

Avaliação da citotoxicidade de nanofibras de poli(butileno adipato-co-tereftalato) com nanohidroxiapatita e nanotubos de carbono superhidrofílicos incorporados

E. Silva*, G.F. Santana-Melo**, T. Ferreira*, A.S. Silva*, N.C.S. Leite*, L.M.R. Vasconcelos**, F.R. Marciano*, A.O. Lobo*.

* Laboratory of Biomedical Nanotechnology, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

** Laboratory of Studies Interdisciplinary of Cell Culture, Univ. Estadual Paulista, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

E-mail: aolobo@pq.cnpq.br

Resumo: A associação entre matrizes poliméricas biorreabsorvíveis com nanohidroxiapatita e nanotubos de carbono vem se mostrando emergente e promissora, principalmente pela capacidade em mimetizar o ambiente *in vivo* e pela eficiência em atuar como reforço estrutural, respectivamente. Neste trabalho foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* de nanofibras de poli(butileno adipato-co-tereftalato) com nanopartículas de interesse biomédica incorporadas, produzidas por eletrospinning. Os resultados mostraram que as nanofibras com nanopartículas incorporadas não apresentaram toxicidade às células, e ainda exibiram um ambiente mais favorável ao desenvolvimento celular da linhagem MG63 quando comparadas a amostra controle de PBAT, exibindo diferença estatisticamente significativa no período inicial de 3 dias ($p < 0,05$). Concluiu-se que nanofibras de PBAT incorporadas com nanopartículas podem ser consideradas um biomaterial atrativo para aplicação biomédica.

Palavras-chave: Eletrospinning; PBAT, Nanotubos de Carbono; Nanohidroxiapatita, viabilidade celular.

Abstract: *The combination of bioresorbable polymeric matrices with nanohydroxyapatite and carbon nanotubes has proved emerging and promising, especially the ability to mimic the in vivo environment and efficiency to serve as structural reinforcement, respectively. This work evaluated the in vitro cytotoxicity of nanofibers of poly (butylene adipate-co-terephthalate) with nanoparticles embedded biomedical interest, produced by electrospinning. The experimental results showed that the nanofibers with incorporated nanoparticles showed no toxicity to cells, and also showed a more favorable development of MG63 cell line environment when compared to a control sample of PBAT, showing statistically significant difference in the initial period of 3 days ($p < 0.05$). We conclude that nanofibre PBAT particles can be incorporated with an attractive biomaterial for biomedical application.*

Key-words: *electrospinning, PBAT, carbon nanotube, nanohydroxyapatite, cell viability.*

Introdução

O processo de eletrospinning consiste em, através da aplicação de alta tensão em uma solução polimérica, deslocar o material através da atmosfera no sentido do campo elétrico gerado. Através desta técnica, é possível produzir emaranhados de fibras poliméricas de ordem de grandeza micro e nanométricas, as quais são de grande interesse como biomateriais.¹⁻³

Hidroxiapatita (HAp) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ é o principal componente inorgânico do osso humano, apresentando como base o fosfato de cálcio. A composição química e a estrutura cristalina da HAp são similares ao componente mineral do osso e dente humano. A HAp apresenta características como adequada bioatividade, biocompatibilidade e biodegradação, sendo muito usada em aplicações biomédicas. No entanto, suas propriedades mecânicas são limitadas, tais como fragilidade e baixa resistência ao desgaste, limitando o uso da HAp em implantodontia.^{4, 5} A HAp também pode conferir excelente osteocondutividade quando seu cristal for semelhante à apatita biológica. Por esta razão, torna-se interessante a redução do tamanho do cristal de HAp à escala nanométrica (nHAp).⁶

Recentes trabalhos relataram que nanopartículas podem conduzir a um depósito mais eficiente de minerais ao redor de implantes. Entre estes materiais, os nanotubos de carbono de múltiplas paredes (CNT, multi-walled carbon nanotube) estão despertando o interesse de pesquisadores na área biomédica, devido à sua excepcional combinação de propriedades mecânicas/química, biocompatibilidade e facilidade de incorporação de grupos funcionais.^{7, 8} Superfícies hidrofílicas são geralmente favoráveis à fixação das células e biomineralização do tecido ósseo.⁹

Algumas investigações vêm sendo realizadas sobre a síntese de poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) associado com diferentes nanopartículas.¹⁰ No entanto, a aplicação de PBAT incorporado com nHAp e o CNT visando aplicação biomédica tem sido pouco estudado. Assim, o objetivo neste trabalho foi desenvolver a técnica de fabricação, por meio de eletrospinning, de nanofibras de PBAT, PBAT incorporado com nHAp e incorporado com CNT, bem como avaliar a citotoxicidade *in vitro* destes materiais.

Materiais e métodos

Produção dos nanotubos de carbono superhidrofílicos

Os nanotubos de carbono foram produzidos à pressão atmosférica e temperatura de 850 °C, na parede de um tubo de quartzo, pelo método de Deposição termoquímica a vapor. O Carbono (Cânfora, C₁₀H₁₆O₂, 84% da massa total) e as fontes do catalisador Fe (Ferroceno, Fe (C₅H₅)₂, 16%) foram evaporadas a 200 °C e inseridas no tubo de quartzo por um fluxo de N₂ de 1.5 LPM. Após 5 minutos de reação, os vapores foram cortados e a estufa resfriada à temperatura ambiente, sob fluxo de N₂. O processo de purificação, para a remoção das nanopartículas de Fe dos nanotubos de carbono (CNT) produzidos, foi realizado pela técnica de recozimento em alta temperatura sob atmosfera livre de oxigênio (N₂). Realizou-se tratamento de funcionalização dos CNT incorporando grupos que contem oxigênio, para proporcioná-los caráter superhidrofílico. O processo foi realizado em um reator de plasma com corrente pulsada direta, com um fluxo de oxigênio de taxa 1 sccm, pressão de 85mTorr, -700 V, frequência de pulso de 20kHz, a 50% do ciclo de trabalho, durante 5 intervalos de tempo de 40 minutos cada.¹¹

Produção da nanohidroxiapatita (nHAp)

Para a produção da nHAp¹², foram utilizados os reagentes: Ca (NO₃)₂ 4H₂O e (NH₄) H₂PO₄ (Synth). Primeiramente dissolveram-se os sais em 50 mL de água deionizada. O volume total da solução foi de 200 mL. O controle do pH foi realizado inserindo-se solução de NH₄OH (25% v/v). A mistura foi sonicada utilizando uma sonda ultrassônica (Vibracell Sonics, 500 W) por 30 min, produzindo um precipitado leitoso/gelatinoso. Após esse período o precipitado foi deixado em repouso em estufa durante 48 horas a 60 ° C, após seco o material foi triturado utilizando moinho analítico modelo A11, marca IKA, com velocidade do motor de 28000 rpm¹³.

Produção da solução polimérica

Para a produção das soluções poliméricas utilizou-se o polímero comercial PBAT fornecido pela BASF (Ecoflex). Primeiramente foi dissolvido o PBAT (12% m/v) em clorofórmio. Separadamente, dispersou-se 1% (m/v) de pós de nHAp e CNT em dimetilformamida (DMF). As dispersões das nanocargas deram-se através de agitação com uma ponteira de ultrassom (Sonic VCX-500) por 60 minutos. Após esta etapa, inseriram-se os respectivos grupos contendo as nanocargas às soluções de clorofórmio + PBAT (12% mv) e manteve-se sob agitação magnética durante 24 horas em sistema fechado, com umidade e temperatura controlados. A Tabela 1 demonstra os grupos das soluções.

Tabela 1 – Divisão dos grupos de amostras

Grupo	Solvente
A	PBAT (12%)
B	PBAT (12%) + CNT (1%)
C	PBAT (12%) + nHAp (1%)

Eletrofiliação das soluções poliméricas

As soluções poliméricas foram eletrofiadas em um sistema adaptado, de baixo custo relativo, utilizando uma fonte de alta tensão da marca BERTAN 230-30R. O processo deu-se a uma distância de 10 cm e tensão de 12 kV, à atmosfera ambiente de 23°C. Foram controlados também os parâmetros de umidade relativa do ar, mantendo esta em 60%. As amostras foram coletadas em um contraeletrodo plano de aço 316L, recoberto por papel alumínio, no intuito de facilitar a remoção das mesmas. O processo durou 40 minutos para cada amostra.

Caracterização morfológica e estrutural das nanofibras

As amostras dos respectivos grupos foram caracterizadas através de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) da marca Zeiss, modelo EVO MA10. A seguir, imagens das fibras com aumentos de 1000 e 6000 vezes.

Teste de Viabilidade Celular

A biocompatibilidade das amostras, PBAT, PBAT+nHAp, PBAT+CNT, foi analisada utilizando teste de citotoxicidade *in vitro*. Inicialmente células osteoblásticas (MG63 Cell line human) (Sigma-Aldrich, EUA) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, N.Y., USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Previamente ao plaqueamento celular, as amostras foram colocadas em lâminulas de vidro com 13 mm de diâmetro (Fisherbrand / Microscope Cover Glass) e hidratadas por 24 horas no meio de cultura. Após a hidratação as amostras foram esterilizadas com lâmpada ultravioleta (UV) em fluxo laminar (Veco, Campinas, Brasil) por 6 horas e posteriormente colocadas em placas de 24 poços, nos quais foram adicionados 1 ml de meio DMEM e 2x10⁴ de cultura celular MG63. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C até o período de análise.

O teste de citotoxicidade foi realizado utilizando a técnica de redução do sal de tetrazolium - MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolol - Sigma-Aldrich, EUA) pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase presente na matriz de mitocôndrias de células viáveis. Após 3 e 7 dias de

incubação, todo o meio foi aspirado e foram colocados 500 μ l de MTT (0,5mg/mL) em cada poço, a placa foi incubada por 1 hora em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida o MTT foi retirado e foram colocados 500 μ L de DMSO (Dimetil Sulfóxido, Sigma-Aldrich, USA), a placa foi colocada no shake (Solab Científica, Piracicaba, Brasil) sob agitação constante por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esse período foram transferidos 100 μ L de cada poço para uma placa de 96 poços plana e a quantificação foi feita em espectrofotômetro (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Áustria) com filtro de 570nm. O poliestireno da superfície da placa de cultura de 24 poços com o crescimento celular sem a imersão do biomaterial foi adotado com controle negativo para validação do teste, enquanto 5% de DMSO em meio DMEM FBS a 10% serviu como controle positivo, causando citotoxicidade.¹⁴

Os experimentos foram realizados com n=3 e os dados analisados por meio do programa GraphPad Prism. O teste estatístico utilizado foi ANOVA um fator e quando necessário também foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Caracterização das nanofibras

As amostras foram submetidas à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para analisar morfológicamente as blendas formadas, a disposição e formato das fibras, e a determinação de seus diâmetros, e os resultados obtidos estão na Figura 2.

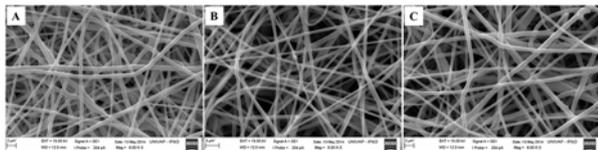


Fig 2. Micrografia das mantas de nanofibras de (A) PBAT, (B) PBAT+CNT (1%) e (C) PBAT+nHAp (1%) eletrofiadas.

A análise morfológica das blendas, por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura, mostrou a disposição entre as fibras, seu diâmetro e formato. A figura 2A, mostra a micrografia de PBAT sem incorporação de CNT, pode-se analisar a disposição das mesmas que são desalinhadas, de diâmetro médio de 674,25nm e possui formato liso. Já na micrografia 2B, pode-se notar a diferença nos diâmetros e em sua espessura, a fibra com CNT incorporado possui formato levemente rugoso, diâmetro médio de 758,95nm e também estão emaranhadas, no entanto o espaçamento entre uma fibra e outra é maior. Na figura 2C, após a incorporação de nHAp (1%) os diâmetros são similares aos apresentados pela Figura 2B. Pode-se concluir que a distribuição de PBAT em todas as blendas é homogênea. Como visto na literatura a porosidade e disposição do polímero influencia como fator determinante na

velocidade de degradação o que induz o crescimento celular.¹⁵

Viabilidade celular

A Figura 3 apresenta o gráfico comparativo da viabilidade celular dos grupos experimentais PBAT+CNT e PBAT+nHAp com o grupo controle PBAT. Observou-se que no período de 3 dias houve diferença estatisticamente significativa do percentual de viabilidade celular entre as amostras ($p < 0,05$). Entretanto no período de 7 dias, não foi observada diferença estatística entre os índices de viabilidade celular ($p > 0,05$).

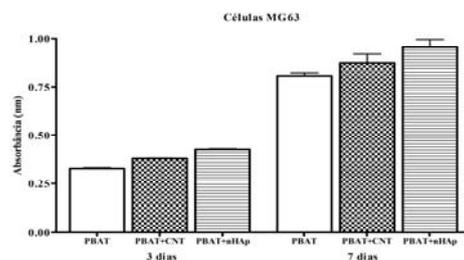


Fig 3. Viabilidade celular de MG63 por meio de ensaio de MTT.

Discussão

Neste estudo, a citotoxicidade de amostras de PBAT incorporadas ou não com nHAp ou CNT foram analisadas *in vitro*, utilizando células MG63, por meio do teste MTT. Os resultados mostraram que as nanopartículas de CNT e HAp incorporadas ao PBAT não induzem efeitos citotóxicos nesta linhagem celular, uma vez que permitiram adesão e proliferação destas e apresentaram melhores resultados nos dois períodos estudados em relação ao PBAT. Pesquisas atuais buscam a incorporação de nanopartículas nas soluções poliméricas para o processo de produção de nanofibras por eletrofição¹⁻³. A finalidade destes novos materiais é associar as melhoras nas propriedades mecânicas e a aceleração do processo de osteogênese *in vitro* e osseointegração *in vivo* utilizando nHAp¹⁶. O ensaio MTT avalia a toxicidade do material através da quantificação da viabilidade celular, uma vez que apenas células viáveis com mitocôndrias funcionais podem oxidar o sal de tetrazolium (MTT), resultando em cristais de formazan que são mensurados quantitativamente em espectrofotômetro, onde a absorbância é proporcional ao número de células viáveis na cultura analisada¹⁷⁻¹⁹. Os resultados mostraram que as nanofibras produzidas de PBAT+CNT e PBAT+nHAp exibiram maior crescimento celular que a nanofibra controle de PBAT, independente do período avaliado. Entretanto apenas no período de 3 dias foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Conclusão

Concluiu-se que nanofibras de PBAT incorporadas com nanopartículas de nHAp e CNT não apresentaram toxicidade quando submetidas ao teste de viabilidade

celular por MTT, podendo ser consideradas como um biomaterial atrativo para aplicação biomédica.

Agradecimentos

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

Referências

- [1] Shin SH, Purevdorj O, Castano O, Planell JA, Kim HW: A short review: Recent advances in electrospinning for bone tissue regeneration. *Journal of tissue engineering* 2012, 3:2041731412443530.
- [2] Szentivanyi AL, Zernetsch H, Menzel H, Glasmacher B: A review of developments in electrospinning technology: new opportunities for the design of artificial tissue structures. *The International journal of artificial organs* 2011, 34:986-97.
- [3] Teo WE, Ramakrishna S: A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology* 2006, 17:R89-R106.
- [4] Doostmohammadi A, Monshi A, Salehi R, Fathi MH, Karbasi S, Pieles U, Daniels AU: Preparation, chemistry and physical properties of bone-derived hydroxyapatite particles having a negative zeta potential. *Materials Chemistry and Physics* 2012, 132:446-52.
- [5] Farrokhi-Rad M, Shahrabi T: Effect of suspension medium on the electrophoretic deposition of hydroxyapatite nanoparticles and properties of obtained coatings. *Ceramics International* 2014, 40:3031-9.
- [6] Thomas V, Dean DR, Jose MV, Mathew B, Chowdhury S, Vohra YK: Nanostructured biocomposite scaffolds based on collagen coelectrospun with nanohydroxyapatite. *Biomacromolecules* 2007, 8:631-7.
- [7] Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE: Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology letters* 2005, 155:377-84.
- [8] Saito N, Usui Y, Aoki K, Narita N, Shimizu M, Ogiwara N, Nakamura K, Ishigaki N, Kato H, Taruta S, Endo M: Carbon nanotubes for biomaterials in contact with bone. *Current medicinal chemistry* 2008, 15:523-7.
- [9] Sawase T, Jimbo R, Baba K, Shibata Y, Ikeda T, Atsuta M: Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clinical oral implants research* 2008, 19:491-6.
- [10] Fukushima K, Rasyida A, Yang MC: Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites. *Appl Clay Sci* 2013, 80-81:291-8.
- [11] Lobo AO, Ramos SC, Antunes EF, Marciano FR, Trava-Airoldi VJ, Corat EJ: Fast functionalization of vertically aligned multiwalled carbon nanotubes using oxygen plasma. *Mater Lett* 2012, 70:89-93.
- [12] Barbosa MC, Messmer NR, Brazil TR, Marciano FR, Lobo AO: The effect of ultrasonic irradiation on the crystallinity of nano-hydroxyapatite produced via the wet chemical method. *Mat Sci Eng C-Mater* 2013, 33:2620-5.
- [13] Lobo AO, Zanin H, Siqueira IAWB, Leite NCS, Marciano FR, Corat EJ: Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites. *Mat Sci Eng C-Mater* 2013, 33:4305-12.
- [14] Son SR, Linh NTB, Yang HM, Lee BT: In vitro and in vivo evaluation of electrospun PCL/PMMA fibrous scaffolds for bone regeneration. *Sci Technol Adv Mat* 2013, 14.
- [15] Fukushima K, Rasyida A, Yang MC: Biocompatibility of organically modified nanocomposites based on PBAT. *J Polym Res* 2013, 20.
- [16] Kim HW, Lee HH, Knowles JC: Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2006, 79A:643-9.
- [17] Maheshwari SU, Samuel VK, Nagiah N: Fabrication and evaluation of (PVA/HAp/PCL) bilayer composites as potential scaffolds for bone tissue regeneration application. *Ceram Int* 2014, 40:8469-77.
- [18] Serrano MC, Gutierrez MC, del Monte F: Role of polymers in the design of 3D carbon nanotube-based scaffolds for biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2014, 39:1448-71.
- [19] Kalia S, Boufi S, Celli A, Kango S: Nanofibrillated cellulose: surface modification and potential applications. *Colloid Polym Sci* 2014, 292:5-31.