

# Uso de curvas termogravimétricas para a determinação do teor de mineralização em hidrogéis

M. M. Horn<sup>1</sup>, M. de Paula<sup>2</sup>, V. C. A. Martins<sup>2</sup> e A. M. de Guzzi Plepis<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Interunidades em Bioengenharia – EESC, USP, São Carlos, Brasil

<sup>2</sup>Instituto de Química de São Carlos – IQSC, USP, São Carlos, Brasil

Received 07/10/2013; accepted 16/12/2013

Available online 23/12/2013

## Resumo

Os hidrogéis têm sido estudados para aplicações biomédicas, como em sistemas de liberação de fármacos e em engenharia de tecidos. Os materiais contendo fosfato de cálcio têm sido frequentemente utilizados para a substituição e reconstituição de defeitos ósseos. Assim, este trabalho descreve a obtenção de hidrogéis mineralizados e sua posterior caracterização. A quantificação do teor de mineralização foi determinada por termogravimetria, sendo encontrados valores em torno de 40% de calcificação, que corresponde a valores de resíduo a 750°C. Os resultados por EDX e raios-X indicam que o fosfato de cálcio depositado é hidroxiapatita estequiométrica e que os cristais estão distribuídos na superfície dos hidrogéis.

**Palavras-chave:** Termogravimetria, mineralização, hidrogéis.

## 1. Introdução

A síntese de materiais biomiméticos consiste na combinação de fosfato de cálcio com uma matriz polimérica que permite a obtenção de materiais que quando implantados estimulem a osteogênese [1]. Uma grande variedade de substitutos ósseos naturais e sintéticos tem sido considerados para a reparação óssea. Dentre estes substituintes, biomateriais contendo fosfato de cálcio tem sido frequentemente utilizado para a substituição e reconstituição de defeitos ósseos [2]. Este uso está baseado em uma série de características como biocompatibilidade, bioatividade e excelentes propriedades osteocondutoras.

A hidroxiapatita (HA) é o mais importante biomineral encontrado em tecidos duros naturais, mas como outros fosfatos de cálcio, apresentam baixas propriedades mecânicas. Por isso, sua combinação com matrizes poliméricas pode promover o aumento das propriedades mecânicas e biocompatibilidade do material formado [3]. A biomineralização, que é o processo de formação natural de apatita em humanos e animais pode ser simulada *in vitro*, com a deposição de fosfato de cálcio na superfície de hidrogéis pela imersão da matriz polimérica em uma solução aquosa de cálcio e fosfato. Este método é conhecido como método biomimético, que é o principal passo para iniciar a nucleação de cálcio e fosfato na matriz polimérica [1].

Para a obtenção de hidrogéis, polissacarídeos têm sido utilizados devido a sua biocompatibilidade, fontes abundantes e baixo custo. Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais, compostos por uma fase sólida que representa 10% do volume total do gel e o restante da composição, a fase líquida, é água. [4]. A fase sólida garante a consistência do gel, proporcionando a capacidade de absorver grandes quantidades de água, mas ao mesmo tempo, mantendo-se insolúvel no meio aquoso. Devido a sua

composição ser majoritariamente água, essa característica torna os hidrogéis compatíveis com a maioria dos tecidos vivos. Além disso, são maleáveis e macios o que minimiza os danos para o tecido circundante durante e após o implante. Assim, os hidrogéis podem ser utilizados tanto para a área de regeneração tecidual, como também para liberação controlada de fármacos e fatores de crescimento [5].

A combinação de hidrogéis e cerâmicas de fosfato de cálcio levam a formação de uma matriz promissora para a área de regeneração tecidual com a combinação das propriedades dos materiais [6]. Como forma de melhorar a bioatividade e propriedades mecânicas de hidrogéis, neste trabalho se propõe a formação de materiais compósitos entre os biopolímeros quitosana, xantana e colágeno e um material inorgânico (fosfato de cálcio), através da mineralização *in vitro*, com o intuito de induzir o crescimento de HA na sua superfície. Poucos trabalhos na literatura descrevem a determinação quantitativa do teor de mineralização por termogravimetria, mas esta técnica pode ser utilizada, uma vez que a hidroxiapatita, o produto desejável no processo de mineralização, é estável até 1200°C.

## 2. Experimental

### 2.1 Componentes dos hidrogéis

Para a extração da  $\beta$ -quitina a partir de gládios de lula, seguiu-se o um processo corriqueiro no laboratório, baseado no protocolo de obtenção da quitosana descrito anteriormente [7] que consiste em três etapas: desmineralização, desproteínização e desacetilação. Para o processo de desmineralização foi utilizado 40,0 g de gládio de lula moído com HCl 0,55 mol L<sup>-1</sup> à temperatura de 25°C por 2 h com agitação mecânica constante. Após isso, o material foi lavado até a neutralidade e seco a 37°C. No

\* Endereço para correspondência: Tel.: +55 16-3373-9976  
E-mail: [amplepis@iqsc.usp.br](mailto:amplepis@iqsc.usp.br) (A. M. de Guzzi Plepis)

processo de desproteinização o sólido obtido foi aquecido a 80°C por 1 hora com NaOH 0,30 mol L<sup>-1</sup>, lavado até a neutralidade e seco em estufa, sendo obtida a β-quitina. Na última parte do procedimento obtém-se a quitosana através da desacetilação parcial dos grupos acetamida em que a β-quitina obtida é aquecida com NaOH 40% (massa/massa) a 80°C durante 3 h em atmosfera de nitrogênio. A partir da quitosana obtida preparou-se uma solução com concentração 0,5% em ácido acético 1,0%. O grau de acetilação foi determinado por titulação condutimétrica [8] e o valor encontrado foi de 10,53 % ± 0,03.

O colágeno aniônico foi obtido por hidrólise alcalina de tendão bovino por tratamento com uma solução alcalina contendo hidróxidos, sulfatos e cloretos de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> por um período de 24 h a 25°C, seguido da estabilização com uma solução contendo cloretos e sulfatos dos mesmos cátions. Após isso, foram realizadas lavagens com ácido bórico (3%), água destilada, EDTA 0,3% e água destilada novamente. O gel foi obtido por extração e homogeneização em solução de ácido acético pH 3,5 e preparada uma solução com concentração de 0,5%. A reação de hidrólise do colágeno produz uma matriz de colágeno polianiónico carregado negativamente, a pH 7,4 [7].

A xantana utilizada foi produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris* e comercializada pela Fluka – BioChemica. O material foi utilizado sem prévia purificação. A solução de xantana (concentração 0,5%) foi preparada pela dissolução desta em água desionizada a temperatura de 25°C.

## 2.2 Obtenção dos hidrogéis

Os hidrogéis foram preparados nas proporções quitosana/xantana (1:2) e quitosana/xantana/colágeno (1:2:0,5) e denominados QX e QXC. Após isso, foram dialisados em tampão (fosfato dissódico – ácido cítrico) pH 5,6, lavados com água desionizada, congelados e liofilizados.

## 2.3 Mineralização e caracterização

A mineralização *in vitro* foi feita pelo método de imersão alternada (6 x 10 min), processo utilizado no grupo, e descrito anteriormente [9]. Para isso, foram utilizadas soluções de CaCl<sub>2</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,4) e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,12 mol L<sup>-1</sup> (pH 9,0) ambas preparadas em tampão Tris (0,050 mol L<sup>-1</sup>). Os hidrogéis denominados QXm e QXCm foram lavados, liofilizados e caracterizados por termogravimetria (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva por raio-X (EDX) e raios-X.

Para a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) as amostras foram colocadas nos suportes apropriados e recobertas com uma fina camada de carbono de 20 nm de espessura, e as fotomicrografias obtidas em um microscópio da marca ZEISS modelo LEO-440.

A análise de Energia Dispersiva por raio-X (EDX) foi realizada em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 200), com detector de SiLi Pentafet,

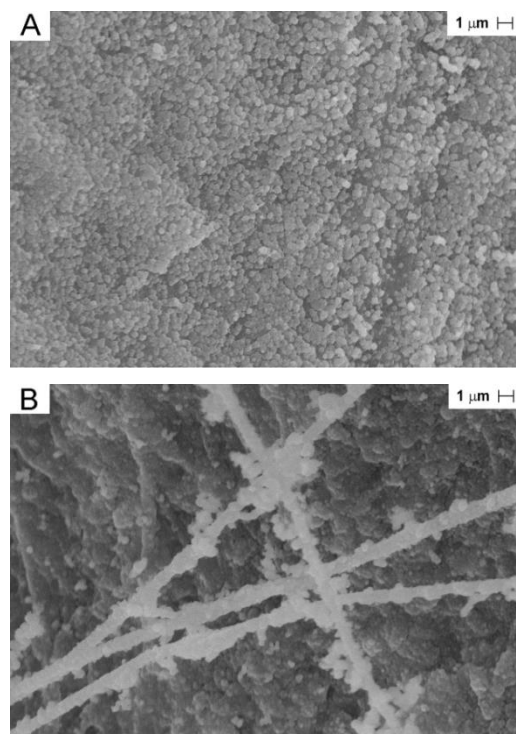
janela ultrafina ATW II (Atmosphere Thin Window), de resolução de 133 eV à 5,9 keV, acoplado a um Microscópio Eletrônico LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltd), com um detector Oxford (Oxford Instruments Inc.). Esta técnica foi utilizada para determinar a relação Ca/P do fosfato de cálcio depositado na matriz. Esta relação foi obtida pela média dos teores dos elementos cálcio e fósforo presentes nas matrizes em três áreas distintas.

As curvas termogravimétricas foram obtidas utilizando-se amostras de aproximadamente 10 mg, em atmosfera de ar sintético com variação de temperatura de 25 a 800°C e razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup> em um equipamento TGA 2050 (TA Instruments).

Os difratogramas de raio-X das matrizes mineralizadas foram obtidos em um difratômetro automático Rigaku-Rotaflex Ru-200B, com radiação monocromática de CuKα (1,5418 Å) com potência de 50 kV, 100 mA.

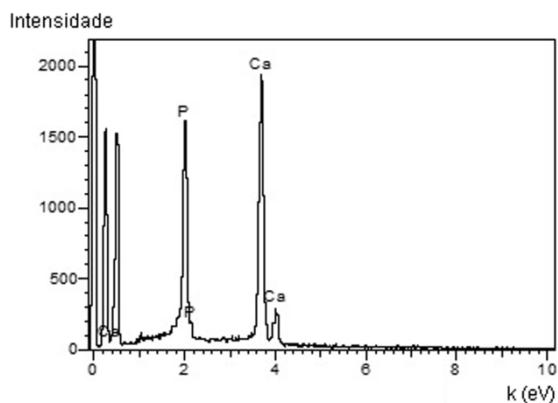
## 3. Resultados e Discussão

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para observar a deposição de sais de fosfato de cálcio na superfície dos hidrogéis. Através das fotomicrografias por MEV (Fig. 1) é possível observar que houve deposição de sais de fosfato e que estes estão distribuídos de forma homogênea na superfície das matrizes poliméricas. Para QXm (Fig. 1A), esta distribuição foi observada somente na superfície do hidrogel e diferença nos materiais mostra que para o hidrogel QXCm, além de se distribuírem na superfície, os sais de fosfato também se depositam na fibra de colágeno (Fig. 1B).



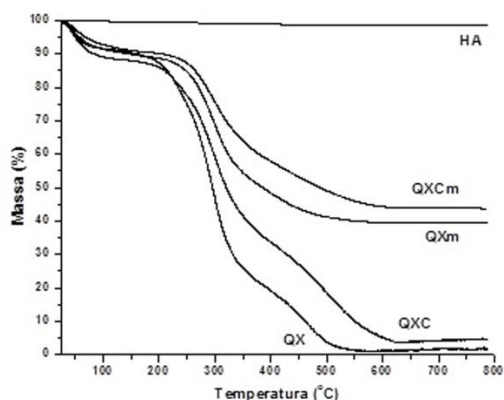
**Figura 1.** Fotomicrografias por MEV. Em A, QXm e em B, QXCm. Aumento de 10 000 x.

O EDX foi utilizado para verificar a razão Ca/P do sal de fosfato de cálcio que foi depositado na matriz. Com isso, é possível identificar o tipo de sal de fosfato depositado na matriz polimérica. A Figura 2 mostra um espectro de EDX obtido para o hidrogel QXm, indicando a presença dos picos revelando à presença dos principais compostos do mineral: carbono (0,2 KeV), oxigênio (0,5 KeV), cálcio (4,0 KeV) e fósforo (2,0 KeV). A razão Ca/P foi de 1,67 para QXm e de 1,65 para QXCm, que são valores próximos ao valor teórico da hidroxiapatita (HA) estequiométrica (1,67), conforme descrito em literatura [10].



**Figura 2.** Espectro de EDX do hidrogel QXm.

As curvas termogravimétricas (Fig. 3) foram utilizadas para determinar a quantidade de resíduo inorgânico presente a 750 °C, que expressa o teor de mineralização dos hidrogéis. O uso desta técnica é útil, pois a hidroxiapatita (produto mais desejável durante a mineralização) é estável até 1200°C [11] e nesta temperatura, todo o material orgânico presente já se decompôs. Foram obtidas curvas termogravimétricas das amostras de hidrogéis mineralizados e não mineralizados, com o intuito de comparar a diferença no perfil de perda de massa quando os sais de fosfato são depositados na matriz polimérica.



**Figura 3.** Curvas termogravimétricas da HA, dos hidrogéis não mineralizados e mineralizados (ar sintético, 25 a 800 °C e 10 °C min<sup>-1</sup>).

A Figura 3 mostra o perfil de perda de massa da hidroxiapatita (HA), em que se observa que dentro do

intervalo de temperatura estudado, não ocorre perda de massa deste composto inorgânico, o que permite o uso desta técnica para a determinação da quantidade de fosfato de cálcio depositado nos hidrogéis.

Para os hidrogéis não mineralizados (QX e QXC) observa-se os três estágios de perda de massa, característicos para materiais formados por polímeros: o primeiro se refere à perda de água estrutural (25-200°C), o segundo, à degradação térmica das cadeias poliméricas (200-400°C) e o terceiro (400-700°C), à carbonização dos polímeros. Os valores de resíduos, obtidos a 750°C mostram valores de 1,8% para QX e de 4,5% para QXC, que provavelmente estão relacionados a sais residuais do processo de obtenção de colágeno e também porque a xantana utilizada não passou por um processo prévio de purificação. A Tabela 1 mostra os valores de porcentagem de perda de massa obtidos para cada intervalo de temperatura.

**Tabela 1.** Porcentagem de perda de massa obtida através das curvas termogravimétricas

Amostra	% Perda de Massa			
	1ª etapa (25-200°C)	2ª etapa (200-400°C)	3ª etapa (400-700°C)	Resíduo (750°C)
HA	0,5	0,6	0,4	98,5
QX	13,9	66,8	17,5	1,8
QXC	12,3	53,7	29,5	4,5
QXm	11,2	40,3	8,9	39,6
QXCm	9,8	32,2	14,2	43,8

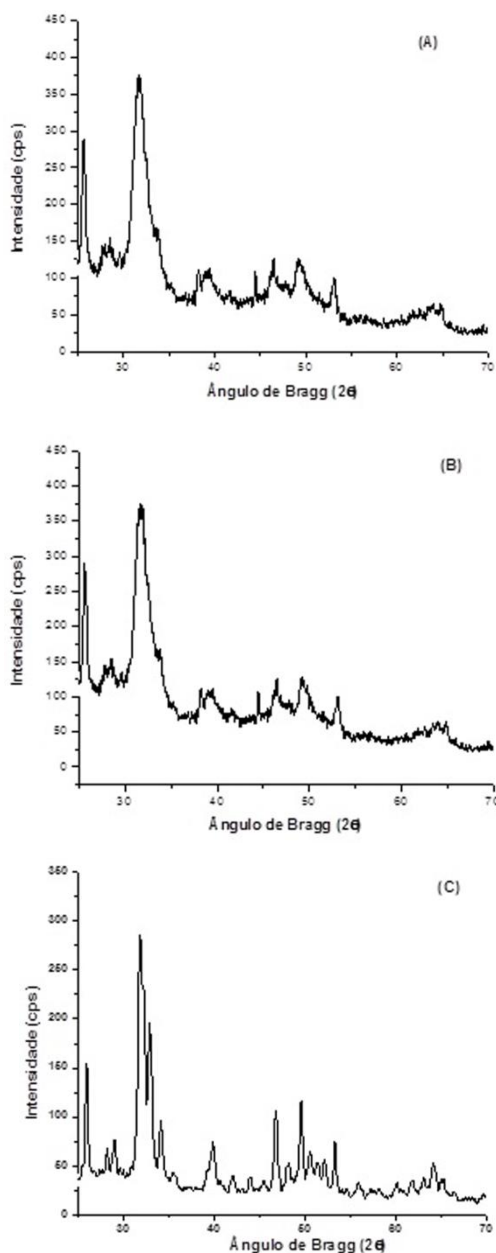
Para os hidrogéis mineralizados (QXm e QXCm), observa-se uma mudança no comportamento das curvas quando comparado às curvas obtidas para os hidrogéis não mineralizados. Neste caso, ainda são observados os três estágios de perda de massa descritos anteriormente, mas a partir de 600°C, as curvas tornam-se constantes e não é mais observado a mudança nos valores de perda de massa. Os resultados mostraram que para o QXm a quantidade de resíduo foi de 39,6 % e para o hidrogel QXCm foi de 43,8 %, indicando que HA está presente pois é termicamente estável nesta temperatura. A presença de colágeno provoca um aumento de cerca de 4% na quantidade de fosfato de cálcio depositado, que pode estar relacionado ao material que além de depositado na superfície dos hidrogéis, também se deposita nas fibras colagênicas, como mostrado pelas fotomicrografias por MEV (Figura 1B).

A difração de raios-X permite verificar a estrutura cristalográfica do sal de fosfato de cálcio obtido na mineralização. A Tabela 2 mostra que os resultados para os hidrogéis mineralizados são similares aos da HA sintética de acordo com o difratograma padrão da JCPDS (9-0432).

**Tabela 2.** Principais valores de d para as matrizes mineralizadas

Amostras	Principais valores de d (Å)			
QXm	2,83	2,70	3,33	1,90
QXCm	2,86	2,65	3,36	1,88
JCPDS (9-0432)	2,81	2,72	3,43	1,84

Os difratogramas dos hidrogéis mineralizados são mostradas na Figura 4A e 4B.



**Figura 4.** Difratograma de raios X dos hidrogéis mineralizados. Em A, QXm, em B, QXCm e em C, HA sintética não cristalina (MARTINS et al, 1998).

As curvas são similares e mostram um pico intenso e largo em torno de 31° (2θ), mostrando que foi formado HA nas matrizes. Este alargamento e baixa resolução, mostrados nos difratogramas resulta da baixa cristalinidade da HA formada na superfície das matrizes mineralizadas. Estes resultados são comparáveis àqueles da HA não cristalina (Figura 4C) encontrada em literatura [12] com picos mais largos em comparação com os padrões de difração da HA sintética.

#### 4. Conclusão

Os resultados de mineralização *in vitro* indicaram que os hidrogéis preparados neste trabalho induzem a deposição de fosfato de cálcio na superfície do material, com uma relação Ca/P semelhante à hidroxiapatita estequiométrica. Além disso, a presença de colágeno aumenta a quantidade de sal depositado no hidrogel, confirmado pela técnica de termogravimetria. Devido às suas características, estes materiais são promissores para aplicação na área de regeneração óssea.

#### Agradecimentos

MMH agradece ao CNPq pela bolsa concedida (Processo 140362/2008-8).

#### Referências Bibliográficas

- [1] Tanase CE, Sartoris A, Popa MI, Verestiuc L, Unger RE, Kirkpatrick CJ. In vitro evaluation of biomimetic chitosan-calcium phosphate scaffolds with potential application in bone tissue engineering. *Biomed. Mater.* 2013;8(2):25002-11. [\[Google Scholar\]](#) [\[Visualizar Item\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#)
- [2] Tavakol S, Nikpour MR, Amani A, Soltani M, Rabiee SM, Rezayat SM, Chen P, Jahanshahi M. Bone regeneration based on nano-hydroxyapatite and hydroxyapatite/chitosan nanocomposites: an in vitro and in vivo comparative study. *J. Nanopart. Res.* 2013;15:1-16. [\[Google Scholar\]](#) [\[CrossRef\]](#)
- [3] Pighinelli L, Kucharska M. Chitosan–hydroxyapatite composites. *Carbohydr. Polym.* 2013;93(1):256-262. [\[Google Scholar\]](#) [\[Visualizar Item\]](#) [\[CrossRef\]](#)
- [4] Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2012;64:18-23. [\[Google Scholar\]](#) [\[CrossRef\]](#)
- [5] Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Adv Mater* 2009;21(32-33):3307-29. [\[Google Scholar\]](#) [\[Visualizar Item\]](#) [\[CrossRef\]](#)
- [6] Gkioni K, Leeuwenburgh SCG, Douglas TEL, Mikos AG, Jansen JA. Mineralization of hydrogels for bone regeneration. *Tissue Eng* 2010;16:577-585. [\[Google Scholar\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#)
- [7] Horn MM, Martins VCA, Plepis AMG. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. *Carbohydr. Polym.* 2009;77(2):239-43. [\[Google Scholar\]](#) [\[CrossRef\]](#)



- [8] Raymond L, Morin FG, Marchessault H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. Carbohydr. Res. 1993;246(1):331-336. [\[Google Scholar\]](#) [\[CrossRef\]](#)
- [9] Batista TM, Martins VCA, Plepis AMG. Thermal behavior of in vitro mineralized anionic collagen matrices. J. Therm. Anal. Cal. 2009;95(3):945-9. [\[Google Scholar\]](#) [\[Visualizar Item\]](#) [\[CrossRef\]](#)
- [10] Habraken WJEM, Wolke JGC, Jansen JA. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2007;59(4-5):234-248. [\[Google Scholar\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#)
- [11] Markovic M, Fowler BO, Tung MSJ. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. J. Res. Nat. Inst. Stand. Technol. 2004;109(6):553-568. [\[Google Scholar\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#)
- [12] Martins VCA, Goissis G, Ribeiro AC, Jr Marcantônio E, Bet MR. The controlled release of an antibiotic by hydroxyapatite: anionic collagen composites. Art. Org. 1998;22:215-21. [\[Google Scholar\]](#) [\[CrossRef\]](#)