

Avaliação *in vitro* do intumescimento e degradação do biocompósito de borracha natural-nanocelulose-biovidro

Ângelo Romeu da Silva Júnior¹, Juliana Kelmy Macário Barboza
Daguano¹, Jorge Vicente Lopes da Silva¹

arsilva@cti.gov.br, juliana.daguano@cti.gov.br, jorge.silva@cti.gov.br

¹Divisão de Tecnologias para Produção e Saúde
CTI/MCTI Renato Archer – Campinas/SP

Abstract. *Tissue Engineering has been gaining more and more attention in the field of biomedical research, therefore the development of new materials that meet the necessary requirements as a support for cells to promote tissue regeneration is necessary. Among these requirements are the material's ability to absorb fluids (swelling) for cell maintenance, and the possibility of being reabsorbed by the body in a controlled manner, compatible with the formation of new tissue (hydrolytic degradation). In this sense, composites have the advantage of adding the different properties of the materials that constitute them, in order to meet the most diverse functions. Thus, in the present work, the natural rubber-nanocellulose-bioglass biocomposite was characterized regarding its in vitro behavior against swelling and hydrolytic degradation.*

Resumo. Tendo em vista que a Engenharia de Tecidos vem ganhando cada vez mais atenção no ramo da pesquisa biomédica, o desenvolvimento de novos materiais que atendam os requisitos necessários como suporte para as células promoverem a regeneração tecidual se faz necessário. Dentre esses requisitos estão a capacidade do material em absorver fluidos (intumescimento) para a manutenção celular e a possibilidade de ser reabsorvido pelo organismo de forma controlada e compatível com a formação do novo tecido (degradação hidrolítica). Nesse sentido, os compósitos têm como vantagem agregar as diferentes propriedades dos materiais que o constituem, de forma a atender as mais diversas funções. Assim, no presente trabalho o biocompósito de borracha natural-nanocelulose-biovidro foi caracterizado quanto ao seu comportamento *in vitro* frente ao intumescimento e à degradação hidrolítica.

1. Introdução

Os biomateriais sempre estiveram presentes na humanidade, desde a antiguidade, com o relato da utilização de suturas feitas de pele animal, até os dias de hoje, com o advento da medicina regenerativa. Nas últimas décadas houve um crescimento significativo no uso dos biomateriais, graças às evoluções nas áreas da Engenharia e da Saúde (Rodrigues, 2013), sendo visto uma grande interligação de diversas tecnologias com uma única finalidade, poder ajudar e amparar as necessidades humanas. Os biomateriais podem ser de origem natural ou até de forma sintética, podendo ser utilizados para diversas aplicações envolvendo aplicações biomédicas, como suporte, aprimoramento ou até mesmo na substituição de um tecido danificado ou em funções biológicas. Pontuando

isso, tem-se como um dos principais materiais de estudo os polímeros naturais, que com o avanço das pesquisas estão sendo evidenciados como materiais de grande destaque, principalmente tratando-se da Engenharia Biomédica. Esses materiais são provenientes de fontes naturais e abundantes, possuem biocompatibilidade, biodegradabilidade e boas propriedades mecânicas (Lin; Dufresne, 2014). Outro material que vem recebendo destaque no ramo científico é o material bioativo, no caso vidros e vitrocerâmicos, os quais apresentam grande capacidade de biocompatibilidade e bioatividade (Mundstock, K. B., Oliveira, A. P. N. D., Hotza, D., & Rogero, S 2012). Todavia, os materiais à base de vidro possuem uma grande defasagem no sentido de suas propriedades mecânicas, tendo assim baixa elasticidade e flexibilidade.

A borracha natural é dada como um polímero natural, com alto peso molecular, que pode ser oriunda da seiva de diversos vegetais, sendo que o principal deles é a *Hevea Brasiliensis*, também conhecida como seringueira. A borracha natural é a forma mais interessante em contraposição aos tipos de borracha sintética, uma vez que a forma de obtenção dela se dá por meio da utilização do petróleo, restando dúvidas quanto a sua disponibilidade. Em contrapartida, a borracha natural pode ser encontrada na forma de uma suspensão, extraída na forma de látex, como cadeias isoméricas de cis-1,4-isopreno (Guerra,et al, 2021). Devido as suas propriedades químicas e físicas, é muito utilizada por ter uma alta elasticidade e flexibilidade. Ademais, a borracha natural tem como grande vantagem a possibilidade de incorporar novos compostos, tornando possível melhorar as características do biomaterial em questão, sendo um ótimo candidato para aplicação como matriz de um material compósito, ou até como matriz para um sistema de liberação de drogas (Santos,2015; Almeida, et al, 2020). Entretanto, uma desvantagem da borracha natural é sua hidrofobicidade, que pode ser um limitante para aplicações em medicina regenerativa (Steffens, 2021).

Devido a sua alta propriedade bioativa, o vidro desenvolvido na década de 60 pelo prof. Larry Hench, conhecido por biovidro 45S5, é um dos biomateriais mais estudados e utilizados em regeneração e engenharia de tecidos no mundo, pois apresenta propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, bioatividade e biocompatibilidade; propriedades muito exigidas em aplicações como implantes dentários, substitutos ósseos com ação antimicrobiana, dentifrícios com efeito remineralizante, sistema de liberação controlada de drogas, dentre outros (Rizwan; Handi; Basirun, 2017). Entretanto, esses materiais carecem de resistência mecânica, mas para contornar este problema, as partículas de biovidro têm sido combinadas com outros materiais, principalmente com polímeros, a fim de obter um compósito (Hum, et al, 2013).

Por fim, tem-se o material de nanocelulose, como um polímero natural formado por unidades β-D-glucopiranose, de baixo custo, bastante utilizado atualmente, tendo como suas principais características sua alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, com grande relevância nas aplicações da engenharia biomédica (Dufresne, 2013).

Dessa forma, o presente trabalho visa avaliar por meio de testes *in vitro* o compósito à base de borracha natural, sendo inserida a nanocelulose e o biovidro 45S5, podendo assim congregar, respectivamente, características hidrofílicas e bioativas desses materiais, com as propriedades mecânicas de polímeros, tais como a borracha natural.

2. Metodologia

Para a realização dos experimentos de avaliação do grau de intumescimento e degradação *in vitro* do biocompósito de borracha natural-nanocelulose-biovidro (BN-NC-BG), os materiais foram obtidos a partir da disponibilidade do grupo de pesquisa de Materiais Inteligentes e Aplicações da Unesp - Universidade Estadual Paulista *Júlio de Mesquita Filho*, localizada no campus de Rosana/SP, sob colaboração do Prof. Dr. Michael Jones da Silva.

Brevemente, membranas do biocompósito foram obtidas a partir da mistura primária do compósito de BN-NC, que foi utilizado para incorporar as partículas de BG. Para tanto, nanocompósito BN-NC foram obtidos pela incorporação de suspensões aquosas de NC (4,2% m/V) em BN (43% m/V) na proporção em massa igual a 95-05 e 90-10 (BN-NC). A mistura foi então moldada em substrato de vidro e seca em estufa convencional a 60°C durante 12 h para obtenção dos filmes. As amostras de BN-NC-BG foram obtidas seguindo a metodologia descrita por Sousa et al. Uma solução a 4% m/V de BN-NC foi preparada dissolvendo um pequeno pedaço de filme nanocompósito de BN-NC em clorofórmio. Em seguida, as quantidades de massa desejadas de BG (10, 30 e 50%) foram adicionadas à solução. Novamente, filmes foram obtidos pelo método de evaporação do solvente. Na Tabela 1 são apresentadas as amostras estudadas nesse trabalho.

Tabela 1 – Composição das amostras estudadas quanto ao intumescimento e à degradação.

Amostra	BN – Borracha Natural (%)	NC – Nanocelulose (%)	BG – Biovidro 45S5 (%)
BN	100	-	-
BN 95-05	95	5	-
BN 90-10	90	10	-
BN 90-10/10	90	10	10
BN 90-10/30	90	10	30
BN 90-10/50	90	10	50

A caracterização quanto às propriedades de intumescimento e degradação foram realizadas por meio de ensaios utilizando uma solução salina que simula o fluido corpóreo, também conhecida como *Phosphate-Buffered Saline (PBS)*. Por fim, também foram utilizados a Espectroscopia por Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), conforme descrito a seguir.

2.1. Teste de intumescimento

As amostras foram cortadas na medida de 10 x 5 cm, e posteriormente, pesadas e identificadas, para depois, dar-se início ao processo de ensaio de intumescimento. O volume de solução PBS utilizada no ensaio leva em conta o peso inicial das amostras, mantendo a relação de 1 ml para cada 1 mg. As amostras de compósito foram imersas em PBS, e foram colocadas para serem incubadas no shaker (Excella E24, New Brunswick) a 37 °C em diferentes tempos, para verificar a sua capacidade de absorção de

líquido, sendo os períodos de: 24, 72, 120, 168 e 360 horas. Feito isso, com o auxílio de um papel filtro foi removido o excesso de líquido superficial, e as amostras foram pesadas em balança analítica em triplicata. O intumescimento foi obtido pela equação exposta em:

$$\frac{I(\%) = \text{massa final} - \text{massa inicial} \times 100}{\text{massa final}}$$

Sendo I: Capacidade de intumescimento.

2.2. Teste de degradação hidrolítica.

A degradação foi avaliada por meio da utilização da solução tampão de PBS, onde as amostras foram incubadas por 4 tempos diferentes, sendo eles: 15, 21 e 28 dias. Depois de removidas da solução, as amostras foram lavadas em água destilada, com o auxílio da pissseta, e pesadas em balança analítica em triplicata. Em seguida, as amostras foram armazenadas em microtubos vedados com paraffilme, para subsequente congeloamento a -72 °C por 24 horas, em ultrafreezer (U360 innova, New Brunswick Scientific). Uma vez as amostras congeladas, essas foram secas utilizando o liofilizador (Freezone 2.5, Labconco) por período de 24h. Por fim, as amostras foram pesadas novamente, como forma de monitoramento de perda de massa, levando como embasamento o seu peso inicial.

A porcentagem de degradação hidrolítica foi calculada por meio da equação:

$$\frac{D(\%) = \text{Massa Inicial} - \text{Massa seca} \times 100}{\text{massa inicial}}$$

Sendo D: Perda de massa

2.3 Caracterização por FTIR

Espectros foram obtidos pela análise de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) das amostras, sendo acessados para identificar perdas de grupos funcionais, como também identificar possíveis interações entre o biocompósito com o PBS. A leitura das amostras foi realizada posteriormente ao processo de degradação, sendo as amostras selecionadas de 15, 21 e 28 dias e uma amostra denominada como 0 horas, ou seja, uma amostra que não tinha sido submetida ao ensaio. A análise ocorreu no modo de reflexão total atenuada (ATR_FTIR) no equipamento spectrum 100, PerkinElmer, equipado com um cristal de diamante, tendo como parâmetros de medida o intervalo de 4000-550cm⁻¹, com 16 varreduras.

2.4 Caracterização por MEV

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para verificar a morfologia das amostras após os ensaios de intumescimento e de degradação. Para tanto, as amostras foram previamente recobertas com ouro. A caracterização utilizou o equipamento Mira XMU da marca Tescan.

3. RESULTADOS E DISCUSÃO

3.1 Teste de intumescimento e degradação

A princípio, é necessário pontuar características da borracha natural, de forma que ela possui propriedades hidrofóbicas, isso ocorre em função do seu principal polímero, sendo ele o poli(cis-1,4-isopreno). No teste em questão, foram avaliadas as propriedades dos materiais compósitos de borracha natural quanto à absorção de fluido, como visto na Figura 1. No teste foi utilizado como componente a solução salina de PBS. Destarte, observa-se que as amostras de BN-NC com adição de 10 e 30% de BG obtiveram maior capacidade de absorção, em contrapartida as amostras de borracha natural com nanocelulose e 50% de biovidro (BN 90-10/50) e amostras com 10% de nanocelulose (BN 90-10) tiveram baixos índices.

No caso do ensaio de degradação, foi observado que as amostras de borracha natural com celulose e 10% e 30% de biovidro obtiveram maior taxa de degradação, enquanto as amostras de borracha natural apenas com o adicional de nanocelulose obtiveram menor taxa de degradação.

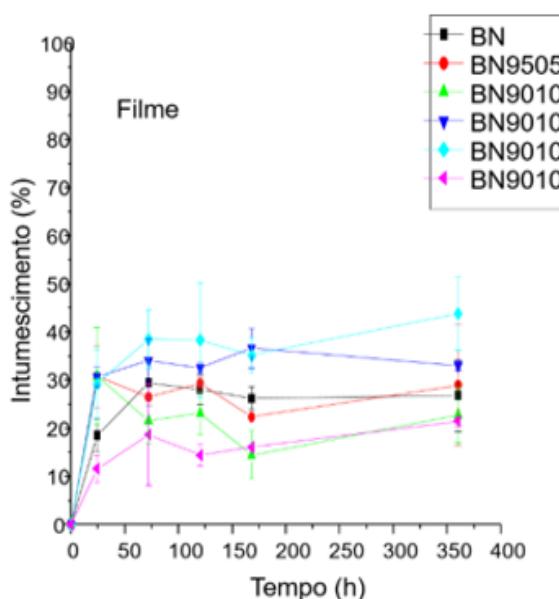


Figura "a" – Capacidade de intumescimento

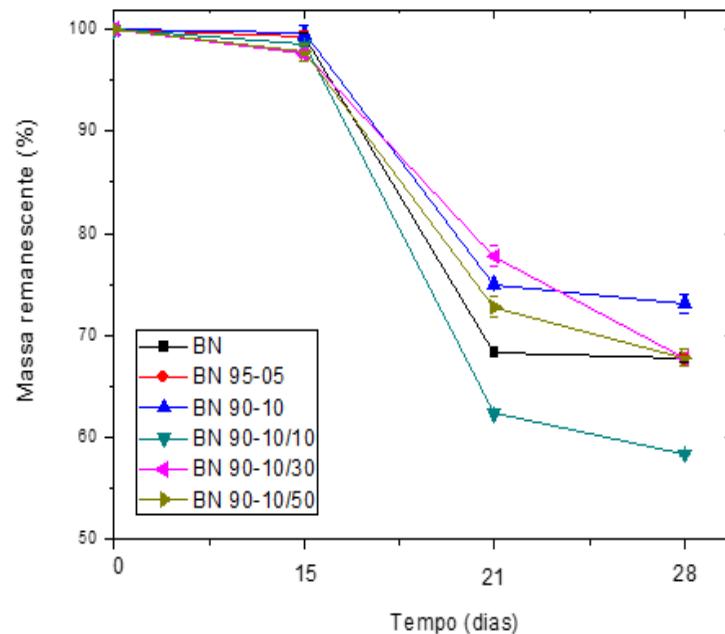


Figura "b" – perda de massa das amostras.

3.2 Caracterização por Espectroscopia de infravermelho - FTIR.

A Figura 2 apresenta a análise por espectroscopia FTIR das amostras, tendo como base as bandas características dos materiais, como presente na Tabela 2. A priori, as amostras contendo apenas em sua composição a borracha natural e nanocelulose foram as que mais mostraram mudanças em suas estruturas, após exposição ao PBS. Dessa forma, em todas as amostras do compósito de borracha natural é possível notar a modificação nos espectros de 1662 cm^{-1} , exceto na composição de BN 90-10/50. A banda em questão

corresponde a uma dupla ligação entre os carbonos, na qual são observadas modificações à medida que ocorre o processo hidrolítico, denotada nos espectros de 15, 21 e 28 dia

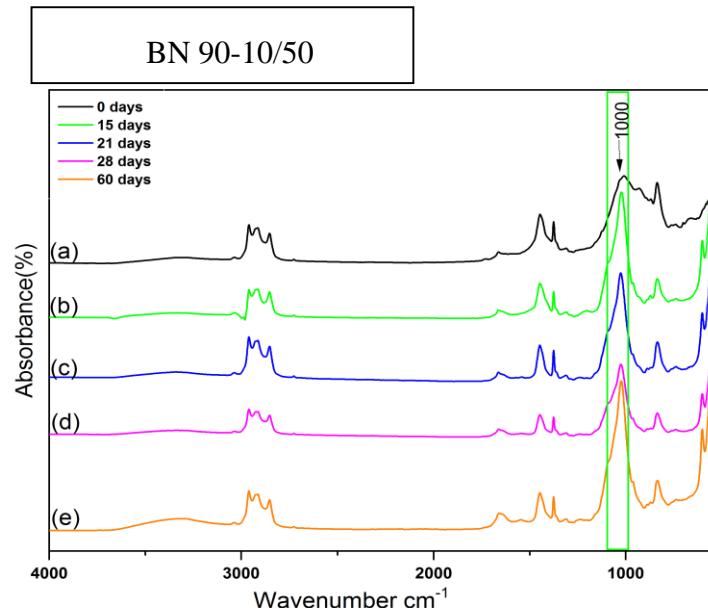
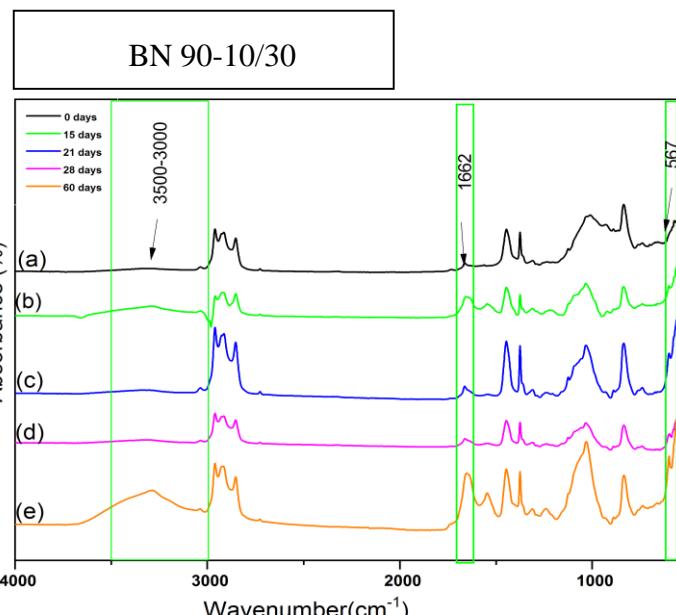
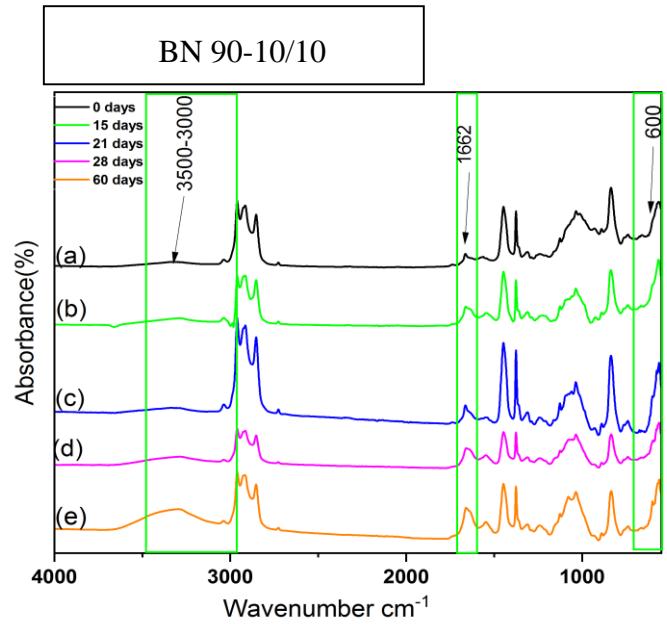
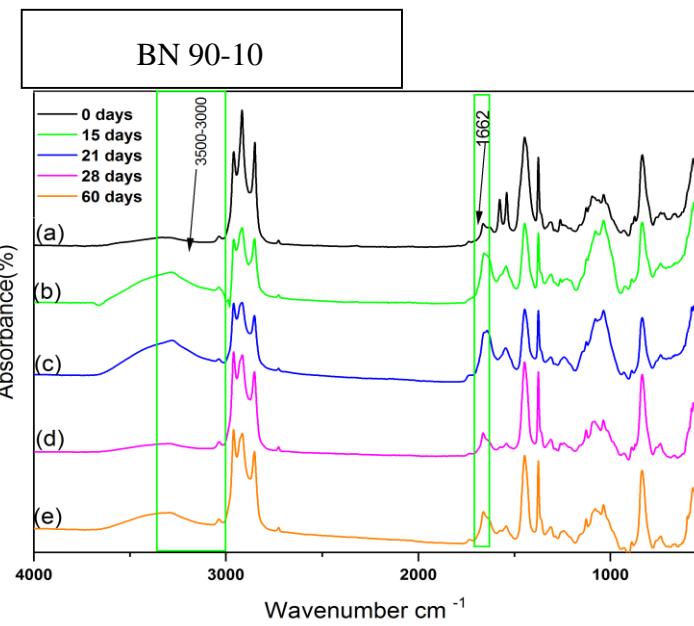
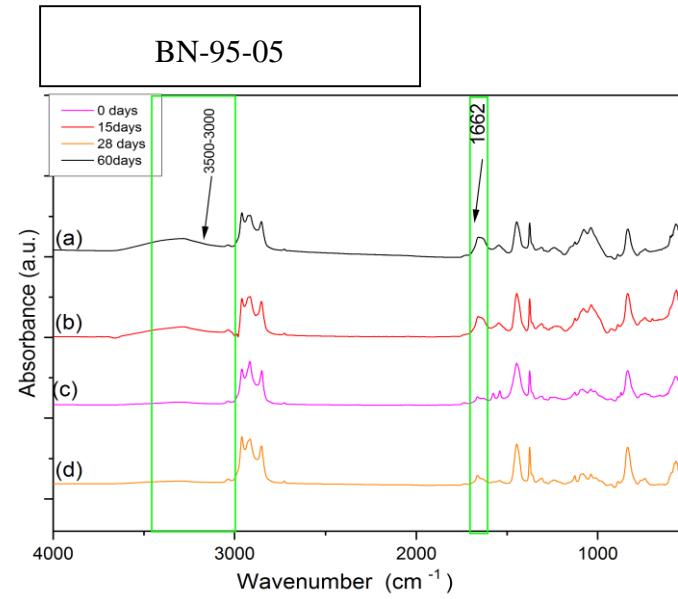
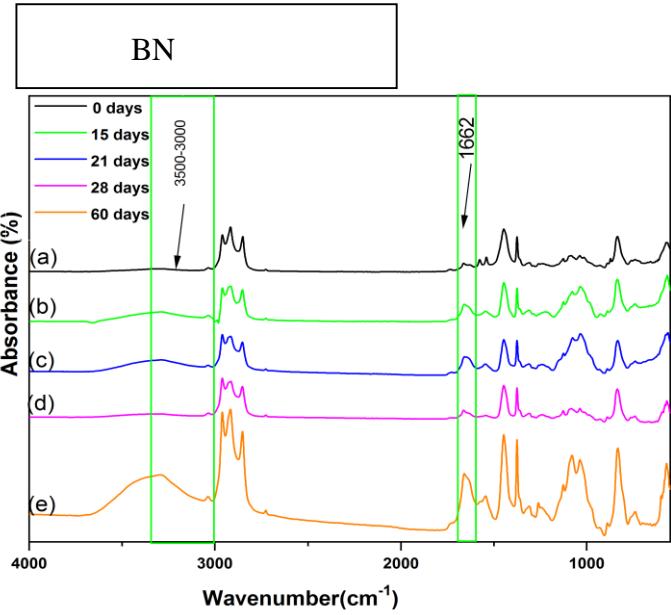


Figura 2 - Espectros de FTIR das amostras BN, BN-95, BN-90-10, BN-90-10/30 e BN-90-10/50, antes e após teste de degradação pelos períodos de 15, 21 e 28 dias.

Tabela 2: Bandas características dos materiais borracha natural (BN), nanocelulose (NC) e biovidro 45S5 (BG) encontradas em espectros de FTIR.(MJ silva,

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupamento	BN	BG	NC
460	Si–O–Si symmetric bending		X	
488	C–C–C in-plane bending		X	
567	C–C–C in-plane bending		X	
600	P–O bending (amorphous)			X
740	–CH ₂ – rocking		X	
841	C=CH wagging		X	
887	P–O		X	
920	Si–O–Si		X	
1010	Si–O–Si		X	
1036	C–O stretching (C, L)			X
1060	C–O stretching (HC, L)			X
1080	C–O		X	
1127	C–H bending		X	
1309	–CH ₃ deformation		X	
1374	C–H bending of CH ₃		X	
1431	residual carbonate group			X
1444	C–H bending of CH ₃		X	
1662	C=C stretching		X	
2725	–CH ₃ overtone deformation asymmetric		X	
2851	C–H stretching of CH ₃ and CH ₂		X	
2914	C–H stretching of CH ₃		X	
2961	C–H stretching of CH ₃		X	
3038	CH stretching		X	

A reação entre essa dupla ligação C=C com a água corrobora com a criação do grupo funcional hidroxila, que posteriormente está sendo evidenciado na presença da banda “estufada” localizada entre 3000 cm⁻¹ e 3500 cm⁻¹, sendo representado por um alongamento entre uma ligação de carbono e hidrogênio. A Figura 3 exemplifica a reação do isopreno (principal componente da borracha natural) com a água. Adicionalmente, nas amostras de BN 95-05 pode ser observada a mudança de vibrações pela ligação simples entre o C–O e C–H, mais precisamente nos seus alongamentos, devido à hidrólise. Enquanto a borracha com 10% de nanocelulose mostrou poucas alterações durante o teste de degradação, tendo apenas um deslocamento notório na banda de 1444 cm⁻¹ com o aumento das ligações entre o carbono e hidrogênio, para o primeiro compósito de borracha natural com nanocelulose e biovidro pode ser observada a interação do grupo fosfato (P–O) com a água. Por fim, nos espectros da borracha natural com 30% e 50% de

biovidro, foram observadas poucas mudanças estruturais, sendo elas a interação de uma ligação simples da dobra entre 3 carbonos (C-C-C) ocorrendo com o PBS, sendo sinalizada por uma maior vibração, onde no caso da amostra BN 90-10/50, ocorre a mesma vibração em função da sua espessura, posteriormente a isso, a mesma vibração indica a formação de hidroxiapatita.

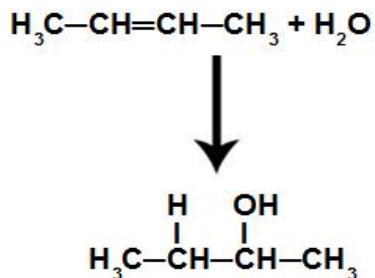


Figura 3 – Reação de hidratação do isopreno, identificada no processo de degradação.

3.2 – Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens do MEV foram utilizadas para analisar as características da morfologia da superfície das amostras antes e após imersão em PBS por 28 dias, como pode ser visto na Figura 4. As amostras de borracha natural apresentaram uma superfície rugosa, mas que após o teste podem ser notadas fissuras consideráveis, evidenciando a fragilidade do material nessa condição. As amostras de BN 95-05 tiveram esse comportamento frágil antes mesmo da imersão em PBS, denotando lixiviação em sua superfície após o teste. As amostras BN 90-10 tiveram sua morfologia caracterizada principalmente pela formação de um aglomerado de nanocelulose, os quais não são mais observados após 28 dias de imersão em PBS, mas com boa tolerância ao teste. Em relação às amostras de BN 90-10/30 e 50, é possível notar que sua área superficial é definida por uma certa segregação dos componentes nas amostras, possivelmente em decorrência de uma maior preferência de interação entre a nanocelulose e o biovidro, mas com boa tolerância ao teste de degradação. Em contrapartida, nas amostras de BN 90-10/10 não foi observada essa característica de segregação antes do teste, demonstrando maior homogeneidade do material, e nem a presença de fissuras, mesmo após exposição ao PBS por 28 dias.

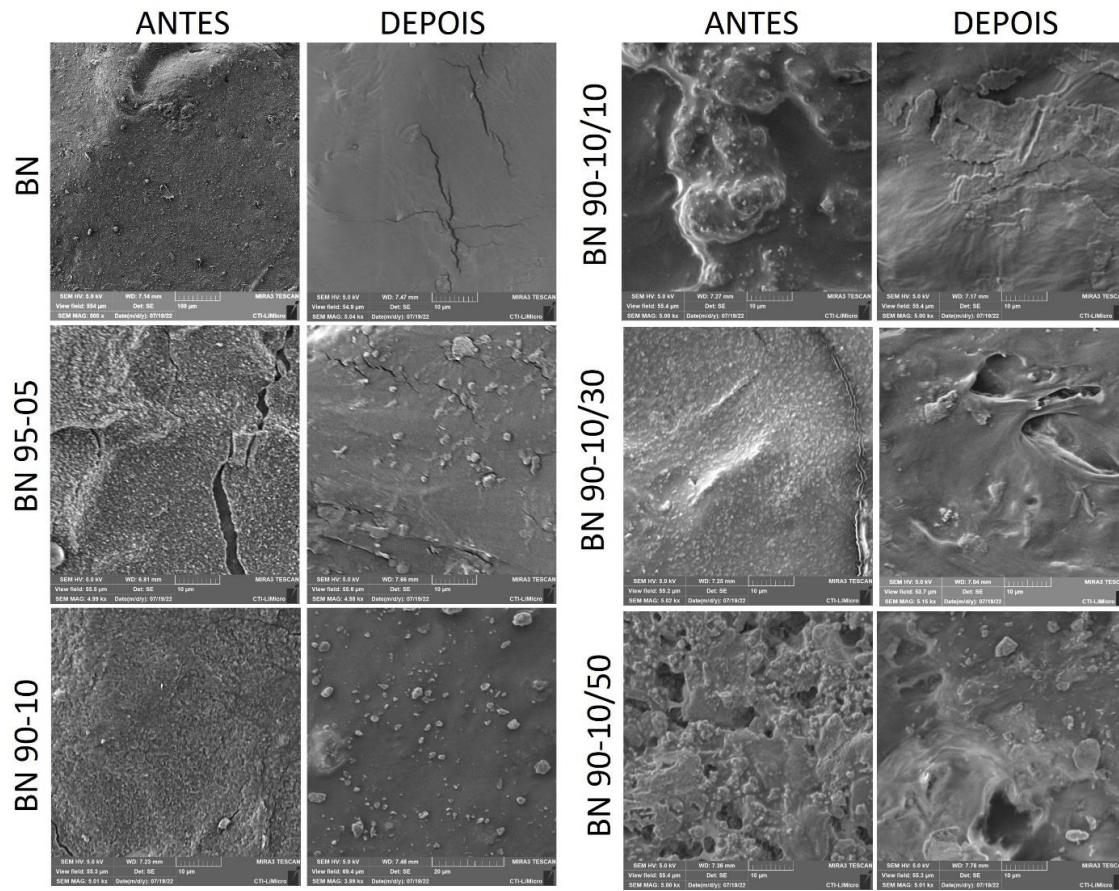


Figura 4 – Micrografias das amostras antes e após 28 dias de imersão em PBS.

4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, os resultados obtidos com a condução dos ensaios de intumescimento e degradação evidenciam as diferentes propriedades de absorção de fluidos e de degradação dos materiais à base de borracha natural, bem como as significativas mudanças em suas estruturas, como visto nas análises de FTIR-ATR e MEV. Ainda, é possível notar um comportamento hidrofóbico do biocompósito, mesmo com a adição da nanoceulose e do biovidro, tendo em vista suas capacidades hidrofílicas. Por fim, segundo a abordagem final desse trabalho, dentre as composições do biocompósito, as amostras que BN 90-10 e BN 90-10/10 denotaram maior potencial, levando em conta suas capacidades de biodegradabilidade e intumescimento, podendo influenciar em diversos setores da área biomédica, como por exemplo drug delivery.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, Gustavo Foresto Brito de et al. Controlled drug delivery system by fs-laser micromachined biocompatible rubber latex membranes. **Applied Surface Science**, v. 506, p. 144762, 2020.
- BARROS, Natan Roberto et al. Highly absorptive dressing composed of natural latex loaded with alginate for exudate control and healing of diabetic wounds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 119, p. 111589, 2021.
- DOGNANI, **Eletrofiação de fibras de borracha natural com adição de polianilina**. 2016.92. Dissertação (mestrado em ciências e tecnologias de materiais) - faculdade de ciência e tecnologia (FCT). Universidade Estadual paulista “Júlio de mesquita filho”, presidente Prudente.
- FERREIRA, **Síntese e caracterização de suportes porosos (scaffolds) à base de goma do cajueiro oxidada e carboxietil quitosana**. 2019.78. Dissertação (mestrado em química) - Departamento de química orgânica e inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- GUERRA, Nayrim Brizuela et al. Biomedical applications of natural rubber latex from the rubber tree Hevea brasiliensis. **Materials Science and Engineering: C**, v. 126, p. 112126, 2021
- HUM, J. et al. Stiffness improvement of 45S5 Bioglass®-based scaffolds through natural and synthetic biopolymer coatings: An ultrasonic study. **Strain**, v. 49, n. 5, p. 431-439, 2013.
- LIN, Ning; DUFRESNE, Alain. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, p. 302-325, 2014
- MUNDSTOCK, Karoline Bastos et al. Avaliação da biocompatibilidade de vidro e vitrocerâmica do sistema SNCP (SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅). **Química Nova**, v. 35, p. 665-670, 2012.
- PERES, Augusto CC et al. Uso de DSC na determinação de parâmetros de vulcanização de látex de borracha natural. **Polímeros**, v. 16, p. 61-65, 2006.
- RIZWAN, M.; HAMDI, M.; BASIRUN, W. J. Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 105, n. 11, p. 3197-3223, 2017.
- RODRIGUES, Isabella CP et al. Extracellular matrix-derived and low-cost proteins to improve polyurethane-based scaffolds for vascular grafts. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2022.
- RODRIGUES, Luciano Brito. Biomaterials applications in orthopaedics. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 2, p. 63, 2013. Brito, S. M. (2013).
- SAMANTA, Himadri Sekhar; RAY, Samit Kumar. Synthesis, characterization, swelling and drug release behavior of semi-interpenetrating network hydrogels of

sodium alginate and polyacrylamide. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 666-678, 2014.

SANTOS, Luiza Maria Pinheiro dos. **Desenvolvimento e caracterização de biocompósito de látex (borracha natural) e fibra de carnaúba**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SOUSA, E. A. E. A.; Silva, M. J. M. J.; Sanches, A. O. A. O.; Soares, V. O. V. O.; Job, A. E. A. E.; Malmonge, J. A. J. A. *European Polymer Journal* 2019, 119

STEFFENS, **Avaliação de atividade antifúngica de compostos naturais em elastômeros com potencial uso biomédico**.2018.94. Dissertação (mestrado em biotecnologia). instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do sul. Caxias do Sul.

PANICHPAKDEE, Jate et al. Electrospinning of natural rubber latex-blended polyvinyl alcohol. **Materials Today: Proceedings**, v. 17, p. 2020-2027, 2019.

TANAKA, Jean Lucas et al. Natural rubber dressing loaded with silver sulfadiazine for the treatment of burn wounds infected with *Candida* spp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 189, p. 597-606, 2021.