DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE PLGA FUNCIONALIZADAS COM AGENTES ANTIMICROBIANOS NANOESTRUTURADOS

S. G. Souza*, M. L. Molin, A. L. Nogueira, A. L. Schneider, E. Duek, A. P. T. Pezzin.

Universidade da Região de Joinville – Rua João Basílio Correia, 1390. João Costa. CEP 89230-205 – Joinville-SC, Brasil * suelengdesouza@gmail.com

RESUMO

A periodontite é uma doença que afeta os tecidos de suporte dental, causando perda da inserção óssea. Um dos tratamentos possíveis é através da regeneração tecidual guiada (RTG). Atualmente, uma variedade de membranas reabsorvíveis está disponível como alternativa às membranas convencionais não reabsorvíveis para esta aplicação, como as membranas de poli(ácido-láctico-co-glicólico) (PLGA). Neste contexto, o presente trabalho objetivou produzir membranas que fossem biocompatíveis e funcionalizadas com agentes antibacterianos nanoestruturados e avaliar suas propriedades térmicas para futuramente aplicação em RTG. Para a produção das membranas foi utilizado o PLGA como matriz polimérica. As NpAg foram utilizadas nas concentrações: 5, 7, 8 e 10 ppm e as NpZnO foram: 10, 50, 100 e 150 ppm. Os materiais obtidos foram caracterizados por TGA e DSC.

Palavras-chave: PLGA, nanopartícula de prata, nanopartícula de óxido de zinco.

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença que afeta os tecidos de suporte dental, causando perda da inserção óssea. Ela se inicia a partir da gengivite, que quando não tratada, progride e a inflamação se torna mais grave [(1)(2)].

Um dos tratamentos possíveis para a periodontite é por meio da técnica de regeneração tecidual guiada (RTG), que consiste em inserir uma membrana biocompatível que faz uma oclusão, permitindo que se forme um coágulo sanguíneo que vai maturar e possibilitar a regeneração do periodonto. Usualmente o tratamento é composto de uma cirurgia para inserção da membrana não reabsorvível, outra

para a retirada da mesma e a prescrição de antibióticos para inibir processos infecciosos[3][2][4].

Atualmente, uma variedade de membranas reabsorvíveis está disponível como alternativa às membranas convencionais não reabsorvíveis. Essas membranas não necessitam de uma intervenção cirúrgica secundária para sua remoção e normalmente são de poliésteres como poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(caprolactona) (PCL) e seus copolímeros ou ainda derivadas de colágeno[2][4].

Para inibir processos infecciosos que podem ocorrer devido a intervenção cirúrgica, são prescritos antibióticos, porém as bactérias possuem potencial para desenvolver resistência contra os mesmos. Algumas nanopartículas são uma alternativa eficaz no combate às bactérias patogênicas. Dentre as nanopartículas com função bactericida podemos citar as nanopartículas de prata (NpAg) e nanopartículas de óxido de zinco (NpZnO)[5].

Neste contexto, o presente trabalho objetivou produzir membranas biopoliméricas que fossem biocompatíveis, funcionalizadas com agentes nanoestruturados e avaliar suas propriedades térmicas para futuramente aplicação em RTG.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram utilizadas nanopartículas de prata obtidas por meio da síntese do óxido de prata sintetizadas na Univille pela aluna Letícia Todeschini[6] e nanopartículas de óxido de zinco fornecidas pela empresa Cristal Master. Como solvente utilizou-se clorofórmio P.A.

O polímero utilizado foi o PLGA 80/20 (80 % ácido lático e 20 % ácido glicólico), sintetizado por Adriana Cristina Motta [7]. A massa molar numérica média do polímero (M_n) é igual a 50.910 g/mol, a massa molar ponderal média (M_w) é de 73.896 g/mol e índice de polidispersividade (Ip) igual a 1,45.

Nanocompósitos

O PLGA, foi inicialmente dissolvido em clorofórmio, sob agitação magnética por 24 h. Posteriormente foram adicionadas as nanopartículas de Ag nas concentrações

aproximadas de 1 ppm, 2,5 ppm, 4 ppm e 5 ppm formando soluções 3 % (m/v). A solução foi submetida à sonificação em banho de ultrassom por 30 min, em seguida foi vertida em placas de Petri com tampa. As amostras foram mantidas em capela de exaustão de gases, a temperatura ambiente, por 96 h para secagem lenta do solvente e formação dos filmes nanocompósitos. Após a evaporação do solvente, os filmes foram secos em estufa a vácuo a 30 ºC por 24 h e armazenados em dessecador[8].

As nanopartíiculas de óxido de zinco necessitaram passar por um processo de modificação de superfície antes da fabricação dos filmes, devido à sua incompatibilidade com a matriz polimérica. Para realizar essa modificação foi utilizado 1-dodecanotiol. Posteriormente o processo de preparação dos filmes seguiu o mesmo mencionado para os nanocompósitos de NpAg, divergindo apenas nas concentrações utilizadas (10%, 50%, 100% e 150%) devido a atividade bactericida do óxido de zinco ser menor quando comparado à prata.

Os nanocompósitos de NpAg e NpZnO foram produzidas com lotes diferentes de PLGA sendo o lote 1 utilizado para as membranas de prata e o lote 2 para as membranas de óxido de zinco.

As membranas foram submetidas às análises: Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

Modificação de superfície das NpZnO

Foram testadas algumas metodologias para a modificação de superfície das nanopartículas de óxido de zinco, que serão brevemente descritas a seguir.

Os experimentos E1, E2, E3 e E4, foram realizados com quantidades iguais de nanopartículas submetidas a secagem e partículas não submetidas a secagem para avaliar a influência desse fator na funcionalização. Todos os experimentos continham as nanopartículas de óxido de zinco, 1-dodecanotiol e álcool nas proporções: E1 DDT – ZnO não seco, 0,3057 g de nanopartícula, 1,0 mL de 1-dodecanotiol e 50 mL de álcool; E2 – ZnO seco, 0,200 g de nanopartícula, 0,2104 mL de 1-dodecanotiol e 15 mL de álcool; E3 – ZnO não seco, utilizou as mesmas concentrações do E2; E4 – ZnO seco, utilizou as mesmas concentrações do E1.

Todos os componentes foram misturados e mantidos sob agitação magnética durante 24 h, posteriormente foram centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos,

lavados com álcool várias vezes e então as nanopartículas funcionalizadas foram filtradas e secas em estufa durante 1 h a 80 °C[9].

Para a amostra E5 DDT foi utilizado 20 mg de nanopartículas de ZnO que foram adicionados a 50 mL de 1-dodecanotiol (DDT) e mantidas durante 24 h. Os produtos resultantes foram, em seguida, isolados por centrifugação e lavados três vezes com clorofórmio para remover o excesso de ligantes livres[10].

Já para a amostra E6 DDT as nanopartículas foram suspensas em 95% de etanol/5% de H_2O, durante 3 minutos, posteriormente sonificadas e foi adicionado 1-dodecanotiol (DDT), foi adicionada para a mistura o que equivale a uma mistura 1: 2,5 w/w ZnO/relação de tiol, e sonificada durante mais 5 min num banho de água. A mistura foi então agitada durante 1 h. o produto foi recolhido por filtração, lavado extensivamente com 100% de etanol, secou-se a 110° C durante 10 min, e, em seguida, armazenada à temperatura ambiente num dessecador[11].

As amostras foram analisadas por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

Apenas as amostras de NpZnO modificadas foram analisadas por FTIR. A figura 1 apresenta os espectros de FTIR para as amostras de óxido de zinco modificadas.

O FTIR da amostra E5 foi a que apresentou as maiores intensidades de pico em torno de 2850 e 2920, que são picos comuns ao dodecanothiol[12].

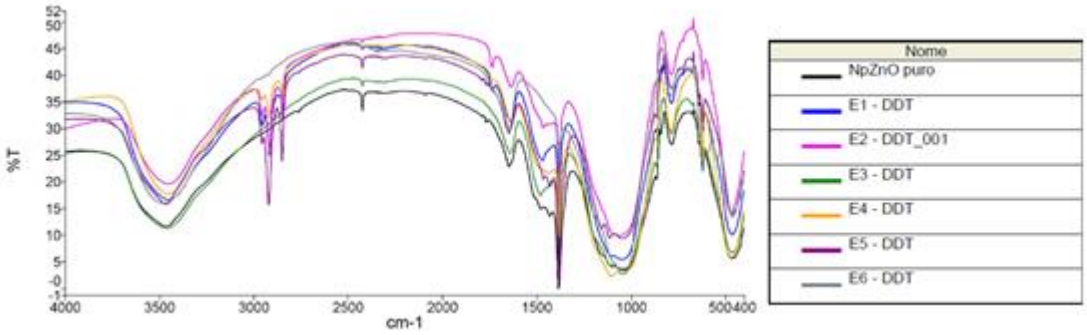

Figura 1. Gráfico do espectro de FTIR das amostras de nanopartículas de óxido de zinco modificadas.

Análise termogravimétrica (TGA)

A figura 2 apresenta as curvas de TGA do PLGA puro e dos nanocompósitos usando a nanoparticula de prata, e a tabela 1 relaciona os dados determinados a partir destas curvas.

Alguns materiais apresentaram dois estágios de degradação. Sendo o primeiro estágio relacionado a presença de umidade ou traços de solvente da amostra. O último estágio, e mais importante, está relacionado a perda de massa dos materiais.

O PLGA puro apresentou 1 estágio principal de degradação, atribuído ao polímero, com T_{onset} igual a 241,24 °C, temperatura onde a degradação é máxima ($T_{máx}$) 264,89 e 91,7 % de perda de massa. Estes valores estão inferiores aos encontrados na literatura (303,55 °C do PLGA)[13]. Este comportamento pode ser explicado pela diferença nas características do material, como por exemplo, a sua massa molar. A estabilidade térmica de materiais poliméricos pode variar em função da sua massa molar[14].

O Perfil de degradação do nanocompósito PLGA/NpAg 5 ppm apresentou 1 estágio principal de degradação com T_{onset} igual a 233,17 °C e $T_{máx}$ 252,67 °C, demonstrando que a estabilidade térmica do material diminuiu em relação ao PLGA puro.

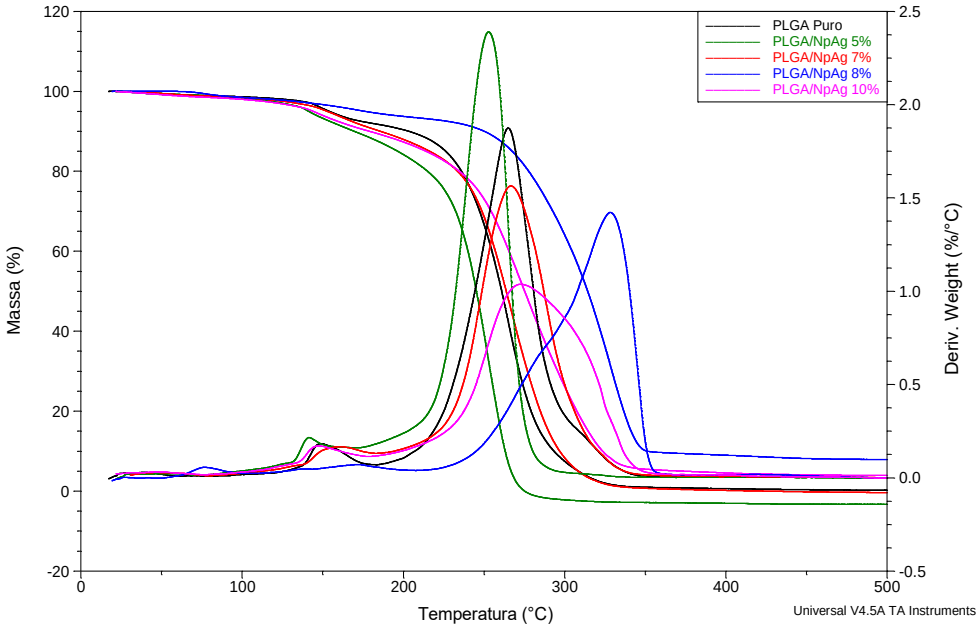

Figura 2. Curvas de TGA e DTG (termogravimetria derivada) do PLGA puro, e dos nanocompósitos usando NpAg.

Tabela 1. Dados da análise de TGA do PLGA puro e dos nanocompósitos usando NpZnO.

AMOSTRAS	$T_{onset\ 1}$ (°C)	$T_{máx\ 1}$ (°C)	Perda de Massa 1 (%)	$T_{onset\ 2}$ (°C)	$T_{máx\ 2}$ (°C)	Perda de Massa 2 (%)
PLGA	138,89	148,00	8,16	241,24	264,89	91,07
PLGA/NpAg 5 ppm	130,91	140,94	10,60	233,17	252,67	92,38
PLGA/NpAg 7 ppm	142,48	157,25	9,99	243,15	266,58	89,94
PLGA/NpAg 8 ppm	157,89	170,82	6,50	287,04	328,22	84,88
PLGA/NpAg 10 ppm	139,77	146,47	9,86	244,04	273,29	85,02

A termogravimetria do material PLGA/NpAg 7 ppm demonstra que o material possui 1 estágio principal de degradação com T_{onset} igual a 243,15 °C e $T_{máx}$ igual a 266,58 °C, portanto a estabilidade térmica aumentou em relação ao PLGA puro. O mesmo ocorre ao verificar os materiais PLGA/NpAg 8 ppm e PLGA/NpAg 10 ppm. O nanocompósito PLGA/NpAg 8 ppm se destaca dos demais, devido à sua $T_{máx}$ (328,22 °C), uma diferença de 63,33 °C em relação ao PLGA puro.

Analisando-se as curvas e os demais dados obtidos com a termogravimetria dos nanocompósito, pode-se afirmar que a estabilidade térmica do PLGA aumenta a partir da adição de 7 ppm de nanopartícula de prata.

A figura 3 apresenta as curvas de TGA do PLGA puro e dos nanocompósitos usando a nanoparticula de óxido de zinco, e a tabela 2 relaciona os dados determinados a partir destas curvas.

A termogravimetria mostrou que praticamente todos os materiais apresentaram um estágio de perda de massa na faixa de 70 a 80 °C referente a existência de água e/ou solvente incorporado ao material.

O perfil de degradação térmica do PLGA mostra a ocorrência de 1 evento térmico principal, atribuído ao polímero, com T_{onset} em 324,7 °C, temperatura onde a degradação é máxima ($T_{máx}$) em 348,7,5 °C e 87,5 % de perda de massa. Essa diferença do perfil da curva do PLGA analisado anteriormente, pode ser atribuir à síntese do material ou à degradação do mesmo, pois os materiais foram fabricados em datas diferentes com lotes de PLGA diferentes.

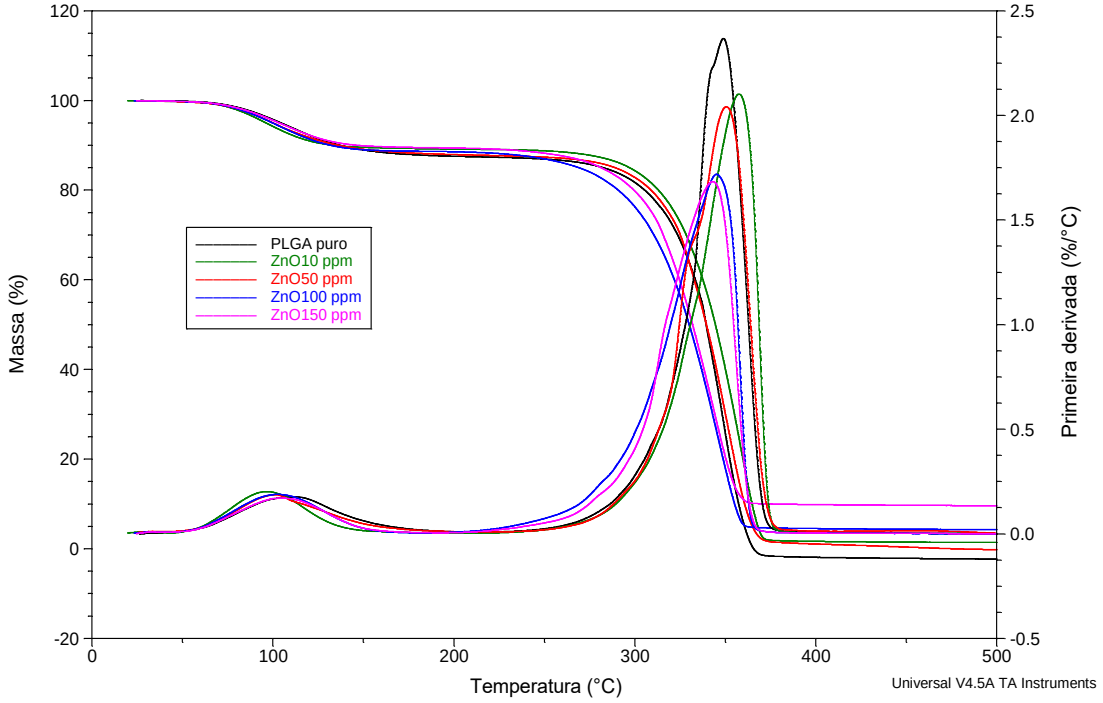

Figura 3. Curvas de TGA e DTG (termogravimetria derivada) do PLGA puro, e dos nanocompósitos usando NpZnO.

O nanocompósito PLGA/ZnO 10 ppm apresentou T_{onset} igual a 326,5 °C e $T_{máx}$ igual a 357,5, portanto a estabilidade térmica aumentou em relação ao PLGA puro. Já os outros nanocompósitos apresentaram menor T_{onset} e menor $T_{máx}$ quando comparados ao PLGA puro. Podendo-se afirmar que a partir da adição de 50 ppm de nanopartícula de ZnO o nanocompósito diminui sua estabilidade térmica.

Tabela 2. Dados da análise de TGA do PLGA puro e dos nanocompósitos usando NpZnO.

AMOSTRAS	$T_{onset\ 1}$ (°C)	$T_{máx\ 1}$ (°C)	Perda de Massa 1 (%)	$T_{onset\ 2}$ (°C)	$T_{máx2}$ (°C)	Perda de Massa 2 (%)
PLGA	78,5	111,9	12,5	324,7	348,7	87,5
PLGA/ZnO 10 ppm	73,9	95,7	10,8	326,5	357,5	89,2
PLGA/ZnO 50 ppm	78,0	100,9	12,0	319,9	350,5	88,0
PLGA/ZnO 100 ppm	76,6	102,4	11,3	308,4	344,8	88,7
PLGA/ZnO 150 ppm	77,4	104,5	10,5	309,4	343,0	89,5

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A figura 4 apresenta as curvas de DSC do PLGA puro e dos nanocompósitos usando a nanopartícula de prata e a tabela 3 relaciona os dados determinados a partir destas curvas.

Para o PLGA observou-se uma T_g de 47,9 °C, T_m de 144,3 °C e a ΔH_m encontrada foi de 21,51 J/g, o que corresponde a 22,94 % de cristalinidade, indicando que o polímero é semicristalino, o que está de acordo com a literatura que descreve que copolímeros de PLGA apresentarão certa cristalinidade quando um de seus monômeros estiver em concentração maior que 70 % em mol[15].

Tabela 3- Dados de temperatura de transição (T_g), entalpia de fusão (ΔH_m) e temperatura de fusão (T_m) obtidos das curvas DSC para as membranas de PLGA e membranas de PLGA funcionalizadas com NpAg.

Membranas	T_g (°C)	ΔH_m (J/g)	T_m (º C)
PLGA	47,9	21,51	144,3
PLGA/NpAg 5 ppm	54,8	18,21	139,2
PLGA/NpAg 7 ppm	62,3	15,23	141,3
PLGA/NpAg 8 ppm	27,8	5,99	145,9
PLGA/NpAg 10 ppm	59,4	21,41	140,7

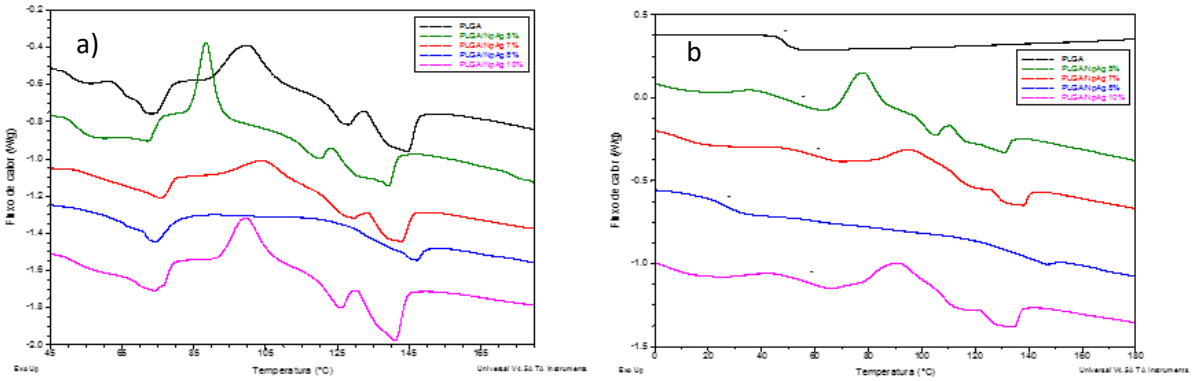

Figura 4. Curvas de DSC para as membranas de PLGA funcionalizadas com NpAg: a) 1º aquecimento; b) 2º aquecimento.

Para o nanocompósito PLGA/NpAg 8 ppm, observou-se uma T_g de 27,8 °C, T_m de 145,9 °C e ΔH_m encontrado foi de 5,99 J/g o que corresponde a 6,4 % de

cristalinidade. Em relação ao PLGA puro, houve uma diminuição da T_g e do grau de cristalinidade, por outro lado, houve um aumento da T_m.

Foi observado comportamento oposto para os demais materiais em relação a T_g e a T_m. O acréscimo de 5, 7 e 10 ppm aumentou a T_g do material em relação ao PLGA puro, enquanto que a T_m diminuiu. Já a entalpia de fusão e consequentemente o grau de cristalinidade, diminuiu em todos os nanocompósitos quando comparados ao PLGA puro. Esta diminuição no grau de cristalinidade poderá acarretar uma diminuição do tempo de degradação desses materiais em relação ao PLGA puro. Júnior (2013)[16] também observou uma diminuição da T_m e da ΔH_m em relação ao polímero puro ao produzir matrizes de nanofibras por eletrofiação de soluções poliméricas de poli(vinil)pirrolidona (PVP) e óxido de zinco (ZnO).

A figura 5 apresenta as curvas de DSC do PLGA puro e dos nanocompósitos usando a nanopartícula de óxido de zinco e a tabela 4 relaciona os dados determinados a partir destas curvas.

Pode-se observar pelas curvas de DSC que os materiais apresentaram comportamento amorfo, não apresentando T_m nem entalpia de fusão. Esse comportamento pode ter relação com a síntese do material.

Referente a funcionalização do PLGA com as nanopartículas de óxido de zinco, observou-se que a incorporação da nanopartícula aumentou a T_g dos materiais em relação ao PLGA puro, porém não houve uma tendência relacionada às concentrações.

Tabela 5- Dados de temperatura de transição (T_g), entalpia de fusão (ΔH_m) e temperatura de fusão (T_m) obtidos das curvas DSC para as membranas de PLGA e membranas de PLGA funcionalizadas com NpZnO.

Membranas	T_g (°C)	ΔH_m (J/g)	T_m (º C)
PLGA	47,94	---	---
PLGA/ZnO 10 ppm	52,05	---	---
PLGA/ZnO 50 ppm	49,83	----	---
PLGA/ZnO 100 ppm	52,98	----	---
PLGA/ZnO 150 ppm	53,20	---	----

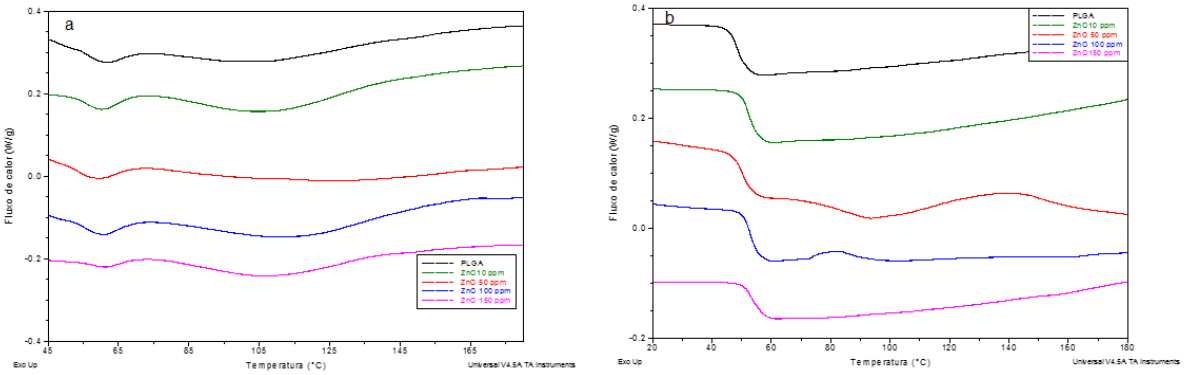

Figura 5. Curvas de DSC para as membranas de PLGA funcionalizadas com NpZnO: a) 1º aquecimento; b) 2º aquecimento.

CONCLUSÃO

As análises de TGA mostraram que a incorporação de nanopartículas de prata melhoram a estabilidade térmica do PLGA puro a partir da incorporação de 7 ppm e que a funcionalização com 8 ppm apresenta a melhor estabilidade térmica das amostras. Já para os materiais com a incorporação de nanopartículas de óxido de zinco, houve uma diminuição da estabilidade térmica a partir da incorporação de 50 ppm e a funcionalização com 10 ppm apresentou a melhor estabilidade térmica das amostras.

As análises de DSC demonstraram que a incorporação de nanopartículas, tanto de prata como de óxido de zinco, provocam mudanças na morfologia do polímero. De uma maneira geral, a funcionalização com as nanopartículas aumentou a T_g dos materiais em relação ao polímero puro.

REFERÊNCIAS

1. BRAGA, F.S.F.F.; MIRANDA, L.A.; MICELI, V.C.; ÁREAS, A.; FIGUEREDO, C.M.S. FISCHER, R.G.; MARQUES, A.F.G.S.; CAMPOS, L.L. SZTAJNBOK, F. R. Artrite Crônica e Periodontite. **Rev Bras Reumatol**, v.47, 276-280, 2007.
2. BOTTINO, M. C.; THOMAS, V.; JANOWSKI, G. M. A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 7, 216–224, 2011.
3. DELIBERADOR, T.M.; NAGATA, M.J.H.; FURLANETO, F.A.C.; MESSORA, M. R.; SANTOS, F.R. Regeneração Tecidual Guiada no Tratamento dos Defeitos de Furca classe II. **RSBO,** v.5, 57– 65, 2008.
4. LIAO, S.; WANG, W.; UO, M.; OHKAWA, S.; AKASAKA, T.; TAMURA, K.; CUI, F.; WATARI, F. A Three-layered Nano-carbonated

Hydroxyapatite/collagen/PLGA Composite Membrane for Guided Tissue **Regeneration Biomaterials**, v.26, 7564–7571, 2005.

5. CHAKRABORTI, S.; MANDAL, A.K.; SARWAR, S.; SINGH, P.; CHAKRABORTY, R.; CHAKRABARTI, P. Bactericidal Effect of Polyethyleneimine Capped ZnO Nanoparticles Onmultiple Antibiotic Resistant Bacteria Harboring Genes Ofhigh-Pathogenicity Island. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v.121, 44–53, 2014.
6. TODESCHINI, L.C. **Síntese de Nanopartículas de Prata para o Desenvolvimento de Membranas Biocompósitas de Poli(L–Ácido Láctico) com Propriedades Antibacterianas para Aplicação em Tratamentos por Regeneração Tecidual Guiada.** 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) – Universidade da Região de Joinville, Joinville.
7. MOTTA, A.C. **Síntese e Caracterização do poli(L-ácido láctico)-PLLA e Poli(Lácido lácticoco-ácido glicólico) – PLGA e degradação "in vitro"**. 2002. Dissertação de Mestrado (Engenharia Mecânica) - UNICAMP, Campinas.
8. MAZUR, L.P. **Preparação e caracterização de nanocompósitos de poli(L-ácido láctico) e diferentes argilas organofílicas.** 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville, Joinville.
9. ZHANG, S.; MAJEWSKI, P.W.; KESKAR, G.; PFEFFERLE, L.D.; OSUJI, C.O. Lyotropic Self-Assembly of High-Aspect-Ratio Semiconductor Nanowires of Single-Crystal ZnO. **Langmuir**, v.27, 11616–11621, 2011.
10. WAGNER, T. W.; LUO, Y.; REDEKER, N. D.; IMMOOS, C. E.; ZHANG, S. Effect of surface-modified zinc oxide nanowires on solution crystallization kinetics of poly(3-hexylthiophene). **Polymer**, v. 55, 2008 – 2013, 2014.
11. SINGH, J.; IM, J.; WHITTEN, J. E. Encapsulation of Zinc Oxide Nanorods and Nanoparticles. **Langmuir,** V. 25, 9947–9953, 2009.
12. CLARO, S. F. **Estudo de Complexos de Ni (II) com os Ligantes Dodecanotiol e Ácido Hexanóico.** 2005. Dissertação (Mestrado em Química) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
13. DIAS, D. J. S.; **Síntese, caracterização físico-química, morfologica e avaliação de viabilidade de células tumorais de mama (mcf-7) submetidas à nanoesferas de PLGA contendo clorambucil**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília.
14. LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros. E-papers. Rio de Janeiro. 2001.
15. MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, 2335-2346, 2000.
16. JUNIOR, F.A.G.S. **Preparação e Caracterização de Compósitos Polímeros/ Semicondutor Inorgânico a Partir da Técnica de Eletrofiação.** Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, São Paulo, 2013.

DEVELOPMENT OF MEMBRANES OF PLGA FUNCTIONALIZED WITH ANTIMICROBIAL AGENTS NANOSTRUCTURED

ABSTRACT

Periodontitis is a disease affecting the tooth supporting tissues, causing loss of bone attachment. One of the possible treatments is through guided tissue regeneration (GTR). Currently, a variety of resorbable membranes are available as alternative to conventional non-resorbable membranes for this application, as the membranes of poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA). In this context, this study aimed to produce membranes were biocompatible and nanostructured functionalized with antibacterial agents and evaluate its thermal properties for future application in RTG. For the production of membranes were used as the PLGA polymer matrix. The NpAg were used at concentrations of 5, 7, 8 and 10 ppm and NpZnO were: 10, 50, 100 and 150 ppm. The materials were characterized by TGA and DSC.

Key-words: PLGA, silver nanoparticles, zinc oxide nanoparticles.