

UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS PARA O ESTUDO DO FLUIDO CORPORAL SIMULADO (SBF)

Sophia Hellen de Assis Domingues (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Henrique dos Santos (Coorientador), Francielle Sato (Orientadora). E-mail: fsato@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Física / Física da Matéria Condensada

Palavras-chave: Bioatividade; *Simulated Body Fluid*; Espectroscopia.

RESUMO

Este projeto teve como objetivo estudar o *Simulated Body Fluid* (SBF), com e sem imersão de vitrocerâmicas bioativas, utilizando técnicas espectroscópicas. Com o monitoramento do pH do SBF em função do tempo, foram realizadas medidas por meio das espectroscopias vibracionais Raman e de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), além da técnica de espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível. Os resultados indicaram que a espectroscopia FTIR-ATR foi a técnica espectroscópica mais sensível as variações iônicas do SBF com imersão de vitrocerâmicas, mostrando-se promissora para a avaliação de dinâmica de bioatividade *in vitro* em biomateriais.

INTRODUÇÃO

Para ser classificado como biomaterial, o material deve ter a capacidade de induzir uma atividade biológica específica quando entram em contato com tecidos ou fluidos biológicos, desde que não prejudiquem o organismo vivo, sendo possível utilizá-los para tratamentos protéticos e terapêuticos (KOKUBO, 2006). A *Food Drug Administration* (FDA) determinou que para ser considerado bioativo, um material não deve ser rejeitado pelo organismo do paciente, sendo assim, deve-se levar em consideração a compatibilidade biológica do material, bem como sua geometria, controle elétrico e desempenho mecânico. Em 1960, surgiram os primeiros biomateriais cujo objetivo era substituir tecidos danificados. Atualmente, na quarta geração, com a evolução da ciência e tecnologia, surgiram materiais com capacidade de substituir mecanismos naturais do organismo, promovendo reações específicas, podendo ser permanentes ou temporários no organismo (FESTAS, 2020).

Ensaio de bioatividade acelular, *in vitro*, é um teste padrão que avalia a capacidade de um material interagir com o corpo, como a formação de uma camada de hidroxiapatita (HA) na sua superfície, simulando o ambiente fisiológico em laboratório. Este tipo de teste é fundamental para desenvolver materiais que se integrem bem com tecidos biológicos, como o ósseo, e para minimizar a rejeição pelo organismo, contribuindo para aplicações biomédicas mais seguras e eficazes. A

utilização de soluções com concentrações iônicas semelhantes ao sangue se mostraram eficazes para tal análise. Entre essas soluções, incluem-se a solução aquosa de 0,9% de cloreto de sódio (NaCl), solução tampão com fosfato (PBS), solução salina balanceada de Hank (HBSS), meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o fluido corporal simulado (SBF), entre outros, sendo o SBF a solução mais utilizada para fins biomiméticos (XIN, 2010). Em 2007, o SBF se tornou a principal solução de teste de bioatividade com sua composição definida conforme o protocolo da Organização Internacional de Padronização (ISO:23317). No entanto, a produção do SBF tem um tempo limite de 28 dias para uso, devido as possíveis alterações físico-químicas que acontecem, por exemplo, alteração do pH e a concentração iônica (KOKUBO, 2006).

As técnicas de análise elementar podem ser aplicadas para avaliação dos SBF pós imersão, entretanto demandam preparações químicas, tais como diluição em solventes. Neste viés, este projeto utilizou técnicas espectroscópicas na região do ultravioleta-vísivel (Uv-Vis) e infravermelho próximo, como alternativa não destrutiva para avaliação das interações iônicas do SBF sem e com a imersão do biomaterial em diferentes tempos, a fim de promover maiores estudos sobre suas propriedades.

MATERIAIS E MÉTODOS

O SBF foi preparado utilizando o método proposto por Kokubo (KOKUBO, 2006.), com cada composto pesado na balança analítica (UW220D, Shimadzu) com precisão de 0,1 mg. No ensaio de bioatividade *in vitro* os biomateriais são imersos em SBF durante diferentes intervalos de tempo, a 36,5°C. Para controle das possíveis alterações do SBF, foram separadas 5 alíquotas de 25 ml de SBF e submetidas as mesmas condições de um ensaio de bioatividade, porém sem a imersão de biomaterial, durante 1, 7, 14, 21 e 28 dias. Também foram analisadas amostras de SBF com a imersão da vitrocerâmica bioativa, produzida a partir do sistema vítreo cálcio-sódio-boro denominado no decorrer do trabalho de P3, durante os intervalos de 14 e 28 dias. Os SBF's, com e sem imersão de P3, em todos os períodos descritos foram analisados pelas técnicas espectroscópicas de absorção no UV-Vis, Raman e FTIR.

2 ml de SBF foi condicionado em cubeta de quartzo, de caminho óptico de 1 cm, para obtenção dos espectros de transmitância no UV-Vis, sendo realizado uma medida por amostra, utilizando um espectrofotômetro UV/Vis/NIR (Lambda 1050, PerkinElmer), no intervalo de 800 a 200 nm, com resolução espectral de 1 nm. Como referência foi utilizada a água ultrapura mili-Q. Para a espectroscopia Raman foram depositados 100 µl de SBF em um espelho de ouro, seco por 60 minutos em condições normais de ambiente, utilizando um espectrômetro Confocal µ-Raman (Senterra, Bruker) com objetiva de magnificação de 20x, focando o laser de excitação (785 nm e potência nominal de 100 mW). Cada espectro foi uma média de 15 varreduras, com tempo de integração no sensor de 5 s, resolução espectral de 9 a 15 cm⁻¹ e obtidos no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹. Os espectros de FTIR-ATR foram obtidos por meio de um espectrômetro de FTIR (Vertex 70V, Bruker) acoplado

ao acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) (Platinum, Bruker) equipado com cristal de diamante. 2 μ l de SBF foram depositados sobre o cristal, e aguardou-se 60 min para evaporação da água (em condições normais de ambiente) para início de cada medida. Cada espectro é uma média de 128 varreduras, no intervalo espectral entre 4000 e 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros de FTIR-ATR e Raman foram normalizados pelo vetor normalização utilizando o *software* OPUS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de transmitância no UV-Vis mostraram alterações significativas na solução do SBF após a imersão P3. Enquanto as amostras do SBF sem imersão de P3, chamado de controle, mantiveram uma estabilidade nos 28 dias, exceto por uma redução da transmitância na região de 230 – 260 nm. Ao fazer a comparação entre o SBF controle e com imersão do biomaterial, entre os tempos de 14 e 28 dias, é observado um deslocamento na banda em 205 nm para maiores comprimentos de onda, sendo um indicativo da interação e degradação de P3. A natureza de absorbância do material sugere que a dinâmica entre o SBF e o biomaterial liberam íons e compostos capazes de absorver energia na entre a região de 200 – 230 nm, no ultravioleta. Entretanto, não foi possível identificar os compostos relacionados a esta alteração.

Ao utilizar a técnica de espalhamento Raman o espectro do SBF controle apresenta bandas semelhantes às do SBF com imersão, impossibilitando assim, a análise de possíveis contribuições da dinâmica iônica entre o material e o SBF durante os períodos de imersão, sendo avaliado que essa técnica não é tão sensível ao tipo de análise desejada.

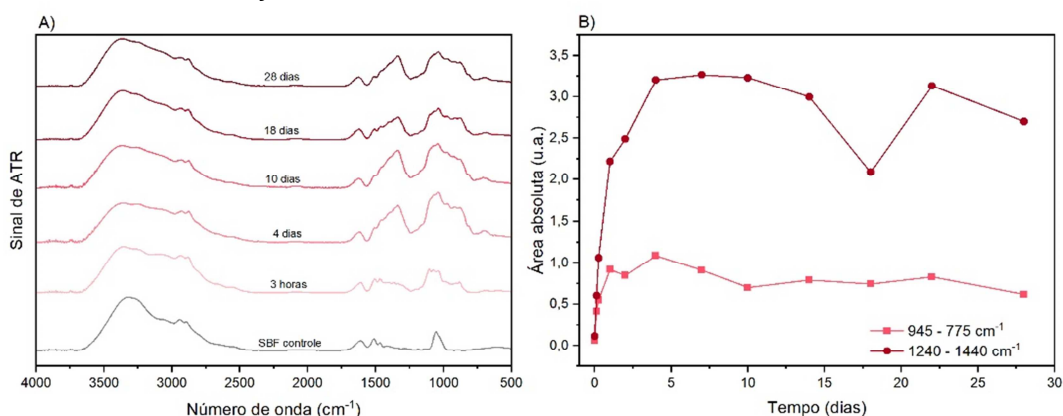


Figura 1. A) Espetros de FTIR-ATR do SBF controle e com imersão da vitrocerâmica P3 em função de diferentes tempos. B) Comportamento das áreas das bandas de borato em função dos tempos em imersão.

Já a espectroscopia FTIR-ATR permitiu monitorar de forma mais evidente interações entre P3 e o SBF em duas regiões principais: entre 775 e 945 cm^{-1} e 1240 e 1440 cm^{-1} , onde o SBF não apresentou bandas, como observado na Figura 1.A). Ao analisar a área absoluta dessas bandas em função do tempo, foi possível observar que a dinâmica entre o SBF e P3 é mais intensa nas primeiras horas, estabilizando-se após períodos mais longos, como mostrado na Figura 1.B).

Segundo estudos prévios (DOS SANTOS, 2023), onde a vitrocerâmica P3 foi estudada em detalhes, é possível associar as duas regiões destacadas a modos vibracionais de boratos. A região entre $775 - 945 \text{ cm}^{-1}$ é típica das unidades de BO_3 e BO_4 associados a estiramentos assimétricos de B-O de grupos diborato. Já a região entre 1240 e 1440 cm^{-1} pode estar associada a grupos trigonais de boro com modos de vibração de estiramentos de boro e oxigênio. Desta forma, a espectroscopia FTIR-ATR permitiu avaliar a evolução de dissociação de P3 por meio das bandas de grupos borato, que são de fundamental importância para avaliação da bioatividade da amostra.

CONCLUSÕES

As técnicas espectroscópicas empregadas nas condições experimentais deste estudo apresentaram sensibilidade as alterações iônicas tanto do SBF controle, quanto do SBF com P3 em imersão. O destaque ficou com a espectroscopia FTIR-ATR que permitiu a análise da dinâmica dos grupos boratos presentes em P3 em meio ao SBF, mostrando-se uma técnica promissora para estudo do SBF com imersão de diferentes biomateriais. Compreender o meio pós-imersão em teste de bioatividade acelular é uma importante informação para o emprego de biomateriais em aplicações biomédicas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Capes, CNPq, ao Departamento de Física e aos demais órgãos que contribuíram para o projeto.

REFERÊNCIAS

FESTAS, A. J.; RAMOS, A.; DAVIM, J. P. Medical devices biomaterials—A review. **Proceedings of the institution of mechanical engineers, part L: Journal of Materials: Design and Applications**, v. 234, n. 1, p. 218-228, 2020.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907-2915, 2006.

XIN, Y.; HU, T.; CHU, P. K. Influence of test solutions on in vitro studies of biomedical magnesium alloys. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 157, n. 7, p. C238, 2010.

DOS SANTOS, H. Estudo da influência na resposta bioativa de vitrocerâmicas produzidas a partir do sistema vítreo boro-sódio-cálcio com diferentes tamanhos de partículas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR (Brasil). **Programa de Pós-Graduação em Física**, 2023.