

## INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO AGENTE RETICULANTE EM MATRIZES DE HIDROGEIS E COMPOSITOS INTELIGENTES DE NANOHIĐROXIAPATITA E PNIPAA<sup>M</sup>\*

Luiza Braga Ferreira dos Santos<sup>1</sup>  
Francielly Moura de Souza Soares<sup>2</sup>  
Emília dos Santos Monteiro<sup>3</sup>  
Paula Anastácia Moraes Cairo Gomes<sup>3</sup>  
Maria Elisa Rodrigues Coimbra<sup>4</sup>  
Carlos Nelson Elias<sup>5</sup>

### Resumo

A busca por materiais sintéticos que mimetizem tecidos e órgãos ou até mesmo, ajudem a restaurar suas funcionalidades, fazem com que o número de publicações envolvendo biomateriais cresça consideravelmente. Embora, em inúmeros casos cirúrgicos seja fundamental a restauração do tecido ósseo, a utilização do enxerto ósseo durante uma cirurgia ainda se encontra muito limitada. O desenvolvimento de compósitos tem sido uma alternativa para combinar diferentes propriedades dos materiais, potencializando suas aplicações. O objetivo desse trabalho foi sintetizar compósitos de PNIPAA<sup>m</sup> e nanopartículas de hidroxiapatita, combinando as propriedades de um hidrogel injetável com uma cerâmica osteocondutora; utilizou-se uma nova rota de síntese e foi investigado como a concentração de agente reticulante, isto é, o MBA, poderia afetar a morfologia e características de uma série de hidrogéis e compósitos. As técnicas de caracterizações utilizadas foram o FTIR, MEV e TGA. Observou-se que a concentração de agente reticulante afetou significativamente a morfologia de todos os compostos obtidos, isto porque o número de cavidades apresentadas na estrutura do hidrogel aumentou com a concentração de MBA utilizada no processo de síntese; essa variação da concentração também influenciou na quantidade de nanohidroxiapatita aderida na matriz polimérica. Os compósitos obtidos apresentaram características favoráveis a potencial aplicação como enxerto ósseo.

**Palavras-chave:** Hidrogel Inteligente; Nanohidroxiapatita; Enxerto Ósseo; Compósito.

### INVESTIGATION OF THE RETICULANT AGENT EFFECTS IN HYDROGELS AND SMART COMPOSITES OF NANOHYDROXYAPATITE AND PNIPAA<sup>M</sup>

#### Abstract

The search for synthetic materials that mimic tissues and organs or even, helps restore their functionalities, makes the number of publications involving biomaterials grow considerably. Although be fundamental the restoration of the bone tissue in a lot of surgical cases, the application of bone graft during surgery still is limited. Composites development has been an alternative to combine different material properties, enhancing their applications. The study goal was to synthesize composites of PNIPAA<sup>m</sup> and hydroxyapatite nanoparticles, combining the properties of an injectable hydrogel with an osteoconductive ceramic; It was used a new route of synthesis and it was investigated how the crosslinking agent concentration, i.e. MBA, could affect the morphology and characteristics of a series of hydrogels and composites. The characterization techniques used were IR, SEM and TGA. It was observed that the crosslinking agent concentration directly affected the morphology of all the obtained compounds, in which the number of cavities presented on the hydrogel structure increased joint with the concentration of MBA used in the synthesis process; this concentration variation also influenced on amount of nanohydroxyapatite adhered in the polymer matrix. The obtained composites presented characteristics favorable to the potential application as a bone graft.

**Keywords:** Smart Hydrogel, Nanohydroxyapatite; Bone Graft; Composite.

<sup>1</sup> Química, Mestre em Ciência dos Materiais, Departamento de Ciência dos Materiais, Instituto Militar de Engenharia (IME), Rio de Janeiro- RJ, Brasil.

<sup>2</sup> Tecnóloga em Metalurgia, Doutoranda em Ciência dos Materiais, Depto. Ciência dos Materiais, IME, RJ, RJ, Brasil.

<sup>3</sup> Química, Doutoranda em Ciência dos Materiais, Depto. de Ciência dos Materiais, IME, RJ, RJ, Brasil.

<sup>4</sup> Odontologia, Doutora em Ciência dos Materiais, Depto. de Ciência dos Materiais, IME, RJ, RJ, Brasil

<sup>5</sup> Engenheiro Metalúrgico, professor titular, Depto. de Ciência dos Materiais, IME, RJ, RJ, Brasil.

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo dos biomateriais vem ganhando cada vez mais espaço, tanto no meio acadêmico quanto no meio clínico. A compreensão de que a junção de biocompatibilidade com funcionalidade pode proporcionar o desenvolvimento de novos biomateriais, em que combinações de suas propriedades podem sanar lacunas ainda não preenchidas; fizeram com que a busca por novos materiais que mimetizam tecidos e órgãos crescesse de forma exponencial [1-2].

Apesar dos inúmeros avanços tecnológicos que vivemos hoje em dia, ainda existem problemas em nossa sociedade. Mas estas limitações fazem com que cientistas de todo o mundo busquem soluções ou tentem minimizar as consequências desses problemas [2]. O enxerto ósseo, apesar de muito utilizado, sofre algumas limitações, enfermidades como a osteoporose ou um acidente, podem acarretar em um cenário onde o enxerto ósseo é o único recurso. Dentre essas limitações, destacam-se: o autógeno devido a quantidade limitada de osso que poderia ser retirado do indivíduo, além de causar muita dor ao mesmo; o alógeno e homogêneo por apresentarem elevada chance de causar reações adversas e/ou rejeição ao tecido hospedeiro [3]. Assim sendo, materiais aloplásticos, por terem sua origem totalmente sintética, têm sido explorados para o uso como materiais de suporte, com o objetivo de não apenas sustentar o novo tecido ósseo a ser formado como também promover a osteoindução [4].

Materiais poliméricos têm ganhado atenção devido a sua facilidade de manufatura e incontáveis tamanhos e formas ao qual possa ser comercializado. Algumas estratégias como alterar as concentrações dos reagentes e/ou o processamento, fazem com que polímeros derivados de um mesmo mero tenham características totalmente diferentes uns dos outros. Os hidrogéis são uma classe de polímeros que apresentam uma estrutura tridimensional, e características hidrofílicas capazes de absorver fluidos biológicos [5]. O poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) é um *smart hydrogel* termosensível, com a capacidade de exibir um ponto de transição conhecido como Temperatura de Solução Crítica Inferior (Lower Critical Solution Temperature - LCST), em torno de 33 °C, isso faz com que se tenha um comportamento de contração ao atingir essa temperatura, possuindo assim uma característica de gel injetável. Logo, esta propriedade fez com que o PNIPAAm despertasse o interesse para aplicação no âmbito medicinal como um material de suporte, entretanto, esse material não possui características osteocondutoras para ser utilizado como enxerto ósseo [6].

A nanohidroxiapatita (nanoHa) sintética é uma cerâmica que possui suas propriedades osteocondutoras conhecidas pela literatura. Como a parte mineral do tecido osseo é composta por cristais de hidroxiapatita carbonatada nano-estruturada, totalizando 65% do seu peso total, a nanoHa é uma excelente candidata a mimetizar o tecido ósseo [7].

Assim sendo, propõe-se nesse trabalho sintetizar uma série de hidrogéis e compósitos de PNIPAAm e nanohidroxiapatita, utilizando uma nova metodologia de síntese e variando a concentração de agente reticulante, com o objetivo de aumentar a polaridade da rede polimérica e alterar a morfologia a ser apresentada pela matriz polimérica, uma vez que a adesão celular está diretamente ligada ao arranjo estrutural dessa matriz. Portanto, esperasse que o arranjo tridimensional do PNIPAAm, juntamente com as propriedades osteocondutoras da nanoHa, sejam suficientes para o desenvolvimento de um biomaterial com o potencial uso como material de suporte, que sustente e promova a diferenciação celular para o

crescimento do tecido ósseo, e assim possa ser utilizado como aloplástico (enxerto ósseo sintético).

## 2 DESENVOLVIMENTO

Os hidrogéis e os compósitos foram sintetizados por meio de adaptações nas rotas descritas por Queiroz (2010) e Ribeiro *et al.* (2017) [8] [9]. No qual, os hidrogéis diferentes dos já relatados na literatura, foram obtidos em atmosfera inerte de Nitrogênio, agitação magnética e na temperatura de aproximadamente 50 °C, com o tempo reacional de 20 minutos. Os reagentes utilizados foram o N-isopropilacrilamida (NIPAM) (Sigma-Aldrich) como monômero, persulfato de amônio (APS) (Gold FM) e metabissulfito de sódio (NMB) (Farmos) como iniciadores redox, na razão da massa/massa de 3,3 e 4,5%, respectivamente; o N-N'-metileno(bis)acrilamida (MBA) (Sigma-Aldrich) foi utilizado como agente reticulante. Obteve-se três hidrogéis o H1.1, H2 e H3 as proporções de APS e NMB foram mantidas para todos os compostos, alterando-se apenas as concentrações do MBA, como mostrado na tabela 1.

**Tabela 1.** Concentração do MBA presente na síntese dos hidrogéis

	H1.1	H2	H3
Razão m/m %	6.0	10.0	20.0

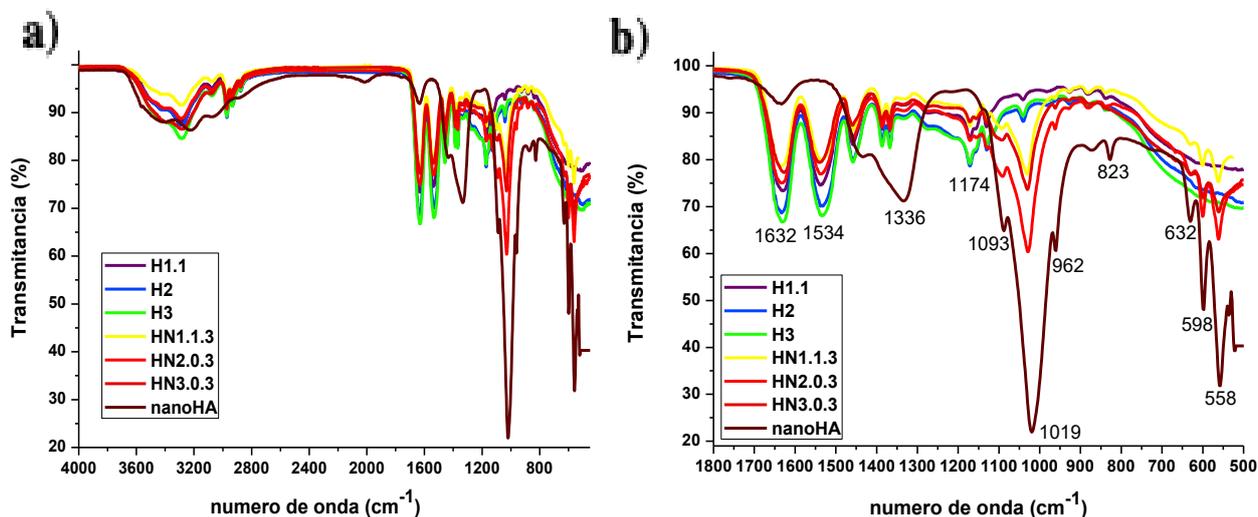
Já na síntese dos compósitos, optou-se por realizar uma mistura química, no qual 30% m/m da nanohidroxiapatita previamente sintetizada foi adicionada ao monômero NIPAM; em seguida, o processo de síntese foi o mesmo que o descrito para os hidrogéis, respeitando igualmente as quantidades estequiométricas e obtendo os compósitos HN1.1.3, HN2.0.3 e HN3.0.3.

Os seis compostos obtidos foram caracterizados por espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) em modo ATR, o espectrômetro da marca VARIAN e modelo 660 IR, foi utilizado na faixa de IR média de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com 32 scans e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Para a realização dos ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV), cada amostra permaneceu intumescendo em água deionizada durante 24 horas e em seguida foram liofilizadas por 72 horas. O MEV utilizado foi o da marca MEV FEI Quanta FEG 250, operado com a distância de trabalho em aproximadamente 9 mm e com aumentos de 2.500, 10.000, 40.000 e 120.000x. A análise termogravimétrica (TGA) foi feita por meio do analisador Termogravimétrico TA Instruments TGA Q500. Os compostos foram submetidos a temperaturas entre 25 à 700 °C, com velocidade de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio.

### 2.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Na figura 1 é possível observar o somatório das bandas características dos hidrogéis e da nanohidroxiapatita, nos espectros referentes aos biocompósitos. As bandas características principais do PNIPAAm estão em 1632  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento C=O da carbonila da amida e em 1534  $\text{cm}^{-1}$  associada a deformação angular da ligação N-H da amida secundária, essas bandas foram estão de acordo com as já descritas por Carrero *et al.* (2018) [10]. Já as principais bandas da nanoHa, também apresentadas para os compostos HN1.1.3, HN2.0.3 e HN3.0.3,

estão em 1093 e 1019  $\text{cm}^{-1}$  referentes às vibrações dos grupos fosfatos  $\text{v}_3\text{PO}_4^{3-}$  e em 598 e 558  $\text{cm}^{-1}$  provenientes da deformação anti-simétrica do  $\text{PO}_4^{3-}$ , estas bandas corroboram com as já citadas na literatura [11] [12]. Notasse uma pequena banda em 823  $\text{cm}^{-1}$  no espectro da nanoHA referente a vibração  $\text{CO}_3^{2-}$ , a presença dessa impureza ocorre devido a metodologia de síntese usada e sua presença favorece a redução no tamanho dos cristais.



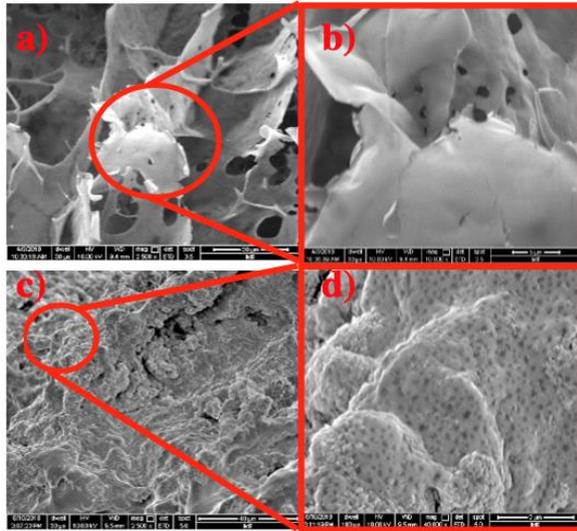
**Figura 1.** (a) Espectro de absorção no infravermelho dos hidrogéis, do biocompósito e da nanoHidroxiapatita. (b) Ampliação do espectro de FTIR na região de 500 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ .

## 2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

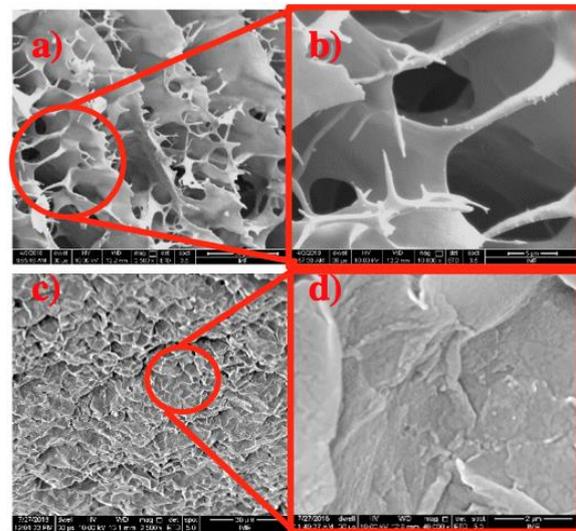
As análises de MEV mostraram que existem diferenças significativas nas morfologias dos hidrogéis. Como poder ser visto nas figuras 1(a)(b), 2(a)(b) e 3(a)(b), os hidrogéis H1.1, H2 e H3, respectivamente, apresentaram uma morfologia com arranjos desorganizados, entretanto é possível observar que o número de cavidades presentes nas superfícies aumentou, de acordo com o aumento da concentração de agente reticulante. Este agente, no caso o MBA, é responsável por produzir pontes entre as cadeias poliméricas na matriz do hidrogel durante o processo de síntese e assim gerar uma rede polimérica tridimensional. As morfologias dos compostos (figuras 1(c)(d), 2(c)(d) e 3(c)(d)), foram totalmente diferentes das morfologias dos hidrogéis, isso se deve ao fato da nanohidroxiapatita ter sido incorporada durante o processo de polimerização e assim participado do arranjo entre as moléculas. O número de cavidades presentes nas superfícies foi menor nos compostos, porém ao comparar as morfologias entre eles, o HN3.0.3, que possui maior concentração de MBA, apresenta um maior número destes, um comportamento semelhante ao do H3. O HN1.1.3 exibiu a morfologia que mais divergiu entre as demais, não apresentando cavidades em sua superfície, mas apresentando poros. Por meio das ampliações de 40.000x, é possível observar a presença de pequenas esferas espalhadas pelas superfícies de todos os compostos, sendo elas as nanopartículas de hidroxiapatita.

A figura 5, exibe a imagem de MEV da morfologia da nanoHa com aumentos de 120.000x, notasse regiões com aglomerados de partículas, uma vez que por possuírem uma área de superfície muito grande, a interação entre as mesmas é alta. Como também há partículas isoladas, determinou-se o tamanho médio dessas partículas, que foi de aproximadamente 59-64 nm, com geometrias circulares e em

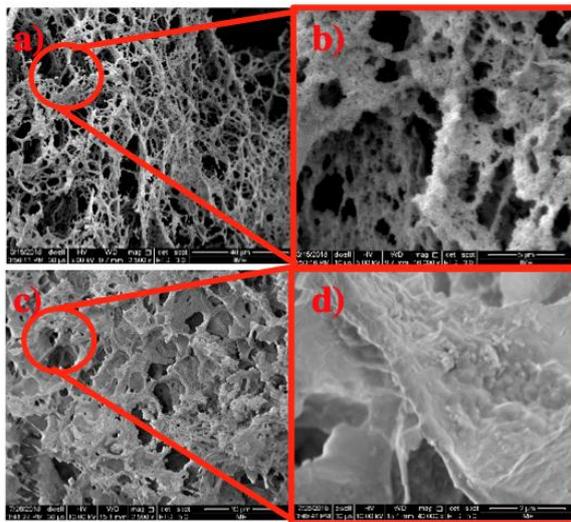
bastões, sendo a geometria em bastão característica de hidroxiapatita com a presença de carbonato em sua estrutura cristalina [7].



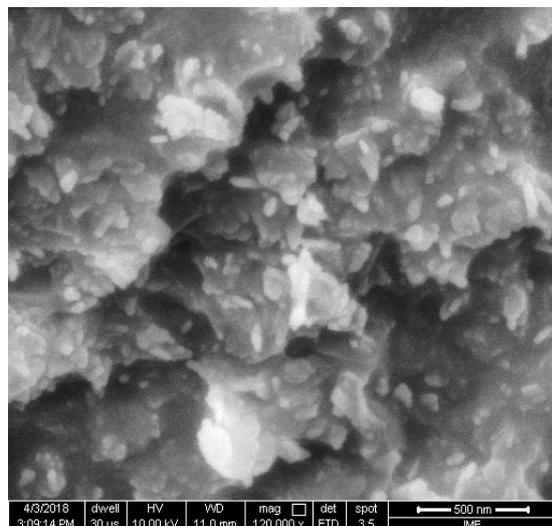
**Figura 2.** (a) Imagem de MEV do H1.1 com aumento de 2.500x. (b) Ampliação da imagem 1a em 10.000x. (c) Imagem de MEV do HN1.1.3, com o aumento de 2.500x. (d) Ampliação de 40.000x.



**Figura 3.** (a) Imagem de MEV do H2 com aumento de 2.500x. (b) Ampliação da imagem 1a em 10.000x. (c) Imagem de MEV do HN2.0.3, com o aumento de 2.500x. (d) Ampliação de 40.000x.



**Figura 4.** (a) Imagem de MEV do H3 com aumento de 2.500x. (b) Ampliação da imagem 1a em 10.000x. (c) Imagem de MEV do HN3.0.3, com o aumento de 2.500x. (d) Ampliação de 40.000x.



**Figura 5.** Imagem de MEV das nanohidroxiapatitas, com o aumento de 120.000x.

### 2.3 Análise termogravimétrica

Por meio da análise termogravimétrica foi possível determinar a quantidade de resíduo no biocompósito e assim estipular a porcentagem da massa de nanohidroxiapatita incorporada na matriz do hidrogel. A nanohidroxiapatita degrada

a temperaturas muito maiores do que 700 °C e a análise de TGA realizada nos hidrogéis, mostrou que todos os três hidrogéis degradam em temperaturas inferiores a 410 °C, entretanto possuem um número de eventos de degradação que variou entre dois e três diferentes tempos. Deste modo, a quantidade de resíduo que restou na análise de TGA dos compósitos menos a quantidade de resíduo dos hidrogéis, fornece a quantidade de nanoHa incorporada. A tabela 2, mostra que o número de nanoHa presente na matriz do compósito foi de 12% para o H1.1 e 20% tanto para o HN2.0.3 quanto para HN3.0.3, ou seja, ocorreu uma perda de massa de nanoHa durante o processo de síntese, pois não foi incorporado os 30% de nanoHa como esperado. Ademais, a maior concentração de MBA presente na matriz, aumenta a polaridade da cadeia polimérica, o que por sua vez, aumenta a interação entre a cadeia polimérica e a nanoHa. Assim podemos considerar que a concentração de 10% m/m do MBA no H2.0.3 foi suficiente incorporar 20% de nanoHa e o aumento dessa concentração, não foi suficiente para aumentar a polaridade do polímero de modo que resultasse em um aumento da quantidade de nanoHa aderida na matriz.

**Tabela 2.** Quantidade de resíduo após a análise de TGA na temperatura de 700 °C

	H1.1	H2	H3	HN1.1.3	HN2.0.3	HN3.0.3
Resíduo (%)	5	5	10	17	25	30

### 3 CONCLUSÃO

A metodologia utilizada permitiu a obtenção de três hidrogéis e três compósitos derivados do mesmo mero, porém com propriedades distintas. O somatório das bandas características da nanohidroxiapatita junto com as do PNIPAAm, demonstradas por meio das análises de FTIR nos compósitos é uma evidência de que a incorporação da nanoHa na matriz do hidrogel foi um sucesso, entretanto, a porcentagem de massa incorporada variou entre 12 e 20%. As diferentes concentrações do agente reticulante, no caso o MBA, permitiram a obtenção de hidrogéis com morfologias diferentes, à medida que número de pontes aumentavam na rede polimérica, o número de cavidades apresentadas pela matriz tanto nos hidrogéis, quanto nos compósitos também aumentavam. Portanto, é possível controlar o número de cavidades desejadas, por meio da concentração do MBA. Somado a isto, os compósitos exibiram uma boa dispersão das nanopartículas de hidroxiapatita em toda a extensão do hidrogel, assim sendo, os compósitos possuem características desejáveis para um material com potencial uso em enxerto ósseo.

### Agradecimentos

Agradecemos as agências de fomento CAPES, FAPERJ e CNPq pelos recursos financeiros destinados ao programa de bolsa e à execução deste projeto.

### REFERÊNCIAS

- 1 Stock, U. A.; Vacanti, J. P. Tissue Engineering: Current state and prospects. Annual Review Of Medicine, 2001, 52, 443 - 451.

- 2 O'Brien, F.J. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. Mater Today, 2011, 14 (3), 88 – 95.
- 3 Uskoković, V.. When 1+1>2: Nanostructured composites for hard Tissue Engineering applications. Material Science Engineering C, 2015, 57, 434 – 451.
- 4 Detsch, R., Will, J., Hum, J., Roether, J. A., Boccaccini, A. R.. 6.1 Biocompatibility, 6.2 Materials and Synthesis. Cell Culture Technology, 2018, 91 - 93.
- 5 Matyjaszewski, K., Tsarevsky, N. V. Macromolecular engineering by atom transfer radical polymerization. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(18), 6513 - 6533.
- 6 HAQ, M. A.; SU, Y.; WANG, D.. Mechanical properties of PNIPAM based hydrogels: A review. Materials Science And Engineering: C, 2017, 70, 842 – 855.
- 7 Yazdani, J., Ahmadian, E., Sharifi, S., Shahi, S., Dizaj, S. M.. A short view on nanohydroxyapatite as coating of dental implants. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 105, 553 - 557.
- 8 Queiroz, P. M.. Síntese e caracterização de hidrogéis superabsorventes obtidos a partir da copolimerização de acrilamida, n-isopropilacrilamida e metacrilato de sódio. Dissertação de mestrado, 2011.
- 9 Ribeiro, C. A.; Martins, M. V.S.; Bressiani, A. H.; Bressiani, J. C.; Leyva, M. E.; de Queiroz, A. A. A.. Electrochemical preparation and characterization of PNIPAM-HAP scaffolds for bone tissue engineering. Materials Science And Engineering: C, 2017, 81, 156-166.
- 10 Carrero, Maria G., James J. Posada, and Marcos A. Sabino. Intelligent copolymers based on poly (N-isopropylacrylamide) PNIPAm with potential use in biomedical applications. Part i: PNIPAm functionalization with 3-butenoic acid and piperazine. International Journal of Advances in Medical Biotechnology I, 2018, 13 - 21.
- 11 Poinern, E.; Brundavanam, R. K.; Le, X. T.; Fawcett, D.. Thermal and ultrasonic influence in the formation of nanometer scale hydroxyapatite bio-ceramic. International Journal Of Nanomedicine, 2011, 6, 2083-2095.
- 12 Chandrasekaran, A.; Suresh S.; Dakshanamoorthy A.. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite (n-HAP) using the wet chemical technique. International Journal Of Physical Sciences, 2013, 8(30), 1639-1645.