

DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS BIOATIVAS COM INCORPORAÇÃO DA MICROALGA *Spirulina*

Michele Greque de Moraes¹, Christopher Stillings², Roland Dersch², Markus Rudisile², Patrícia Pranke^{3*}, Jorge Alberto Vieira Costa¹, Joachim Wendorff²

¹Laboratório de Engenharia Bioquímica, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, P.O. Box 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

²Departamento de Química, Philipps-Universität Marburg, Hans Meerwein Str., D-35032 Marburg, Alemanha.

^{3*}Laboratório de Hematologia e Células tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil – patriciapranke@ufrgs.br

O desenvolvimento de nanofibras é um processo de interesse industrial e científico devido as suas potenciais aplicações para engenharia de tecidos. A adição de compostos com propriedades bioativas, como a microalga *Spirulina* pode proporcionar melhores características as nanofibras para uso em engenharia de tecidos. O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de desenvolvimento de nanofibras de óxido de polietileno (PEO) com incorporação da microalga *Spirulina*. A adição de biomassa às nanofibras melhorou a condutividade (máximo 6,26 mS cm⁻¹) e a viscosidade (entre 0,37 e 0,60 Pa s) durante o processo de *electrospinning*. O diâmetro das nanofibras com adição de biomassa não apresentou diferença ($p < 0,05$) das nanofibras desenvolvidas a partir da solução padrão contendo 4,0% de óxido de polietileno. PEO pode ser substituído por 35,0% de biomassa microalgal, formando nanofibras sem gotas e com diâmetro médio 107 ± 12 nm, podendo ser aplicadas na área médica e de alimentos.

Palavras-chave: *electrospinning*, microalga, nanofibra, óxido de polietileno, engenharia de tecidos

The Development of bioactive nanofibers with the incorporation of microalga Spirulina.

The development of nanofibers is a process of industrial and scientific interest due to its application in tissue engineering. The addition of compounds with bioactive functions, such as the microalga *Spirulina*, can provide the best characteristics of the nanofibers for use in tissue engineering. The aim of this work was to verify the potential for the development of nanofibers made of polyethylene oxide (PEO) with the incorporation of microalga *Spirulina*. The addition of biomass to the nanofibers improved the conductivity (maximum 6.26 mS cm⁻¹) and viscosity (between 0.37 and 0.60 Pa s) for the *electrospinning* process. The nanofiber diameter formed with the solution of the addition of biomass did not show a significant difference ($p < 0.05$) in comparison with the standard solution with 4.0% polyethylene oxide. The PEO can be a substitute for 35.0% of biomass forming nanofibers without droplet with an average diameter of 107 ± 12 nm, for possible use in medical and food areas.

Keywords: *electrospinning*, microalga, nanofiber, polyethylene oxide, tissue engineering.

Introdução

O desenvolvimento de nanofibras é um processo de interesse industrial e científico devido as suas potenciais aplicações em nanocompostos, embalagens para alimentos, materiais para roupas, biosensores para alimentos, nanoeletrônicos, membranas hidrofóbicas, membranas filtrantes, nanocatálises e suportes para engenharia de tecidos (SOMBATMANKHONG et al. 2006).

O *electrospinning* emprega forças eletrostáticas para produzir nanofibras com diâmetros variando de 10 nm a 10 μ m. Alguns estudos são direcionados aos efeitos das condições do

electrospinning na morfologia das fibras formadas. A influência da concentração do polímero, solvente, adição de sal, voltagem, vazão da solução e distância do capilar ao coletor na estrutura das nanofibras, têm sido estudadas utilizando óxido de polietileno (PEO).

O PEO é um polímero que apresenta baixo custo e biocompatibilidade com tecidos e células, podendo ser utilizado em aplicações biomédicas, como no desenvolvimento de curativos. PEO pode ser utilizado em adição a outros polímeros, biocompostos ou microrganismos com funções específicas, auxiliando na formação de nanofibras uniformes (SAFI et al. 2006). A incorporação de compostos bioativos a nanofibras produzidas para uso na medicina, pode auxiliar o desenvolvimento das células, proporcionando eficiente crescimento e aumentando a resistência celular a condições adversas.

A *Spirulina* é uma microalga certificada pelo FDA (Food and Drug Administration) como GRAS (Generally Recognized As Safe), podendo ser utilizada como alimento ou fármaco sem oferecer riscos à saúde. Esta microalga tem sido produzida em grande escala para uso como alimentos e como fonte de produtos farmacêuticos e bioquímicos, podendo ser utilizadas também como fertilizante e energia. Devido ao seu conteúdo nutricional rico em proteínas, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais as microalgas têm sido estudadas nos EUA, Japão, Índia e França para produção de alimentos no combate a desnutrição. No sul do Brasil, as margens da Lagoa Mangueira, uma planta piloto produz 50 kg/mês de *Spirulina* para enriquecimento de alimentos, distribuídos na merenda de crianças da região.

Estudos clínicos sugerem que compostos presentes na biomassa de *Spirulina* apresentam funções terapêuticas, como os polissacarídeos com efeito anti-inflamatório, ácidos graxos com propriedades antibacteriana e antifúngica (BOROWITZKA, 1995) e Calcium Spirulan citado como responsável por inibir metástase pulmonar em humanos, prevenindo adesão e proliferação de células tumorais. Outras características foram atribuídas à biomassa de *Spirulina*, como redução do colesterol no sangue, inativação parcial da replicação de HIV-1 em células de humanos (HIRAHASHI et al., 2002), estímulo do sistema imunológico e lactobacilos intestinais, redução de hiperlipidemia, obesidade e dos efeitos da radiação, drogas e metais pesados (COSTA et al. 2004).

O presente trabalho teve como objetivo verificar o potencial de desenvolvimento de nanofibras de óxido de polietileno com incorporação de biomassa de *Spirulina*.

Experimental

Microorganismo e pré tratamento da biomassa

A microalga utilizada neste estudo foi *Spirulina* LEB 18 (*Arthrospira* LEB 18) isolada da Lagoa Mangueira no sul do Brasil localizada entre o Oceano Atlântico e a Lagoa Mirim (entre as

latitudes 32°32'05''S e 33°31'57''S) (MORAIS et al. 2008). Esta microalga foi cultivada na planta piloto localizada às margens da Lagoa Mangueira em 3 biorreatores tipo raceway de 10.000 L cada.

A biomassa microalgal foi colhida, utilizando filtro de 200 μm . A biomassa colhida foi concentrada em prensa hidráulica e extrusada. Após extrusão a biomassa foi seca a 50°C durante 4 h em secador de bandejas, moído em moinho de bolas, embalada a vácuo e armazenada.

Preparação das soluções para electrospinning

Soluções de óxido de polietileno (PEO) ($900.000 \text{ g mol}^{-1}$) e biomassa de *Spirulina* LEB 18 sob diferentes concentrações e proporções foram preparadas utilizando água como solvente. As amostras foram homogeneizadas em agitador magnético durante toda noite a temperatura de 21°C. Nas amostras SP1 a SP5 a concentração de PEO (4,0%, p/v) foi mantida constante e a concentração de biomassa foi incrementada. Nas amostras SP6 a SP12 a concentração de PEO na solução foi substituída pela biomassa. Foi realizado *electrospinning* em amostra contendo somente PEO para ser utilizada como padrão.

Processo de electrospinning

No processo de *electrospinning* as soluções foram injetadas através de capilar com diâmetro 0,45 e 0,7 mm. O eletrodo de polaridade positiva foi conectado a extremidade do capilar e o isolamento foi conectado ao coletor de alumínio. As distâncias estudadas entre a extremidade do capilar e o coletor foram de 140 a 200 mm. O potencial elétrico aplicado variou de 6,3 a 31,3 kV. A vazão da solução foi entre 0,7 e 3,5 $\mu\text{L min}^{-1}$, controlado através de bomba ligada à pipeta. Todos os experimentos foram conduzidos a temperatura de 21°C.

Caracterização das nanofibras

A morfologia das nanofibras foi observada em microscópio eletrônico de varredura (SEM) (Jeol JSM-7500F, Alemanha). A média do diâmetro das nanofibras foi determinada pela medida de 30 diferentes pontos através das imagens do SEM. Os diâmetros das nanofibras foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tuckey para comparação entre médias dos diâmetros com nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

A viscosidade aparente e a condutividade das soluções foram determinadas através de viscosímetro (Haake PK100, Alemanha) e condutivímetro digital (Inolab, Alemanha), respectivamente.

Resultados e Discussão

Nas amostras SP1 a SP5, em que a concentração de PEO foi mantida em 4,0% e a concentração de biomassa microalgal de *Spirulina* LEB 18 variou de 1,3 a 12,0%, verificou-se aumento da condutividade da solução à medida que a concentração de biomassa foi incrementada. A condutividade variou de 0,0012 mS cm⁻¹, na amostra contendo 4,0% PEO e 1,3% biomassa microalgal, chegando ao máximo 6,26 mS cm⁻¹, na solução com 4,0% PEO e 12,0% biomassa.

O mesmo comportamento foi observado nas amostras SP6 a SP12, onde o polímero foi gradativamente substituído pela biomassa microalgal e a concentração final da solução foi 4,0%. A menor condutividade foi 0,0002 mS cm⁻¹ na solução contendo 3,8% PEO e 0,2% biomassa microalgal, e a máxima 0,0019 mS cm⁻¹, contendo 1,8% PEO e 2,2% biomassa.

As amostras SP3, SP4 e SP5, que possuem as maiores concentrações de biomassa microalgal, apresentaram os máximos valores de condutividade (2,82; 4,71; 6,26 mS cm⁻¹, respectivamente), comparadas as amostras com menores concentrações de biomassa. LU et al. (2006) obtiveram o mesmo comportamento quando desenvolveram nanofibras adicionando alginato de sódio ao PEO, aumentando a condutividade de 2,43 a 4,16 mS cm⁻¹.

Neste estudo, a condutividade variou em função da concentração de biomassa adicionada à solução. A amostra padrão contendo somente 4,0% PEO, apresentou à menor condutividade, comparada as soluções com adição de biomassa (0,00007 mS cm⁻¹).

O aumento da condutividade proporciona incremento das cargas durante o *electrospinning*. Para o desenvolvimento de nanofibras uniformes, sem formação de gotas, é necessário que o processo seja contínuo. Entretanto, deve haver cargas suficientes para que as forças repulsivas aplicadas à solução possam superar a superfície de tensão. A repulsão das cargas na superfície da solução também proporciona o alongamento da mesma, melhorando a formação de nanofibras (RAMAKRISHNA et al. 2005).

As amostras SP1 a SP5, que possuíam concentração constante de PEO, apresentaram incremento da viscosidade com aumento da concentração de biomassa microalgal, variando entre 0,44 Pa s, na solução contendo 1,3% de biomassa, e 0,92 Pa s quando houve adição de 12,0% biomassa microalgal. As amostras com substituição de PEO pela biomassa resultou em redução da viscosidade da solução.

A concentração da solução afeta diretamente a qualidade de nanofibras desenvolvidas pelo método de *electrospinning*. A baixa viscosidade em soluções pouco concentradas proporciona formação de gotas nas nanofibras. O aumento da concentração causa incremento na viscosidade da solução devido ao melhoramento na malha da cadeia molecular, mantendo a continuidade do jato durante o *electrospinning* (WANG et al. 2008). As amostras SP11 (1,8% PEO e 1,8% biomassa

microalgal) e SP12 (1,8% PEO e 2,2% biomassa microalgal) apresentaram baixas viscosidades (0,20 e 0,33 Pa s, respectivamente) o que influenciou a formação de nanofibras com gotas. Nanofibras com gotas possuem menor tensão de quebra comparadas as fibras uniformes, e portanto, menor resistência (LU et al. 2006), desta forma sua utilização se restringe a aplicações em que não é necessário essa característica, como transporte de drogas no organismo.

As amostras SP3 e SP4, que possuíam as máximas concentrações de biomassa microalgal e, conseqüentemente, maior viscosidade, apresentaram nanofibras com diâmetros 107 ± 13 nm e 110 ± 10 nm, respectivamente. LU et al. (2006) através do processo de *electrospinning* utilizando soluções contendo sódio alginato e PEO na razão 2:1 e 1:1 (correspondente as amostras SP3 e SP4 deste trabalho), obtiveram fibras com diâmetro 117 e 228 nm, respectivamente. Fibras com menores diâmetros apresentam razão superfície-área maior, proporcionando adesão, migração e proliferação celular (CHOI et al. 2004).

As amostras SP9 e SP10, em que houve substituição de 25,0 e 35,0% de biomassa por PEO, apresentaram diâmetros 105 ± 18 nm e 107 ± 12 nm, respectivamente (Figura 1). Segundo SAFI et al. (2006), soluções contendo alginato de sódio e PEO nas razões 50:50 e 30:70, foram formadas fibras uniformes, sem gotas e com diâmetros de 99,1 e 109,0 nm, respectivamente.

A amostra padrão contendo apenas 4,0% PEO não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) no diâmetro das nanofibras das amostras SP3, SP4, SP9 e SP10, mostrando que a adição de biomassa microalgal não prejudica o diâmetro das fibras.

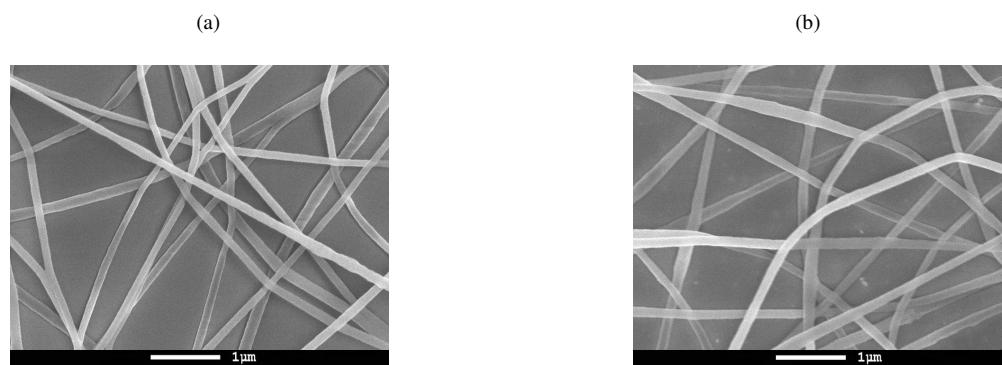


Figura 1: Microscopia eletrônica (SEM), sob aumento de 22.000 vezes, das nanofibras desenvolvidas com soluções contendo 3,0% óxido de polietileno e 1,0% biomassa microalgal de *Spirulina* LEB 18 (a); e 2,6% óxido de polietileno e 1,4% biomassa microalgal de *Spirulina* LEB 18 (b).

Conclusões

O diâmetro das nanofibras da amostra padrão contendo 4,0% PEO não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) do diâmetro das nanofibras com adição de biomassa. A redução da quantidade de polímero para adição de biomassa microalgal proporciona viscosidade e

condutividade adequados para o processo de *electrospinning*, apresentando valores entre 0,37 e 0,60 Pa s de viscosidade e condutividade máxima 6,26 mS cm⁻¹. PEO pode ser substituído por 35,0% de biomassa microalgal, melhorando a qualidade do processo, reduzindo custos com polímero e desenvolvendo nanofibras bioativas que podem ser utilizadas, principalmente, na área médica e alimentícia e com diâmetro de 107 ± 12 nm.

Referências Bibliográficas

1. J. A. V. Costa; L. M. Colla; P. F. Filho. *Bioresource Technol.* 2004, 92, 237.
2. J. S. Choi; S. W. Lee; L. Jeogn, S. Bae; B. C. Min; J. H. Youk, W. H. Park. *Int J Biol Macromol.* 2004, 34, 249.
3. K. Sombatmankhong; O. Suwantong; S. Waleetorncheepsawat. *J Appl Polym Sci. Part B: Polymer Physics.* 2006, 44, 2923.
4. M. A. Borowitzka. *J Appl Phycol.* 1995, 7, 15.
5. M. G. Morais; C. C. Reichert; F. Dalcanton; A. Durante; L. F. Marins; J. A. V. Costa. *Z. Naturforsch.* 2008, 63c, 144.
6. S. Ramakrishna; K. Fujihara; W. E. Teo; T. C. Lim; Z. Ma. *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.* 2005.
7. S. Safi; M. Morshed; S. A. Ravandi; M. Ghiaci. *J Appl Polym Sci.* 2006, 104, 3245.
8. T. Hirahashi; M. Matsumoto; K. Hazeki; Y. Saeki; M. Ui; T. Seya. *Int Immunopharmacol.* 2002, 2, 423.
9. X. Wang; K. Zhang; M. Zhu; H. Yu; Z. Zhou; Y. Chen; B. Hsiao. *Polymer.* 2008, 49, 2755.
10. W. J. Zhu, L. Y. Hu; Z. X. Guo; P. Hu; J. Yu. *Polymer.* 2006, 47, 8026.