

## **SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS HÍBRIDAS A BASE DE COLÁGENO PARA SU APLICACIÓN COMO BIOADHESIVO**

**ROCIO E. STÜRTZ**

*INTEC (UNL-CONICET), Güemes 3450 (3000) Santa Fe, Argentina*

Área / Sub-área: Ciencias Biológicas / Biotecnología

### **INTRODUCCIÓN**

La síntesis de látex híbridos que contienen proteínas ha venido ganando interés debido a que esta técnica tiende a modificar y mejorar las propiedades de las sustancias naturales mediante la incorporación de polímeros sintéticos. Diversas rutas de síntesis permiten la conjugación de una proteína con un polímero sintético, pero no todas permiten la formación de partículas híbridas dispersas en agua para su empleo con formación de películas como el caso de una aplicación en adhesivos. En el presente trabajo se empleará la estrategia desarrollada por Picchio et al. (2014) para sintetizar látex de base acuosa conteniendo partículas híbridas de colágeno parcialmente hidrolizado (gelatina) y un polímero acrílico. Además, se analizará el desempeño de los látex sintetizados en la formación de películas acorde a una aplicación como bioadhesivo.

### **OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo persigue la síntesis de nanopartículas híbridas dispersas en agua, a partir de colágeno parcialmente hidrolizado y un polímero sintético, que sean aptas para ser utilizadas como bioadhesivos de tejidos blandos. En este sentido, se espera que el material en desarrollo combine positivamente las propiedades de ambos componentes, como la biocompatibilidad, la biodegradabilidad y el buen crecimiento celular proporcionado por el colágeno, con la alta adaptabilidad y mejores propiedades (mecánicas, térmicas y adhesivas) de los polímeros sintéticos.

### **METODOLOGÍA**

#### **Síntesis**

Se empleó como técnica de síntesis la polimerización en emulsión, en ausencia de emulsificante, de una formulación de monómeros acrílicos en presencia de gelatina (PB Leiner S.A.). Como iniciador se empleó el par redox formado por el hidroperóxido ( $H_2O_2$ ) y los grupos amino del colágeno. El sistema monomérico empleado está compuesto por ácido acrílico (AA) / n-butilacrilato (BuA) (Aldrich) en la relación 70/30, mientras que las concentraciones de colágeno fueron variables (de 25 a 50% pbm: peso basado en monómero). Como buffer para regular el pH se utilizó carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ , Cicarelli) 5% pbm. La polimerización se llevó a cabo en un reactor de vidrio encamisado de 0.5 L, el tiempo de reacción total fue de 2 h, la temperatura  $80^\circ C$  y el sistema se mantuvo bajo agitación y burbujeo de  $N_2$ .

Título del proyecto: "Síntesis y Caracterización de Polímeros producidos por Procesos en Emulsión y en Miniemulsión"

Código / Numero de Resolución: 501 201101 00210 LI, PACT 80 / Res 321/13

Director del proyecto: Luis Gugliotta

Director del autor: Roque J. Minari Co-Director del autor: Verónica D. G. González

Además, para asegurar la inocuidad del producto se ha estudiado como estrategia de post-tratamiento la diálisis de los látex polimerizados para eliminar el monómero residual. La misma se realizó con una membrana de 10 KDa, frente a agua destilada y deionizada (DDI) y bajo agitación constante. Posteriormente, los látex dializados fueron neutralizados con NaOH 1M, llevándolos a un pH cercano al fisiológico (7). Las letras N y ND se agregan a los códigos de los experimentos para indicar cuando los látex fueron solamente neutralizados (N) o dializados y posteriormente neutralizados (ND).

## Caracterización

A las muestras extraídas a lo largo de la reacción y a la muestra final se les determinó: i) la conversión de los monómeros por gravimetría ( $x$ ); ii) el tamaño medio de partícula ( $\bar{d}_p$ ) por dispersión de luz dinámica (DLS) a 90°; iii) la tensión superficial ( $\sigma_s$ ) utilizando un tensiómetro Krüss; iv) el pH; y v) el potencial zeta ( $\zeta$ ) empleando un equipo zetasizer de Malvern.

Las películas fueron obtenidas secando los látex híbridos sintetizados en moldes de silicona con ángulo recto a 22°C y una humedad relativa del 55% durante 7 días. El espesor final de las mismas fue de aproximadamente 1 mm. A éstas se les analizaron las siguientes propiedades. La opacidad se determinó con la estrategia que plantea Pereda et al. (2010). La estabilidad térmica se evaluó por análisis termogravimétrico (TGA). Las propiedades mecánicas de las películas involucraron ensayos de tracción y dureza empleando un equipo INSTRON 3344. La absorción de agua de las películas se determinó por inmersión en agua a temperatura ambiente durante 7 días o hasta que la película presentó daños. La temperatura mínima de formación de película (MFFT) se determinó por observación de la transparencia de una película aplicada sobre una placa de metal con un gradiente de temperatura. El proceso de formación de películas se analizó mediante el seguimiento del factor de fluidez (FF) con un analizador óptico de formación de películas (Horus).

La biocompatibilidad de las películas se estudió in-vitro. Antes de ser analizadas se les realizó un proceso de esterilización mediante irradiación UV bajo una campana de flujo laminar. El ensayo de biocompatibilidad se evaluó por contacto directo y por contacto indirecto del material a evaluar con las células. La toxicidad celular se determinó mediante un método colorimétrico empleando los reactivos MTS/PMS, que mide la actividad de las enzimas deshidrogenasas celulares; a menor actividad enzimática, mayor efecto citotóxico de la muestra. En este caso se expresó como porcentaje en relación al control sin muestra (blanco). Se utilizó la línea celular VERO.

## RESULTADOS

### Síntesis

En la Tabla 1 se resumen los experimentos llevados a cabo con cantidades variables de gelatina, manteniendo constantes las cantidades de los otros reactivos. Si bien se observaron pequeñas diferencias en la  $x$  final, éstas fueron similares en todos los casos y cercanas a 80%. Los diámetros de partículas obtenidos (> 500 nm) resultaron bastante mayores a los observados con caseína (80-150 nm, Picchio et al. 2014) y a lo esperado en una polimerización en emulsión con un emulsificante convencional (como SDS).

Tabla 1. Polimerización de BuA/AA en presencia de diferentes concentraciones de gelatina. Características de los látex finales.

Experimento	R25%	R35%	R50%
Gelatina [% pbm]	25	35	50
$x$ [%]	80	84	76
$\bar{d}_p$ [nm]	743.0	880.8	530.3
$\sigma_s$ [mN/m]	43.15	43.3	42.8
pH	4.14	4.24	4.16

Además, se aprecia que cuando la concentración de colágeno es de 50% pbm el  $\bar{d}_p$  disminuye con respecto a las formulaciones que tienen 35 y 25% pbm, lo cual se puede asociar a que una mayor cantidad de gelatina puede estabilizar una mayor cantidad de partículas.

Los valores de  $\zeta$  de los látex N y ND fueron entre -65.00 mV y -70.00 mV, los cuales nos estarían indicando una distribución de cargas negativas en la superficie de las partículas; esto se debe a

que el pH del látex (pH=7) es superior al pKa del ácido poliacrílico (4.75) y al punto isoelectrónico de la gelatina (5.20). La repulsión entre las partículas es elevada, lo que evita la formación de aglomerados y hace que el látex sea estable.

### Propiedades de las películas

Todos los látex formaron películas a temperatura ambiente con MFFT por debajo de 5°C, lo cual nos estaría indicando que la gelatina no tiene efecto en la MFFT del sistema híbrido. Por otro lado, la estabilidad térmica de las distintas películas se evaluó mediante TGA. Se observó que las películas híbridas presentaron tanto curvas de degradación como valores de  $T_{max}$  (temperatura de velocidad de degradación máxima) y  $T_{50\%}$  (temperatura a la que se produce el 50% de pérdida de peso)

intermedias entre sus componentes puros, indicando la sinergia entre ambos compuestos.

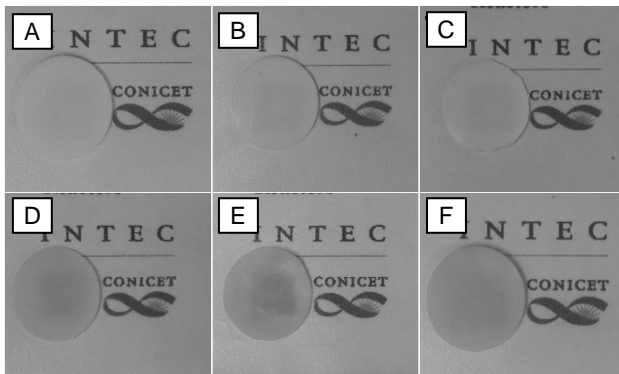


Figura 1. Películas: (A) R25%, (B) R35%, (C) R50%, (D) R25%N, (E) R35%N y (F) R50%N.

En la Fig. 1 se muestran imágenes de las películas obtenidas con los látex antes y después de su neutralización. Se puede observar que las películas obtenidas a partir del látex antes de neutralizar son más brillantes que las mismas obtenidas con los látex neutralizados. Estas últimas presentan una superficie mate, lo que sugiere una diferencia en la

rugosidad de la superficie y con esto en la adhesividad. Dado que la gelatina tiene un carácter más hidrófilo que el polímero acrílico, se puede predecir que los films con mayor cantidad de gelatina presentaran menor resistencia a la inmersión en agua. Esto puede apreciarse en el ensayo de permeabilidad, donde se observó que R50% se disolvió inmediatamente después de la inmersión, mientras que R25% y R35% resistieron de 6 a 4 horas de ensayo hasta de comenzar a desintegrarse. Se notó también un cambio de comportamiento de las muestras sometidas al proceso de neutralización; las mismas soportaron mayor tiempo de inmersión, llegando R25%N y R35%N hasta el final del estudio, 7 días, sin disolverse ni sufrir deterioro, y con valores de la masa relativa absorbida ( $A_w$ ) similares a los obtenidos con los films sin neutralizar. Por otro lado, en los dos tipos de películas se observó que la pérdida de peso ( $WL_w$ ) por disolución de la película en agua fue alrededor de 50%. En la Fig. 2 se muestran los resultados de ensayos de tracción de las diferentes películas. Las

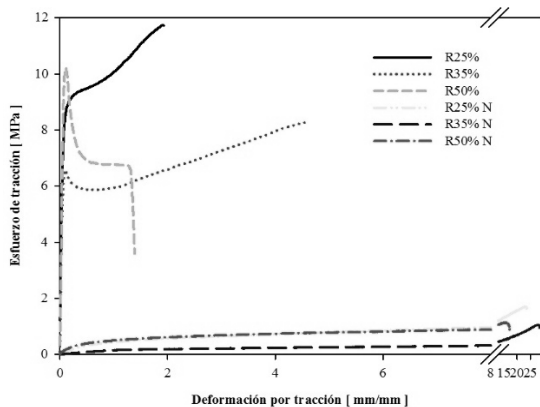


Figura 2. Ensayo mecánico de tracción de las películas obtenidas con los látex antes y después de neutralizar.

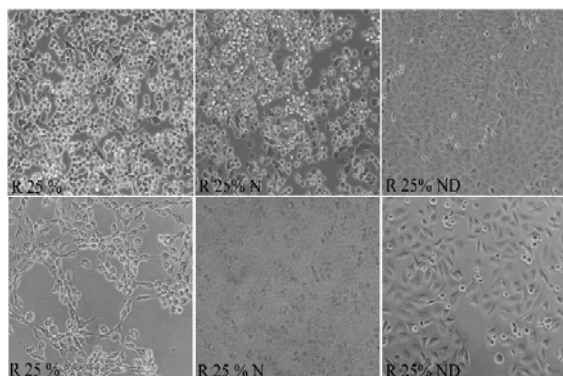


Figura 3. Imágenes de los cultivos celulares en los ensayos de citotoxicidad directo (arriba) e indirecto (abajo).

película obtenida a partir del látex con pH ácido también resultó citotóxica. Las imágenes de la Fig. 3 se correlacionan con los resultados antes expuestos.

muestras neutralizadas presentaron claramente un comportamiento mecánico diferente a las mismas sin procesar, distinguiéndose una marcada disminución tanto en el módulo de Young, la resistencia tensil, como en la dureza; y un gran aumento en la deformación de ruptura. Esto indica un notable cambio en el material formado, pasando éste de ser rígido y duro a un material más blando y acorde a una aplicación como adhesivo cuando se cambia su pH de ácido a neutro.

Sin perder de vista el posible uso de estos materiales en biomedicina, los mismos fueron sometidos a pruebas de biocompatibilidad. Cuando se analizó la actividad metabólica de las células, se observó que las muestras neutralizadas y dializadas mostraron buena compatibilidad en los ensayos de citotoxicidad indirectos. Sin embargo, en los ensayos directos, la simple neutralización no fue suficiente, ya que se observó una importante reducción de la actividad celular, < 70% del blanco, lo cual indica que tiene un potencial citotóxico (Norma ISO 10993), debido posiblemente al contenido remanente de monómeros. Como era de esperar, la

## CONCLUSIONES

Se realizó la polimerización en emulsión de BuA/AA en presencia de colágeno hidrolizado, empleando diferentes concentraciones de proteína y en ausencia de emulsificante, con el objetivo de producir látex híbridos acrílico/gelatina. La estrategia de síntesis propuesta permitió producir partículas acrílico/gelatina dispersas en agua, con propiedades de película con cierto grado de compatibilización y sinergia entre los compuestos que las componen. El material híbrido con el post tratamiento adecuado (neutralizado y dializado) mostró alto grado de biocompatibilidad, resultando un buen candidato en el campo biomédico para su posible aplicación como bioadhesivo para tejidos blandos.

## REFERENCIAS

- Pereda M.; Aranguren M. I.; Marcovich N. E.**, 2010. Caseinate films modified with tung oil. Food Hydrocolloids, 24, 800-808.
- Picchio M.L., Minari R.J., Gonzalez V.D.G., Passeggi M.C.G. Jr., Vega J.R., Barandiaran M.J., Gugliotta L.M.**, 2014. Waterborne acrylic-casein nanoparticles. Nucleation and grafting. Macromolecular Symposia, 344 (1), pp. 76-85.