

BIOCOMPÓSITOS DE ECOVIO/HIDROXIAPATITA/TANINO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Ewerton de O. T. Bezerra^{1*}, Samarah V. Harb², Cesar A. G. Beatrice², Eduardo H. Backes², Lidiane C. Costa², Luiz A. Pessan²

1 – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luís, km 235, São Carlos, SP, Brasil.

2 - Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luís, km 235, São Carlos, SP, Brasil.

*eotbezerra@estudante.ufscar.br

RESUMO

Compósitos poliméricos bioativos e bactericidas possuem uma grande aplicabilidade na área médica, especialmente na engenharia de tecidos. Neste trabalho uma blenda comercial de poli (ácido láctico) (PLA) e poli (butileno adipato co-tereftalato) (PBAT), chamada de Ecovio[®], foi modificada com hidroxiapatita (HA), para fornecer bioatividade, e um derivado de taninos condensados amino-funcionalizado (TN), para conferir propriedade bactericida ao compósito. Primeiramente o TN foi purificado por meio de diálise para remoção de impurezas oriundas do processo de síntese. A diálise foi feita em diferentes tempos (4 e 12 h) e a partir dos resultados de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplado a energia dispersiva de raio-X (EDS), foi escolhido o tempo de 4 h (o tanino dialisado foi chamado de TND). Compósitos de diferentes concentrações m/m (Ecovio puro; Ecovio-10%TN; Ecovio-10%TND; Ecovio-10%HA; Ecovio-10%HA-10%TN; e Ecovio-10%HA-10%TND) foram preparados em misturador interno acoplado a um reômetro de torque (Haake) a 170°C e depois prensados para obtenção de placas. Os resultados de reometria de torque mostraram que a adição de HA ocasionou um aumento do torque do Ecovio (0,5 N m) para 1,0 N m, a adição de tanino (tanto TN como TND) não levou a alteração, e a adição simultânea de HA e tanino ocasionou um aumento do torque para 1,2 N m (Ecovio-10%HA-10%TN) e 1,1 N m (Ecovio-10%HA-10%TND); indicando que os aditivos não degradam a matriz polimérica. Análises térmicas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA) mostraram que os compósitos são estáveis até cerca de 330°C, corroborando com os dados do Haake, que mostraram que não houve degradação da matriz polimérica com a presença dos aditivos estudados.

Palavras-chave: Ecovio, tanino, hidroxiapatita, compósito, engenharia de tecidos.

INTRODUÇÃO

Compósitos a base de poli (ácido láctico) (PLA) tem demonstrado excelentes resultados em termos de biocompatibilidade^(1,2). O PLA é um poliéster semicristalino derivado do ácido láctico, produzido a partir de fontes renováveis, com excelentes propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioabsorção⁽³⁾. Entretanto o PLA é rígido, frágil, apresenta baixa deformação de ruptura, baixa estabilidade térmica e longo período para

degradação *in vivo*⁽⁴⁻⁶⁾. Uma das alternativas para otimizar as propriedades do PLA é a mistura com outros polímeros biodegradáveis. Um dos polímeros que vem sendo estudado para a formação de blendas com o PLA é o poli (butileno adipato co-tereftalato) (PBAT). O PBAT é um poliéster biodegradável altamente flexível com baixa cristalinidade, fácil processamento, alto alongamento na ruptura e tem se mostrado um bom material para aumentar a resistência mecânica e térmica do PLA^(4,6-8).

A blenda comercial Ecovio[®], composta de PBAT e PLA, apresenta um grande potencial para aplicações biomédicas, porém tem sido pouco explorada para essa aplicação. O Ecovio tem sido usado para produção de filmes agrícolas e sacolas biodegradáveis (compostáveis)⁽⁹⁾, filtros para tratamento de água⁽¹⁰⁾, e fibras para liberação controlada de medicamentos⁽¹¹⁾. Neste estudo foram desenvolvidos compósitos a base de Ecovio visando aplicações na engenharia de tecidos. O Ecovio foi modificado com hidroxiapatita (HA), que por ser um componente nativo do osso, possui características que favorecem o crescimento e proliferação de células ósseas⁽¹⁾. Além disso, foi adicionado um derivado de tanino condensado amino-funcionalizado (TN) a fim de conferir propriedades antimicrobianas para o compósito^(12,13).

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

O Ecovio[®] (L BX 8145) foi doado pela empresa BASF e trata-se de uma blenda polimérica com 55% em massa de PBAT e 45% em massa de PLA. Os pellets foram moídos usando um moinho de facas. O derivado de tanino condensado amino-funcionalizado (TN), denominado de Tanfloc SG foi doado pela TANAC S.A (Montenegro-RS, Brasil). A membrana para diálise (Spectra/Por[®] 1, tamanhos de poros de 6-8 kD) foi adquirida da empresa Spectrum Labs. A hidroxiapatita com composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ foi adquirida da empresa Sigma Aldrich[®] na forma de pó e tamanho médio de partícula de 4,58 μm .

Métodos

Primeiramente, o TN foi purificado através de um procedimento de diálise e liofilização com intuito de remover impurezas (ácido fórmico e excesso de íons cloreto) oriundas do seu processo de síntese. Inicialmente o TN (10 g) foi dissolvido em uma solução aquosa diluída de ácido acético (1,0% v/v). Em seguida, a solução de TN foi previamente filtrada para remoção de partículas de madeira e dialisada contra água deionizada em diferentes tempos (4 e 12 h). Após a diálise, o TN foi liofilizado e o rendimento do processo foi estimado.

Espectros de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) do TN antes e após diálise foram obtidos em um espectrofotômetro (Varian 640-IR) na faixa de 600 a 2000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . A morfologia e composição do TN antes e após diálise foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada a energia dispersiva de raio-X (EDS) (Philips XL-30 FEG).

Compósitos a base de Ecovio (Tabela 1) foram preparados em misturador interno acoplado a um reômetro de torque com dois rotores contra-rotantes (Haake Rheomix 600p), sob rotação de 60 rpm durante 5 min a 170 °C. Após esta etapa, o material foi prensado a quente (Marconi, MA098) para obtenção de placas.

As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas em um equipamento da TA Instruments, modelo Q2000 sob atmosfera de nitrogênio (N_2), de acordo com o seguinte método: (1) aquecimento de 0 °C a 200 °C a 10 °C min^{-1} e isoterma por 5 min; (2) resfriamento de 200 °C a 0 °C a 10 °C min^{-1} e isoterma por 5 min e (3) reaquecimento até 200 °C a 10 °C min^{-1} . Análises termogravimétrica (TGA) foram conduzidas em um

equipamento da TA Instruments, modelo Q50, à uma taxa de 20 °C min⁻¹, a partir da temperatura ambiente até 800 °C, sob atmosfera de N₂.

Tabela 1. Composição dos compósitos preparados.

Amostra	Ecovio (%m)	TN (%m)	TND (%m)	HA (m%)
ECO	100	0	0	0
ECOTN	90	10	0	0
ECOTND	90	0	10	0
ECOHA	90	0	0	10
ECOTNHA	80	10	0	10
ECOTNDHA	80	0	10	10

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O TN foi purificado por meio do processo de diálise para remoção de ácido fórmico e excesso de íons cloreto, oriundos do seu processo de síntese. Variou-se o tempo do processo em 4 h (TND4) e 12 h (TND12). Na Figura 1 são mostradas micrografias do TN antes e após diálise. A estrutura do tanino comercial é formada por partículas esféricas com superfície lisa, pois o excesso de íons cloretos levam a formação de pares iônicos (sais) –NH₃⁺/Cl⁻, K⁺/Cl⁻ e Ca²⁺/2Cl⁻ que promovem a organização. Durante a diálise, o pH aumenta, desprotonando os grupos NH₃⁺ e rompendo a estrutura de sal, porque os grupos NH₂ não interagem com íons Cl como os sítios NH₃⁺. Portanto, a diálise rompe a estrutura, levando a uma estrutura frágil, desorganizada e sem ocorrências de partículas esféricas⁽¹²⁾. A análise de EDS (em % massa) revelou que o processo de diálise removeu as impurezas: o teor de íon potássio no TN foi de 0,68%, enquanto após diálise foi de 0,01% (TND4) e 0,02% (TND12); o teor de Ca²⁺ reduziu de 0,15% para 0,02% (TND4) e 0,01% (TND12); e o excesso de íons cloreto presente no TN (16,43%) após diálise foi para 9,60% (TND4) e 8,08% (TND12).

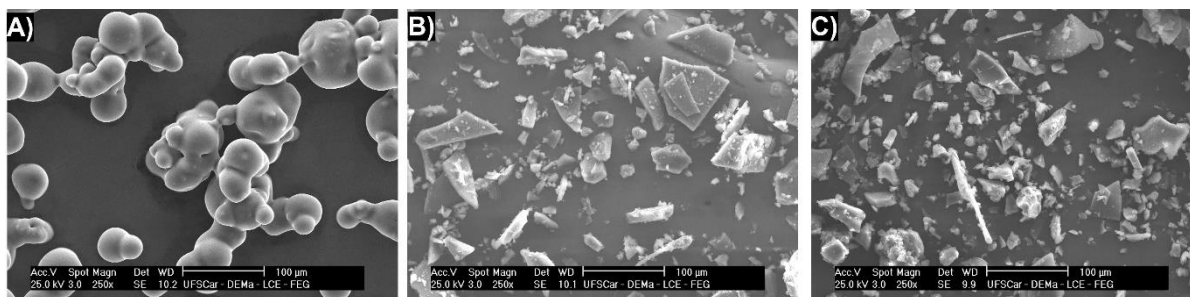


Figura 1. Imagens MEV: A) TN, B) TND4 após 4 h de diálise e C) TND12 após 12 h de diálise.

Os espectros de FTIR do TN antes e depois da diálise (Figura 2A) apresentaram diferenças significativas, indicando que a estrutura do TN sofre mudanças após o processo de diálise, devido a remoção de impurezas. O espectro do TN mostra uma banda em 1735 cm⁻¹, atribuída aos grupos éster de taninos hidrolisáveis, que foram extraídos juntamente com os taninos condensados a partir da casca da *Acacia mearnsii*, popularmente chamada de Acácia Negra. O desaparecimento desta banda nos taninos purificados (TND4 e TND12) evidência a eficiência da purificação na remoção dos taninos hidrolisáveis⁽¹³⁾. O deslocamento da banda em 1462 cm⁻¹ (TN) para 1458 cm⁻¹ (TND12 e TND4), referente ao alongamento da ligação C=C de grupos fenólicos, evidencia a remoção dos íons cálcio e potássio.

Os resultados de MEV-EDS e FTIR mostraram que o processo de diálise é efetivo para purificação do tanino, mesmo utilizando o tempo menor de 4 h. Levando em conta a facilidade

de preparação por menor tempo e o maior rendimento obtido para 4 h (56%), comparado a 5,8% para 12 h, foi escolhido o tempo de 4 h para fabricação dos compósitos. O tanino dialisado escolhido foi chamado de TND.

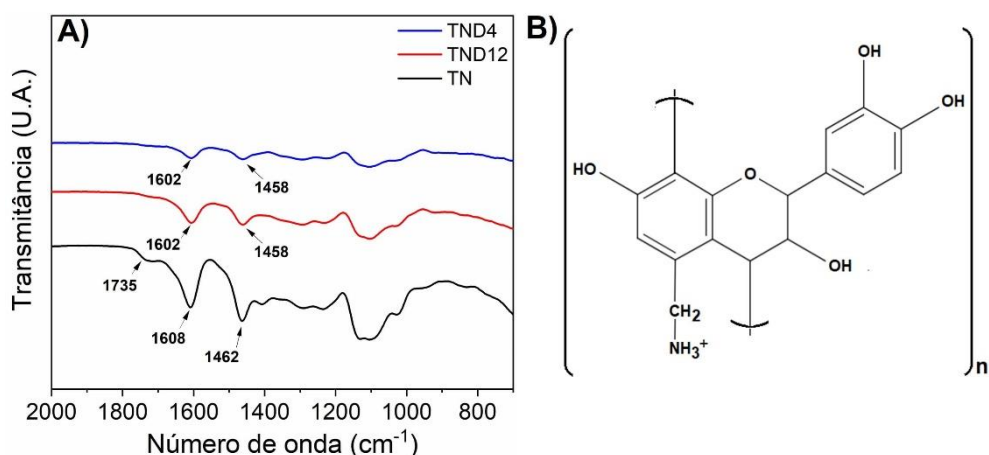


Figura 2. A) Espectros FTIR do tanino condensado amino-funcionalizado (TN) antes e após diálise por 4 h (TND4) e 12 h (TND12). B) Estrutura do tanino condensado amino-funcionalizado.

Para a produção dos biocompósitos realizou-se misturas de Ecovio com aditivos em um misturador interno acoplado a um reômetro de torque. A Figura 3A apresenta as curvas de torque em função do tempo para o Ecovio puro e seus biocompósitos com TN, TND e HA. Os resultados mostram que a adição de HA ocasionou um aumento no torque do Ecovio, enquanto a adição de TN e TND não houve alteração. No entanto, com a adição simultânea de HA e tanino (TN ou TND), o torque foi ligeiramente maior em relação ao biocompósito ECO/HA. Os resultados indicam que a matriz polimérica não se degrada na presença desses aditivos.

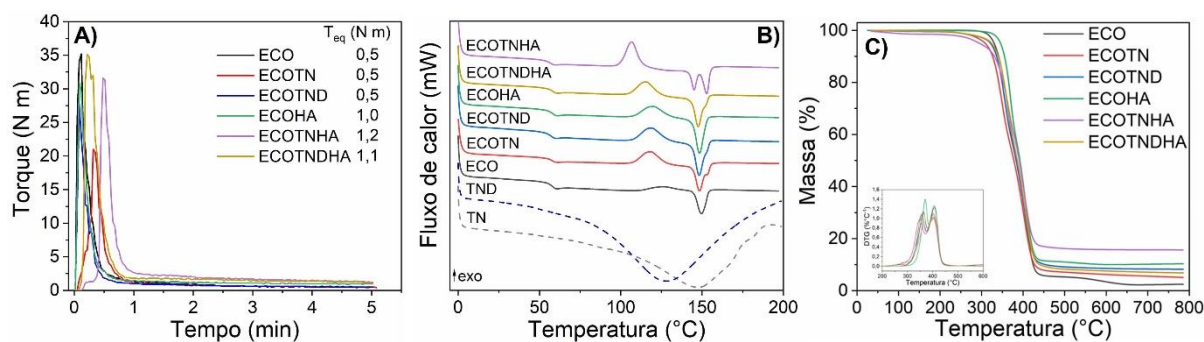


Figura 3. A) Variação do torque em função do tempo de mistura para os compósitos. B) Curvas DSC no 1º aquecimento para o TN e TND (linhas tracejadas) e no 2º aquecimento para os compósitos (linhas cheias). C) TGA dos compósitos estudados.

Os resultados de DSC (Figura 3B) mostram a presença da transição vítrea (T_g) do PLA em torno de 60 °C, confirmando a imiscibilidade entre PBAT e PLA conforme descrito na literatura⁽⁷⁾. Com a presença de aditivos, observa-se que ocorreu um deslocamento da temperatura de cristalização (T_c) de 125,4 °C (ecovio puro) para até 106,8 °C (compósito ECO/TN/HA). Outra modificação que ocorreu com a presença de tanino foi o desdobramento do pico de fusão, que pode estar relacionado à fusão de taninos hidrolisáveis⁽¹³⁾, que ocorre a 146,9 °C (TN) e a 127,9 °C (TND). As curvas de TGA e DTG (Figuras 3C) mostraram que a adição de tanino e HA não modificou significativamente a temperatura de início de degradação (T_{onset}) e os eventos de decomposição do ecovio e, portanto, a presença dos aditivos não afetou a estabilidade térmica da matriz polimérica após processamento a altas temperaturas.

CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos compósitos a base de Ecovio, uma blenda comercial de PLA e PBAT, modificada com hidroxiapatita (HA) e um derivado de taninos condensados amino-funcionalizado (TN), com potencial aplicação biomédica. O tanino foi inicialmente purificado através de diálise por 4 e 12 h, e os resultados de FTIR e MEV-EDS mostraram pouca diferença na composição após os tempos estudados; portanto, foi escolhido o menor tempo de diálise devido ao maior rendimento do processo. Os resultados de reometria de torque e análises térmicas por TGA e DSC mostraram que os aditivos (HA, TN e TN purificado) não degradam a blenda polimérica PLA/PBAT, mesmo após processamento em alta temperatura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE/DEMa/UFSCar) pela utilização do MEV-EDS. Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [número de processo 2017/09609-9, 2017/11366-7, 2018/26060-3 e 2019/27415-2], Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Finanças 001 [número de processo 88887.371791/2019-00], e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [número de processo 306835/2017-7].

REFERÊNCIAS

1. Backes, E. H.; Pires, L. D. N.; Beatrice, C. A. G.; Costa, L. C.; Passador, F. R.; Pessan, L. A. Fabrication of Biocompatible Composites of Poly(Lactic Acid)/Hydroxyapatite Envisioning Medical Applications. *Polym. Eng. Sci.* **2020**, 60 (3), 636–644.
2. Backes, E. H.; de Nóbile Pires, L.; Selistre-de-Araujo, H. S.; Costa, L. C.; Passador, F. R.; Pessan, L. A. Development and Characterization of Printable PLA/ β -TCP Bioactive Composites for Bone Tissue Applications. *J. Appl. Polym. Sci.* **2021**, 138 (5), 49759.
3. Chou, Y. C.; Lee, D.; Chang, T. M.; Hsu, Y. H.; Yu, Y. H.; Liu, S. J.; Ueng, S. W. N. Development of a Three-Dimensional (3D) Printed Biodegradable Cage to Convert Morselized Corticocancellous Bone Chips into a Structured Cortical Bone Graft. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17 (4), 595.
4. Al-Itry, R.; Lamnawar, K.; Maazouz, A. Improvement of Thermal Stability, Rheological and Mechanical Properties of PLA, PBAT and Their Blends by Reactive Extrusion with Functionalized Epoxy. *Polym. Degrad. Stab.* **2012**, 97 (10), 1898–1914.
5. Barbanti, S. H.; Zavaglia, C. A. C.; Duek, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis Na Engenharia de Tecidos. *Polímeros* **2005**, 15 (1), 13–21.
6. Rigolin, T. R.; Costa, L. C.; Chinelatto, M. A.; Muñoz, P. A. R.; Bettini, S. H. P. Chemical Modification of Poly(Lactic Acid) and Its Use as Matrix in Poly(Lactic Acid) Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) Blends. *Polym. Test.* **2017**, 63, 542–549.
7. Arruda, L. C.; Magaton, M.; Bretas, R. E. S.; Ueki, M. M. Influence of Chain Extender on Mechanical, Thermal and Morphological Properties of Blown Films of PLA/PBAT Blends. *Polym. Test.* **2015**, 43, 27–37.
8. Ribeiro Neto, W. A.; De Paula, A. C. C.; Martins, T. M. M.; Goes, A. M.; Averous, L.; Schlatter, G.; Suman Bretas, R. E. Poly (Butylene Adipate-Co-Terephthalate)/Hydroxyapatite Composite Structures for Bone Tissue Recovery. *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, 120, 61–69.
9. Siegenthaler, K. O.; Künkel, A.; Skupin, G.; Yamamoto, M. Ecoflex® and Ecovio®: Biodegradable, Performance-Enabling Plastics. In *Synthetic Biodegradable Polymers*; Rieger B., Künkel A., Coates G., Reichardt R., Dinjus E., Z. T., Ed.; Springer, Berlin, Heidelberg, 2011; pp 91–136.
10. Facchi, D. P.; Facchi, S. P.; Souza, P. R.; Bonafé, E. G.; Popat, K. C.; Kipper, M. J.; Martins, A.

- F. Composite Filter with Antimicrobial and Anti-Adhesive Properties Based on Electrospun Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate)/Poly(Acid Lactic)/Tween 20 Fibers Associated with Silver Nanoparticles. *J. Memb. Sci.* **2022**, 650, 120426.
11. Antunes, L. R.; Breitenbach, G. L.; Pellá, M. C. G.; Caetano, J.; Dragunski, D. C. Electrospun Poly(Lactic Acid) (PLA)/Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) (PBAT) Nanofibers for the Controlled Release of Cilostazol. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, 182, 333–342.
 12. Martins, A. F.; Facchi, S. P.; da Câmara, P. C. F.; Camargo, S. E. A.; Camargo, C. H. R.; Popat, K. C.; Kipper, M. J. Novel Poly(ϵ -Caprolactone)/Amino-Functionalized Tannin Electrospun Membranes as Scaffolds for Tissue Engineering. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, 525, 21–30.
 13. Facchi, D. P.; Lima, A. C.; de Oliveira, J. H.; Lazarin-Bidóia, D.; Nakamura, C. V.; Canesin, E. A.; Bonafé, E. G.; Monteiro, J. P.; Visentainer, J. V.; Muniz, E. C.; Martins, A. F. Polyelectrolyte Complexes Based on Alginate/Tanfloc: Optimization, Characterization and Medical Application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 103, 129–138.

ECOVIO/HYDROXYAPATITE/TANIN BIOCOMPOSITES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

ABSTRACT

Bioactive and bactericidal polymeric composites have broad applicability in the medical field, especially in tissue engineering. In this paper, a commercial blend of poly (lactic acid) (PLA) and poly (butylene adipate co-terephthalate) (PBAT), called Ecovio, was modified with hydroxyapatite (HA) to provide bioactivity, and an amino condensed tannin derivative - functionalized (TN), to confer bactericidal property to the composite. First, TN was purified via dialysis to remove impurities from the synthesis process. Dialysis was performed at different times (4 and 12 h), and from the results of infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM) coupled with energy dispersive X-ray (EDS), the time of 4 h (the dialyzed tannin was called TND). Composites of different ratios wt./wt. (Pure Ecovio; Ecovio-10%TN; Ecovio-10%TND; Ecovio-10%HA; Ecovio-10%HA-10%TN; and Ecovio-10%HA-10%TND) were prepared in an internal mixer coupled to a torque rheometer (Haake) at 170°C and then pressed to obtain plates. The torque rheometry results showed that the addition of HA caused an increase in the Ecovio torque (0.5 N m) to 1.0 N m, the addition of tannin (both TN and TND) did not lead to the change, and the simultaneous addition of HA and tannin caused an increase in torque to 1.2 N m (Ecovio-10%HA-10%TN) and 1.1 N m (Ecovio-10%HA-10%TND); indicating that the additives do not degrade the polymer matrix. Thermal analysis by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) showed that the composites are stable up to about 330°C, corroborating the Haake data, which showed that there was no degradation of the polymer matrix with the presence of the additives studied.

Keywords: Ecovio, tannin, hydroxyapatite, composite, tissue engineering.