

3.13.01 - Engenharia Biomédica / Bioengenharia

Biomembranas baseadas em poli (hidroxibutirato) (PHB), alginato de sódio esterificado (ALG-e), poli (etilenoglicol) (PEG) e nanopartículas de prata (NPsAg) com potencial aplicação em biocurativos de pele

Mário R. P. da Silva^{1*}, George R. S. Andrade², Luís E. Almeida³

1. Laboratório de Biomateriais – Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão-SE/ Estudantes de pós-graduação.
2. Laboratório de Biomateriais – Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão-SE/ Professor-colaborador.
3. Departamento de Engenharia de Materiais - Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão-SE / Orientador

Resumo:

A associação de aditivos poliméricos ou nanopartículas metálicas à matriz de PHB vem se difundido na literatura como uma proposta de preparação de membranas com potenciais aplicações na área de engenharia biomédica, principalmente para confecção de biocurativos de pele. Neste trabalho foram sintetizados filmes baseados em PHB, (PEG) (utilizado como plastificante), ALG (para conferir maior hidrofiliabilidade ao material) e NPsAg (utilizadas como agente bactericida). Para a inserção do ALG à matriz do PHB, foi necessário realizar um procedimento de esterificação do ALG, o que resultou em uma esterificação parcial de $39,32 \pm 3,55$ %. As NPsAg foram caracterizadas pelas técnicas de UV-vis e MET, as quais revelaram, respectivamente, a presença de uma banda plasmônica centrada em 411 nm e nanopartículas aproximadamente esféricas com diâmetros em torno de 20 nm. Tais nanopartículas foram adsorvidas na matriz polimérica de PHB, ALG-e e PEG através da técnica de troca de fases. A adsorção das NPsAg foi qualitativamente avaliada pela técnica de UV-vis, o que demonstrou que a presença de ALG foi essencial para o ancoramento das partículas à matriz polimérica. Análises de MEV sugerem que as NPsAg não influenciam a estrutura morfológica superficial do PHB, enquanto a adição de ALG-e e PEG modifica a morfologia superficial. Foi realizado o teste de permeação a vapor de água, apresentando uma eficiência na transferência de vapores pelo filme com PHB.

Autorização legal: Este trabalho foi aprovado pelo comitê de pesquisa do DECEM/UFES.

Palavras-chave: Biopolímeros; bactericida; engenharia biomédica.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, FAPITEC.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFES.

Introdução:

O maior órgão do corpo humano é a pele, a qual tem a função de proteger o organismo de fatores externos. Por conta de sua exposição, este órgão está sujeita a diversos tipos de lesões como cortes, traumas, necroses e queimaduras. Neste aspecto, a engenharia tecidual tem direcionado estudos com a finalidade de desenvolver biocurativos baseados em biopolímeros que atendam demandas como substitutos parciais e permanentes da pele. Os curativos de pele tradicionais são, em grande parte, de origem sintética, o que pode liberar resíduos nocivos ao local de tratamento, além de exibirem limitações como a rejeição, risco de contaminação por agentes patogênicos, tanto no organismo, quanto no ambiente onde serão descartados, além de serem de difícil remoção, quando sua permanência se torna relativamente longa, podendo provocar a reabertura do ferimento (MONTASER *et al.*, 2016; TRINCA *et al.*, 2017).

Um candidato promissor para utilização como curativo de pele é o (PHB), um polímero biocompatível, de baixo custo e biodegradável. O PHB naturalmente possui caráter hidrofóbico, contudo, para sua utilização como biocurativo, é necessário modificar algumas de suas propriedades, como as propriedades mecânicas e de absorção de água. Um exemplo de plastificante utilizado para melhorar as propriedades mecânicas do PHB é o PEG, o qual pode conferir maior elasticidade na estrutura polimérica do PHB. Uma solução para o problema da baixa absorção de água é a adição de ALG na composição do material. Para aumentar a homogeneização com os demais componentes, faz-se necessário um procedimento de esterificação parcial do alginato (LOPES *et al.*; 2016). Outra característica desejável a um curativo para queimaduras é que este apresente propriedades bactericidas e fungicidas. Tais características podem ser obtidas pela inserção de NPsAg ao filme formado (MONTASER *et al.*, 2016).

O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar filmes com base em PHB em várias proporções, afim de desenvolver um biocurativo de pele humana, deste modo, foi acrescentando o PEG para utilização como plastificante, o ALG-e para adicionar propriedades hidrofílicas e sua composição hidrofóbica para facilitar na homogeneização com PHB e PEG. E as NPsAg foram utilizadas como agente bactericida.

Metodologia:**Materiais**

O PHB empregado foi fornecido pela PHB Industrial S/A (São Paulo, Brasil), clorofórmio (Panreac), Álcool n-Butanol (Neon), Alginato de sódio (Dinâmica), Poli (Etileno glicol) (Dinâmica), Hidreto de Sódio e Boro (Vetec), citrato de sódio (Sigma) e Nitrato de Prata (Sigma) foram utilizados como recebidos. Utilizou-se água destilada para a preparação das nanopartículas.

Produção de NPsAg pelo método do citrato e borohidreto

Em um experimento típico, misturou-se soluções aquosas de citrato de sódio (0,31 mM, 100 mL) e nitrato de prata (0,25 mM, 100 mL). Na sequência, foi adicionada uma solução de borohidreto de sódio (0,25 mM, 6 mL) e agitada lentamente durante 10 minutos por agitação magnética. Finalmente, a mistura foi aquecida gradualmente até ebulição em um banho de silicone líquido durante 90 minutos.

Esterificação do ALG com o n-Butanol

A esterificação do ALG foi realizada de acordo com o método proposto por BRODERICK *et al.*, (2006). Inicialmente foi realizada uma mistura de álcool n-butanol (185mL) com 5g de ALG (na proporção em massa de 30:1). A esta mistura, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura de 50°C, por 6 horas.

Produção de filmes de PHB/PEG/ALG-e com NPsAg

Para esta síntese, massas conhecidas de PHB, PEG e ALG-e (ver Tabela 1) foram adicionadas a 50mL de clorofórmio e deixadas a 80°C e agitação branda por 24 horas. Em seguida, foi utilizada uma metodologia proposta por TRBOJEVICH *et al.*, (2002) para a incorporação de NPsAg no gel polimérico, o qual é baseado no método de troca de fases. Para a preparação dos filmes, o gel polimérico com as nanopartículas foi vertido em uma placa de vidro, pela técnica de *casting*.

Tabela 1 – Detalhamento das percentagens em massa dos filmes de PHB.

	<i>PHB</i> ₁₀₀	<i>PHB</i> ₁₀₀ <i>Ag</i>	<i>PHB</i> ₉₈	<i>PHB</i> ₉₈ <i>Ag</i>	<i>PHB</i> ₉₂	<i>PHB</i> ₉₂ <i>Ag</i>	<i>PHB</i> ₉₀	<i>PHB</i> ₉₀ <i>Ag</i>	<i>PHB</i> ₈₈	<i>PHB</i> ₈₈ <i>Ag</i>
PHB	100%	100%	98,8%	98,8%	92,7%	92,7%	90%	90%	88,6%	88,6%
PEG					6,11%	6,11%	10%	10%	10,22%	10,22%
ALG-e			1,22%	1,22%	1,22%	1,22%			1,22%	1,22%
NPsAg		Com		Com		Com		Com		Com

Fonte – Autores.

Caracterização das amostras

A adsorção de NPsAg no gel polimérico foi avaliada através da Espectroscopia de Absorção na região do UV-vis, comparando-se a absorvância antes e após da troca de fases. A morfologia dos filmes produzidos foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para este estudo, as amostras foram metalizadas com ouro e caracterizadas em um Jeol, modelo JSM 6390LV/LGS. As nanopartículas de prata em suspensão foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) usando um JEOL 1400plus operado em uma voltagem de 120 kV. Finalmente, os filmes foram caracterizados pela técnica de permeação a vapor de água (PVA) utilizando o método gravimétrico estático baseado na norma internacional ASTM (E96/E96M-10; STANDARD, 2013).

Resultados e Discussão:**Esterificação do ALG**

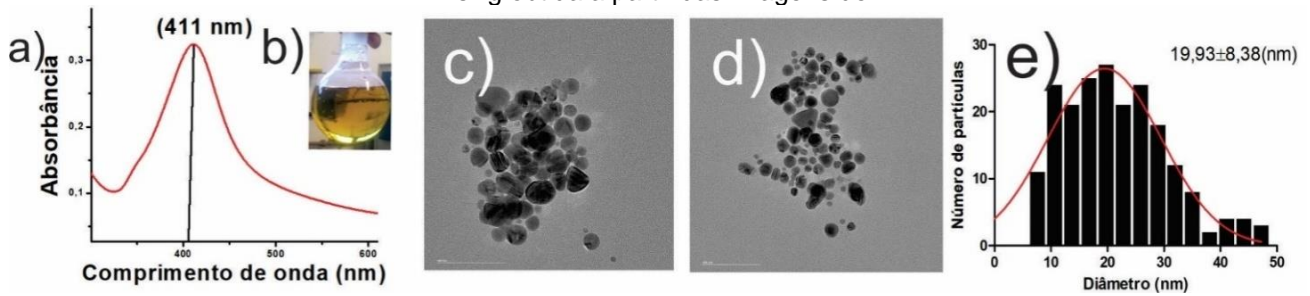
Neste trabalho, o ALG foi esterificado com a finalidade de promover uma maior homogeneidade com os demais componentes do compósito polimérico (PHB+PEG), além da inserção de íons de sódio, os quais facilitam a restauração do tecido epitelial. Após o procedimento descrito na metodologia, realizou-se uma titulação para determinar o grau de esterificação em porcentagem (GE%), o qual resultou em $39,32 \pm 3,55$, resultado compatível com o obtido em trabalhos prévios do grupo (LOPES *et al.*, 2016).

Caracterização das NPsAg

Durante a síntese das nanopartículas, a coloração da solução inicial (incolor) foi sistematicamente alterada para amarelo (Figura 1b), indicando a formação das nanopartículas. A caracterização desta amostra foi realizada por medidas na região do UV-vis e análises de microscopia eletrônica de transmissão. Os espectros de absorvância na região do UV-vis foram adquiridos no intervalo compreendido entre 300 e 600 nm (Fig. 1a). No espectro exposto na Figura 1a), nota-se a presença de uma banda centrada em 411 nm, que corresponde à banda de ressonância de plasmon das NPsAg. De acordo com a literatura, as nanopartículas obtidas são esféricas com diâmetros na ordem de 20 nm, já que para este tipo de partículas a banda de ressonância plasmônica ocorre entre 410 e 450 nm. Para melhor entendimento da morfologia, foram executados ensaios de MET e os resultados desta análise podem ser observados nas Figuras 1c) e 1d). Em tais imagens, pode-se observar a presença de partículas aproximadamente esférica em maior contraste. Assim, com base nas imagens de MET, um histograma da distribuição dos diâmetros das partículas foi construído, o qual evidenciou a presença de partículas com tamanhos médios na ordem de $19,93 \pm 8,38$ nm. Segundo a

literatura, as partículas com tais dimensões são favoráveis para aplicações bactericidas (JYOTI; *et al* 2015).

Figura 1 - a) Espectro de absorção de NPsAg dispersas na fase aquosa, b) fotografia da suspensão das NPsAg em meio aquoso, 1c) e 1d) Imagens de MET de NPsAg e 1e) Distribuição de tamanhos para as NPsAg obtida a partir das imagens de MET.



Fonte – Autores.

Adsorção de NPsAg no filme de PHB/PEG/ALG-e por espectroscopia de absorção na região do UV-vis

A porcentagem de NPsAg transferida para a fase polimérica (em clorofórmio) foi calculada através da diferença de absorbância após o método de troca fases. Pelos resultados apresentados na Tabela 2, nota-se que o gel com composição PHB_{100} (amostra que consiste somente em PHB) foi a que apresentou a menor porcentagem de transferência de nanopartículas em relação aos demais géis, com 35,8% de adsorção. As demais amostras apresentaram um grau maior de transferência, justificando o uso de PEG e ALG. A amostra com gel de $PHB_{98}Ag$ teve a melhor adsorção, com 60,4%.

Tabela 2 – Descrição dos valores do (PAG (PHB)%) para as amostras de $PHB_{100}Ag$, $PHB_{98}Ag$, $PHB_{92}Ag$, $PHB_{90}Ag$ e $PHB_{88}Ag$.

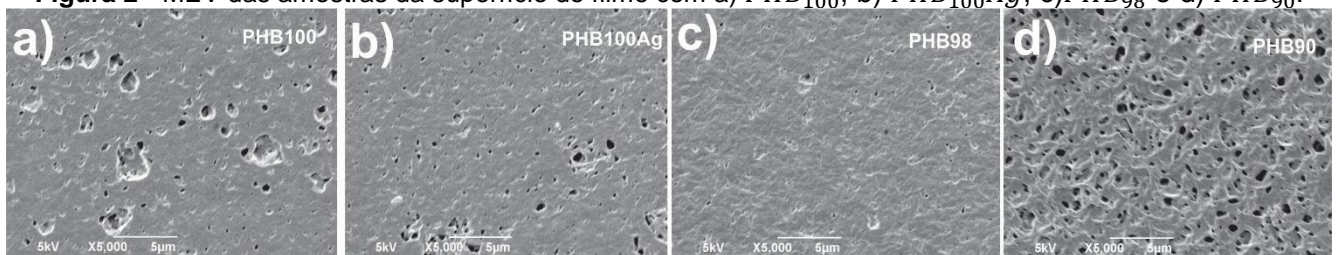
	$PHB_{88}Ag$	$PHB_{90}Ag$	$PHB_{92}Ag$	$PHB_{98}Ag$	$PHB_{100}Ag$
PAG (PHB)%	54,1%	45,86%	39,1%	60,4%	35,8%

Fonte – Autores.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

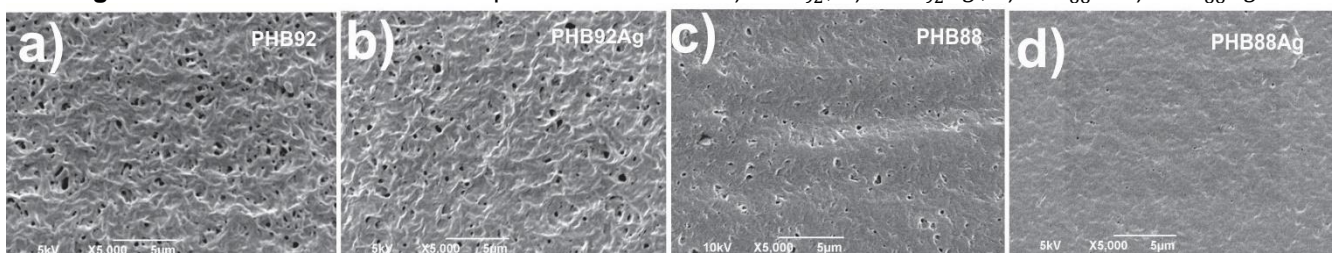
As micrografias de superfície relataram a morfologia das amostras dos filmes com PHB. A Figura 2a demonstra que o filme de PHB_{100} (PHB puro), apresenta alguns poros em sua superfície. Algo semelhante também é observado na amostra que possui NpsAg ($PHB_{100}Ag$, Figura 2b), e nas demais amostras com composição semelhante. Não foi possível observar diferenças significativas entre os filmes de PHB_{92} (Figura 3a) e $PHB_{92}Ag$ (Figura 3b), e entre PHB_{88} (Figura 3c) e $PHB_{88}Ag$ (Figura 3d), em relação as características superficiais das amostras. Com a adição de PEG (PHB_{90} , Figura 2c) e ALG-e (PHB_{98} , Figura 2d) nos filmes, foi possível observar por meio das micrografias algumas modificações na superfície das amostras, em comparação com o PHB_{100} e $PHB_{100}Ag$. As diferenças de topografia observadas nas amostras em estudo podem ter sido ocasionadas pela presença de defeitos ou limitações provenientes do processo de secagem do filme (*casting*) (LOPES; *et al* 2016).

Figura 2 - MEV das amostras da superfície do filme com a) PHB_{100} , b) $PHB_{100}Ag$, c) PHB_{98} e d) PHB_{90} .



Fonte – Autores.

Figura 3 - MEV das amostras da superfície do filme de a) PHB_{92} , b) $PHB_{92}Ag$, c) PHB_{88} e d) $PHB_{88}Ag$.

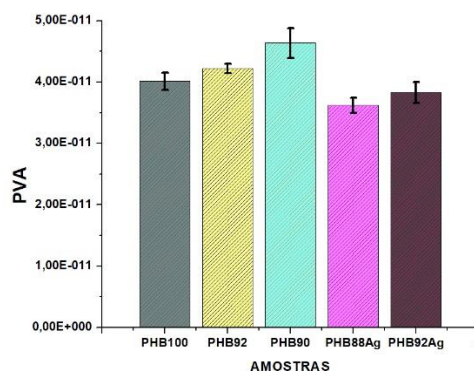


Fonte – Autores.

Permeação a vapor de água (PVA)

O resultado do valor da permeabilidade a vapor de água (PVA) dos filmes poliméricos $PHB_{92}Ag$, $PHB_{88}Ag$, PHB_{100} , PHB_{92} e PHB_{90} pode ser observado na Figura 4). Os resultados da triplicata foram submetidos ao teste estatístico *t-Student* com significância de 95%, podendo, assim, avaliar se há diferença significativa entre o valor médio das amostras. Na amostra PHB_{90} , houve um aumento significativo na permeação de vapores em relação as demais amostras, evidenciando uma permeação de vapores uniforme. A adição de NPsAg não influencia na permeação de vapores do experimento. A amostra $PHB_{88}Ag$ teve uma menor permeação de vapor de água, o que pode estar relacionado ao menor número de poros em sua superfície, como apresentado pela caracterização de MEV, ilustrado na Figura 3d (LOPES *et al* 2016).

Figura 4 – Gráfico de permeação à vapor de água de $PHB_{92}Ag$, $PHB_{88}Ag$, PHB_{100} , PHB_{92} e PHB_{90} .



Fonte – Autores.

Conclusões:

A esterificação parcial do ALG obteve uma porcentagem de 39,32 ±3,55%, adicionando propriedade hidrofílica ao composto polimérico. Pelo espectro UV-vis e MET, foi constatada uma banda centrada em 411 nm e NPsAg aproximadamente esféricas com o diâmetro na ordem de 19,93±8,38 nm, respectivamente. Géis de PHB/PEG/ALG-e em diferentes composições, foram homogeneizados com NPsAg por meio do método de troca de fases e caracterizados, sendo a amostra PHB_{98} a que demonstrou a maior adsorção de NPsAg. Análises de MEV sugerem que as NPsAg não influenciam a estrutura morfológica superficial do PHB, Análises de MEV sugerem que as NPsAg não influenciam a estrutura morfológica superficial do PHB, enquanto a adição de ALG-e e PEG modifica a morfologia superficial da amostra. Para os resultados com PVA a amostra com PHB_{90} , obteve uma maior eficiência pela influência do PEG em sua composição e as demais com resultados similares.

Por fim, o filme com composição de PHB/PEG/ALG-e/NPsAg, apresenta um potencial para curativo de pele, sendo também necessária outros tipos de caracterizações e aplicação em testes de bioatividade de *in vitro* e *in vivo*.

Referências bibliográficas

- A. L. NOGUEIRA, G. S. ZANELLA, S. G. SOUZA, A. L. SCHNEIDER, D. K. ABATTI, A. P. T. P. Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata para Aplicação no Desenvolvimento de Membranas de Poli(L-Ácido Láctico) com Propriedades Antibacterianas. **22º CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais 06 a 10 de Novembro de 2016, Natal, RN, Brasil**, p. 2679–2690, 2016.
- BRODERICK, E. et al. The characterisation of a novel , covalently modified , amphiphilic alginate derivative , which retains gelling and non-toxic properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 298, p. 154–161, 2006.
- ASTM E96/E96M–10; STANDARD. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials 1. p. 1–12, 2013.
- JYOTI, K.; BAUNTHIYAL, M.; SINGH, A. ScienceDirect Characterization of silver nanoparticles synthesized using Urtica dioica Linn . leaves and their synergistic effects with antibiotics. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 3, p. 217–227, 2015.
- MONTASER, A. S. et al. Preparation and characterization of alginate/silver/nicotinamide nanocomposites for treating diabetic wounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 739–747, 2016.
- RIBEIRO LOPES, J.; DOS REIS, R.; ALMEIDA, L. E. Production and characterization of films containing poly(hydroxybutyrate) (PHB) blended with esterified alginate (ALG-e) and poly(ethylene glycol) (PEG). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 44362, p. n/a--n/a, 2016.
- TRBOJEVICH, R. et al. Preparation and isolation of gold nanoparticles coated with a stabilizer and sol-gel compatible agent. p. 1973–1980, 2002.
- TRINCA, R. B. et al. Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound. **European Polymer Journal**, 2017.