

Caracterização da esponja de água doce (*Metania reticulata*) para uso como arcabouço de engenharia tecidual

Suzana Barreto Noronha Ribeiro^a, Florêncio da Veiga Junior^a, Cecília Volkmer Ribeiro^b, Flávio James Tommasini^a, Jheison Lopes dos Santos^a, Daniel Navarro da Rocha^a, Marcelo Henrique Prado da Silva^a

Instituto Militar de Engenharia (IME)

Praça General Tibúrcio, 80, 22290-270, Praia Vermelha, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

^bFederal University of Rio Grande do Sul – UFRGS

Av. Paulo Gama, 110. CEP: 90040-060 -

*suzananoronha13@gmail.com

RESUMO: A demanda de materiais novos que sirvam como meio bioativo ou arcabouços porosos para aplicações no campo biomédico vem aumentando devido ao aumento de idade geral da população, doenças causadas por acidentes ou recorrentes a traumas, reduzindo a qualidade de vida. Esponjas de água doce retiradas do Rio Negro (Amazonas, Brasil) apresentam estrutura silicosas, surgindo como fonte alternativa para diversas aplicações. Estudos demonstram que estruturas porosas revestidas de apatita biológica aumentam a adsorção de proteínas e aceleram a adesão de células osteogênicas. O objetivo desse trabalho foi analisar a morfologia da superfície a composição química presente por técnicas de difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS), observando a presença de estruturas silicáticas que, em meio biológico, favorecem a osteogênese e consequentemente o processo de regeneração óssea.

PALAVRAS-CHAVE: Caracterização. Esponja de água doce. Arcabouços.

ABSTRACT: The demand for new materials that serve as a bioactive medium or porous frameworks for applications in the biomedical field has been increasing due to the general age increase of the population, illnesses caused by accidents or recurrent to trauma, which reduce the quality of life. Freshwater sponges taken from the Rio Negro (Amazonas, Brazil) have siliceous structure, appearing as an alternative source for applications several. Studies have shown that porous structures coated with biological apatite increase the adsorption of proteins and accelerate the adhesion of osteogenic cells. The objective of this work was to evaluate the surface morphology and chemical composition by means of X-ray diffraction (SRX) techniques, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and X-ray spectroscopy by dispersive energy (EDS), observing the presence of mainly silica structures which, in biological environment, favor osteogenesis and consequently the process of bone regeneration.

KEYWORDS: Characterization. Freshwater sponge. Scaffolds.

1. Introdução

Nos últimos anos, o campo biomédico demonstrou uma demanda crescente por biomateriais com diferentes formas, como andaimes (molde poroso), grânulos e microesferas. Entre as razões para essa demanda crescente estão o aumento geral da população

idosa em todo o mundo associado a doenças relacionadas à idade. Além disso, as fraturas induzidas por trauma reduziram a qualidade de vida das pessoas [1]. No entanto, várias desvantagens estão limitando as aplicações de biomateriais, como altos custos, disponibilidade insuficiente de tecido ósseo saudável no local doador e possíveis efeitos colaterais adversos [1,2].

Para superar essas limitações, as estruturas biológicas das esponjas são uma fonte alternativa para várias aplicações. A possibilidade dessa substituição depende da organização hierárquica de seus esqueletos fibrosos (*Demospongiae*) e espículas mineralizadas feitas de sílica (*Demospongiae* e *Hexactinellida*) ou carbonato de cálcio (*Calcarea*) [3]. O uso de bioestruturas sustentáveis do ambiente marinho, esponjas, esqueletos de corais e ouriços-do-mar, para aplicações biomédicas, é conhecida como biotecnologia azul e considerada como uma nova e importante área de pesquisa de rápido crescimento [4]. Nesse contexto, a engenharia de tecidos oferece uma abordagem promissora para substituir ou reparar tecidos com um design complexo. De fato, estruturas com tamanho de poro adequado e porosidade interconectada podem levar a processos de regeneração favoráveis devido ao suporte físico para adesão, proliferação e diferenciação celular, sem efeitos citotóxicos [5]. Além disso, sua grande área superficial interna permite uma rápida vascularização por ação capilar e, conseqüentemente, perfusão instantânea de sangue em andaimes implantados [5,6].

Diferentes classes de materiais (metal, polímero, cerâmica e compósitos) foram investigadas para a construção de andaimes naturais ou sintéticos. Entre eles, biomateriais baseados em sílica e cerâmica de fosfato de cálcio para andaimes de engenharia de tecidos têm chamado muita atenção devido à sua capacidade de formar ligações químicas diretamente ao osso e promover reparo em defeitos ósseos críticos [7,8]. Esse fenômeno é definido como bioatividade e a presença de grupos funcionais na superfície do biomaterial é uma condição

essencial para a formação da apatita óssea [8]. Estudos demonstraram que esse revestimento de apatita biológica melhora a absorção de proteínas enquanto acelera o recrutamento e a adesão de células osteoprogenitoras [9,10].

O presente trabalho avaliou a morfologia da superfície e a composição química das esponjas de água doce (*Metania reticulata*) por difração de raios X (SRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (FEG-SEM) e dispersão de energia X- espectroscopia de raios (EDS).

2. Materiais e métodos

As esponjas de água doce foram coletadas no Rio Negro (Amazonas, Brasil) e caracterizadas antes e após o tratamento térmico. Para remover todo o material orgânico, os procedimentos de purificação seguiram um método anterior de lavagem com água deionizada e, posteriormente, um tratamento térmico a 550 ° C por 1 h (**figura 1**) [11].



Fig. 1 – Amostras de esponjas de água doce antes e depois da calcinação.

2.1 Caracterização

As amostras foram caracterizadas por difração de raios X em um difratômetro de pó de raios X modelo Bruker-AXS (modelo D8

adiantado) com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$), 40kV e 30mA, etapa 0,02 a 10 segundos a cada 10° a 80° . As análises de FTIR foram realizadas em um espectrofotômetro infravermelho com transformada Nicolet Fourier (modelo iS50 FT-IR) com os espectros obtidos na faixa de 4000-400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

Utilizou-se microscopia eletrônica de varredura com pistola de emissão de campo (FEG-SEM) para analisar as amostras em um Fanta Quanta 250, operando a 10kV, após o processo de deposição de Pt por um revestidor de pulverização por alto vácuo (LEICA modelo ACE600) para evitar o carregamento eletrônico do amostras. Além disso, a análise química semi-quantitativa foi realizada por espectroscopia de raios-X em energia dispersiva (EDS).

3. Resultados e discussão

3.1 Difração de raios-X (DRX)

Os padrões de difração das esponjas de água doce pura e calcinados a 550°C são mostrados na figura 2 e na figura 3, respectivamente. A esponja de água doce antes da calcinação apresentou picos bem definidos, indicando a presença de óxido de silício como quartzo (JCPDS 46-1045). Além disso, foi detectado um pequeno conteúdo de hidróxido de silicato de ferro (JCPDS 17-0470), possivelmente associado à contaminação. Estruturas de silicato ajudam no processo de biomineralização em meio biológico [12]. Após a calcinação, o pico do hidróxido de silicato de ferro não foi detectado. Além disso, um novo pico, correspondente à sílica monoclinica (JCPDS 12-0708) foi detectado. Portanto, pode-se verificar que após a calcinação é constituída apenas de SiO_2 .

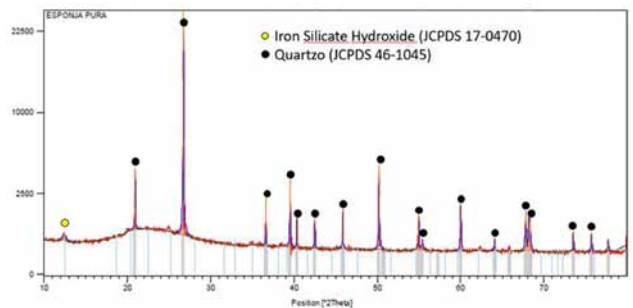


Fig. 2 – Difratograma de esponja de água doce pura.

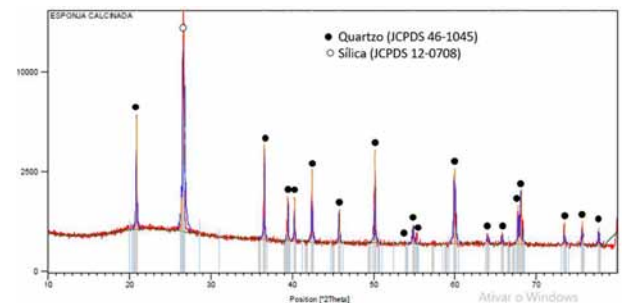


Fig. 3 – Difratograma de esponja de água doce calcinada a 550°C .

3.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de infravermelho da esponja de água doce pura antes e após a calcinação a amostras de 550°C são mostrados na **figura 4** e **figura 5**, respectivamente. Após o tratamento térmico, as bandas de 3670 cm^{-1} , relativas ao alongamento Al-OH , e 1630 cm^{-1} , associadas à ligação dupla $\text{C} = \text{O}$, não foram observadas. As bandas de 1060 cm^{-1} , 780 cm^{-1} e 690 cm^{-1} correspondem à ligação Si-O e foram detectadas antes e após o tratamento térmico. As bandas 1030 cm^{-1} e 915 cm^{-1} não foram visualizadas para as amostras sinterizadas [13,14,15,16]. Por outro lado, em 464 cm^{-1} , foi observada uma absorção da ligação Si-O tetragonal [17]. A presença de um grupo de feldspato hidratado após a calcinação e a predominância de ligações de

silício e oxigênio reforçam a proposição inicial para o uso desses materiais. Eles podem ser usados como andaimes porosos, ligando-se à hidroxiapatita enquanto melhoram a estrutura e a composição. Dessa forma, possibilita o processo de osteogênese e consequente melhor reabsorção e biomineralização do tecido ósseo.

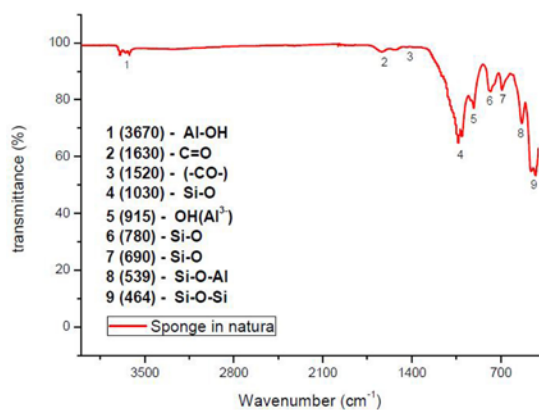


Fig. 4 – Espectro de FTIR de esponja de água doce pura.

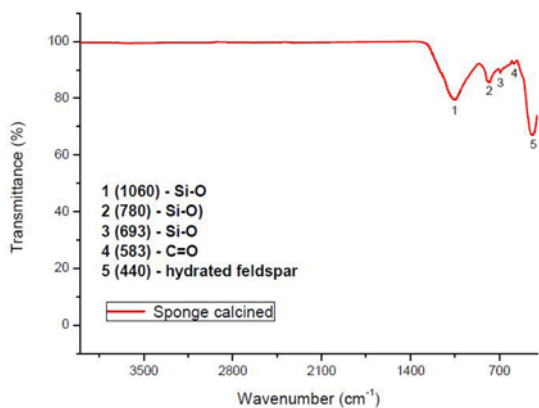


Fig. 5 – Espectro de FTIR de esponja de água doce calcinada a 550 °C.

3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (EDS)

A morfologia da esponja de água doce

apresentou-se de diferentes maneiras, de acordo com a região analisada. As estruturas variam da região externa para a interna. Na **figura 6**, a micrografia mostra uma visão geral de como se comporta externamente em sua forma natural, com uma ampliação de 150x. Foi possível observar a presença de espículas de sílica, que suportam a estrutura do animal e uma região de aglomerados.

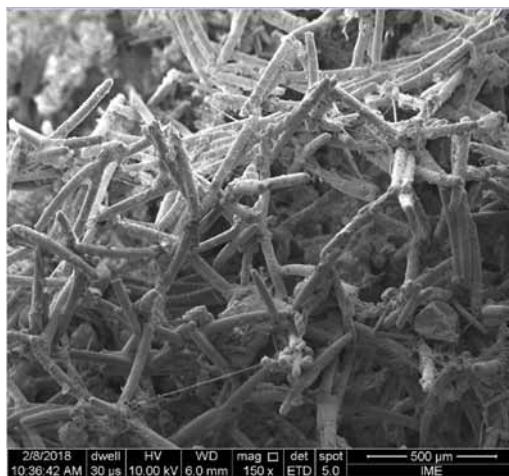


Fig. 6 – Morfologia da parte externa da esponja de água doce, espécie *Metania reticulata* com aumento de 150x.

A **figura 7** mostra a amplificação do lado de fora da esponja de água doce, com um aumento de 3000x. Observamos a presença de uma estrutura tubular porosa, além das duas estruturas mencionadas anteriormente, que são as espículas e uma região de aglomerados. É possível observar as espículas na forma de uma haste com pontas arredondadas e uma superfície áspera. Provavelmente, essa rugosidade deve estar relacionada à quantidade de material orgânico presente. Essas grades tubulares possuem uma estrutura que nos permite acreditar na possibilidade de usá-las como estrutura, vinculando-as a materiais bioativos, como as

apatitas, que quando aderidas a essa estrutura podem auxiliar no processo de regeneração óssea.

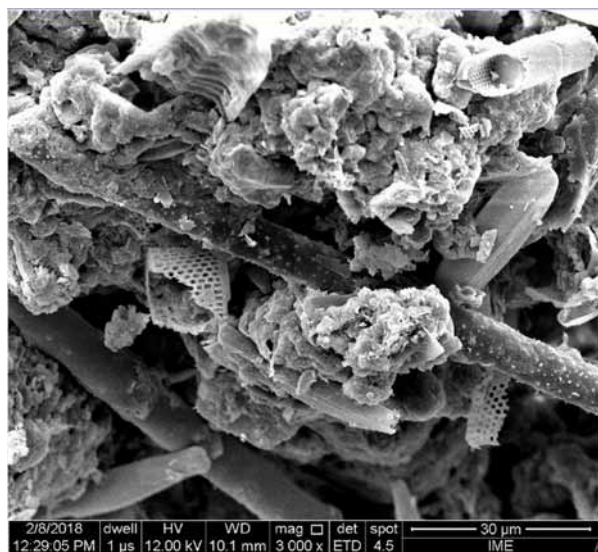


Fig. 7 – Morfologia da parte externa da esponja de água doce, espécie *Metania reticulata* com aumento de 3.000x.

A **figuras 8, 9, 10, 11 e 12** representam as micrografias e a identificação dos elementos químicos presentes nas amostras da esponja de água doce em seu estado natural. Foram encontradas várias morfologias que as caracterizam de acordo com seu filo correspondente. Na **figura 8**, temos uma imagem com uma ampliação de 50X. A análise de EDS realizada nesta área mostrou a presença de silício (Si), ferro (Fe) e bromo (Br), onde a platina (Pt) é devida ao revestimento. Os demais elementos já eram esperados de acordo com a literatura. O silício é o principal componente que, sua presença se torna evidente pela análise das bandas de absorção por espectroscopia no infravermelho e as fases presentes na difração de raios-x. Provavelmente, os outros elementos devem estar associados a uma grande quantidade de elementos orgânicos presentes nas

amostras, além de serem elementos com relato e presença nas águas do rio Tapajós e na bacia do Rio Negro, de onde foi extraído o material para este estudo. [18]

A **figura 9** mostra o EDS realizado apenas na região da coluna vertebral, nas hastes arredondadas, o que mostrou que eles têm basicamente silício nas amostras da esponja de água doce e podem ser chamados de espículas de sílica, de acordo com a literatura. Utilizou-se platina (Pt) para cobrir esta amostra.

A **figura 10** mostra o interior da esponja de água doce. É composto da gêmula e das espículas de sílica. Além do revestimento de platina (Pt), o EDS apresentou silício (Si), ferro (Fe) e bromo (Br). O bromo e o ferro são encontrados em uma intensidade mais alta que o silício, mas, de acordo com a análise de FT-IR e DRX, a quantidade desses elementos em relação ao silício em toda a amostra é tão pequena que eles não apresentam faixas ou fases união com outros elementos da amostra. Esses elementos já eram esperados devido à sua presença na região do Rio Negro, de onde foram removidos. De acordo com a literatura, outras amostras colhidas na mesma região possuem composições equivalentes às encontradas no gênero *Metania reticulata*.

A parte externa da esponja, além das espículas de sílica, possui uma estrutura semelhante a uma grade em forma de tubo. Essa estrutura tubular em forma de poro é representada na micrografia e na EDS da **figura 11**. A EDS mostra a presença de silício (Si), alumínio (Al) e ouro (Au), sendo o último do revestimento. A presença de alumínio é corroborada pelo FT-IR da amostra de esponja de água doce antes do tratamento térmico, com faixas de estiramento de Si-O-Al e deformação OH⁻ (AL³⁺). Após a calcinação, retiramos todo o material orgânico da amostra, apresentando ausência de

bandas contendo alumínio. A presença de alumínio também ocorre devido à região onde a amostra foi coletada.

A parte externa da esponja também possui uma região de aglomerados que são apresentados na **figura 12**. O EDS também apresentado na **figura 12** mostra a presença de silício (Si), alumínio (Al) e ouro (Au), sendo que o ouro é proveniente do revestimento. Segundo a literatura, o gênero *Metania fittkai* obtido no mesmo local apresenta ausência de alumínio e, em comparação com outros gêneros, essa ausência é explicada como um biomarcador para esta espécie [19]. Embora os dois gêneros sejam removidos do mesmo local, a presença de alumínio em *Metania reticulata* e a ausência em *Metania fittkai* podem atuar da mesma maneira que um biomarcador para as espécies, diferenciando-as.

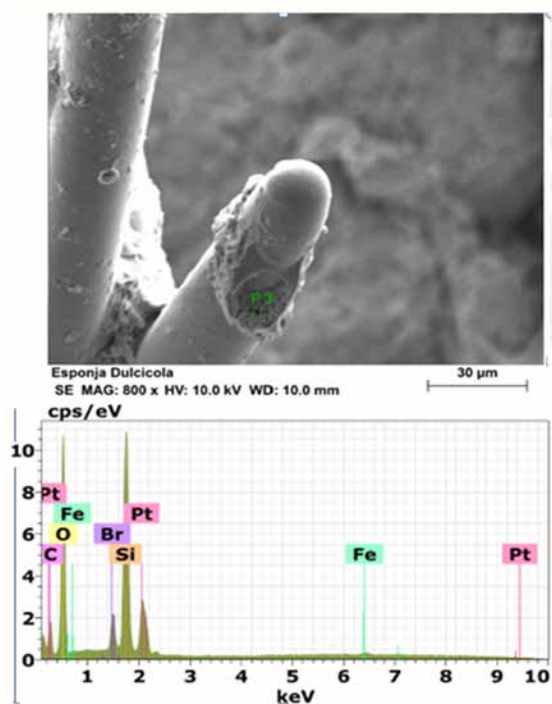


Fig. 8 – Identificação de elementos químicos por EDS de esponja pura com aumento de 50x.

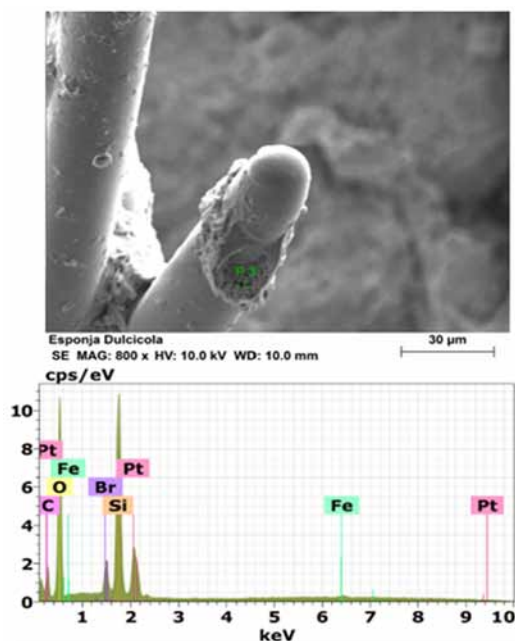


Fig. 9 – Identificação dos elementos químicos por EDS da esponja pura com aumento de 800x.

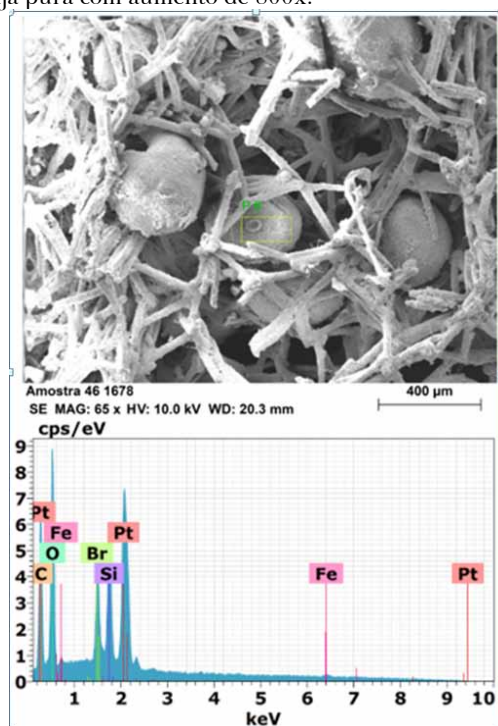


Fig. 10 - Identificação dos elementos químicos por EDS da esponja pura com aumento de 65x.

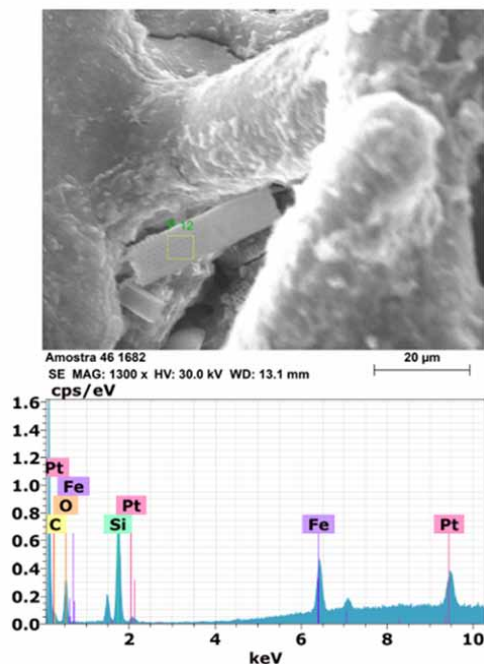


Fig. 11 - Identificação dos elementos químicos por EDS da esponja pura com aumento de 1500x.

4. Conclusões

O silício é mostrado como um elemento importante na composição da espécie *Metania reticulata*. A presença de bromo, ferro e expressiva quantidade de alumínio concorda com a literatura, apresentando a disponibilidade dos mesmos elementos em esponjas doces no Brasil e no exterior. A ausência de fases e bandas de bromo e ferro mostra que a quantidade desses elementos é baixa em relação ao silício na composição da *Metania reticulata*. A calcinação das amostras a 550°C por 1h removeu toda a matéria orgânica da esponja, permanecendo as ligações de silício e oxigênio em sua composição. Deste modo, a sílica obtida a partir de esponjas doces da espécie

Metania reticulata pode ser aplicável em usos biomédicos.

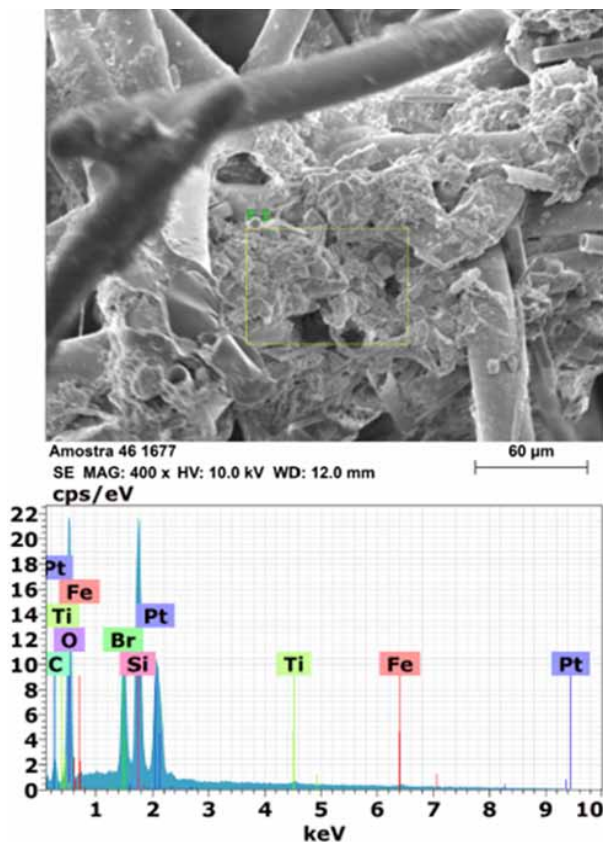


Fig. 12 - Identificação dos elementos químicos por EDS da esponja pura com aumento de 400x.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Dra. Cecília Volkmer Ribeiro pela identificação das espécies de esponjas e ao IME pelos recursos utilizados para a realização deste trabalho, bem como pelo financiamento do CNPq, CAPES e FAPERJ.

Referências Bibliográficas

- [1] Williams, D.F.; The Williams Dictionary of biomaterials. Liverpool University Press, 1999. p.42
- [2] Gorriz C., Ribeiro F., Guedes J.M., Fernandes P.R. A biomechanical approach for bone regeneration inside scaffolds, Proc. Eng. 110 (2015) 82–89.
- [3] Grant RE (1833), Lectures on comparative anatomy and animal physiology; on the classification of the animals. Lancet 1:153–159
- [4] Müller WEG (1995), Molecular phylogeny of Metazoa [Animals]: monophyletic origin. Naturwissenschaften 82:321–329
- [5] Wang XH, Müller WEG (2009a), Contribution of biomineralization during growth of polymetallic nodules and ferromanganese crusts from the Pacific Ocean. Frontiers Mater Sci China doi:10.1007/s11706-009-0033-0
- [6] Cortesini R. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation. Transpl Immunol 2005;15:81–89.
- [7] Dash M, Samal SK, Douglas TE, Schaubroeck D, Leeuwenburgh SC, Van Der Voort P, Declercq HA, Dubrue P. Enzymatically biomineralized chitosan scaffolds for tissue-engineering applications. J Tissue Eng Regen Med 2015; doi:10.1002/term.2048.
- [8] Chabaud S, Rousseau A, Marcoux TL, Bolduc S. Inexpensive production of near-native engineered stromas. J Tissue Eng Regen Med. 2015; doi:10.1002/term.2036.
- [9] Duan B., Wang M. Customized Ca–P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor, J. R. Soc. Interface (2010), rsif20100127.
- [10] Mota RCDAG, Da Silva E.O., De Lima F.F., De Menezes L.R., Thiele A.C.S. 3D printed scaffolds as a new perspective for bone tissue regeneration: literature review, Mater. Sci. Appl. 7 (2016) 430.
- [11] HIJON, N., CABANAS M.V., PENA, J., VALLET-REGI, M. Nanocrystalline bioactive apatite coatings. Acta Biomater, 2 (2006), p. 567.
- [12] BORUM, L.; WILSON Jr., O.C. Surface modification of hydroxyapatite. Part II. Silica. Biomaterials, vol. 24, 2003, p. 3681-3688.
- [13] Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. T.; Schmitt, K. D.; Chu, C. T. W.; Olson, D. H.; Sheppard, E. W.; McCullen, S. B.; Higgins, J. B.; Schlenker, J. L.; J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 10843.
- [14] Lechner CC, Becker CF. Silaffins in Silica Biomineralization and Biomimetic Silica Precipitation. Mar Drugs. 2015;13(8):5297-333.
- [15] Morales A.A., Sánchez F.P. Caracterización por espectroscopía en el infrarrojo de óxidos de silicio depositados em ambiente de N₂O. Superfícies y Vacío 16(2), 16-18, junio de 2003.
- [16] Ribeiro M. Produção e caracterização de multicamadas de dimensões nanométricas de filmes a base de silício. Tese de doutorado, Ed rev. São Paulo, 2009, p.139.
- [17] Rivera W., Torrer C.M., Pisso A.E. Estudio de silicio poroso por ftr. Revista colombiana de física, vol. 34, no. 1. 2002.
- [18] Seyler, P. T.; Boaventura, G. R. Distribution and partition of trace metals in the Amazon basin. Hydrological Processes 2003, 17, 1345.
- [19] De Barros, I. B.; Volkmer-Ribeiro, C.; Silva, C. C.; Veiga Junior, V. F.; Composição Elementar da Esponja Dulcícola Metania fittkauii Volkmer-Ribeiro; Rev. Virtual Quim., 2014, 6 (5), 1380-1390.