

ANALISE DA BIOATIVIDADE E EFEITO BACTERICIDA DO NOVO COMPÓSITO DE nHap/MWCNT FUNCIONALIZADOS

N. C. S. Leite 1*, N. S. da Silva 2**, F. R. Marciano 3*, A. O. Lobo 4*

*Universidade do Vale do Paraíba, Laboratório de Nanotecnologia Biomédica, São José dos Campos, Brasil

** Universidade do Vale do Paraíba, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, São José dos Campos, Brasil
nelly.leite@gmail.com

Resumo: A hidroxiapatita é amplamente utilizada em aplicações biológicas, como substituto ósseo por apresentar boa bioatividade, biocompatibilidade e osteocondutividade, porém apresenta propriedades mecânicas deficientes, a adição de nanotubos de carbono de múltiplas paredes –MWCNT (Multi-walled carbon nanotubes) em sua estrutura visa melhorar essas propriedades, criando uma nova classe de nanocompósito. Foi avaliado e comprovado a bioatividade desse novo material imerso por 14 dias em fluido corporal simulado (SBF – simulated body fluid) pela presença de hidroxiapatita carbonatada em sua superfície depois do período de imersão. O material também mostrou ter efeito bactericida tanto em bactérias gram positivas como gram negativas. Esses resultados indicam o grande potencial do novo nanocompósito para aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, nanotubo de carbono de múltiplas paredes, bioatividade, efeito bactericida.

Abstract: *Hydroxyapatite is widely used in biological applications such as bone substitute due to its good bioactivity, biocompatibility and osteoconductivity, however has deficient mechanical properties, the addition of multi-walled carbon nanotubes - MWCNT in its structure aims to improve these properties, creating a new class of nanocomposite. In this work was evaluated and demonstrated the bioactivity of this new material after immersion for 14 days in simulated body fluid (SBF-simulated body fluid) by the presence of carbonated hydroxyapatite on surface of material. The material also showed a bactericidal effect on both gram-positive and gram-negative bacterial. These results indicate the great potential of this new nanocomposite for biomedical applications.*

Keywords: *Hydroxyapatite, multi-walled carbon nanotube, bioactivity, bactericidal effect.*

Introdução

Hidroxiapatita (HAp) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ é o principal componente inorgânico do osso humano. Ela tem como base fosfato de cálcio e sua composição química e estrutura cristalina são similares ao componente mineral do osso e dente humano. HAp tem boa bioatividade, biocompatibilidade, osteocondutividade e biodegradação com essas características ela é extensamente usada em

aplicações biomédicas. No entanto, suas propriedades mecânicas são pobres, tais como a fragilidade e a baixa resistência ao desgaste, limitando o uso da HAp em aplicações de implantes [1, 2].

A HAp confere excelente osteocondutividade se o cristal for semelhante à apatita biológica. Por esta razão, a redução do tamanho do cristal de nanoescala HAp é de interesse [3].

Os nanotubos de carbono de múltiplas paredes MWCNTs (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 [4, 5]. Superfícies hidrofílicas são geralmente favoráveis à fixação das células e biomineralização do tecido ósseo [6]. Algumas investigações têm sido realizadas sobre a síntese de nHAp e MWCNT usando vários métodos para obter nanocompósitos nHAp / MWCNT [7]. No entanto, para o desenvolvimento de compósitos à base de nHAp/MWCNT necessita-se modificar a superfície dos MWCNTs incorporando grupos carboxílicos [8].

Recentemente Lobo e colaboradores [9], desenvolveram um novo método para a fabricação de compósitos à base de nHAp/MWCNT após a modificação de superfície com grupos carboxílicos e carboxilatos e utilização da síntese química assistida por ultrassom (nHAp / MWCNT).

O ensaio de bioatividade visa observar o comportamento de um material imerso em um fluido corporal simulado contendo aproximadamente as concentrações de sais no plasma humano sem a presença de proteínas. A interação entre o material e o SBF se dá por interações químicas, precipitando uma camada de apatitas de carbonado de cálcio na superfície dos materiais indicando a bioatividade do mesmo [10].

O sucesso na incorporação de um implante dentro do corpo depende da integração do tecido e resistência a infecção, o que é influenciada pela adesão de células e bactérias às superfícies [11]. O uso de dispositivos médicos (próteses, cateteres, stent, etc) expandiu-se nos últimos anos devido à crescente demanda por cuidados médicos da população em envelhecimento. Atualmente esses dispositivos apresentam sucesso em termo de biocompatibilidade associado a um baixo risco de falha em seu uso [12]. As falhas ocorrem devido ao crescimento de bactérias no material ocasionando a não

biocompatibilidade do mesmo, podendo causar infecção local ou sistêmica levando à morte do paciente. Mesmo que o risco seja baixo e as falhas ocorram em uma pequena porcentagem dos pacientes, o impacto sobre toda a população e sobre os custos para os sistemas nacionais de saúde são enormes [12, 13]. Atualmente a produção de biomateriais resistentes às bactérias tem o intuito de mimetizar tanto a estrutura química, carga superficial quanto a nanotopografia de superfícies que possuem o efeito bactericida naturalmente, como por exemplo a pele de tubarão, asas de insetos, escama de peixe, e a teia produzida pela aranha, garantindo o sucesso do biomaterial [13, 14].

Neste trabalho, avaliou-se a bioatividade desta nova classe de nanobiomateriais desenvolvida (nHAp/3%MWCNT) utilizando fluido corporal simulado 1.5 SBF [15] e seu efeito bactericida sob as bactérias *E. coli* e *S. aureus* objetivando a produção de um biomaterial eficiente para aplicações biológicas.

Materiais e métodos

Os MWCNTs foram depositados na parede do tubo de quartzo por vapor químico (método CVD térmico) à pressão atmosférica e a 850 °C. Fontes de carbono (cânfora, C₁₀H₁₆O, 84% da massa total), e o catalisador de Fe (ferroceno, Fe (C₅H₅)₂, 16%) foram evaporados a 200 °C e transportado para dentro do tubo de quartzo por um fluxo de N₂ de 1,5 litros/minuto. Após 5 minutos de reação, os vapores foram cortados e o forno arrefeceu até a temperatura ambiente sob N₂. Os MWCNTs foram produzidos por cânfora/ferroceno e purificados por recozimento a alta temperatura numa atmosfera livre de oxigênio (N₂) [8]. O novo método de funcionalização dos nanotubos de carbono com multicamadas MWCNT para a incorporação de grupos contendo oxigênio foi realizada num reator de plasma pulsado de corrente contínua, com uma taxa de fluxo de oxigênio de 1 sccm, com uma pressão de 85 mTorr, -700 V e com uma frequência de pulsos de 20 kHz a 50 % ciclo de trabalho durante 40 minutos [16, 17].

Para a produção do nanocompósito, nHAp/3%MWCNT seguiu-se os procedimentos descritos na patente BR10201300578, pertencente a UNIVAP respeitando o sigilo da mesma, utilizou-se os reagentes: Ca (NO₃)₂ 4H₂O e (NH₄)₂ H₂PO₄ contendo uma quantidade de MWCNT correspondendo a 3% do peso final da amostra. Ambos reagentes foram dissolvidos separadamente em 50 mL de água deionizada. As duas soluções foram misturadas e o controle do pH foi realizado inserindo-se a solução de NH₄OH (25%), visando a manutenção do pH da mesma em torno de 10 durante todo o processo. A mistura foi sonicada utilizando uma sonda ultrassônica (Vibracell Sonics, 500 W) por 30 min, produzindo um precipitado leitoso/gelatinoso. A amostra passou pelo processo de lavagem durante 10 dias, todos os dias era retirado o sobrenadante da solução e adicionado novamente água deionizada. Após esse período retirou-se o sobrenadante pela última vez e 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 e velocidade do motor de 28000 rpm [9, 18].

A amostra de nHAp/3%MWCNT foi analisada através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), Análise da área superficial específica pelo método BET, Porosimetria por intrusão de mercúrio (PIM) e Difração de raios-X (DRX) sendo utilizado um difratograma de raios-X da marca Panalytical e modelo X'Pert Pro, sendo o sinal analisado no software HighScore 3.0 da marca Panalytical.

Para o teste de bioatividade o nanocompósito nHAp/3%MWCNT foi imerso na solução de 1.5 SBF, pH 7.4 [15] regulado com solução tampão TRIS, contendo as concentrações dos íons em mM: Na⁺ 142.0; K⁺ 5.0; Ca²⁺ 3.75; Mg²⁺ 1.5; Cl⁻ 148.8; HCO₃⁻ 4.2; HPO₄²⁻ 1.5 e SO₄²⁻ 0.5 [19]. A amostra foi incubada numa relação sólido/líquido de 1 mg/mL sem renovação do SBF, acondicionada em incubadora refrigerada de bancada, equipamento da marca Cientec, modelo CT-712-R, agitadas a 75 RPM, em temperatura em torno de 36,5 °C por 14 dias. Após imerso pelo período determinados, o nanocompósito foi lavado com água deionizada à 80 °C para remoção dos sais, filtrado utilizando papel filtrante de 200 mm, e seco em temperatura ambiente por 24 h. A análise do teste de bioatividade foi feita pela Difração de raios-X (DRX) da amostra.

Para avaliação do efeito bactericida, o nanocompósito nHAp/3%MWCNT foi disperso em tampão fosfato salino - PBS (phosphate buffered saline) estéril na proporção de 1 mg/mL e autoclavados. Foram utilizadas cepas padrão de *Eschechia coli* (ATCC 25922) gram negativa e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) gram positiva. Uma suspensão das bactérias (~10⁷ unidades formadoras de colônias) de volume de 7 µL foi imersa em tubo contendo 6 mL de meio Luria Broth (Sigma) para dispersar as bactérias uniformemente pelo período de 3 h para *E. coli* e 12 h para *S. aureus* a 37 °C conforme curva de crescimento das cepas.

O contato do material com as bactérias foi realizado incubando uma amostra de 100 µL do nanocompósito diluído em PBS em placa de 24 poços, adicionando 1000 mL de meio LB com 5 µL de bactéria suspensa pelo período de 3 h para *E. coli* e 12 h para *S. aureus* a 37 °C, o teste foi realizados em triplicata. Após o período de incubação uma alíquota de 100 µL de cada poço foi levado para medida da densidade óptica (DO) por meio da absorbância de cada poço usando um espectrofotômetro (Spectra Count, Packard). Antibiótico Gentamicina (10 mg/mL) de amplo espectro e meio Luria Broth (LB) estéril foi utilizado como controle positivo e negativo, respectivamente. Para o cálculo da ação bactericida utilizou-se a fórmula:

$$R(\%) = \frac{B-C}{B} \times 100 \quad (1)$$

Onde: R é a ação bactericida expressa em porcentagem. B é o valor médio da DO no grupo controle, e C o valor médio da DO nos grupos que foram testados.

Os dados foram analisados utilizando software Origin 8.5® pelo teste Anova one-way e Tukey ($p < 0.05$).

Resultados

A análise da área superficial pelo método BET do nanocompósito nHap/3% MWCNT indica um valor de área de $65.5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e diâmetro de poro de 3.45 nm . Pela análise de porosimetria por intrusão de mercúrio, o nanocompósito apresenta porosidade total de 97.1% .

A micrografia eletrônica de transmissão nos revela o formato e tamanho dos cristais da amostra nHap/3%MWCNT.

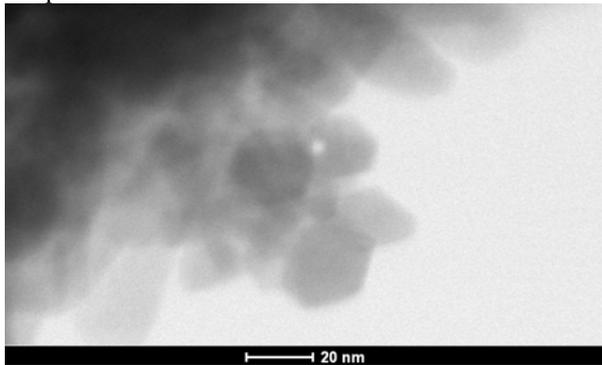


Figura 1: Micrografia da amostra de nHap/3%MCNT.

No difratograma de raios-X, Figura 2, observamos a presença de cristais de Hidroxiapatita e presença de carbonos ambos com sistema cristalino hexagonais na amostra nHap/3%MWCNT, conforme as fichas cristalográficas utilizadas.

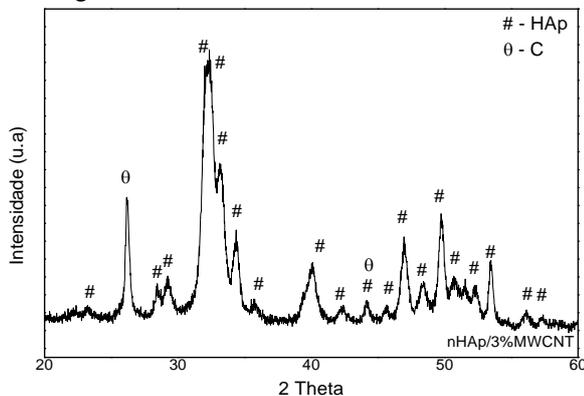


Figura 2: Difratograma de raios-X da amostra nHap/3%MCNT. Utilizado fichas cristalográfica: JCPDS 009-0432 (Hidroxiapatita) e JCPDS 026-1077 (Carbono identificado utilizando a ficha do Grafite).

Após a teste de bioatividade o difratograma de raios - X, Figura 3, indica a presença de cristais de Hidroxiapatita carbonatada na amostra, confirmando a bioatividade do material.

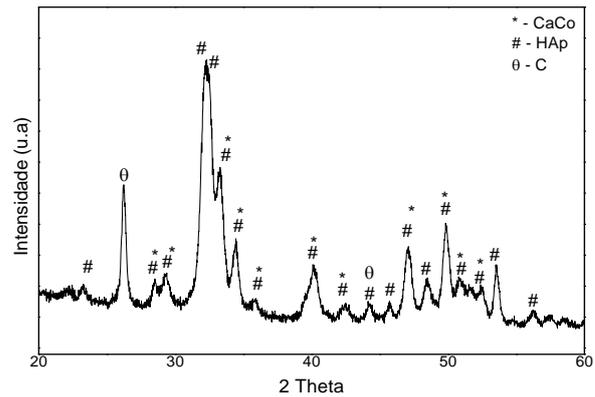


Figura 3: Difratograma de raios-X da amostra de nHap/3%MWCNT após imersão em 1.5 SBF por 14 dias. Utilizado fichas cristalográfica: JCPDS 009-0432 (Hidroxiapatita), JCPDS 004-0697 (Carbonato de Cálcio e JCPDS 026-1077 (Carbono identificado utilizando a ficha do Grafite).

Na Figura 4 observamos o efeito bactericida dos materiais nas duas cepas utilizadas, com maior efeito sobre a bactéria gram positiva *S. aureus* quando comparado à gram negativa *E. coli*.

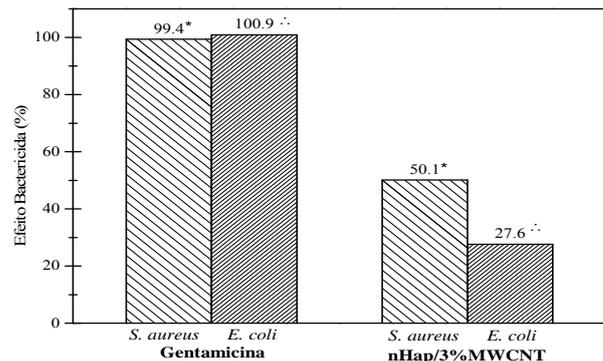


Figura 4: Efeito bactericida da amostra de nHap/3%MWCNT em contato com as cepas de *S. Aureus* e *E. coli* ($p < 0.05$).

Discussão

O método BET revelou a grande área superficial do nanocompósito nHap/3%MWCNT. Alguns autores relatam que quanto maior for a área superficial de um material em pequena quantidade, melhor será interação deste material com as células [20, 21].

A comparação dos difratogramas antes (Figura 2) e após (Figura 3) o ensaio de bioatividade nos revela que o material é capaz de interagir com o fluido corporal simulado favorecendo a formação de camada de hidroxiapatita carbonatada após o período de imersão em 1.5 SBF, indicando a bioatividade do material [19, 22].

Na micrografia eletrônica de transmissão, Figura 1, da amostra nHap/3%MWCNT observa-se o cristal de 20 nm , acredita-se que o efeito bactericida do compósito nHap/3%MWCNT visto na Figura 4, se deve por sua ação mecânica, o mesmo observado com o silício negro, que contém cristais bem finos na razão de 90 nm em sua

superfície, mimetizando a topografia das asas da libélula, lesionando as bactérias devido a tensão de deformação imposta por sua nanoarquitetura de superfície contra a membrana das bactérias gram negativas e a parede peptidoglicana e membrana interna das bactérias gram positivas, levando-as a morte [14]. O experimento será realizado novamente variando a concentração do material em contato com as cepas, a fim de identificar qual concentração é mais eficaz.

Conclusão

O nanocompósito de nHAp/3%MWCNT induziu a bioatividade *in vitro*, após a imersão em solução de 1.5x SBF durante 14 dias, promovendo a deposição de uma camada de carbonato de cálcio. Além de apresentar ação bactericida significativa, sendo mais eficaz na cepa gram positiva. Estes resultados indicam a aplicabilidade futura do nanocompósito de nHAp/3%MWCNT como scaffolds para regeneração óssea. Ensaio *in vitro* e *in vivo* serão realizados pelo nosso grupo para melhor caracterizar a bioatividade, calcificação da matriz extracelular e propriedades mecânicas do material para futuras aplicações.

Agradecimentos

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

Referências

- [1] Doostmohammadi, A., et al., Preparation, chemistry and physical properties of bone-derived hydroxyapatite particles having a negative zeta potential. *Materials Chemistry and Physics*, 2012. 132(2-3): p. 446-452.
- [2] Farrokhi-Rad, M. and T. Shahrabi, Effect of suspension medium on the electrophoretic deposition of hydroxyapatite nanoparticles and properties of obtained coatings. *Ceramics International*, 2014. 40(2): p. 3031-3039.
- [3] Thomas, V., et al., Nanostructured biocomposite scaffolds based on collagen coelectrospun with nanohydroxyapatite. *Biomacromolecules*, 2007. 8(2): p. 631-7.
- [4] Monteiro-Riviere, N.A., et al., Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology Letters* 2005. 155(3): p. 377-84.
- [5] Saito, N., et al., Carbon nanotubes for biomaterials in contact with bone. *Current Medicinal Chemistry Journal* 2008. 15(5): p. 523-7.
- [6] Sawase, T., et al., Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clinical Oral Implants Research*, 2008. 19(5): p. 491-6.
- [7] Najafi, H., Z.A. Nemati, and Z. Sadeghian, Inclusion of carbon nanotubes in a hydroxyapatite sol-gel matrix. *Ceramics International*, 2009. 35(7): p. 2987-2991.
- [8] Lobo, A.O., et al., Fast preparation of hydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned multiwalled carbon nanotube composites for bioactive application. *Langmuir*, 2010. 26(23): p. 18308-14.
- [9] Lobo, A.O., et al., Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 2013. 33(7): p. 4305-12.
- [10] Kokubo, T. and H. Takadama, How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials*, 2006. 27(15): p. 2907-15.
- [11] Cheng, L., et al., Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dental Materials*, 2012. 28(5): p. 561-572.
- [12] Campoccia, D., L. Montanaro, and C.R. Arciola, A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces. *Biomaterials*, 2013. 34(33): p. 8018-8029.
- [13] Hasan, J., R.J. Crawford, and E.P. Ivanova, Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. *Trends in Biotechnology*, 2013. 31(5): p. 295-304.
- [14] Ivanova, E.P., et al., Bactericidal activity of black silicon. *Nat Commun*, 2013. 4.
- [15] Tanahashi, M., et al., Apatite Coating on Organic Polymers by a Biomimetic Process. *Journal of the American Ceramic Society*, 1994. 77(11): p. 2805-2808.
- [16] Ramos, S.C., et al., Wettability control on vertically-aligned multi-walled carbon nanotube surfaces with oxygen pulsed DC plasma and CO₂ laser treatments. *Diamond and Related Materials*, 2010. 19(7-9): p. 752-755.
- [17] Xu, T., et al., Surface modification of multi-walled carbon nanotubes by O₂ plasma. *Applied Surface Science*, 2007. 253(22): p. 8945-8951.
- [18] Lobo, A.O., et al., Processo para produção de nanocompósito de nanoapatitas e os ditos nanocompósitos. , in Instituto Nacional da Propriedade Industrial-INPI. 2013: Brasil.
- [19] Zhu, P., Y. Masuda, and K. Koumoto, The effect of surface charge on hydroxyapatite nucleation. *Biomaterials*, 2004. 25(17): p. 3915-3921.
- [20] Huang, H.-H., et al., Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomolecular Engineering*, 2004. 21(3-5): p. 93-97.
- [21] Ranella, A., et al., Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro/nano silicon structures. *Acta Biomaterialia*, 2010. 6(7): p. 2711-2720.
- [22] Bohner, M. and J. Lemaître, Can bioactivity be tested *in vitro* with SBF solution? *Biomaterials*, 2009. 30(12): p. 2175-2179.