

EFEITO ANTIMICROBIANO DE MANTAS DE NANOFIBRAS POLI ÁCIDO LÁCTICO COM DIÓXIDO DE TITÂNIO INCORPORADOS

T. C. O. Marsi¹, T. V. Toniato¹, J. R. Oliveira², L. D. Oliveira², F. R. Marciano¹, A. O.Lobo¹

¹Laboratório de Nanotecnologia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, Brasil

²Unesp Campus de São José dos Campos, Laboratório de Microbiologia e Imunologia, São José dos Campos, Brasil

e-mail: aolobo@pq.cnpq.br.

Resumo: Mantas de nanofibras de poli (ácido-láctico) (PLA) com nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) incorporadas, produzidas por eletrospinning, podem ser utilizadas na produção de *scaffolds* mesoporosos visando aplicação biomédica. Entre as características desejáveis de nanobiomateriais destaca-se a topografia tridimensional da superfície e o efeito antimicrobiano dos mesmos. Demonstrou-se o efeito antimicrobiano de amostras de nanofibras de PLA/TiO₂ em cultura de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: Nanopartículas, Poli (ácido láctico), dióxido de titânio, eletrospinning, nanofibras, efeito bactericida.

Abstract: Poly (lactic acid) (PLA) nanofibers mats with incorporated titanium (TiO₂) nanoparticles produced by electrospinning dioxide can be used to produce mesoporous scaffolds targeting biomedical applications. Among the desirable characteristics of nanobiomaterials can highlight the three-dimensional topography of the surface and the antimicrobial effect there of. We showed the antimicrobial effect of samples of nanofibers PLA/TiO₂ in culture of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: Nanoparticles, poly (lactic acid), titanium dioxide, electrospinning, nanofibers, bactericidal activity.

Introdução

Nos últimos anos tem aumentado a ocorrência de pacientes hospitalizados colonizados e/ou infectados por microrganismos multirresistentes [1]. *Pseudomonas aeruginosa* (bastonetes gram-negativos) é um patógeno comum em pacientes críticos, cujas cepas são isoladas das colonizações e infecções epidêmicas/endêmicas nas Unidades de Terapia Intensiva - UTIs. *Staphylococcus aureus* (coco gram-positivo) é outra espécie de interesse médico, encontrada em ambiente nosocomial, garganta, intestinos e pele, relacionada a diversas infecções em seres humanos [2]. A colonização nasal é assintomática, o que permite ampla disseminação; quando barreiras naturais estão comprometidas por trauma ou cirurgia, pode se alojar no tecido e provocar lesões [3].

A ciência tem evidenciado propagação de bactérias multirresistentes por biofilmes viscosos que se formam em implantes médicos (usados quando a estrutura de tecidos/órgãos não é reparada pelo próprio organismo). Neste caso, o uso de implantes de biomateriais torna-se alternativa viável, que permite restabelecer as funções normais do paciente [4]. Dentre os materiais utilizados como implantes, os polímeros apresentam grande potencial de aplicação, pela facilidade de produção, manuseio e características mecânicas semelhantes aos tecidos biológicos [5]. Polímeros biorreabsorvíveis como PLA, têm recebido destaque na Engenharia de Tecidos pela aplicação na produção de *scaffolds* ou como suporte para cultura de células [6]. Tais materiais apresentam degradação pela redução de tamanho em meio biológico, reabsorção *in vivo* e eliminação por rotas metabólicas do organismo, levando a eliminação total do material/subprodutos, sem efeitos colaterais [7].

Scaffolds de nanofibras têm sido pesquisados como nanobiomateriais pela semelhança às estruturas fibrosas da matriz extracelular (MEC). Nanofibras podem ser produzidas por fiação eletrostática, possível pela utilização de polímeros naturais ou sintéticos como PLA [8]. Diversas técnicas podem ser utilizadas para produção de mantas poliméricas, como eletrospinning, processo que possibilita agregar partículas nanométricas aos polímeros com melhora de propriedades mecânicas e aumento da taxa de biodegradabilidade [9]. Para produção de nanofibras por eletrospinning e aplicação como nanocompósitos o uso de nanopartículas de TiO₂ tem a finalidade de associar propriedades mecânicas do biomaterial a aceleração do processo de proliferação celular e ação bactericida do TiO₂ (semicondutor usado em processos de auto limpeza, desinfecção de superfícies, do ar e água). O objetivo deste estudo é a aplicação de amostras de nanofibras de PLA/TiO₂ (*scaffolds* mesoporosos) em meio de cultura bacteriano (*S. aureus* e *P. aeruginosa*) visando identificar o potencial antimicrobiano do TiO₂ e sua possível aplicação no recobrimento de *scaffolds* ou outros tipos de implantes utilizados na Engenharia de Tecidos.

Materiais e métodos

As amostras de mantas de nanofibras híbridas de PLA/TiO₂ utilizadas neste estudo foram produzidas no Laboratório de Nanotecnologia Biomédica (NanoBio) da UNIVAP em São José dos Campos/SP. Foi utilizada técnica de eletrofiação que permite obter distribuição homogênea das nanopartículas no interior/exterior e controle da fotoatividade pela degradação do polímero em meio biológico, efeito este essencial para o controle eficiente do processo infeccioso durante todo o período de biorreabsorção e crescimento tecidual.

Produção das mantas de PLA/TiO₂ por eletrofiação

Para produção das mantas de nanofibras poliméricas foi utilizado PLA 2003D da *Nature Works*®, solventes: clorofórmio, N,N-dimetilformamida (DMF), ácido acético (99,7%) da *Synth*®, nanopartículas de TiO₂ da *Degussa*® TiO₂ P25 (80% anatase). Foi usada a concentração de 0,09 g/mL de PLA. Foram preparadas soluções com concentrações de 1%, 3% e 5% de nanopartículas de TiO₂. O PLA foi misturado ao clorofórmio, em sistema fechado, submetido à constante agitação por agitador magnético e barra magnética, até total dissolução dos grânulos (150 minutos). Utilizou-se 2,25 g de PLA respeitando a concentração de 0,09 g/mL (m/v) e 15 mL de clorofórmio. A parte, o TiO₂ anatase no DMF foi dispersado no probe de ultrassom (90 minutos). Utilizou-se 1, 3 e 5% (m/v) de TiO₂. Após a dispersão a solução de PLA foi misturada a de TiO₂, a solução final foi mantida fechada sob agitação por 20 horas, para homogeneização. O ajuste do parâmetro de tensão aplicada e distância de trabalho (distância capilar/seringa) é fundamental, por interferir na morfologia e diâmetro das nanofibras produzidas. Os parâmetros de eletrofiação foram: agulha de 0,8 mm, 12 kV de tensão, 10 cm de distância de trabalho e 25 minutos de tempo de coleta. A eletrofiação foi realizada em capela de exaustão à temperatura de 21°C e umidade de 45%.

Caracterização das Nanofibras de PLA/TiO₂

As nanopartículas de TiO₂ foram caracterizadas por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX). As amostras de nanofibras de PLA/TiO₂ foram caracterizadas morfológicamente por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com aumento de 5000 vezes. Foi depositada fina camada de ouro (~10 nm) sobre as nanofibras de PLA/TiO₂ por evaporadora (*Sputtering*). Foi utilizado o software *Image J* para processamento e análise de imagens, o que permitiu determinar o diâmetro médio das nanofibras formadas.

Ensaio Biológicos com Bactérias

Ensaio biológicos foram realizados com objetivo de identificar a ação antibacteriana das nanopartículas de TiO₂ presentes em amostras de PLA/TiO₂. Os grupos de

estudo foram: PLA puro, PLA/TiO₂ a 1%, 3%, 5%, meio BHI (*Brain Heart Infusion, Merck*) e bactéria (controle) e meio BHI puro (branco). Utilizou-se amostras das mantas com 5mmx5mm, tamanho adequado para acomodá-las nos poços da placa de 96 poços. Para cultura microbiana foram utilizadas cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* em suspensões padronizadas em solução salina com 5x10⁵ cel/mL. As placas de 96 poços foram preenchidas com 100µL de meio BHI e 100µL de suspensão bacteriana, as amostras foram acrescentados aos poços e as quatro placas de microtitulação (*S. aureus* 6h e 24h e *P. aeruginosa* 6h e 24h) foram levadas a incubação em estufa com 5% de CO₂ e 37°C por 6h e 24h.

Análise de Espectrometria de Densidade Óptica (DO)

Após 6h e 24h as placas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram levadas a leitura no espectrofotômetro *Elisa* (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Biotk ELx 808*), leitor de absorbância de microplacas, para identificação da proliferação microbiana pela relação entre densidade óptica e UFC/ml. Em meio BHI de coloração original amarela e límpida a turvação é indicativa de crescimento bacteriano (bactérias planctônicas dispersas na cultura). O *Elisa* aplicou o *shaker* de 30s em cada microplaca antes da leitura. A leitura da DO de *S. aureus* foi feita em comprimento de onda (λ) de 490 nm e do *P. aeruginosa* em λ de 630 nm.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa *GraphPadPrism 5.0.*, os números de UFC/mL em Log₁₀ foram analisados estatisticamente pelo ANOVA, teste de Tukey, p< 0.0001.

Resultados

A partir da caracterização das nanopartículas de TiO₂ por EDX obteve-se o espectro mostrado na Figura 1 que identifica picos de titânio (Ti) e oxigênio (O) podendo-se afirmar que o material caracterizado apresenta-se puro, isento de contaminantes. A verificação da composição química das nanopartículas de TiO₂, confirma que quando realizadas as análises químicas das nanofibras de PLA/TiO₂ as nanopartículas poderiam ser facilmente identificadas no interior das nanofibras poliméricas.

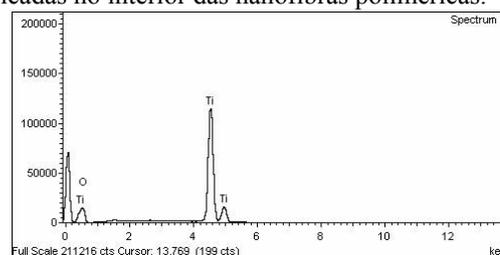


Figura 1: Identificação de nanopartículas de TiO₂ por energia dispersiva de raios-X.

Amostras de PLA/TiO₂ produzidas foram submetidas à Microscopia Eletrônica de Varredura para análise morfológica, observação da disposição, formato e determinação do diâmetro das fibras. A Figura 2A apresenta nanofibras obtidas pela solução de PLA puro, em que se verifica a produção de *scaffolds* mesoporosos, com grande quantidade de espaços entre as fibras o que favorece a ancoragem celular. As Figuras 2B, 3A e 3B apresentam respectivamente nanofibras com nanopartículas de PLA/TiO₂ a 1%, 3% e 5% com aumento de 5000 vezes, o que permite a observação da superfície e avaliação da disposição das nanopartículas de TiO₂. Nas Figuras 2B, 3A e 3B é possível verificar que com o aumento da concentração da nanopartícula de TiO₂ na solução polimérica há aumento da quantidade da nanopartículas na superfície das nanofibras, deixando-as mais rugosas e com maior diâmetro, caracterizando-as como biomateriais mesoporosos, o que permite maior ancoragem e crescimento celular.

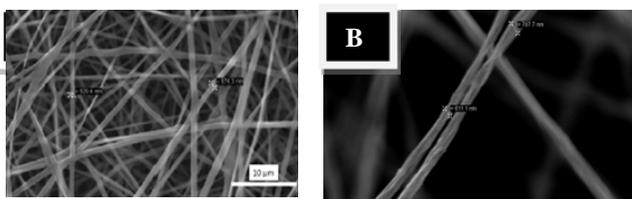


Figura 2: Micrografias de nanofibras de A) PLA e B) PLA/TiO₂ 1%.

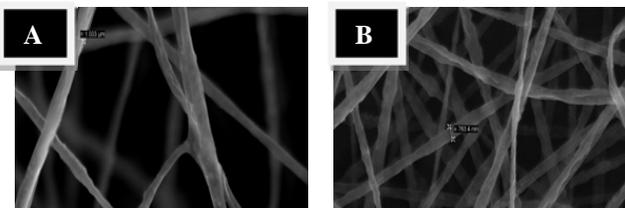


Figura 3: Micrografias de nanofibras de A) PLA/TiO₂ 3% e B) PLA/TiO₂ 5%.

As nanofibras apresentaram diâmetros médios de 723,2 nm para a concentração de 1% de TiO₂, 628,7 nm para 3% e 588,8 nm para 5%, observa-se a redução do diâmetro médio das amostras com o aumento da concentração de TiO₂.

Nos ensaios biológicos foi feita cultura de bactérias: *S. aureus* e *P. aeruginosa* em meio líquido BHI, inoculadas e incubadas por 6h e 24h. Após o período de incubação as amostras foram retiradas do meio e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (*Elisa*). Os valores de absorbância foram considerados como indicadores da viabilidade celular. As Figuras 4 e 5 demonstram os resultados de Densidade Óptica após 6h e 24h para *S. aureus* e *P. aeruginosa* respectivamente.

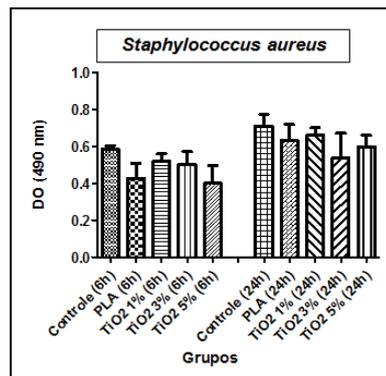


Figura 4: Gráfico de média/desvio padrão das medidas de densidade óptica de *S. aureus* (6h/24h de incubação).

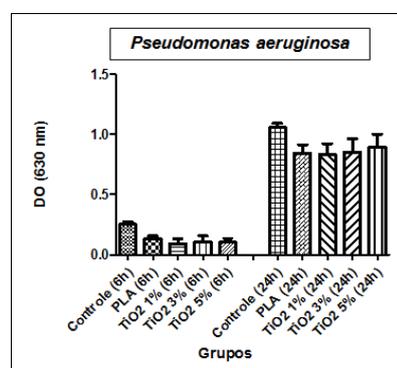


Figura 5: Gráfico de média/desvio padrão das medidas de densidade óptica de *P. aeruginosa* (6h/24h de incubação).

Discussão

Nas Figuras 4 e 5 pode-se observar valores médios e desvio padrão de absorbância para os grupos experimentais. Na cultura de *S. aureus* (Fig. 4) em 6h de incubação a redução da densidade bacteriana foi significativa para o grupo de TiO₂ 5%. Em incubação por 24h a redução significativa de *S. aureus* foi do grupo TiO₂ 3% e TiO₂ 5% em relação ao grupo controle. Os ensaios com *S. aureus* demonstraram o crescente efeito antimicrobiano do TiO₂ em decorrência de sua maior concentração nas nanofibras de PLA/TiO₂, ou seja, quanto maior a concentração do TiO₂ nas nanofibras maior a redução de densidade bacteriana. Para os ensaios com *P. aeruginosa* (Fig. 5) em incubação de 6h e 24h a redução da densidade bacteriana foi significativa para o TiO₂ 1%, 3% e 5% em relação ao grupo controle. Os ensaios bactericidas evidenciaram efeito restrito das nanofibras de PLA/TiO₂ para cultura de *S. aureus* e expressivo efeito antimicrobiano para cultura de *P. aeruginosa*, ambas as bactérias multiresistentes. Os *scaffolds* produzidos demonstraram atividade antimicrobiana para bactérias gram-positivas e gram-negativas o que evidencia sua abrangente aplicação biomédica.

Estudos recentes têm demonstrado aplicação anti-

crobiana de nanopartículas de TiO₂. Farias et al. (2014) desenvolveram películas finas híbridas de polianilina e TiO₂ pela técnica de auto-montagem camada-a-camada (LBL). Atividade antibacteriana do filme PANI/TiO₂ foi estudada, resultados obtidos sugerem sua utilização como revestimento antimicrobiano [10].

Li et al. (2013) produziram um híbrido de celulose e TiO₂ em que as nanopartículas de TiO₂ foram dispersas sobre superfície e/ou matriz de celulose. O biomaterial apresentou atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* (gram-negativo) e *Staphylococcus aureus* (gram-positivo) e demonstrou ser material antimicrobiano promissor para aplicações biomédicas [11].

Nataraj et al. (2014) comparou atividade antimicrobiana de nanopartículas de TiO₂ (80 nm de diâmetro) e nanofios (100 nm de diâmetro) contra *S. aureus*. Ambas amostras demonstraram atividade antimicrobiana e citocompatibilidade. O crescimento de *S. aureus* foi parcialmente inibido por 2% e 4% em peso de nanopartículas de TiO₂ e totalmente inibido por nanofios de TiO₂ até 24 h. Nanofios de TiO₂ tratados com *S. aureus* exibiram células com menor potencial de membrana em relação as células tratadas com nanopartículas. Propriedades antimicrobianas foram validadas por modelo *ex vivo* (pele de porco) completando ensaios *in vitro* [12].

Trabalhos científicos sobre atividade antimicrobiana específica de nanofibras de PLA/TiO₂ não foram encontrados na literatura pelo fato de trata-se de material e processo de produção inovadores. Os resultados obtidos no presente estudo permitem evidenciar o efeito antimicrobiano das amostras de nanofibras de PLA/TiO₂ com concentrações de TiO₂ de 1%, 3% e 5% em meio de cultura bacteriano (*S. aureus* e *P. aeruginosa*) em incubação por 6h e 24h. Análise estatística permitiu evidenciar ação antimicrobiana significativa para ambas as culturas, em especial para *P. aeruginosa* cuja redução de densidade bacteriana foi significativa para todos os grupos de estudo nos dois períodos de incubação. Futuros estudos com nanofibras de PLA/TiO₂ objetivam pesquisar propriedades antibacterianas em longo prazo e capacidade de inibir formação de biofilmes, propriedades desejáveis para evitar infecção associada a implantes.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP (2011/17877-7 e 2011/20345-7) e CNPq (474090/2013-2) pelo apoio financeiro.

Referências

[1] Masterton RG, Mifsud AJ, Rao GG. Hospital Isolation Precautions Working Group. Review of hospital isolation and infection control precautions. *J Hosp Infect.* 2003; 54(3): 171-3.
[2] Cassettari VC, Strabelli T, Medeiros EAS. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? *Braz J Infect Dis*, v.

9, n. 1, p. 70-6, 2005.

[3] Robert S, Chambers S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. *Intern Med J*, v. 35, p. 97S-105S, 2005.
[4] Shin H, Jo S, Mikos AG. *Biomaterials*, 24, p. 4353 (2003).
[5] Griffith, LG. *Acta Mater.*, 48, p. 263 (2000).
[6] Kellomaki M, Tormala P. *Method. Mol. Biol.*, 238, p.1 (2004).
[7] Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. *Act. Microsc.*, 11, p. 85 (2002).
[8] Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications. *Adv Mater.* 2009; 21:3343.
[9] Branciforti MC, Custodio TA, Guerrini LM, Averous L, Bretas RES. Characterization of nano-structured poly(D, L-lactic acid) nonwoven mats obtained from different solutions by electrospinning. *J Macromol Sci, Part B: Phys* 2009; 48:1222 e 40.
[10] Farias EA, Dionisio NA, Quelemes PV, Leal SH, Matos JM, Silva Filho EC, Bechtold IH, Leite JR, Eiras C. Development and characterization of multilayer films of polyaniline, titanium dioxide and CTAB for potential antimicrobial applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;35:449-54.
[11] Li SM, Dong YY, Ma MG, Fu LH, Sun RC, Xu F. Hydrothermal synthesis, characterization, and bactericidal activities of hybrid from cellulose and TiO₂. *Carbohydr Polym.* 2013;96(1):15-20.
[12] Nataraj N, Anjusree GS, Madhavan AA, Priyanka P, Sankar D, Nisha N, Lakshmi SV, Jayakumar R, Balakrishnan A, Biswas R. Synthesis and Antistaphylococcal Activity of TiO₂ Nanoparticles and Nanowires in ex vivo Porcine Skin Model. *J Biomed Nanotech-nol.* 2014;10(5):864-70.