

## PRODUÇÃO DE COMPÓSITOS À BASE DE POLIHIDROXIBUTIRATO E HIDROXIAPATITA PARA A APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAIS

G. A. Santos<sup>1</sup>, L. M. Oliveira<sup>1</sup>, A. F. Vasconcelos<sup>1</sup>, W. Acchar<sup>2</sup>, N. C. Olivier<sup>1</sup>, A. C. S. Dantas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Juazeiro, Av. Antônio Carlos Magalhães, 510 Santo Antônio 48902300 - Juazeiro, BA

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário, Natal-RN

\* alan.dantas@univasf.edu.br

### RESUMO:

A hidroxiapatita (HA) é um material cerâmico amplamente estudado devido a sua grande similaridade química com a fração inorgânica do osso. No entanto, este material apresenta excessiva fragilidade e alto módulo de elasticidade quando comparado com o tecido ósseo. O Polihidroxibutirato (PHB) é um polímero termoplástico, biodegradável e biocompatível que apresenta baixo módulo de elasticidade e degradação gradativa conservando suas propriedades mecânicas mesmo após implantado. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da infiltração do PHB fundido nas propriedades mecânicas de corpos porosos de HA. As amostras foram caracterizadas por difratometria de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e resistência à compressão. Os melhores resultados foram obtidos para amostras com porosidade geométrica inicial de 10%, que atingiram  $19,00 \pm 4,70$  MPa antes da infiltração e  $83,00 \pm 4,41$  MPa após a infiltração com PHB alcançando uma porosidade geométrica final de 5%.

Palavras chave: Hidroxiapatita, PHB, infiltração, Propriedades Mecânicas

## INTRODUÇÃO

A substituição de tecido devido à ocorrência de patologias e traumatologia ortopédicas tem impulsionado a pesquisa, na área de biomateriais, em busca de materiais que possam desempenhar um papel biofuncional substituindo ou auxiliando na formação de um novo tecido. Alguns materiais sintéticos e dispositivos estão sendo aperfeiçoados e outros, sendo desenvolvidos para repor ou restaurar funções e substituir partes do corpo danificadas. Para tal aplicação fatores críticos para o sucesso do implante incluem um projeto apropriado, a correta seleção de materiais e a sua biocompatibilidade <sup>(1)</sup>.

Nos últimos anos vários materiais vêm sendo estudados no intuito de utilizá-los como substitutos ósseos, diminuindo os riscos de uma rejeição ou de uma nova cirurgia. Dentre estes materiais podemos destacar a hidroxiapatita, HA, uma vez que esta apresenta grande similaridade química com a fração inorgânica do osso. No entanto, apesar da excelente interação química e biológica com o tecido ósseo, a HA apresenta excessiva fragilidade e alto módulo de elasticidade quando comparado com o tecido ósseo <sup>(2)</sup>.

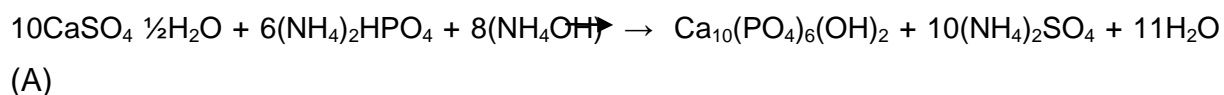
O PHB (Polihidroxibutirato) é um termoplástico que pertence à família dos polihidroxialcanoatos (PHAs), que são poliésteres com fórmula molecular  $(C_4H_6O_2)_n$ . Este polímero apresenta duas propriedades importantes para o uso no corpo humano: biodegradação e a biocompatibilidade. A sua decomposição ocorre de forma gradativa conservando suas propriedades mecânicas por um tempo maior quando comparado com outros polímeros como, por exemplo, o poliácido láctico (PLLA) <sup>(3)</sup>. O PHB apresenta boa resistência mecânica à compressão, que é cerca de 62 MPa, similar ao do osso trabecular <sup>(4)</sup> e esses valores podem variar de acordo com o grau de cristalinidade que esse polímero possui podendo variar de 50 a 80%. A união do polihidroxibutirato (PHB) com a hidroxiapatita (HA) tem dentre seus objetivos, associar a biodegradabilidade do PHB e a bioatividade da HA, buscando um material com propriedades mecânicas e bioativas intermediárias, aprimorando a compatibilidade mecânica e biológica entre o implante e o tecido ósseo.

O objetivo deste trabalho foi Produzir compósitos a partir do Polidroxibutirato (PHB)/ Hidroxiapatita (HA) através da infiltração do PHB fundido em corpos porosos de HA, produzindo um compósito de matriz cerâmica de HA reforçado com PHB.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A HA utilizada neste trabalho foi produzida através de uma reação de conversão pelo tratamento do sulfato de cálcio hemihidratado (Gesso Mineral S.A) com uma solução de monohidrogeno fosfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , em meio básico utilizando hidróxido de amônio  $(\text{NH}_4\text{OH})$  (ALVARES, 2012). As concentrações dos reagentes utilizadas na síntese foram  $0,12 \text{ molL}^{-1}$  para o  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $3 \text{ molL}^{-1}$  para o  $\text{NH}_4\text{OH}$  e  $0,2 \text{ molL}^{-1}$  para o  $\text{CaSO}_4 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ .

A relação de Ca/P foi de 1,667 molar, que é a razão estequiométrica para formação de HA, de acordo com a equação A:



O fosfato de amônio dibásico  $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$  foi adicionado a uma velocidade de gotejamento de 20 mL por minuto. O processo de adição da solução de monohidrogeno fosfato de amônio (0,12 mol/L) foi constante e ininterrupto até que, se adicionasse o volume total de 5L a vazão volumétrica de 20 mL/min. A reação foi mantida em um pH acima de 9,5 para evitar a formação de fases secundárias de apatitas utilizando o hidróxido de amônio. Ao final da síntese, a mistura permaneceu, ainda, sob agitação mecânica por uma hora.

Após 48 horas o produto da reação foi filtrado e lavado com água destilada, seguido de secagem à 90°C por 12 horas. O sólido formado foi calcinado a de 900 °C por duas horas, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, para estabilização da forma das partículas e controle da área superficial.

Para promover a variação na porosidade das amostras, foi adicionada parafina a HA em uma proporção de 3, 5 e 10%, relativa à massa de HA. A homogeneização foi realizada diluindo-se a parafina em um ligante orgânico (n-Hexano 99% P.A), seguido da adição do pó de HA. Os corpos verdes foram preparados por prensagem uniaxial utilizando um molde de aço com uma cavidade retangular interna de 10x60mm utilizando-se 10 g do pó.

Os corpos verdes foram, então, sinterizados a duas temperaturas diferentes, 1100°C e 1200 °C, utilizando um forno tipo mufla (modelo 10013 marca Jung). A curva de sinterização foi ajustada em dois estágios. No primeiro, para remoção do ligante, a temperatura foi elevada a 216°C a uma taxa de 0,5°C/min, permanecendo nessa temperatura por 75 min. No segundo estágio, a temperatura foi elevada até a temperatura de sinterização a uma taxa de 5°C/min onde permaneceu por 150 min.

O PHB, produzido pela bactéria *Wautersia eutropha*, foi fornecido pela PHB Industrial, localizada na cidade de Serrana, no interior de São Paulo. Para a realização da infiltração os corpos porosos foram colocados junto com 10 g do PHB em forma de pó e dentro de um recipiente refratário. Em seguida, as amostras foram inseridas dentro do forno a uma temperatura de 180°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min durante um período de 3 horas.

Os pós foram caracterizados via espectroscopia de infravermelho - FTIR marca Bruker, modelo FS66. As amostras foram misturadas com 0,3 g de KBr e prensadas em forma de pastilhas, estas foram analisadas por técnica de transmitância, na região de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>.

Para o estudo microestrutural dos materiais, foram utilizados equipamentos de DRX marca SIEMENS, modelo Diffract ACT série 1000, utilizando fonte de radiação Cu-K $\alpha$ , com difratogramas registrados com um passo de 0,02° em 2 $\theta$  e tempo de integração de 1s por ponto.

Para analisar a morfologia e tamanho das partículas dos materiais utilizados, foram obtidas imagens através do microscópio eletrônica de varredura-MEV, marca HITACHI, modelo TM-1000; Tabletop Microscope. Foram obtidos, também, espectros na microanálise por energia dispersiva, por meio do EDS, para observação química qualitativa e quantitativa da composição das amostras em uma determinada região.

A densidade geométrica das amostras foi calculada segundo a densidade teórica da hidroxiapatita, que é de 3,156 g/cm<sup>3</sup> e do PHB que é de 1,26 g/cm<sup>3</sup>. O cálculo da densidade foi realizado através da equação B:

$$D = \frac{m}{C \times L \times h} \quad (B)$$

Onde m, C, L e h representam respectivamente a massa, comprimento, largura e altura de cada amostra medida. A partir da densidade das amostras, a

porcentagem de porosidade das amostras e dos compósitos foi calculada segundo a equação C e D respectivamente:

$$\% \text{porosidade} = \left[ 1 - \left( \frac{D}{d} \right) \right] \times 100 \quad (\text{C})$$

$$\% \text{porosidade} = \left[ 1 - \left( \frac{D}{X_{\text{PHB}} \cdot d_{\text{PHB}} + X_{\text{HA}} \cdot d_{\text{HA}}} \right) \right] \times 100 \quad (\text{D})$$

Os testes de resistência mecânica foram realizados em uma Máquina Universal de Ensaio Mecânico, modelo (EMIC- DL 10000). Durante os ensaios de resistência à compressão,  $\sigma_c$ , foi aplicada uma taxa de compressão de 1,0 mm/min., e célula de carga de 5,0 kN. Para ensaios de resistência à compressão foram utilizados corpos de prova com seção quadrada de 10x10 mm e altura de 20 mm.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Materias Primas

Para avaliar a pureza do PHB e da HA utilizados neste trabalho, análises de FTIR e de difração de raios-X foram utilizadas. A caracterização do PHB a partir do FTIR mostrou todas as bandas características do polímero, mostrando alto grau de pureza, Figura 1.

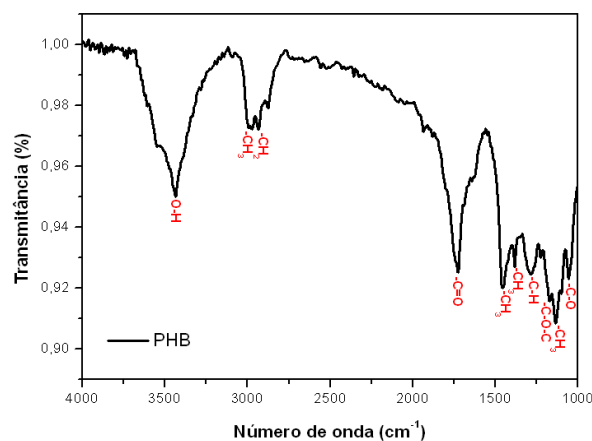


Figura 1- Espectro de infravermelho obtido do PHB.

Na figura 2, pode ser visto o difratograma de raios X do pó de HA após calcinação a 900°C, onde podem ser observados picos relacionados à HA e ao TCP, que é um fosfato de cálcio com relação Ca/P igual a 1,5. A formação do TCP ocorre quando o pH da reação, atinge valores abaixo de 9,5 o que resulta na formação da apatita com deficiência em cálcio ( $\text{Ca}_{9-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{OH})_2$ )<sup>(5)</sup>. A presença do TCP não influencia negativamente as propriedades biológicas da HA, uma vez que o TCP é uma cerâmica bioreabsorvível. A partir da análise dos picos de maior intensidade, pôde-se medir o percentual de TCP presente na HA. Esse valor é de 15% de TCP, desse modo apesar de se tratar de um fosfato de cálcio bifásico (BCP), será utilizada a denominação HA.

Nenhum pico referente ao sulfato de cálcio hemidratado ou dihidratado foi observado, evidenciando que a conversão do gesso em fosfato de cálcio foi completa.

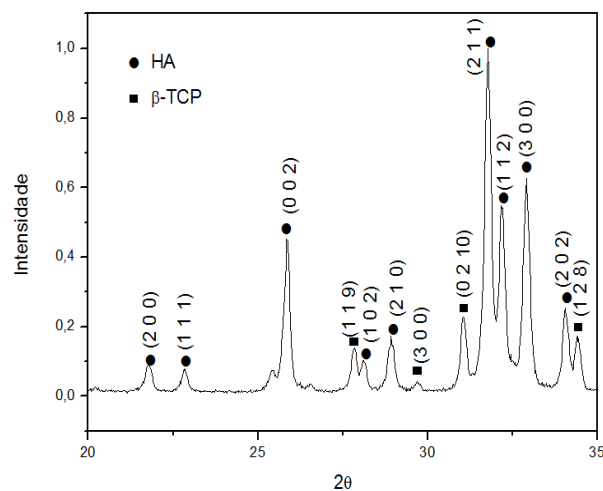


Figura 2- Difratograma de raios-X do pó de HA calcinado à 900°C.

### Compósitos Infiltrados

Após compactação e sinterização os corpos densos e porosos foram infiltrados com o PHB fundido em amostras de diferentes porosidades. Para a obtenção de diferentes níveis de porosidade foram preparados corpos verdes de HA com diferentes quantidades de parafina, que foram sinterizadas a 1100°C ou 1200°C.

A figura 3 apresenta as propriedades mecânicas das amostras, antes e após o processo de infiltração, onde pode ser visto que ocorreu um aumento significativo da resistência mecânica das amostras, após o processo de infiltração.

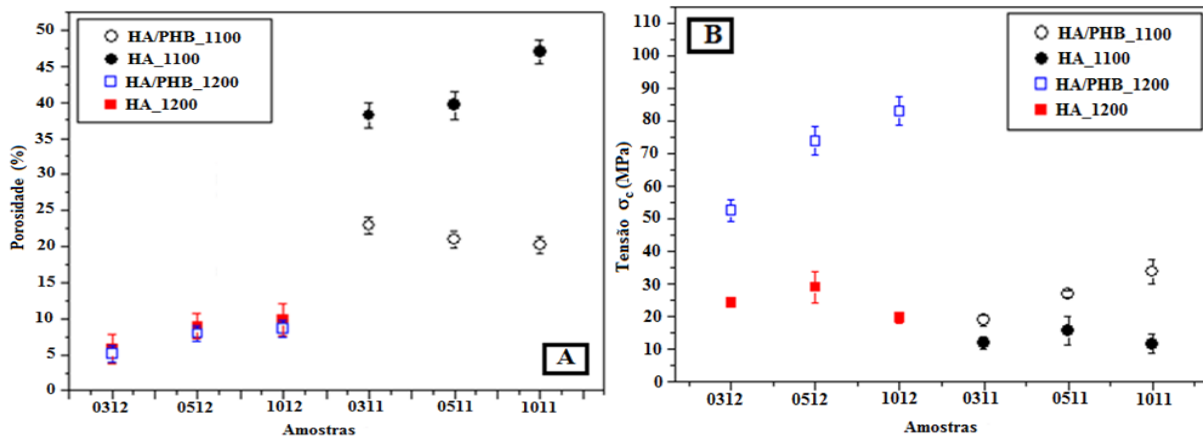


Figura 3 - Compósitos HA/PHB produzidos por infiltração em (A) resistência à compressão e (B) porosidade.

As amostras sinterizadas a 1200 °C atingiram maiores valores de  $\sigma_c$  após a infiltração, onde pode ser observado um aumento de mais de 400% para as amostras produzidas com 10% de parafina. Essas amostras partiram de um valor de  $19,0 \pm 4,7$  MPa antes da infiltração para valores de  $83,0 \pm 4,41$  MPa após a infiltração. Este aumento está intimamente relacionado com o preenchimento dos poros que resulta em melhor transmissão de carga, aumento da tenacidade, além do preenchimento de defeitos superficiais.

Diferente deste trabalho, que utilizou polímero fundido, Fedotov *et al.* <sup>(6)</sup> desenvolveram corpos porosos à base de TCP e HA em que esses foram infiltrados por solução de quitosana. O trabalho de Fedotov *et al.* <sup>(6)</sup> mostrou, que ao introduzir esta solução, a resistência mecânica à compressão aumenta significativamente com o aumento da concentração de quitosana na solução. Isto ocorre devido ao preenchimento de falhas e de poros, o que está intrinsicamente ligado ao comportamento mecânico destes materiais.

A figura 4 mostra a superfície de fratura das amostras de HA porosas antes e após a infiltração do biopolímero. A figura 4-A apresenta a HA sinterizada a 1100 °C, em que se utilizou 3 % de parafina em massa, pode-se observar a morfologia dos grãos e a presença de porosidade. A figura 4-B mostra a superfície de fratura da HA

após o processo de infiltração, onde é possível visualizar a presença do polímero residual, que preencheu parte dos poros preexistentes no material. Os corpos de prova de HA produzidos com 5% a 1100 °C, antes e após a infiltração estão apresentados nas figuras 4-C e 4-D respectivamente e as amostras preparadas com 10% de parafina sinterizados a 1100 °C estão apresentadas nas figuras e 4-E e 4-F. Através das micrografias, é possível confirmar a introdução do PHB.

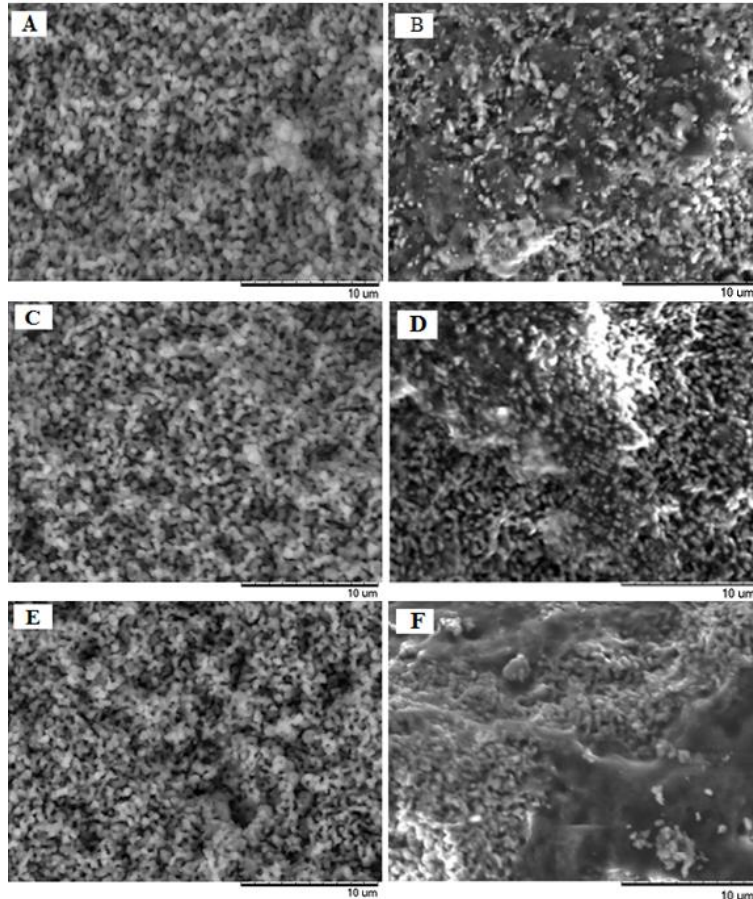


Figura 4 - Morfologia da superfície de fratura das amostras sinterizadas a 1110°C, antes e após a infiltração, em (A) HA\_3\_1100, (B) HA/PHB \_3\_1100), (C) HA\_5\_1100, (D) HA/PHB \_5\_1100), (E) HA\_10\_1100 e (F) HA/PHB\_10\_1100.

A figura 5 apresenta a superfície de fratura das amostras de HA sinterizadas a 1200°C, antes e após a infiltração do PHB, onde se pode confirmar a incorporação do polímero. A figura 5-A mostra a HA porosa antes da infiltração e a figura 5-B após a infiltração, através dessa figura confirma-se a introdução do PHB. O mesmo ocorre



com as amostras produzidas com 5 e 10% de parafina produzidas à 1200°C, apresentadas nas figuras 5-C, 5-D, 5-E e 5-F.

A introdução de poros na HA facilita a proliferação celular, alojando macrocélulas ósseas, com isso introduzindo matriz extracelular contribuindo para a fixação do implante e conseqüentemente adquirindo uma maior resistência mecânica <sup>(7)</sup>. A introdução de um polímero biodegradável como precursor a melhora da resistência mecânica da HA, que irá conferir uma maior resistência mecânica quando implantada, ao passo que o PHB se degrada, ocorre a liberação de substâncias que auxiliam na produção de matéria orgânica <sup>(8)</sup>, à medida que o polímero se degrada, ocorre a abertura dos poros que permitem a fixação das células.

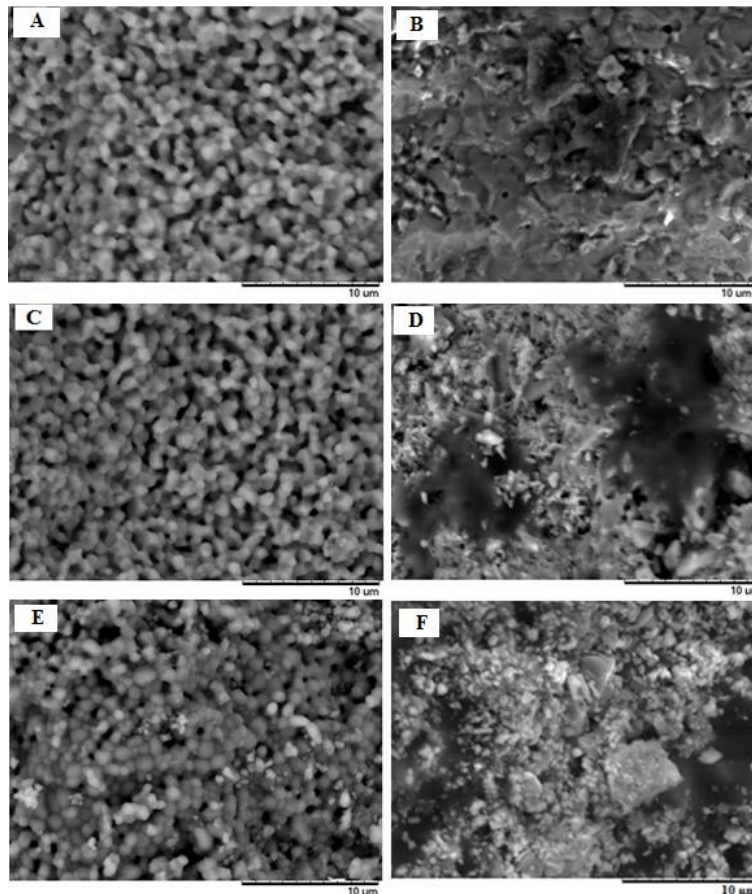


Figura 5- Morfologia da superfície de fratura das amostras sinterizadas a 1200°C, antes e após infiltração, em (A) HA\_3\_1200, (B) HA/PHB\_3\_1200, (C) HA\_5\_1200, (D) HA/PHB\_5\_1200, (E) HA\_10\_1200 e (F) HA/PHB\_10\_1200.

As amostras sinterizadas a 1100 °C apresentaram maiores valores de porosidade devido a uma sinterização parcial das partículas. Estas amostras apresentaram maior incorporação do PHB. Isto se deve à maior presença de poros. Uma maior diminuição de porosidade concomitante ao aumento de resistência mecânica à compressão que passa de 11, 91 ± 1,96 MPa para a amostra de HA\_10\_1100 para 33,86 ± 3,69 MPa, após a infiltração.

No presente trabalho, a quantidade máxima de PHB infiltrado foi de 1,02 g, para as amostras HA\_10\_1100, estas amostras atingiram o maior valor de resistência mecânica após a infiltração, quando comparada com amostras produzidos a mesma temperatura de sinterização, atingindo o valor de 33,86 ± 3,69 MPa .

Os compósitos produzidos a 1200°C, em geral, obtiveram o melhor comportamento mecânico, visto que possuem uma menor quantidade de poros. Nesses compósitos notou-se um menor teor de preenchimento dos poros pela infiltração do PHB, porém o compósito HA/PHB\_10\_1200, atingiu o melhor resultado, chegando a um valor de 83 ± 4,3 MPa.

Trabalhos realizados por Martínez-Vázquez *et al* <sup>(9)</sup> utilizando o método de *robocasting*, mostram que a introdução dos biopolímeros PCL e PLA em estruturas porosas de TCP promoveu um aumento na resistência à compressão das amostras monolíticas de TCP, onde os compósitos preparados com TCP e PCL, atingiram uma resistência mecânica à compressão de 60 MPa e os compósitos produzidos com TCP e PLA atingiram uma resistência à compressão de 130 MPa. A quantidade final de PHB infiltrado pode ser vista na tabela 1:

Tabela 1 - Quantidade de PHB introduzido em corpos porosos de HA de 5,0 ± 0,2 g de massa.

<b>Compósitos</b>	<b>Massa de PHB infiltrado (g)</b>
HA/PHB_3_1100	0,60 ± 0,16
HA/PHB_3_1200	0,02 ± 0,01
HA/PHB_5_1100	0,85 ± 0,01
HA/PHB_5_1200	0,03 ± 0,01
HA/PHB_10_1100	1,02 ± 0,05
HA/PHB_10_1200	0,04 ± 0,02

## CONCLUSÃO

A infiltração do PHB promoveu um aumento da resistência à compressão das amostras porosas de HA. Para as amostras produzidas via infiltração, constatou-se que quanto maior a porosidade das amostras maior a quantidade de polímero infiltrado, devido a maior presença de espaços vazios no corpo poroso de HA.

Amostras sinterizadas a 1200°C apresentaram menores valores de porosidade e conseqüentemente maiores valores de resistência, antes de infiltração. Após a infiltração estas amostras atingiram maiores valores de resistência devido ao preenchimento dos poros e das falhas superficiais.

## REFERENCIAS

1. CAMPBELL, A.A. Bioceramics For Implant Coatings. *Materials Today*, vol. 6, p.26-30, 2003.
2. ALVARES, T.V.S. Caracterização de cerâmicas densas de hidroxiapatita produzidas a partir do gesso. Petrolina, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais), Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2012.
3. VANIN, M.; SANTANA, C.C; TORRIANI, I.L.; PRIVELIC, T.; DUEK, E. A. R. In vitro study of degradation of poly(b-hydroxybutyrate) (PHB) / poly(L-lactic acid) (PLLA) blends in the form of films. *Polímeros*, vol.14 n°3, 2004.
4. GALEGO, N.; ROZSA, C.; SÁNCHEZ, R.; FUNG, J.; VÁZQUEZ, A.; TOMÁS, J.S. Characterization and application of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. *Polym Test.*, vol.19, p. 485–492, 2000.
5. DESCAMPS, M.; DUHOO, T.; MONCHAU, F.; LU, J.; HARDOUIN, P.; HORNEZ, J.C.; LERICHE, A. Manufacture of macroporous -tricalcium phosphate bioceramics. *Journal of the European Ceramic Society*, vol.28, p.149-157, 2008.
6. FEDOTOV, A. Y.; BAKUNOVA, N. V.; KOMLEV, V. S.; BARINOV, S. M. High porous calcium phosphate bioceramics reinforced by chitosan infiltration. *Chemical Technology*. vol. 439, n°2, p. 233–236, 2011

7. DACULSI, G.; LEGEROS, R. Z.; NERY, E.; LYNCH, K.; KEREBEL, B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *Materials. Research*, vol. 23, p. 883-94; 1989.
8. ROSA, D.S.; SALVINI, V.R.; PANDOLFELLI, V.C. Processamento e avaliação das propriedades de tubos cerâmicos porosos para microfiltração de emulsões. *Cerâmica*, vol. 52, p. 157-171, 2006.
9. MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, F. J.; PERERA, F. H.; MIRANDA, P.; PAJARES, A.; GUIBERTEAU, F. Improving the compressive strength of bioceramic robocast scaffolds by polymer infiltration. *Acta Biomaterial*, vol. 6, p. 4361–4368, 2010.

## PRODUCTION OF HYDROXYAPATITE/POLYHYDROXIBUTIRATE BASED COMPOSITES FOR BIOMATERIALS APPLICATIONS

### ABSTRACT

Hydroxyapatite (HA) is a ceramic material broadly studied due to its great similarity with the human bone. However, this material presents high stiffness and young modulus in comparison with the bone tissue. The polyhydroxibutirate (PHB) is a thermoplastic and biodegradable polymer that presents bone like young modulus and gradative degradation, that results in a permanence of the mechanical properties after implantation. The aim of this study is to evaluate the effect of the infiltration of melted PHB on the mechanical properties of porous HA bodies. The composite samples were characterized by SEM, EDS and compressive strength. The samples produced with 10% paraffin and sintered at 1200 °C showed the best mechanical properties and reached an increase of the compressive strength from  $29,00 \pm 4,70$  MPa before infiltration to  $83,00 \text{ MPa} \pm 4,41$  after infiltration with PHB for a final porosity of 5%..

Key words: Hydroxyapatite, PHB, infiltration, mechanical properties