

ANÁLISE DA BIOATIVIDADE DE COMPÓSITO A BASE DE NANO-HIDROXIAPATITA E NANOTUBOS DE CARBONO SUPERHIDROFILÍCOS

F. A. S. Pereira, N.C.S. Leite, G. N. Salles, F.R. Marciano, A.O. Lobo*

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

*Email: aolobo@pq.cnpq.br e loboao@yahoo.com

Resumo: A associação entre nanotubos de carbono de múltiplas paredes superhidrofílicos (MWCNT-O), e nano-hidroxiapatita (nHAp) é uma alternativa promissora na área da saúde, devido à alta biocompatibilidade deste nanomaterial. Uma de suas grandes utilidades é o aprimoramento da deficiência mecânica da nHAp, sendo esta essencial para aplicabilidade em regeneração de tecido ósseo. Torna-se necessário, portanto, analisar a bioatividade deste compósito, a fim de viabilizar a aplicabilidade do mesmo para recobrimento de próteses ósseas e formação de tecidos. Neste estudo, avaliou-se a bioatividade do compósito de nHAp/MWCNT-O (1% m/v) produzidos pela síntese via úmida assistida por irradiação ultrassônica imergindo-os por até 14 dias, em fluido corporal simulado. A bioatividade foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura, medição de pH e difração de raio X. Observou-se uma elevada bioatividade, identificando a formação de nHAp carbonatada na superfície e entre os nHAp/MWCNT-O. Estes resultados são promissores para o uso de compósitos de nHAp/MWCNT-O para a regeneração de tecido ósseo.

Palavras-chave: Nano-hidroxiapatita, nanotubo de carbono de múltiplas paredes, superhidrofílicidade e bioatividade.

Abstract: The association between superhydrophilic multi-walled carbon nanotubes and nano-hydroxyapatite is a promising technique, due to the high biocompatibility of this nanobiomaterial. One of its major uses is for the improvement of hydroxyapatite mechanical failure. It is necessary to analyze the bioactivity of this biocompound, in order to enable its applicability for covering bone prosthesis and tissue formation. In this study, we evaluated the bioactivity of the nHAp/MWCNT-O (1% w/v) composites soaking them up to 14 days, in simulated body fluid (SBF). We evaluated the bioactivity using scanning electron microscopy, pH measurements and x-ray diffracton. We showed a high bioactivity identifying the carbonated nHAp presence on and between nHAp/MWCNT-O composites. These results are promising to use of nHAp/MWCNT-O composites to bone tissue regeneration.

Keywords: Hydroxyapatite, multi-walled carbon nanotube, bioactivity.

Introdução

Os nanotubos de carbono de múltiplas paredes superhidrofílicos (MWCNT-O) são excelentes candidatos para terapêutica biomédica, pois são biomateriais nanoestruturados similares à matriz extracelular. Eles apresentam combinação única de características mecânicas e químicas, facilidade de incorporação de grupos funcionais e biocompatibilidade [1, 2].

A combinação de materiais a fim de se obter um melhor conjunto de propriedades é uma técnica consolidada e o produto de tal combinação é denominado compósito.

Deste modo, paralelamente ao estudo de MWCNT-O, a nanohidroxiapatita (nHAp), forma de fosfato de cálcio de maior proeminência na fase mineral do tecido ósseo, é um componente que desperta interesse científico, pois é um material osteocondutivo e biodegradável que pode ser utilizado em implantes e fixação protética [3]. Devido a tais características, a nHAp é considerada um dos materiais mais biocompatíveis para reparação óssea [4].

Outra importante propriedade da nHAp é a osteointegração. Contudo, uma limitação da nHAp é sua baixa resistência ao desgaste e baixas propriedades mecânicas [5, 6].

Por este motivo, estudos inovadores vêm gerando compósitos com base na associação entre nHAp e MWCNT-O a fim de reduzir as limitações da HAp e aprimorar a qualidade das terapias biomédicas [4].

A interação entre as vantagens da nHAp e as características do MWCNT-O, tais como superfícies favoráveis à fixação das células e biomineralização do tecido ósseo [7], é tópico de pesquisas promissoras.

Desenvolveu-se, atualmente, uma nova metodologia para a fabricação de compósitos à base de nHAp/MWCNT-O, por modificação de superfície com grupos carboxílicos e carboxilatos e utilização da síntese química via úmida assistida por ultrassom [8].

A análise de bioatividade utilizando fluido corporal simulado (SBF) é uma técnica *in vitro* que consiste na avaliação da possível resposta *in vivo* de biomateriais. Se apresentar bioatividade, forma-se uma camada de nHAp carbonatada sobre as superfícies de biomateriais após a imersão em SBF em períodos de até 21 dias [9 e 10].

Neste trabalho, avaliou-se a bioatividade do novo compósito à base de nHAp/MWCNT-O [8] utilizando

SBF com o intuito de aplicabilidade dos mesmos como enxertos e conformação de arcabouços visando a aplicabilidade na regeneração de tecido ósseo.

Materiais e métodos

Todo o processo de produção de nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWCNT-O) foi realizado no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Os MWCNT-O foram depositados na parede do tubo de quartzo pela técnica de deposição química via fase vapor assistida por processo térmico à pressão atmosférica e a 850 °C. Fontes de carbono (cânfora, $C_{10}H_{16}O$, 84% da massa total) e o catalisador de Fe (ferroceno, $Fe(C_5H_5)_2$, 16%) foram evaporados a 200 °C e transportado para dentro do tubo de quartzo por um fluxo de N_2 de 1,5 litros/minuto [11]. Após 5 minutos de reação, os vapores foram cortados e o forno arrefeceu até a temperatura ambiente sob N_2 . Os MWCNT-O foram produzidos por cânfora/ferroceno e purificados por recozimento a alta temperatura numa atmosfera livre de oxigênio (N_2) [12]. O novo método de funcionalização dos MWCNT-O 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 [13, 14]. Estas amostras serão denominadas MWCNT-O.

Para a produção da nHAp, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ e $(NH_4)_2H_2PO_4$ foram dissolvidos em 50 mL de água deionizada separadamente. As duas soluções foram misturadas, o controle do pH foi realizado inserindo-se solução de NH_4OH (25%), visando a manutenção do pH 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 foi elevada durante 10 dias sendo retirado o sobrenadante da solução e adicionando-se novamente água deionizada. Após esse período, o precipitado foi deixado em repouso em estufa durante 48 horas a 60°C. Após sua secagem, triturou-se o material com moinho analítico modelo A11, marca IKA, com velocidade do motor de 2800 rpm. Para a produção do compósito nHAp/MWCNT-O (1% m/v), seguiu-se o mesmo procedimento descrito acima, porém adicionou-se pó de MWCNT-O funcionalizado (1% em peso) na solução de $(NH_4)_2H_2PO_4$.

Caracterizou-se as amostras por difração de raio-X (DRX, X-Pert Philips), sendo o sinal analisado no software HighScore 3.0 da marca Panalytical. Morfologicamente, as amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As mesmas foram metalizadas com uma fina camada de ouro (~10 nm) via técnica de *Sputtering* e posteriormente analisadas no microscópio eletrônico de varredura EVO MA10-Zeiss.

Para o teste de bioatividade, o compósito nHAp/MWCNT-O (1%) foi imerso na solução de 1.5

SBF, pH 7.4 [10], regulado com solução tampão TRIS, contendo as concentrações dos íons em mM: Na^+ 142.0; K^+ 5.0; Ca^{2+} 3.75; Mg^{2+} 1.5; Cl^- 148.8; HCO_3^- 4.2; HPO_4^{2-} 1.5 e SO_4^{2-} 0.5 [15]. As amostras foram incubadas numa relação sólido/liquido de 1 mg/mL sem renovação do SBF, acondicionadas em incubadora refrigerada de bancada, da marca Cientec (CT-712-R), agitadas a 75 rpm, em temperatura em torno de 36,5 °C por 14 dias.

Após imersão pelo período determinado, mediu-se, com peagâmetro, o pH da solução. O compósito foi lavado com água deionizada à 80 °C para remoção dos sais, filtrado em papel filtrante de 200 mm, e seco à temperatura ambiente por 24 h. As medidas de pH foram analisadas no software Origin 8.5 utilizando o modelo de curva exponencial com coeficiente de correlação entre 0.98 - 0.94, em seguida a análise do teste de bioatividade foi feita por Difração de Raio-X (DRX) da amostra.

Resultados

Primeiramente, as amostras de nHAp/MWCNT-O, nHAp e MWCNT-O foram caracterizadas por difração de raio-X, conforme indicado na figura 1. Observou-se a presença de cristais de hidroxiapatita nas amostras de nHAp/MWCNT-O, cujos picos são semelhantes aos encontrados na amostra de nHAp. No grupo MWCNT-O, é notória a presença de carbonos hexagonais e ausência de nHAp.

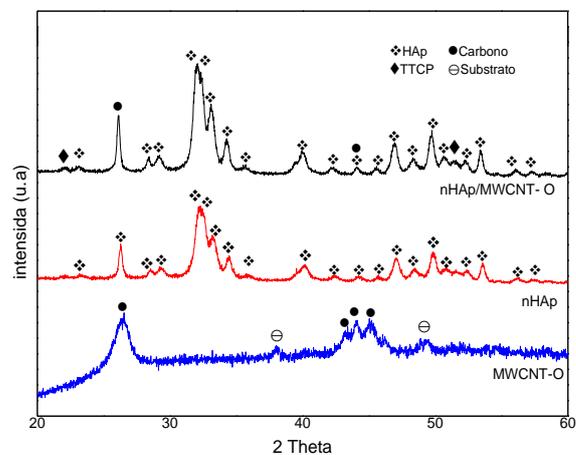


Figura 1: Difração de raios-X das amostras de nHAp/MWCNT-O, nHAp e MWCNT-O. Como referência dos picos, utilizou-se fichas cristalográficas: JCPDS 009-0432 (Hidroxiapatita), JCPDS 025-1137 (TTCP), JCPDS 026-1077 (Carbono presente no grafite) e JCPDS 052-0997 (substrato do porta amostra contendo Cu, Fe e Si em sua composição).

Na micrografia das amostras realizada em MEV, caracterizou-se a morfologia do material, como indicado na figura 2. Na imagem 2c, é possível observar a interação do MWCNT-O com a nHAp.

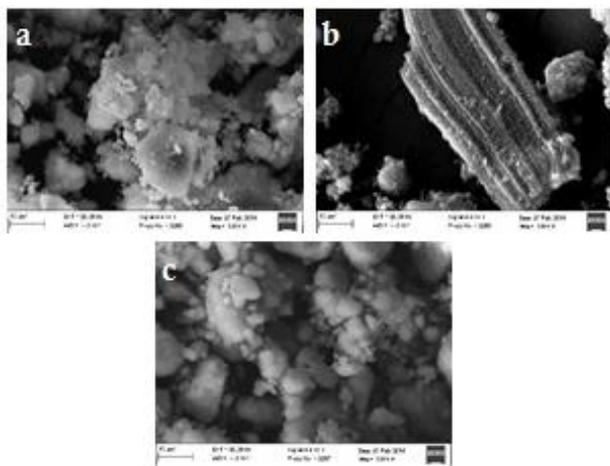


Figura 2: Micrografias das amostras: a. nHAp, b. MWCNT-O e c. nHAp/MWCNT-O (1% m/v). Em 2c, observa-se interação do MWCNT-O com a nHAp.

Após a caracterização dos materiais, realizou-se o ensaio de bioatividade, imergindo-se os mesmos, por 14 dias, em SBF. Após o período incubatório, as amostras foram analisadas em difratometria de raio-X. Observou-se, neste ensaio, picos de carbonato de cálcio nas três amostras, indicativo de que tanto o compósito, quanto a nHAp e o MWCNT-O isolados possuem interação com o SBF.

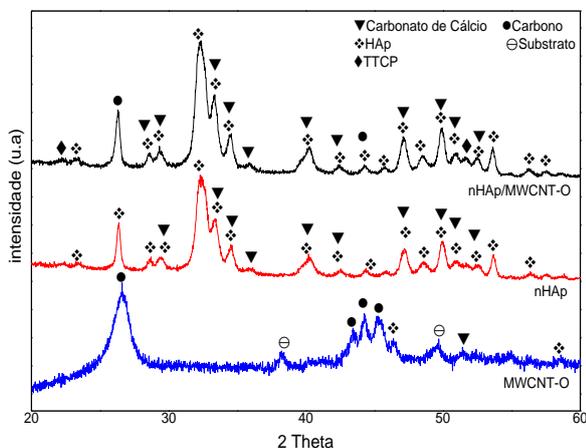


Figura 3: Difração de raios-X das amostras de nHAp/MWCNT-O, nHAp e MWCNT-O e após 14 dias imersos em 1.5 SBF. Como referência dos picos, utilizou-se fichas cristalográficas: JCPDS 009-0432 (Hidroxiapatita), JCPDS 025-1137 (TTCP), JCPDS 004-0697 (Carbonato de cálcio), JCPDS 026-1077 (Carbono presente no grafite) e JCPDS 052-0997 (substrato do porta amostra contendo Cu, Fe e Si em sua composição).

Realizou-se também medição do pH da solução de SBF durante o período incubatório do teste de bioatividade, a qual indicou alcalinização crescente do

meio até aproximadamente o décimo dia de incubação. Nos dias posteriores, os valores de pH foram estabilizados. Tal comportamento de elevação de pH sinaliza a interação do material com o SBF, confirmando novamente a bioatividade do compósito.

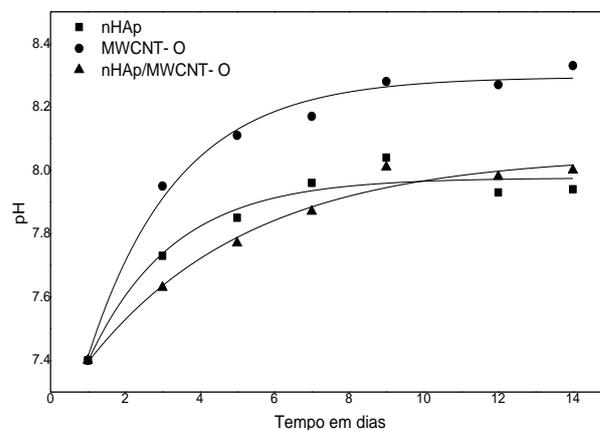


Figura 4: Gráfico dos valores crescentes de pH das amostras de nHAp, MWCNT-O e nHAp/MWCNT-O, imersos em 1.5 SBF, em função dos dias de incubação.

Discussão

O cálcio é um dos principais componentes do SBF e está amplamente distribuído em materiais bioativos, sendo efetivo no processo de precipitação e dissolução. Sua presença é um dos fatores responsáveis por estímulo para crescimento ósseo e formação da camada biologicamente ativa [16]. Comparando-se os espectros dos difratogramas antes e após imersão em SBF, figuras 1 e 3 respectivamente, observa-se a presença de cristais de nHAp carbonatada apenas após o período de incubação, indicando bioatividade do compósito.

Nas micrografias das amostras antes do ensaio de bioatividade, figura 2, visualiza-se morfologicamente a agregação entre o MWCNT-O e a nHAp, comprovando que ocorre associação de ambos na formação do compósito.

A medição dos valores de pH, representada na figura 4, indicou elevação dos mesmos em todas as amostras durante o período de incubação, passando de $\approx 7,4$ para $\approx 8,0$ no grupo nHAp/MWCNT-O. A estabilização dos valores de pH ocorreu aproximadamente após 9 dias de incubação. Sabe-se que a alcalinização do pH é fundamental para atividade e formação da nHAp carbonatada [17]. Deste modo, ambos os ensaios de difração de raios-X e medição de pH revelam que o compósito pode ser considerado bioativo, pois é capaz de interagir com o fluido corporal simulado, precipitar nHAp carbonatada [18] e alcalinizar o pH do meio.

Espera-se que a resposta do organismo ao compósito nHAp/MWCNT-O seja similar à obtida nestes ensaios. Para isto, investigações futuras pretendem elucidar o comportamento de nHAp/MWCNT-O em animais, a fim de confirmar *in vivo* a mesma eficácia verificada neste estudo *in vitro*.

Conclusão

O presente estudo do compósito nHAp/MWCNT-O indicou que o mesmo tem suas características alteradas após imerso em SBF, por 14 dias, comprovando sua bioatividade *in vitro*, pois uma camada de carbonato de cálcio foi depositada sobre o material e seu pH foi alterado. Tal comportamento comprova uma futura aplicabilidade deste compósito, de forma a contribuir com calcificação de matriz extracelular e regeneração tecidual.

Agradecimentos

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

Referências

- [1] Doostmohammadi A, Monshi A, Salehi R, Fathi MH, Karbasi S, Piele 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Najafi H, Nemati ZA, Sadeghian Z: Inclusion of carbon nanotubes in a hydroxyapatite sol-gel matrix. *Ceramics International* 2009, 35:2987-91.
- [8] Lobo AO, Marciano FR, Corat EJ, Trava-airoldi VJ: Processo para produção de nanocompósitos de nanoapatitas e os ditos nanocompósitos. Patente: Privilégio de Inovação. BR10201300578, 11 março 2013, INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
- [9] Lobo AO, Zanin H, Siqueira IA, Leite NC, Marciano FR, Corat EJ: Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications* 2013, 33:4305-12.
- [10] Kokubo T, Takadama H: How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials* 2006, 27:2907-15.
- [11] Ranella A, Barberoglou M, Bakogianni S, Fotakis C, Stratakis E: Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro/nano silicon structures. *Acta biomaterialia* 2010, 6:2711-20.
- [12] Cheng L, Weir MD, Xu HHK, Antonucci JM, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X: Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dental Materials* 2012, 28:561-72.
- [13] Tanahashi M, Yao T, Kokubo T, Minoda M, Miyamoto T, Nakamura T, Yamamuro T: Apatite Coating on Organic Polymers by a Biomimetic Process. *Journal of the American Ceramic Society* 1994, 77:2805-8.
- [14] Antunes EF: Estudo de nanotubos de carbono como fonte de elétron na geração de plasmas. *Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais*, 2006, 193.
- [15] Zhu P, Masuda Y, Koumoto K: The effect of surface charge on hydroxyapatite nucleation. *Biomaterials* 2004, 25:3915-21.
- [16] Tasis, D, Stergios-Pispas, Galiotis C, Bouropoulos N: Growth of calcium carbonate on non-covalently modified carbon nanotubes. *Materials Letters* 2007, 61(28):5044-6.
- [17] Raynaud S, Champion E, Bernache-Assolant D, Thomas P: Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterization and thermal stability of powders. *Biomaterials* 2002, 23:1065-72.
- [18] Bohner M, Lemaître J: Can bioactivity be tested *in vitro* with SBF solution? *Biomaterials* 2009, 30:2175-9.