

Desenvolvimento de biomateriais porosos para liberação de ativos

Development of porous biomaterials for drug release.

RESUMO

Luis Felipe Ribeiro
ribeiro.2017@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil.

Luis Fernando Cabeça
luiscabeca@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil.

Márcio Florian
marcioflorian@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil.

O presente estudo visa produzir hidróxiapatita porosa para aplicações de enxertia óssea. O aumento da porosidade na HAP pode favorecer o crescimento celular para o interior do enxerto e aumentar o contato entre célula e substrato o suficiente para o crescimento ósseo. Esse processo pode influenciar o processo de osteocondução reduzindo o tempo de recuperação dos pacientes. A proposta para a produção dos poros é utilizar agentes formadores de poros de natureza orgânica que podem ser removidos via aquecimento durante o processo de sinterização da cerâmica. Em seguida, realizar a incorporação de ácido zoledrônico para liberação *in situ*. Ensaios de análise termogravimétrica, difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura foram realizados para caracterização do material.

PALAVRAS-CHAVE: Hidroxiapatita. Osteocondução. Sinterização.

ABSTRACT

The present study aims to produce porous hydroxyapatite for bone grafting applications. The increase in porosity in HAP can favor cell growth into the graft and increase the contact between cell and substrate enough for bone growth. This process can influence the osteoconduction process, reducing patients' recovery time. The proposal for the production of pores is to use pore forming agents of an organic nature that can be removed by heating during the ceramic sintering process. Then, perform the incorporation of zoledronic acid for *in situ* release. Tests of thermogravimetric analysis, X-ray diffraction and scanning electron microscopy were performed to characterize the material.

KEYWORDS: Hydroxyapatite. Osteoconduction. Sintering.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

As cerâmicas de fosfato de cálcio são amplamente sintetizadas para aplicações em implantes ósseos ou em revestimentos de implantes. A hidroxiapatita é a fase mais importante das biocerâmicas, uma vez que ela é encontrada naturalmente nos tecidos duros, em sua fase mineral. Com fórmula química de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, apresenta a relação de Ca/P de 1,67 e excelente biocompatibilidade. (PARK e LAKES, 2007)

Apesar das vantagens da utilização da hidroxiapatita (HAP) na enxertia óssea, esta possui desvantagens principalmente na osteocondução, devido ao processo de sinterização do material. Este possui uma porosidade baixa, (muito menor que o enxerto heterógeno), isso dificulta a formação óssea natural do paciente aumentando o tempo de cuidados pós-operatório, propensão infecciosa, rejeição e desacoplamento do material além de incômodos e dores sofridas ao indivíduo (ROSA, SHAREEF e NOORT, 2000).

Atualmente, o desenvolvimento desse material está direcionado para as características da sua porosidade como o tamanho e a interconectividade desses poros para que o contato de células mensequimais, agentes osteotrópicos ou de vasculatura adentrem esses poros. Para a produção desses poros, um composto orgânico é adicionado durante a síntese do material para que durante o processo de sinterização do material, esse orgânico seja evaporado deixando os poros na cerâmica (YOSHIKAWA et al., 2008).

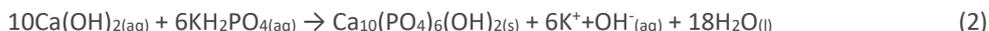
O aumento da porosidade no material induz as células para o interior do enxerto o que conseqüentemente aumenta o contato entre célula e substrato o suficiente para o crescimento ósseo, ainda sim, este é um processo lento e estressante ao paciente. Para tentar amenizar esse problema pode também ser incorporado fármacos nos poros da HAP os quais são capazes de ativar as células de crescimento e diminuir o tempo de cura do material. Uma classe de compostos que exercem essa função são os bisfosfanatos. Um fármaco da família dos bisfosfanatos é o ácido zoledrônico, um potente inibidor da proliferação de osteoclastos, largamente usado no tratamento da osteoporose (Cai et al., 2018). Assim, selecionamos o ácido zoledrônico como fármaco de ativação celular devido a sua alta afinidade ao tecido ósseo.

O objetivo geral deste trabalho é realizar a síntese da hidroxiapatita (HAP) porosa utilizando reagentes orgânicos de sacrifício, a sua caracterização e a incorporação de ácido zoledrônico no material.

MATERIAIS E MÉTODOS

SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA

A síntese da hidroxiapatita foi feita a partir da rota de via úmida pelo processo de precipitação homogênea. Uma solução aquosa de 300 mL de óxido de cálcio (4,4660 g) foi agitada por 20 minutos para a formação do $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Foi preparada uma solução de 50 mL de KH_2PO_4 (6,501 g) e gotejada na solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. O pH foi controlado ($\text{pH} > 10$) para formar a fase adequada de HAP. As equações 1 e 2 apresentam, respectivamente, a formação de hidróxido de cálcio e a formação de hidróxiapatita.

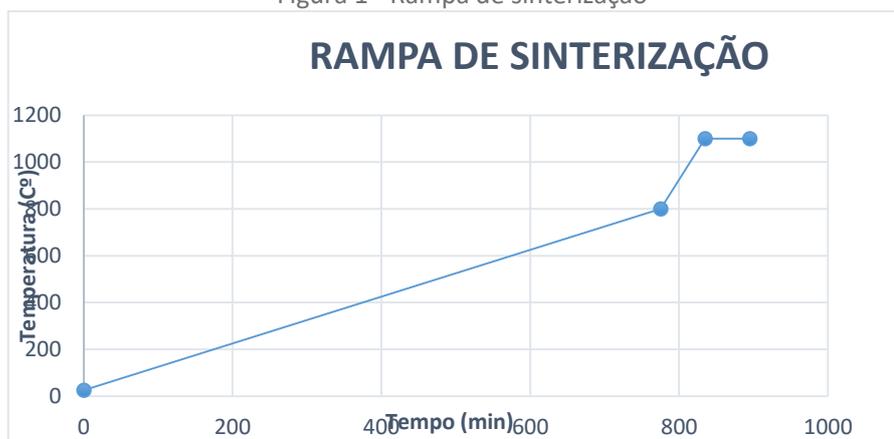


O composto orgânico foi adicionado na solução de hidróxido de cálcio. Os agentes orgânicos formadores de poro utilizados neste trabalho foram o álcool polivinílico (PVA) e a carboximetilcelulose (CMC) em quantidades de 10% de massa em relação à massa total da amostra.

Após precipitada a HAP esta foi seca em estufa a 70° C por dois dias para que toda a água do processo de síntese fosse evaporada. Em seguida, a HAP foi moídas manualmente com almorafiz e pistilo. O pó de HAP foi levado para o processo de sinterização.

A sinterização das amostras de HAP com formadores de poros foi realizada em um forno Nabertherm LHT 02/17 LB Speed. A rampa de sinterização adotada pode ser vista na Figura 1. As amostras em temperatura ambiente (25 C°) foram submetidas a um aquecimento na taxa de 1 C° por minuto até 800 C° seguida de 5 C° por minuto até 1100 C°.

Figura 1 - Rampa de sinterização



Fonte: Autoria própria

ANÁLISE DE RAIOS X

As amostras de HAP a verde e sintetizadas foram enviadas para análise de difração de raios X. As análises foram feitas no difratômetro da marca Bruker modelo D2 Phaser 2nd Genmostrado, utilizando ânodo de cobre, com o parâmetro 2θ graus variando de 20° a 80°, velocidade de 0,03 °/s e fenda (slit) de 0,2 mm.

ANÁLISE TERMOGRAVIMÈTRICA

As análise termogravimétrica (TGA) foram utilizados amostras de HAP com

10% de formadores de poros (PVA e CMC). As amostras foram enviadas para termogravimetria (Analisador Termogravimétrico Shimadzu TGA-51H), e submetidas à aquecimento até 800 °C, com taxa de aquecimento de 10°C/min e fluxo de gás de arraste de ar sintético de 20 ml/min.

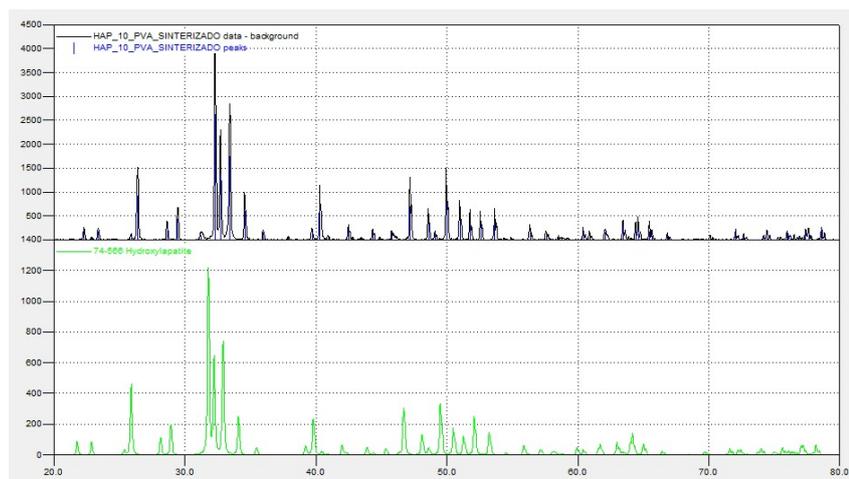
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), amostras de HAP após o processo de sinterização foram analisadas em aparelho de microscopia eletrônica de varredura (MEV) FEI Quanta 200 (Universidade de Londrina). Para possibilitar a visualização de tal superfície no microscópio, foi necessário a realização de sputtering com partículas de ouro sobre a superfície (Aparelho de sputtering/coating Bal-Tec SCD-050). As amostras foram analisadas utilizando com ampliações de 800x, 3000x, 60000x e 15000x.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após sintetizada e sinterizada as amostras de hidróxiapatita foram caracterizadas. O primeiro ensaio foi o DRX pois este ensaio aponta a fase cristalina obtida após a sinterização. O difratograma (Figura 2) apresenta os resultados da amostra de HAP com poros a partir do uso de PVA. Os resultados apresentaram um deslocamento dos picos, porém, é um deslocamento de todo o conjunto e não somente de picos específicos. Logo, é possível dizer que a HAP sintetizada corresponde a fase HAP desejada.

Figura 2. DRX da HAP sintetizada com PVA

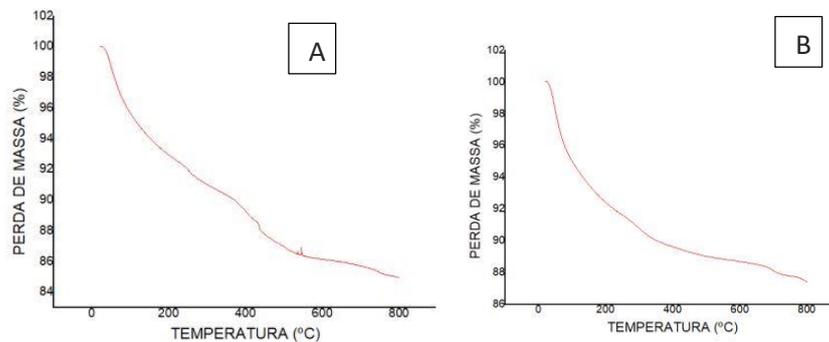


Fonte: Autoria própria (2020)

O próximo teste realizado foi a análise de TGA onde é possível notar a perda de massa em relação à temperatura. Esse ensaio fornece a quantidade, em massa, de agente formador de poro incorporado na amostra de HAP e em que temperatura ela é degradada.

O resultado para a amostra HAP/PVA (Figura 3A) aponta uma perda de massa de aproximadamente 14%. O resultado da amostra HAP/CMC (Figura 3B) mostra uma perda de massa de 12%, ou seja, em ambos os testes houve maior perda de massa que o esperado. Os testes foram realizados uma segunda vez mas os resultados também apresentaram os mesmos padrões. Esses valores podem ser atribuídos a uma falha no equipamento.

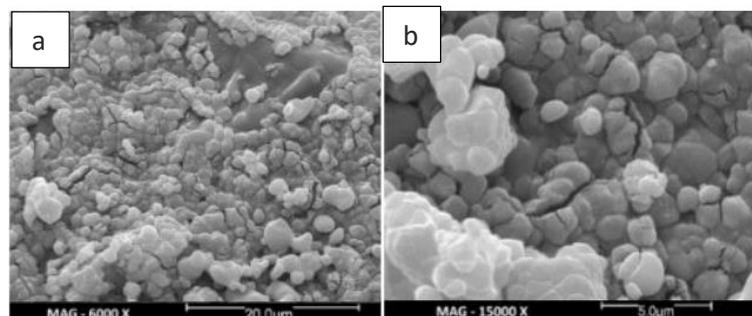
Figura 3. Resultado de TGA da amostra HAP/PVA (A), e amostra HAP/CMC (B).



Fonte: Autoria própria (2020)

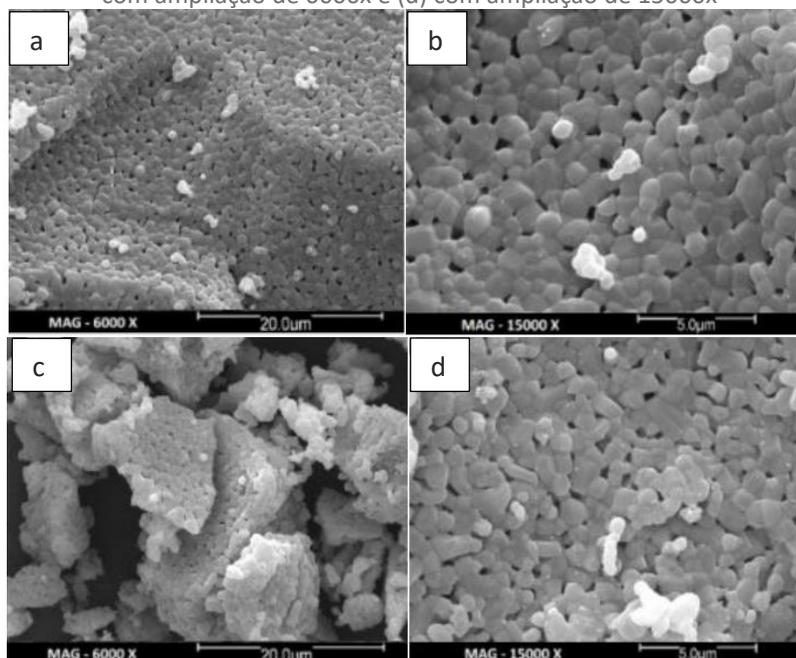
As figuras seguintes são imagens de MEV de regiões de hidroxiapatita sinterizadas e foram realizadas para identificação da morfologia dos poros obtidos pela degradação do material orgânico incorporado na síntese durante a sinterização. A Figura 4(a) e 4(b) é de material sem agente formador de poro que será utilizado para comparação. A Figura 5(a) e 5(b) e a Figura 5(c) e 5(d) são imagens de MEV das amostras de hidroxiapatita sintetizadas com PVC e CMC, respectivamente.

Figura 4. MEV de hidroxiapatita sinterizada sem agente formador de poro (a) com ampliação de 6000x e (b) com ampliação de 15000x.



Fonte: Autoria Própria (2020)

Figura 5. MEV de amostra de hidroxiapatita sinterizada com PVA (a) com ampliação de 6000x e (b) com ampliação de 15000x. MEV de hidroxiapatita sinterizada com CMC (c) com ampliação de 6000x e (d) com ampliação de 15000x



Fonte: Autoria Própria (2020)

A partir das imagens de MEV, é possível notar que os agentes formadores de poros realmente cumpriram seu objetivo. A ampliação de 15000x deixa notado a região de vazios das amostras em relação ao material de referência que é a HAP produzida sem agentes formadores de poros. Nota-se também uma quantidade maior de poros para amostras de PVC com relação ao do CMC, entretanto, os testes devem ser melhorados para obtenção de um material com maior intensidade de poros. Uma alternativa seria aumentar o proporção de 10% para 20% e 40% de agentes orgânicos.

CONCLUSÃO

O processo de síntese de hidroxiapatita utilizado a partir dos reagentes selecionados é eficiente e validado pelo ensaio de DRX. Além disso, a adição de compostos orgânicos cumprem o seu objetivo de agente formador de poro a partir da análise das imagens de MEV realizadas. Entretanto, em função da pandemia de covid a incorporação do AZ nos poros de HAP não pode ser realizada. Como ensaios complementares, a porosimetria de mercúrio seria fundamental e foi projetada para ser realizada neste trabalho, porém, foi afetada pelo cenário de pandemia causada pelo vírus COVID-19, assim como, os ensaios de citotoxicidade para a verificação e validação do uso deste material em sistemas biológicos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço todos os técnicos do LabMulti, laboratório multiusuário da UTFPR de Londrina; Universidade Estadual de Londrina (UEL) e em especial a UTFPR câmpus Londrina pelo apoio ao projeto destaque.

REFERÊNCIAS

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials - An Introduction**. 3ª. ed. Nova Iorque: Springer, 2007. 535 p. ISBN 978-0-387-37879-4.

ROSA, A. L.; SHAREEF, M. Y.; NOORT, R. V. **Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita**. *Pesqui Odontol Bras*, 14, Setembro 2000. 273-277.

YOSHIKAWA, H.; TAMAI, N.; MURASE, T.; MYOUI, A. **Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering**. *Interface Focus*, [s. l.], 23 dez. 2008. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/23687748_Interconnected_Porous_Hydroxyapatite_Ceramics_for_Bone_Tissue_Engineering. Acesso em: 09 jul. 2020.

LOCA, DAGNIJA et al. **Porous Hydroxyapatite Bioceramic Scaffolds for Drug Delivery and Bone Regeneration**. IOP Conference Series Materials Science and Engineering, 2011. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/231067809_Porous_Hydroxyapatite_Bioceramic_Scaffolds_for_Drug_Delivery_and_Bone_Regeneration. Acesso em 08 jul. 2020.

LU, YAO et al. **High-activity chitosan/nano hydroxyapatite/zoledronic acid scaffolds for simultaneous tumor inhibition, bone repair and infection eradication**. *Materials Science & Engineering C, Materials Research Bulletin*, 2018. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928493117325754?via%3Dihub>. Acesso em: 08 jul. 2020.

PIGNATELLO, R. BASILE, L. Puglisi, G. **Chitosan glutamate hydrogels with local anesthetic activity for buccal application**. *Drug Delivery*. 2009; 16:176-81. PMID:19514978. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10717540902861267>. Acesso em: 28 ago. 2020.

CAI, Y.; GAO, T.; FU, S.; SUN, P. **Development of zoledronic acid functionalized hydroxyapatite loaded polymeric nanoparticles for the treatment of osteoporosis**. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 16, n. 2, p. 704–710, 2018. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2018.6263>. Acesso em: 28 ago. 2020.