

Obtenção de hidrogéis a base de halloysita modificada com hidroxiapatita com potencial aplicação em sistemas para regeneração óssea

Obtaining hydrogels based on halloysite modified with hydroxyapatite with potential application in bone regeneration systems

Anne Caroline da Silva Rocha

Bolsista PCI, Licenciada em Química, D.Sc.

Luciana Neves Rodrigues

Bolsista PCI, Técnica em química.

Lívia Rodrigues de Menezes

Professora colaboradora, D.Sc.

Luiz Carlos Bertolino

Supervisor, Geólogo, D.Sc.

Resumo

O dano tecidual extenso e a falha de órgãos causam milhões de mortes, devido à incapacidade de regeneração natural. Em resposta, a engenharia de tecidos surgiu como uma área promissora, focada em desenvolver tratamentos avançados para regeneração de tecidos. Embora no setor de engenharia óssea a hidroxiapatita destaque-se amplamente por sua osteocondutividade, sua baixa dispersão e característica mais quebradiça limitam sua aplicação neste setor. Em contrapartida, a halloysita, com suas propriedades mecânicas superiores, é utilizada como reforço estrutural, e sua combinação com hidrogéis e hidroxiapatita visa melhorar as propriedades mecânicas e aliando as mesmas a boas propriedades biológicas. Os resultados obtidos pelos sistemas híbridos de Hallo e Hap indicam propriedades promissoras dos sistemas no campo da engenharia tecidual óssea.

Palavras-chave: hidrogel; halloysita; hidroxiapatita; regeneração óssea.

Abstract

Extensive tissue damage and organ failure cause millions of deaths due to the inability of natural regeneration. In response, tissue engineering has emerged as a promising area focused on developing advanced treatments for tissue repair and regeneration. Although in the bone engineering sector, hydroxyapatite (Hap) stands out widely for its osteoconductivity, its low dispersion and more brittle limit its application in this sector contrast, halloysite (Hallo), with its superior mechanical properties, is used as structural reinforcement, and its combination with hydrogels and hydroxyapatite aims to improve the mechanical properties and combine them with good biological properties. The results obtained by the hybrid systems of Hallo and Hap indicate promising properties of the systems in the field of bone tissue engineering.

Key words: hydrogel; halloysite; hydroxyapatite; bone regeneration.

1. Introdução

O dano de grandes regiões teciduais e a perda ou falha de órgãos ainda se encontram como a causa de milhões de mortes atualmente em nível mundial. Neste processo, a incapacidade de regeneração natural do corpo culmina em complicações que podem levar a danos permanentes ou até mesmo ao óbito (Zhao *et al.*, 2022). No tocante da engenharia de tecidos ósseos, destaca-se que este campo tem crescido rapidamente nos últimos anos, impulsionado pela alta prevalência de desordens e lesões ósseas, como a osteoporose, fraturas ósseas e defeitos ósseos causados por traumas ou doenças. Dessa forma, a demanda por soluções de engenharia de tecidos ósseos aumenta devido às limitações dos tratamentos tradicionais, como enxertos autólogos e alogênicos, que podem envolver problemas como rejeição imunológica e morbidade do local doador (Hawng; Lee, 2022).

Neste campo de aplicação, os hidrogéis ganham ainda mais destaque devido a sua capacidade de mimetizar a matriz extracelular dos tecidos humanos, sua porosidade intrínseca e sua elevada interação com os fluidos biológicos que tendem a gerar excelentes resultados no que tange a regeneração de tecidos. Além disso, outros materiais como a hidroxiapatita também têm sido explorados, especialmente por sua atividade osteocondutiva, o que a torna atrativa para aplicações em regeneração óssea. Contudo, sua baixa resistência mecânica limita o uso em aplicações que exigem alta durabilidade estrutural (Sharma *et al.*, 2023).

A halloysita, um outro componente de interesse, possui propriedades mecânicas superiores que a tornam uma excelente escolha para reforço estrutural em compósitos, sendo usada como carga de reforço em hidrogéis e outros materiais voltados para engenharia de tecidos (Boraei *et al.*, 2024). Assim, a combinação de hidrogéis com partículas de halloysita e hidroxiapatita visa otimizar tanto as propriedades mecânicas quanto as biológicas, potencializando a eficácia dos tratamentos regenerativos.

2. Objetivos

O objetivo do estudo é avaliar a modificação da halloysita com hidroxiapatita para obtenção de sistemas hidrogéis para serem utilizados na regeneração óssea.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais utilizados

Para a obtenção dos sistemas descritos no presente relatório foram utilizados os seguintes reagentes: Ácido fosfórico 85% P.A. – Obtido da Êxodo científica; Óxido de cálcio; Gelatina Bloom 300g – Obtida da Sigma Aldrich; Halloysita (< 635 μ m), coletada no município de Paraíba do Sul no Rio de Janeiro; Hidróxido de amônio 28-30% P.A. ACS – Obtido da Êxodo científica; L-arginina – Obtida da Sigma Aldrich.

3.2 Obtenção da halloysita modificada com hidroxiapatita

Para a obtenção das partículas de Halloysita (Hallo) modificada com hidroxiapatita (Hallo-Hap), o processo se iniciou com a dispersão da Halloysita (2,0 g) em água destilada (100 ml) com uso de Ultrasonicador 500 W por 3 minutos. Após esta etapa, pesou-se 5,92 g do óxido de cálcio que foi adicionado em água deionizada (100 mL) e levado ao agitador magnético numa velocidade de 300 rpm e temperatura ambiente por 30 minutos para que houvesse a formação de hidróxido de cálcio. Procedeu-se então, com o gotejamento de 100 ml de uma solução aquosa 0,3 M de ácido fosfórico que foi adicionado ao meio com uma vazão de 5 mL/min com auxílio de bomba peristáltica, o sistema foi mantido em agitação por 1 hora a uma velocidade de 300 rpm e temperatura ambiente.

Transcorrida 1 hora o sistema foi aquecido a 90 °C e sob este sistema gotejou-se uma solução 1,0 M de hidróxido de amônio até que atingisse pH 10. Esse meio reacional foi mantido em agitação magnética por 24 horas a uma velocidade de 300 rpm e temperatura ambiente. Após o fim deste intervalo de tempo, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm em ciclos de 5 minutos para que a lavagem da hidroxiapatita fosse realizada. Após 4 ciclos de lavagem, o sobrenadante atingiu o pH da água de lavagem das partículas e seguiu-se com a secagem das partículas em estufa a 100 °C por 24 horas.

3.3 Obtenção dos hidrogéis de gelatina reticulados com arginina

Para a obtenção dos hidrogéis, inicialmente as diferentes partículas (Hallo, Hap ou Hallo-Hap) foram dispersas em água destilada com uso de Ultrasonicador 500 W por 3 minutos. Após esta etapa adicionou-se a essa suspensão de partículas a gelatina numa concentração 5% m/m em relação a massa de água. Para que a solubilização da gelatina ocorresse, os sistemas foram levados a agitação magnética a 300 rpm em uma temperatura de 60 °C por 30 minutos. Após esta etapa, os sistemas foram arrefecidos sob agitação magnética e então adicionou-se L-arginina (2% m/m em relação a gelatina) nas soluções de gelatina, para a melhor solubilização da L-arginina os sistemas foram mantidos em agitação por 10 minutos e então, foram vertidos em placas de petri ou placas de cultura 48 poços. Os géis seguiram para estufa a 37 °C por 24 h para que a reticulação da gelatina pudesse ocorrer, uma vez reticulados, os sistemas foram congelados a -80 °C por 5 horas e então liofilizados (40 µHg / - 52 °C) por 48 horas.

Deve-se destacar que na formulação dos sistemas foram avaliadas as concentrações de 1, 2 e 3% m/m (em relação a massa de gelatina) de cada uma das partículas avaliadas.

3.4 Caracterização das partículas de hap e hallo-hap

3.4.1 Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Os materiais foram analisados por ATR no Perkin Elmer Spectrum 10.4.2., na faixa de 600 a 4000 cm⁻¹.

3.4.2 Difração de raios-X (XRD)

Os materiais foram analisados no difratômetro Bruker-AXS D8 Advanced Eco, variando 2θ de 2 a 60°.

3.5. Caracterização dos hidrogéis obtidos

3.5.1 - Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Fragmentos dos sistemas foram posicionados na fita de carbono, e levadas ao metalizador Sputer Coater da Bal-Tec, modelo SDC 005, sendo cobertas com uma camada fina de prata, sob uma corrente de 30mA por 150 segundos. Após o recobrimento as amostras foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura HITACHI, modelo TM3000.

3.5.2 - Análise do grau de porosidade dos hidrogéis

Para a obtenção do grau de porosidade, amostras de formato cilíndrico com diâmetro de 2 cm e altura de 3 cm foram pesados e posteriormente imersos em etanol absoluto por 30 minutos para avaliar a porosidade dos sistemas. Após esta etapa procedeu-se com os cálculos descritos a seguir:

$$\text{Porosidade (\%)} = (W2 - W3 - Ws)/(W1 - W3) \times 100\%$$

Onde: W1 é massa do béquer com etanol absoluto; W2 massa do béquer após imersão do hidrogel; W3 massa do béquer após a remoção do hidrogel e Ws massa do hidrogel seco.

3.5.3 – Análise da citotoxicidade e adesão celular

Três fragmentos de cada sistema (5 mg) foram esterilizados com gás etileno e avaliados quanto a citotoxicidade e adesão celular em fibroblastos L929 e pré-osteoblastos MC3T3-E1 por meio de ensaio de MTT.

3.6. Análise estatística dos resultados obtidos

Foram calculados a média e o desvio padrão para cada sistema, e os resultados foram submetidos ao teste de Tukey para determinar médias significativamente diferentes ($\alpha=0,05$).

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização das partículas obtidas

4.1.1 Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

A análise de FTIR exibiu as bandas características da hidroxiapatita (Hap), como a do grupo fosfato em 1030 cm^{-1} , e da halloysita (Halo), como as vibrações de OH entre 3600-3700 cm^{-1} e Si-O-Si em torno de 1000 cm^{-1} , estão presentes no sistema híbrido (Halo-Hap). Indicando que ambas as estruturas foram obtidas e preservadas nos sistemas híbridos, a maior intensidade das bandas referentes à Hap podem indicar o predomínio desta fase nas amostras híbridas.

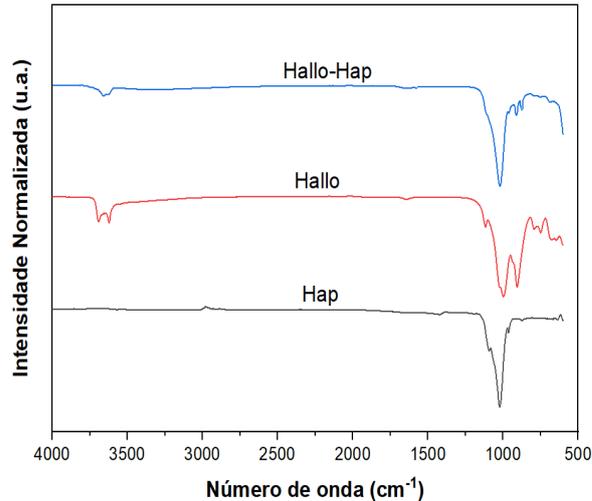


Figura 1. Espectros de infravermelho das partículas de hidroxiapatita, halloysita e halloysita modificada.

4.1.2 - Difração de raios-X (XRD)

Os difratogramas de raios-X obtidos (Figura 2), exibem perfis típicos de cada um dos componentes avaliados. No que tange a hidroxiapatita verifica-se a presença de picos característicos, especialmente na região em torno de $2\theta = 25^\circ$, 31° , 32° , e 40° , que correspondem aos planos cristalográficos típicos da estrutura hexagonal da hidroxiapatita. A halloysita apresenta um padrão de DRX com picos em posições características de sua estrutura na região entre $2\theta = 10^\circ$ e 42° . O difratograma do sistema híbrido (Hallo-hap) mostra picos correspondentes tanto à hidroxiapatita quanto à halloysita, o que indica que ambas as fases cristalinas estão presentes na amostra, a maior intensidade dos picos referentes a fase Hap pode indicar o predomínio dessa fase nas amostras corroborando os resultados de FTIR.

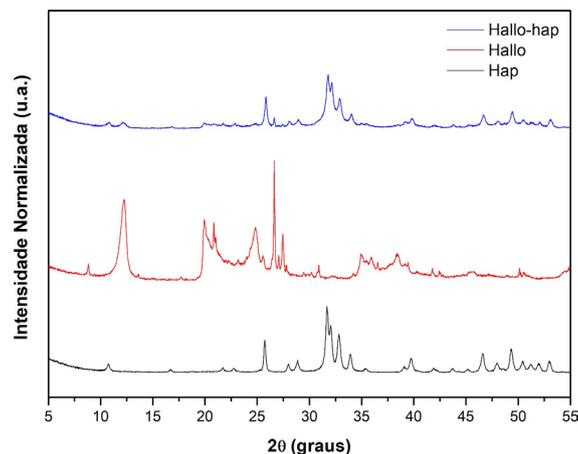


Figura 2. Difratogramas de raios X das partículas de hidroxiapatita, halloysita e halloysita modificada.

4.2 Caracterização dos hidrogéis obtidos

4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

De acordo com os resultados obtidos nas microscopias (Figura 3), verifica-se a presença de poros randômicos em todos os sistemas. Em relação aos sistemas contendo hidroxiapatita e halloysita, observam-se poros mais colapsados em relação aos sistemas híbridos, nos quais os poros se exibem mais estruturados e com maior espessura das paredes dos poros.

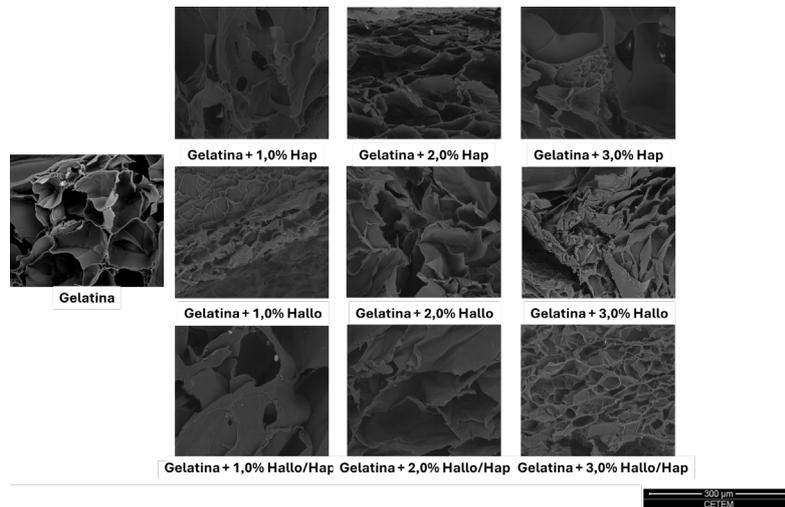


Figura 3: Microscopias de MEV dos hidrogéis obtidos.

4.2.2 Análise do grau de porosidade dos hidrogéis

Em relação aos resultados obtidos no grau de porosidade, Figura 4, verifica-se que de forma geral a adição de Hap, Hallo e Hallo-Hap à gelatina reduz o grau de porosidade do material, o que pode estar associado ao preenchimento parcial dos poros pela presença das partículas, reduzindo os espaços vazios. No entanto, observa-se que todos os sistemas exibiram graus de porosidade superiores a 65%, a mais alta porosidade obtida é um aspecto vantajoso, uma vez que, o grau de porosidade de hidrogel desempenha um papel significativo no processo de regeneração, pois comanda fortemente a difusão das macromoléculas, nutrientes e oxigênio.

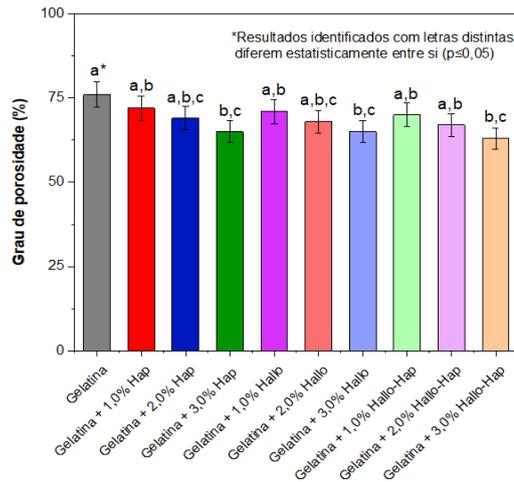


Figura 4. Gráfico referente ao grau de porosidade dos hidrogéis contendo hidroxiapatita, halloysita e halloysita modificada com hidroxiapatita nas concentrações de 1%, 2% e 3%.

4.2.3 Análise da citotoxicidade

Com base nos resultados de viabilidade celular, todos os sistemas não apresentam citotoxicidade segundo a norma estabelecida na ISO 10993-5, uma vez que as alíquotas de células quando em contato com os materiais apresentaram uma viabilidade acima de 95% para todas as amostras avaliadas. Os resultados de adesão celular da linhagem L929, foram obtidos a partir da medição da absorbância do corante, cuja intensidade de absorção é diretamente proporcional ao número de células aderidas nos materiais. Nesta perspectiva, observa-se que todos os sistemas apresentaram elevada adesão celular à sua superfície, a adição das partículas gerou um aumento da adesão celular nos sistemas sendo esse efeito mais intenso nos materiais híbridos indicando um efeito sinérgico da adição de ambas as partículas no sistema.

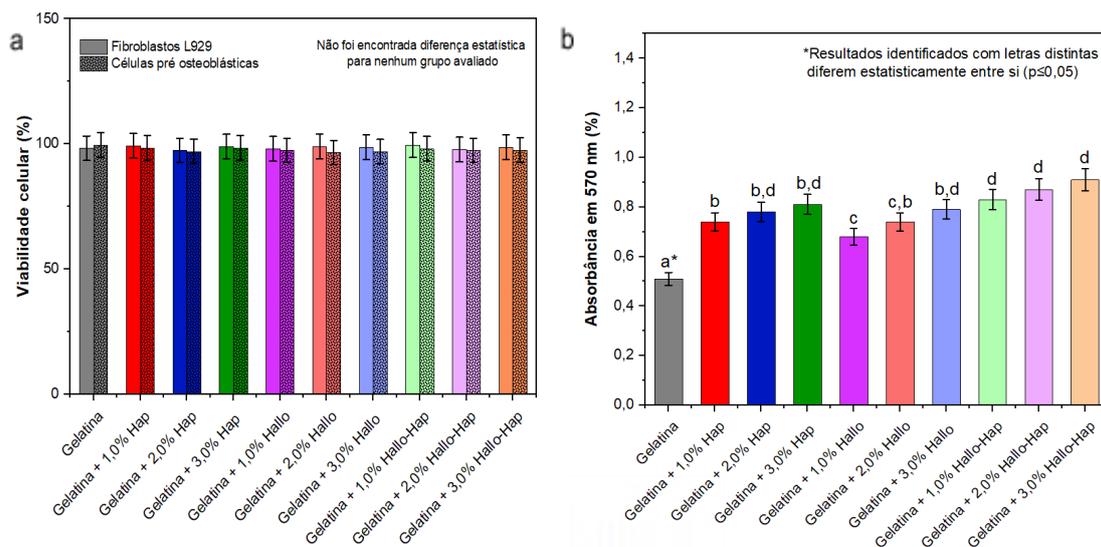


Figura 5: Resultados de (a) viabilidade celular e (b) adesão celular dos hidrogéis contendo hidroxiapatita, halloysita e halloysita modificada com hidroxiapatita nas concentrações de 1%, 2% e 3%.

5. Conclusão

Os resultados denotam a formação de géis com bons graus de porosidade (superiores a 65%) e indicam que a adição de hidroxiapatita, halloysita e halloysita modificada com hidroxiapatita à gelatina não compromete a viabilidade celular e elevam a adesão celular dos sistemas. Os resultados apontam que os sistemas obtidos apresentam aspectos promissores à sua aplicação no setor de engenharia óssea.

6. Agradecimentos

Agradeço ao meu supervisor e a professora colaboradora por todo apoio e orientação, ao CETEM e ao Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano (IMA) pela infraestrutura cedida para realização do projeto e ao CNPq pela bolsa concedida.

7. Referências Bibliográficas

Boraei, S. B. A., Eshghabadi, F., Hosseinpour, R., Zare, Y., Munir, M. T., & Rhee, K. Y. Halloysite nanotubes in biomedical applications: Recent approaches and future trends. *Applied Clay Science*, v.253, p.107346, 2024.

Hwang, H. S., & Lee, C. S. Recent progress in hyaluronic-acid-based hydrogels for bone tissue engineering. *Gels*, v.9, n.7, p.588-598, 2023.

Sharma, R., Malviya, R., Singh, S., & Prajapati, B. A Critical Review on Classified Excipient Sodium-Alginate-Based Hydrogels: Modification, Characterization, and Application in Soft Tissue Engineering. *Gels*, v.9, n.5, p. 430, 2023.

Zhao, Y., Song, S., Ren, X., Zhang, J., Lin, Q., Zhao, Y. Supramolecular adhesive hydrogels for tissue engineering applications. *Chemical Reviews*, v.122, n.6, p. 5604-5640, 2022.