG, H.; CHUN, I. & RENEKER, D. H. - *Polymer*, 40, p.4585 (1999).
- [4] FUKUSHIMA K, RASYIDA A, YANG M. Biocompatibility of organically modified nanocomposites based on PBAT. *J Polym Res* (2013) 20:302.
- [5] JEONG, E. H.; IM, S. S. & YOUK, J. H. - *Polymer*, 46, p.9538 (2005).
- [6] MADURANTAKAM PA, COST CP, SIMPSON DG, BOWLIN GL. Science of nanofibrous scaffold fabrication: strategies for next generation tissue-engineering scaffolds. *Nanomedicine.* 2009; 4:193.
- [7] MEDEIROS, E. S.; MATTOSO, L. H.C.; ITO, E. N.; GREGORSKI, K. S.; ROBERTSON, G. H.; OFFEMAN, R.D.; WOOD, D. F.; ORTS, W. J.; IMAM, S. H. - *J. Biobased Mater. Bio.*, 2, p.231 (2008).
- [8] ZUO, W. W., ZHU, M.; YANG, W.; YU, H.; CHEN, Y. & ZHANG, Y. - *Polym. Eng. Sci.*, 45, p.704 (2005).