



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXIDADE DE SUPERFÍCIES RECOBERTAS
POR NANOTUBOS DE CARBONO – APLICAÇÕES COMO
BIOMATERIAIS**

**RELATÓRIO FINAL DE PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
(PIBIC/CNPq/INPE)**

Alessandro Eustáquio Campos Granato (UNIVAP, Bolsista
PIBIC/CNPq)

E-mail: alessandrofuba@hotmail.com

Dr. Evaldo José Corat (LAS/CTE/INPE, Orientador)

E-mail: corat@las.inpe.br

Dra. Cristina Pacheco Soares (UNIVAP, Co-orientadora)

E-mail: cpsoares@univap.br

COLABORADOR Doutorando Anderson de
O. Lobo (ITA/INPE)

Julho de 2010

Folha de aprovação

A confiança é a mãe dos grandes atos.

(Friedrich Von Schiller)

Meus pais,
Enzo Granato e
Mara Lúcia Campos Granato

AGRADECIMENTOS

Ao conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais . INPE, pela oportunidade de estudo e utilização de suas instalações.

Ao Laboratório Associado de Sensores e Materiais . LAS, pela oportunidade de utilização de suas instalações.

Ao orientador Prof. Dr. Evaldo Jose Corat, pelo conhecimento passado, pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Cristina Pacheco Soares, pelo conhecimento passado, pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

Ao doutorando Anderson de Oliveira Lobo, pelo conhecimento passado, paciência e orientação.

Aos amigos e amigas Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares – UNIVAP.

Aos amigos e amigas do Laboratório Associado de Sensores e Materiais

AValiação DA GENOTOXICIDADE DE SUPERFÍCIES RECOBERTAS POR NANOTUBOS DE CARBONO – APLICAÇÕES COMO BIOMATERIAIS

RESUMO

Nanomateriais são promissores pelo fato de apresentarem similaridades com componentes nanoestruturados de matriz extracelular. Nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWCNT) possuem um grande potencial para aplicações biomédicas devido as suas propriedades, tais como, condutividade elétrica, alta estabilidade química, alta resistência mecânica, etc. Estudou-se a biocompatibilidade celular com os MWCNT, utilizando linhagens celulares L929 e SaOS-2. Houve uma transição para o estudo de interação dos nanotubos com bactérias e, inicia-se agora, um estudo de genotoxicidade celular. Nesta apresentação será mostrado o final dos estudos com bactérias, realizadas até fevereiro/2010 e os planos para os estudos de genotoxicidade. O objetivo do trabalho com bactérias foi à realização de teste da atividade bactericida dos MWCNTs, avaliando a possível aplicação do mesmo em filtros e revestimentos de dispositivos biomédicos. Os MWCNTs modificados por tratamento a plasma foram produzidos no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS/INPE). Os testes bactericidas foram realizados no Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Intracelulares da UNIVAP. Para a realização dos testes utilizou-se cepa bacteriana padrão da linhagem *Escherichia coli* ATCC25922. Como resultados parciais, os MWCNTs demonstraram uma ação bactericida significativa, podendo variar de acordo com o tempo de incubação e a concentração de MWCNTs. Para dar continuidade, pretende-se realizar uma associação da citotoxicidade e genotoxicidade de superfícies recobertas MWCNTs em cultura de células. Visto que a biocompatibilidade e genotoxicidade dos CNTs ainda serem muito questionadas no meio científico, é de grande importância a comprovação dessas teorias, uma vez que só assim o seu estudo poderá ter continuação com segurança. Os objetivos deste trabalho são: 1) Avaliar se os MWCNTs produzem ou induzem danos ao material genético de células; 2) Demonstrar como as células interagem com os MWCNTs; 3) Demonstrar através de técnicas de laboratório se os MWCNTs utilizados são biocompatíveis.

ABSTRACT

Nanomaterials are promising because of similarities to the nanostructured components of extracellular matrix. Multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) have great potential for biomedical applications due to its properties such as electrical conductivity, high chemical stability, high mechanical strength, etc. We studied the cellular biocompatibility with MWCNT, using cell lines SAOS-2 and L929. There was a transition for the study of interaction of nanotubes with bacteria, and starts now, a study of cell genotoxicity. This presentation will show the end of the studies with bacteria, made up february/2010 and plans for genotoxicity studies. The objective was to achieve ,with bacteria tests, the bactericidal activity of MWCNTs, evaluating the possible application of it in filters and coatings for biomedical devices. The MWCNTs modified by the plasma treatment were produced by the Associated Laboratory of Sensors and Materials (LAS / INPE). The bacterial tests were performed at the Laboratory of Dynamic Intracellular Compartments of UNIVAP. For the tests we used the standard bacterial strain of Escherichia coli strain ATCC25922. As partial results, the MWCNTs have demonstrated a significant bactericidal action, and may depend on the incubation time and concentration of MWCNTs. To continue, we intend to perform an association of cytotoxicity and genotoxicity of MWCNTs coated surfaces in cell culture. Seen that the biocompatibility of CNTs and genotoxicity are still heavily questioned in the scientific environment, it is of great importance to prove these theories, since only thus their study may continue safely. Our objectives are: 1) Evaluate whether the MWCNTs produce or induce damage to genetic material of cells, 2) Demonstrate how cells interact with MWCNTs and 3) Demonstrate through laboratory techniques if the MWCNTs are biocompatible.

SUMÁRIO

	PAG.
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS.....	15
CAPITULO 1: INTRODUCAO.....	17
CAPITULO 2: MATERIAIS E METODOS.....	19
2.1 Produção de nanotubos de carbono de paredes multiplas (MWCNT).....	20
2.2 Linhagem celular.....	20
2.2.1 Fibroblastos.....	21
2.3 Manutenção da cultura celular.....	21
2.4 Teste de citotoxicidade.....	22
2.4.1 Teste de citotoxicidade pelo metodo direto (MTT).....	23
CAPITULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
3.1. Testes de Genotoxicidade: Teste de Micronúcleo	25
3.2. Teste de citotoxicidade pelo método direto (MTT).....	28
CAPITULO 4: CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS.....	32
CAPÍTULO 5: TRABALHOS FUTUROS.....	33
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reator de microondas para o crescimento de nanotubos de carbono..... **20**

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Gráfico com os valores obtidos com os testes bactericidas realizados com concentrações de 5, 7, 9, 12mg de NTCs após 24h de incubação.....26
- Gráfico 2:** Gráfico com os valores obtidos com os testes bactericidas realizados com concentrações de 5, 7, 9, 12, 15, 20 e 30 mg de NTCs após 24h de incubação.....27
- Gráfico 3:** Gráficos com os valores obtidos com os testes bactericidas realizados com concentrações de 12, 15, 20, 30 mg de NTCs após 3h de incubação.....26
- Gráfico 4:** Densidade óptica utilizando Fe como catalisador.....28
- Gráfico 5:** Viabilidade celular após os respectivos tempos de incubação com NTC, látex e papel de filtro.....29
- Gráfico 6:** Densidade óptica utilizando Ni como catalisador.....30
- Gráfico 7:** Viabilidade celular após os respectivos tempos de incubação com NTC, látex e papel de filtro.....30

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia vem despertando muito interesse na comunidade científica, ao longo das últimas décadas muitos esforços são realizados no sentido de atingir o tão desejado controle em nível atômico e molecular sobre os processos industriais. Com o surgimento dos materiais nanométricos, e em função deles, novas técnicas de caracterização foram projetadas e implementadas (HERBST, 2004).

Os nanotubos de carbono (CNT) são um dos materiais mais promissores da nanotecnologia. Os métodos de síntese, purificação e pós-processamento produzem CNT com diversas propriedades e características físicas e uso em várias áreas. Estas propriedades têm feito aos CNT objeto de uma grande quantidade de estudos, os quais têm revelado um imenso potencial de aplicação em diferentes áreas, tais como a eletrônica, a física e a biologia. Da projeção do uso abrangente do CNT surge a compreensão de seus possíveis efeitos nocivos, visando aplicabilidade como biomateriais (HELLAND, 2008).

Os CNTs são macromoléculas unidimensionais, cujas incríveis propriedades têm incentivado a sua pesquisa em abundância desde sua descoberta em 1991 (IJIMA, 1991). Existem dois tipos de CNTs, e outras derivações deles, sendo estes os CNT de paredes simples (do inglês, SWCNTs) e os de paredes múltiplas (do inglês, MWCNTs). SWCNTs são construídos a partir de uma única camada de grafite (0,4- 10 nm de diâmetro), enquanto os MWCNTs consistem de múltiplos cilindros concêntricos de grafite aumentando o seu diâmetro (10- 100 nm) (LIN *et al.*, 2004). Ambos SWCNTs e MWCNTs possuem alta resistência a tensão, são ultra-leves, e possuem excelente estabilidade térmica e química. Em combinação com suas propriedades metálicas e semicondutoras, essa matriz de características notáveis tem em vista uma infinidade de aplicações (CVETICANIN *et al.*, 2010).

Na nanomedicina, ramo emergente de utilização de nanomateriais como alternativa para diagnósticos e tratamentos, os CNTs vêm sendo utilizados como substratos para o crescimento de neurônios e ligamentos para intervenções regenerativas do sistema nervoso central e sítios do tecido ósseo, substratos para detecção de anticorpos associados a doenças do sistema auto-imune com alta especificidade (HU *et*

al. 2004); (WANG & JAN, 2004). Quando em contato com ácidos nucleicos (DNA ou RNA), vacinas, e proteínas, os CNTs mostraram-se substratos eficazes para o seqüenciamento de genes (PANTAROTTO *et al.* 2004). Conseqüentemente esforços para tirar vantagem das propriedades físicas e químicas dos CNTs, em benefícios biológicos devem rodear a hidrofobicidade desses nanomaterias. Pesquisas ao longo da última década mostraram que os CNTs e fulerenos podem ser facilmente modificados, ambos covalentemente ou não-covalentemente, por incorporação de grupos funcionais químicos ou biológicos para reforçar a solubilidade e biodisponibilidade. As modificações covalentes dos SWCNTs, por exemplo, normalmente envolvem funcionalização com grupos amida e éster incorporando grupos funcionais nas paredes e nas extremidades dos tubos (SANO *et. al.*, BANERJEE *et. al.*, POMPEO *et. al.*, BAHR *et. al.*, SUN *et. al.*). No entanto, essas ligações covalentes são freqüentemente muitas vezes marcadas por alterações indesejáveis nas propriedades físicas e químicas dos SWCNTs (PANTAROTTO *et. al.*, 2003). Pesquisas mostraram ocorrem efeito citoprotetor dos derivados de fulerenos e CNTs no estresse oxidativo, principalmente pela eliminação de radicais livres (LAI *et. al.*, 2004), o que tornaria sua aplicabilidade inviável. Muitas controvérsias são levantadas na literatura mundial sobre a utilização dos CNTs para aplicações biomédicas. Estas duvidas são na maioria das vezes devido aos catalisadores metálicos, utilizados para a catalise do processo, ou mesmo devido ao processo de hidrofobicidade, o que ocasiona aglomerados dos CNTs, dificultando sua interação com a matriz extracelular.

Neste relatório, serão apresentados resultados já obtidos de citotoxicidade celular dos CNTs crescidos verticalmente sobre ligas de titânio e propostas de trabalhos futuros que visam uma associação dos estudos de citotoxicidade e genotoxicidade.

Com estes estudos complementares, espera-se elucidar se esta nova classe de materiais possam a vir ocasionar efeitos genotóxicos associados aos citotóxicos, a fim de dar continuidade às pesquisas que trataram apenas da citotoxicidade. Pois para que possam ter aplicações como biomaterias em seres humanos, estes precisam provar não causarem nenhum malefício ao DNA de células.

CAPITULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PRODUCAO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MULTIPLAS

(MWCNT) UTILIZANDO PLASMA DE MICROONDAS

A deposição dos MWCNT foi realizada utilizando um reator de plasma de microondas, devido ao seu alto grau de pureza e alinhamento. Já foram bem determinados pelo grupo de Diamante e Materiais Relacionados (DIMARE), do Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) que os MWCNT produzidos por esta técnica não são citotóxicos para as células, conforme estudado por LOBO e colaboradores em seu trabalho de mestrado [LOBO, 2008]. Todas as amostras foram cortadas em dimensões de 1cm^2 . Para os procedimentos de limpeza, as amostras foram lixadas com lixa 600. Após a etapa de limpeza, as amostras, foram submetidas à etapa de deposição do filme catalisador (Ni) sobre suas superfícies, após estes procedimentos, as mesmas foram submetidas ao processo de crescimento dos MWCNT. Os MWCNT foram crescidos em duas etapas, as quais denominam-se, etapas de pré-tratamento e deposição, respectivamente. Na etapa de pré-tratamento, os objetivos foram criar nano-ilhas do material catalisador, para que a partir destas os MWCNT pudessem ser nucleados. Antes de iniciar esse processo, foram misturados 90 sccm de H_2 + 10 sccm de N_2 a uma pressão de 4×10^3 Pa, aquecendo o porta-amostra com uma resistência elétrica até atingir uma temperatura aproximada de 300°C . Na fase de pré-tratamento, com duração de 5 minutos, a potência do gerador de microondas foi mantida em 800 W onde a temperatura atingiu cerca de 730°C . Na etapa de deposição, 14 sccm de CH_4 foram adicionados como fonte de carbono por 1 minuto.

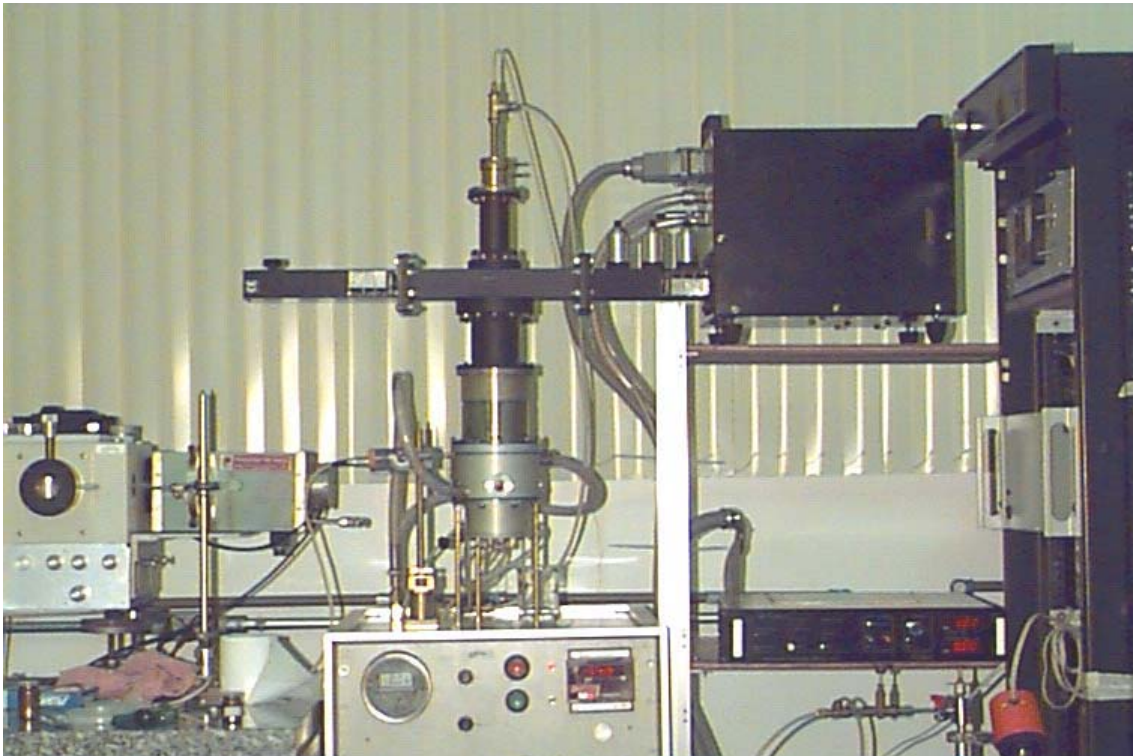


Figura 1: reator de microondas para o crescimento de MWCNT.

2.2 Testes bactericidas

Os testes bactericidas com MWCNT foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba, com a supervisão do Prof. Dr. Newton Soares da Silva.

2.2.1. Cepa bacteriana

Foi utilizada cepa bacteriana padrão da linhagem *Escherichia coli* ATCC25922. Denominada como E.coli (ver Fig. 3), trata-se de uma parte natural do intestino dos animais, incluindo o homem, exercendo um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas (Silva et al., 2003). Dentre as cepas de E.coli, entretanto, há um grupo capaz de provocar doenças em indivíduos humanos, coletivamente chamadas de E.coli enteropatogênicas. Essas cepas ocupam hoje o segundo lugar entre os principais

agente causadores de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos, onde respondem por 7,4% dos surtos e 28,6% das mortes provocadas no período de 1993 a 1997 (Olsen et al., 2000; Moretti). Embora a maior parte de suas formas sejam inofensivas, algumas podem causar alguns danos como diarreia, infecções no trato urinário, doenças respiratórias entre outras doenças. Ainda outros tipos de E.coli podem ser utilizados como marcadores de água contaminada, pois a presença da mesma em água ou alimentos é indicativa de contaminação por fezes humanas (ou raramente de animais). A quantidade de E.coli em cada milímetro cúbico de água é uma das principais medidas usadas no controle da pureza da água potável, esta medida é conhecida como índice coliforme da água (Centers of Disease Control and Prevention).

2.2.2 Meio de cultura (caldo BHI)

Foram diluídos 3,7 gramas de meio BHI (Brain and Heart Infusion, Gibco) em 100 ml de água destilada, para o preparo de 100 ml de solução de meio de cultura para cepa bacteriana. Após esta etapa, as mesmas foram deixadas sob agitação para homogeneização da mistura. Em seguida, a solução foi autoclavada para esterilização e armazenada em uma garrafa de vidro, mantida em uma estufa (Fanem®) a 37°C.

2.2.3 Cultura da E.coli

Através de uma cultura de estoque, foram preparadas, através de repique, culturas de estoque em tubos de vidro 18x18mm, contendo 100 µl de solução bacteriana e 8 ml de caldo BHI estéril. A Fig. 4 mostra uma curva típica de proliferação da E.coli. A cultura então foi encubada em estufa (Fanem®) a 37°C por um período de 3 a 4 horas correspondente a fase exponencial, também chamada de fase log do crescimento bacteriano.

2.3. Determinação de parâmetros para a realização dos testes bactericidas

Em tubos de vidro 18x18mm, contendo 8 ml de caldo BHI e 100 µl de solução bacteriana foram adicionadas as seguintes concentrações de MWCNT: 5, 7, 9, 12, 15, 20 e 30 mg. Em seguida, a cultura foi incubada de 3 a 4 horas correspondente a fase exponencial. Após este período de incubação foram retiradas alíquotas de 10 µl desta

solução, e colocadas em placa de 24 poços adicionando-se 1 ml de caldo BHI, sendo todos os testes realizados em quintuplicata. As amostras foram incubadas por um período de 3 e 24 horas. Foram utilizados controles positivos (antibiótico - Gentamicina) e negativos (água destilada).

2.2 LINHAGEM CELULAR

2.2.1. Fibroblastos

A linhagem celular utilizada foi a CLL I NCTC (ATCC) clone 929-clone da linhagem L, tecido conjuntivo de camundongo, designado L-929. As células foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial . MEM (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino . SFB, 1% de antibiótico Antibiotic Antimycotic (Gibco) e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, em garrafas plásticas Nunc de 25 cm³.

2.3 MANUTENCAO DA CULTURA CELULAR

As células foram mantidas, como estoque, em nitrogênio Líquido. A partir disto, preparou-se uma garrafa de cultura de 25 cm³, contendo 1 ml de cultura de células (106 células/ml), adicionando-se 2 ml de meio de cultura MEM, enriquecido com 10% SFB. As células foram mantidas em estufa com controle automático de temperatura 37°C e pressão de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação em microscópio invertido Olympus CK40. Estas células foram subcultivadas após tripsinização, quando formada uma monocamada confluenta. Após o período de 3 minutos com 2 ml de tripsina as mesmas foram retiradas, adicionando-se 3 ml de meio de cultura MEM suplementado com 10 % de SFB. Para liberação das células da parede da garrafa, foram utilizados um jato forte com o auxílio de pipetador automático. Deste volume foram retiradas alíquotas de 1 ml e passadas para novas garrafas, adicionando-se mais 2 ml de meio MEM, ou DMEM suplementado com 10% SFB e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

2.4 TESTE DE CITOTOXICIDADE

O teste de citotoxicidade tem como objetivo detectar o potencial de um material

ou dispositivo em produzir efeitos letais ou subletais em sistemas biológicos a nível celular. Este teste deve ser aplicado a todas as categorias de biomateriais. Existem três possibilidades para o teste de citotoxicidade: o teste por eluição, o teste por contato direto e o teste por difusão em agar. No caso deste, trabalho foi utilizado o teste por contato direto, onde uma determinada quantidade do material é colocada diretamente sobre uma monocamada de cultura de células recoberta por meio de cultura. A liberação de substâncias tóxicas pelo material pode lesar as células ou reduzir a taxa de crescimento celular da cultura.

2.4.1 TESTE DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DIRETO (MTT)

Para realização dos testes foram utilizadas amostras de MWCNT alinhados crescidos sobre Ti, e funcionalizados com plasma de O₂, produzidos a partir do Ni como catalisador, por já apresentarem melhores resultados de biocompatibilidade, com e sem tratamento utilizando plasma de O₂. Também foram utilizados controles positivos para a citotoxicidade e genotoxicidade (fragmentos de luva de látex) e controle negativo, com natureza provenientes atóxicos (papel utilizado para filtrar meio de cultura). Todas as amostras utilizadas possuíam a mesma área (10 mm²). Os crescimentos celulares também foram monitorados, onde não foram então, imersas as respectivas amostras. Todas as amostras foram esterilizadas utilizando luz ultravioleta por um período de 24 horas antes da realização dos testes. Os tempos de incubação das amostras variaram entre 2 e 96 horas, dependendo do tipo de teste que foi utilizado. Suspensões das linhagens celulares CHO nas concentrações de 1x10⁵ células/ml foram semeadas em volumes de 0,3 mL utilizando placas de 24 poços de fundo chato e 0,47 ml de meio HAM-F12. Após estes procedimentos, foram então incubadas por 24 horas, a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para a formação da monocamada celular. Depois deste período, foram adicionadas as amostras de MWCNT, MWCNT funcionalizados à plasma, controle positivo e controle negativo. Os testes foram realizados em quintuplicata. Após o período determinado de incubação com as amostras e controles, todas as amostras foram removidas dos seus respectivos poços para o passo de incubação com o corante. Para a leitura do MTT, após o período de incubação, os poços serão lavados com 300 µL de PBS e em seguida foram acrescentado 200 µL de MTT (3-(4,5-dimetilthiazolone-2-yl)-2,5-difenil tetrazol bromide), numa concentração final de 0,5 mg/mL de MTT-formazana, deixando-as incubadas por um período de 1

hora em estufa, sobre proteção da luz. Após esta etapa, foram retirados o MTT, e adicionados 400 µL do solvente DMSO sobre os precipitados de formazana. Em seguida, as placas foram mantida em agitação por 30 minutos para a solubilização dos cristais de formazana. A leitura da absorbância dos cristais de formazana, diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis, foram medidas utilizando um leitor de ELISA Spectra Count com comprimento de onda de 570 nm (MTT). Leituras do branco também foram realizadas para determinação do sinal de fundo (background). Os dados foram normalizados conforme a fórmula especificada na equação 4.1:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{\text{Absorbância das Células das amostras} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância de Células Controle Positivo} - \text{Absorbância do Branco}} \times 100$$

Equação 1: Cálculo da viabilidade celular.

CAPITULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da ação bactericida e da citotoxicidade do MWCNT foram obtidos durante a vigência da aluna Mariana Bernardes. Seus resultados demonstraram uma ação bactericida em torno de 25%, podendo variar de acordo com o tempo de incubação e a concentração de MWCNTs, como mostram os itens seguintes.

3.1. TESTES BACTERICIDAS

Os gráficos abaixo mostram os resultados obtidos com os teste bactericidas realizados com diferentes concentrações de NTCs. O controle positivo corresponde às bactérias tratadas com Gentamicina, um antibiótico de uso tópico. Como controle negativo às bactérias foram tratadas com água destilada. Também, foram realizadas leituras do meio de cultura para mostrar que o meio estava livre de bactérias, não sofrendo, entretanto, nenhum tipo de contaminação. A barra de erro corresponde ao desvio padrão da media das leituras das cinco amostras diferentes de cada grupo. No gráfico 1, observamos que no geral ocorreu uma diminuição no número de bactérias em todos os grupos, em longo prazo. Entretanto observamos que a ação bactericida aumenta à medida em que a concentração dos NTCs aumenta. A ação bactericida varia de 20% a 60% com 12 mg.

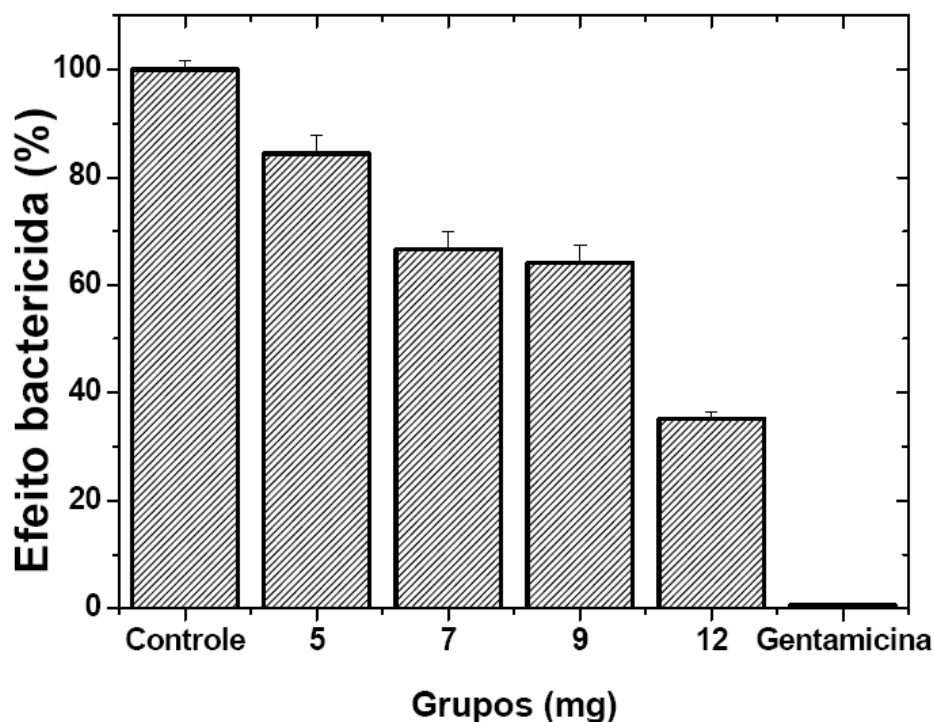


Gráfico 1: Gráfico com os valores obtidos com os testes bactericidas realizados com concentrações de 5, 7, 9, 12mg de NTCs após 24h de incubação.

No gráfico 2, observamos que ocorreu uma diminuição do número de bactérias até a concentração de 12 mg, com efeito bactericida variando de 20% até 60% , como demonstrado no gráfico anterior. Porém, à medida em que a concentração de NTCs aumenta os valores de ação bactericida decaem. Uma possível explicação, seria o aumento da densidade óptica do meio com o aumento do número de NTCs dispersos no meio. Outra possível explicação, seria a difícil dispersão dos mesmos em meio aquoso, na medida em que a concentração aumenta, pois os mesmo formam aglomerados o que diminui a área disponível para aderência das bactérias (Akasaka et al., 2009)

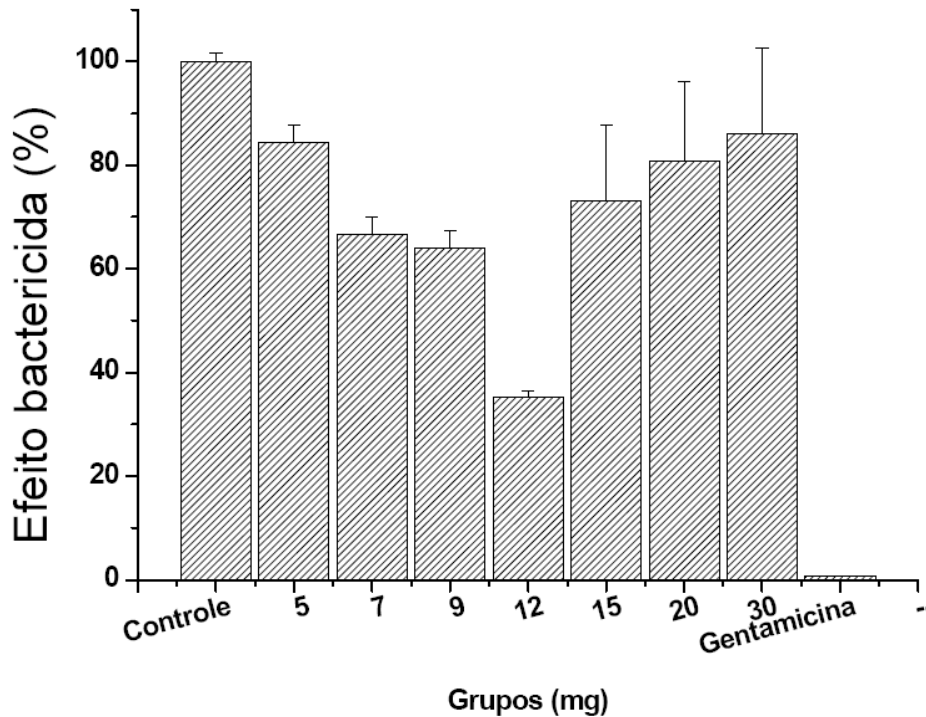


Gráfico 2: Gráfico com os valores obtidos com os testes bactericidas realizados com concentrações de 5, 7, 9, 12, 15, 20 e 30 mg de NTCs após 24h de incubação.

No gráfico 3, observamos que os valores de ação bactericida em curto prazo estão entre 35% e 40%. Porém com valores inferiores os valores de ação bactericida não se mostraram relevantes.

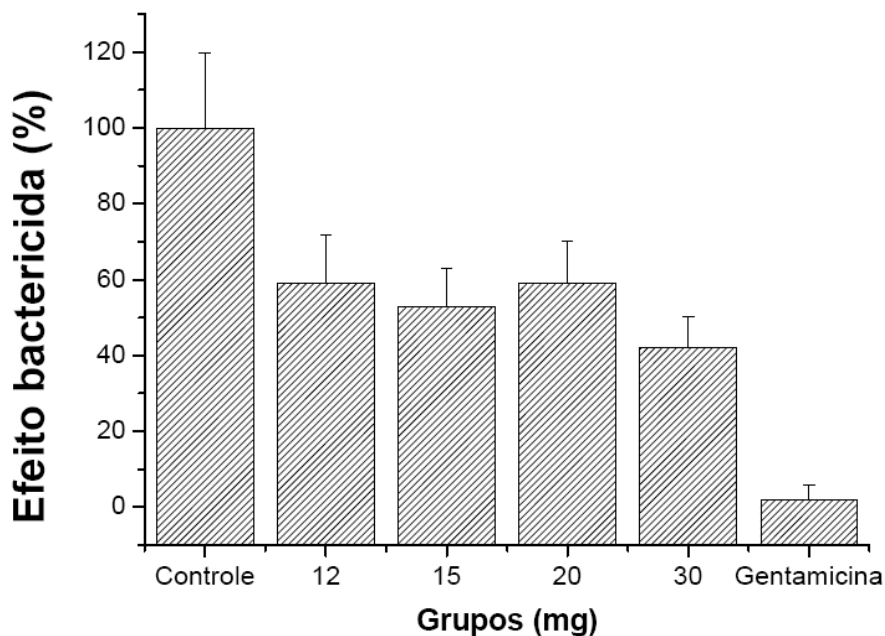


Gráfico 3: Gráficos com os valores obtidos com os testes bactericidas realizados com concentrações de 12, 15, 20, 30 mg de NTCs após 3h de incubação.

Alguns estudos relatam que esta ação bactericida dos NTCs, se dá devido à interação dos mesmos com a célula bacteriana por vários mecanismos. Os principais relatados na literatura são que as nanopartículas podem interagir diretamente com a célula bacteriana, por exemplo, interrompendo a transferência de elétrons transmembrana, oxidando componentes celulares ou produzindo produtos secundários (por exemplos, espécies reativas de oxigênio) que causam danos nas células (Li et al, 2008).

3.2 TESTE DE CITOTOXIDADE PELO MÉTODO DIRETO (MTT)

A viabilidade celular está proporcionalmente relacionada ao grau de redução do MTT, a viabilidade do NTC foi estudada avaliando a densidade óptica das placas onde continham células viáveis. Os testes foram realizados em períodos de 0 a 96hrs, e para o controle do cálculo em porcentagem de células viáveis, utilizou-se placas onde foram imersos fragmentos de papel de filtro. O gráfico 4 mostra os valores de densidade óptica obtidos utilizando Fe como catalisador, após os respectivos tempos de incubação das amostras de NTC, látex e papel de filtro.

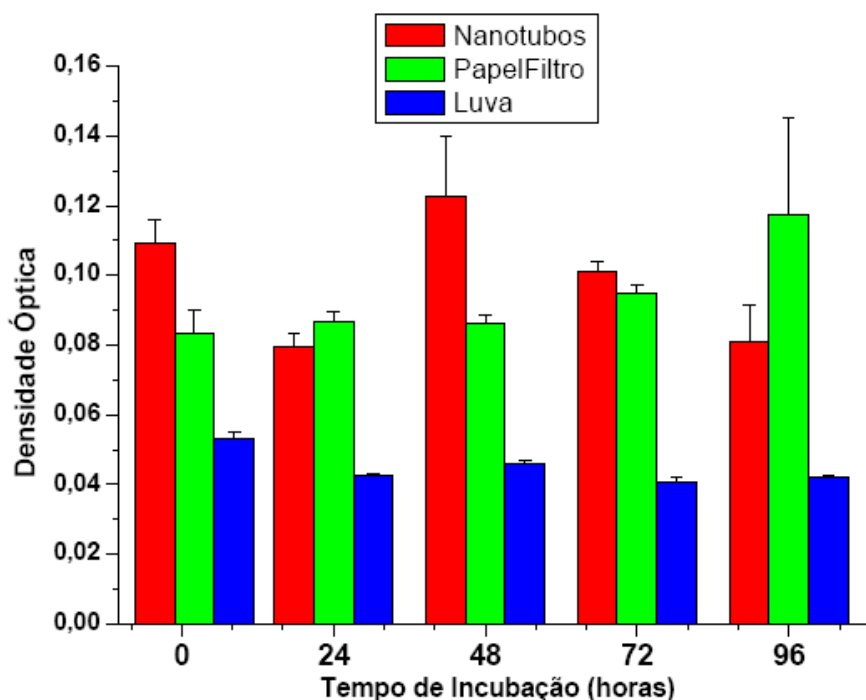


Gráfico 4: Densidade óptica utilizando Fe como catalisador.

O gráfico 5 mostra os valores de viabilidade celular, utilizando Fe como catalisador após os respectivos tempos de incubação com as amostras.

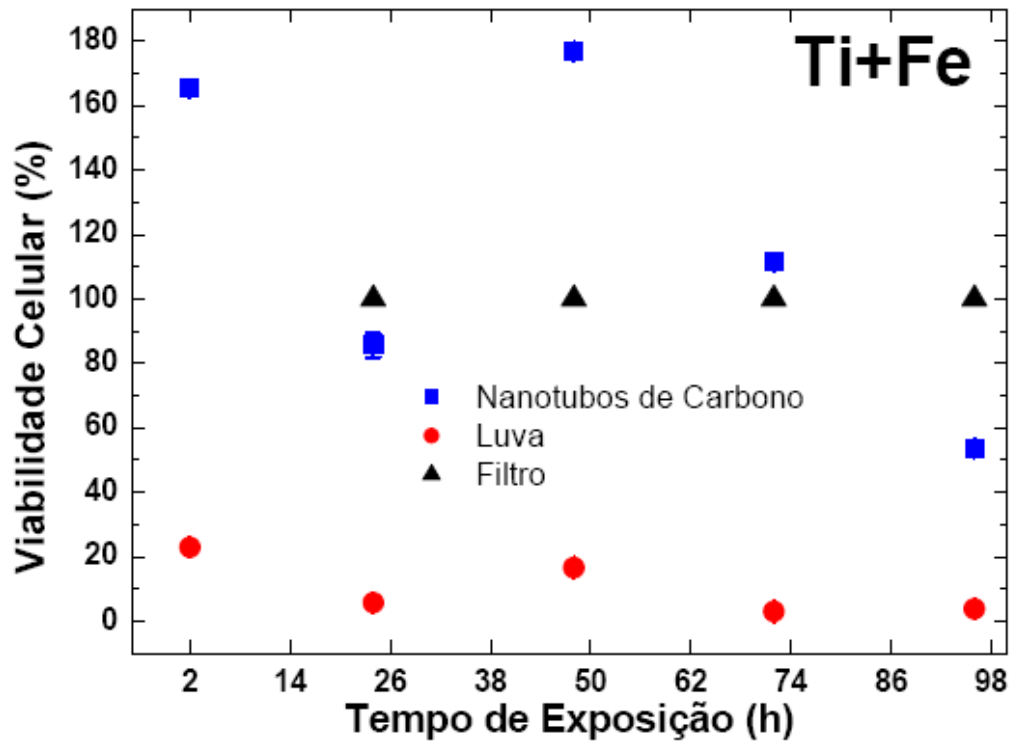


Gráfico 5: Viabilidade celular após os respectivos tempos de incubação com NTC, látex e papel de filtro

O gráfico 6 mostra os dados de densidade óptica obtidos utilizando Ni como catalisador, após os respectivos tempos de incubação das amostras de NTC, látex e papel de filtro.

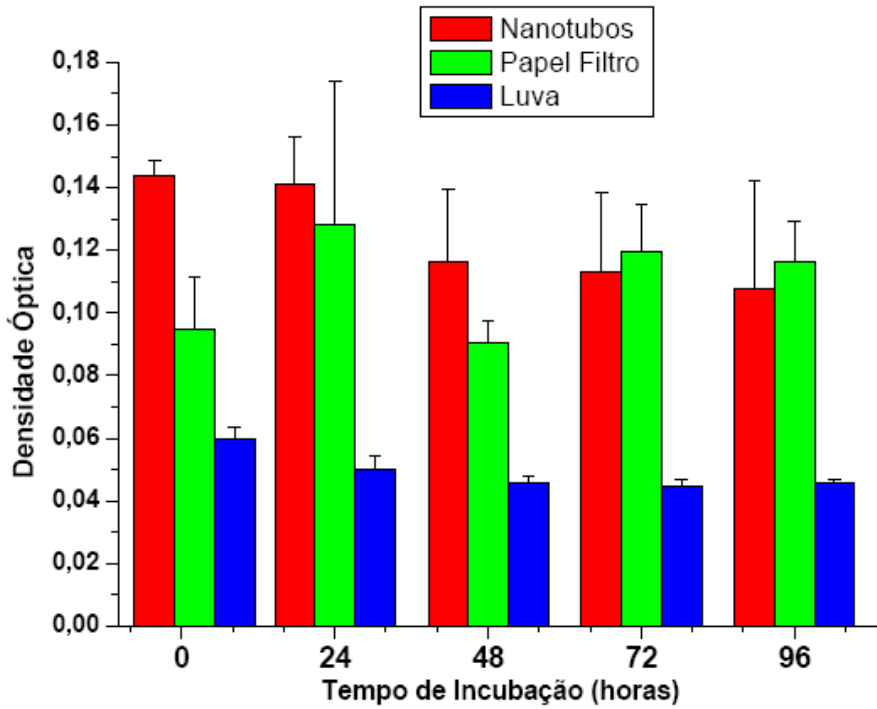


Gráfico 6: Densidade óptica utilizando Ni como catalisador.

O gráfico 7 mostra os valores de viabilidade celular, utilizando Ni como catalisador após os respectivos tempos de incubação com as amostras.

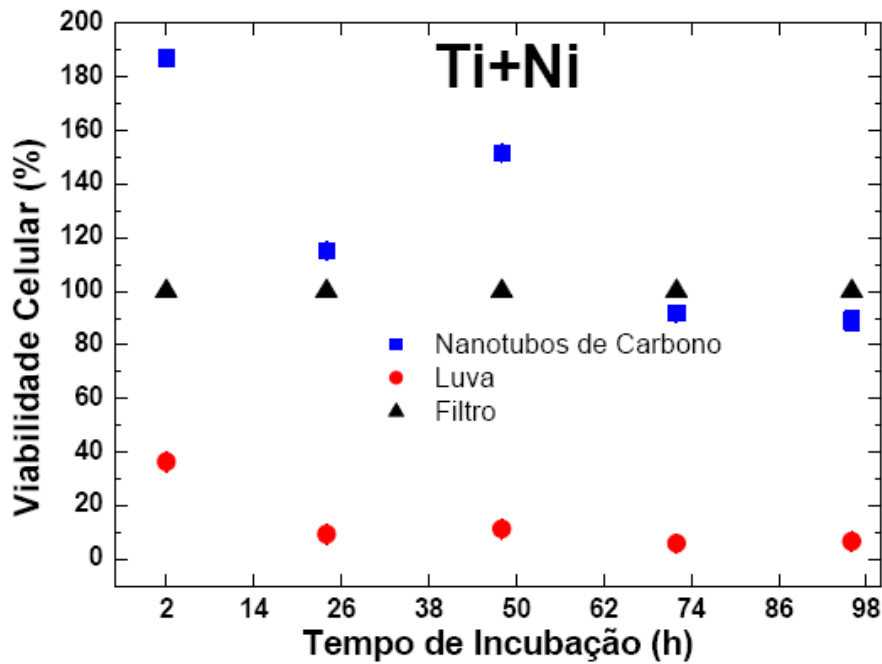


Gráfico 7: Viabilidade celular após os respectivos tempos de incubação com NTC, látex e papel de filtro

Podemos observar com os resultados obtidos que em ambos os casos a viabilidade celular foi alta, apresentando valores acima de 70%. Porém as amostras que utilizaram Ni como catalisador com o decorrer do tempo, mostraram uma maior viabilidade celular, em relação ao Fe. O fato do Fe apresentar uma viabilidade menor em relação ao Ni, pode indicar que há influência da partícula catalisadora utilizada durante o processo de formação “nanoclusters”, como podemos descrever o processo como crescimento tipo “ponta”, onde as nanopartículas acompanham o crescimento dos nanotubos durante a síntese (LOBO, 2007). Ou também, pelo fato da presença de uma grande quantidade de partículas de Fe produzidas na etapa de pré-tratamento, onde muitas delas podem não participar do processo de síntese de nanotubos, ficando presentes como contaminantes nas superfícies de titânio.

Estes resultados foram cruciais para que haja a continuação deste trabalho. Através destes resultados preliminares podemos partir para os testes genotóxicos daqui para frente, pois os testes genotóxicos só podem ser realizados quando não comprovada a citotoxicidade de uma substância.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Os valores de ação bactericida obtido com os NTCs, mostram que os mesmos podem ser uma alternativa aos tradicionais métodos de desinfecção químicos, que são propensos a gerar resíduos nocivos à saúde. Porém a falta de conhecimento dos possíveis danos que podem ser causados por esses materiais à saúde impede a aplicação dos mesmos de imediato. Devido a isso é necessária a realização de mais estudos para uma melhor compreensão de possíveis implicações que podem ser causadas à saúde humana e ao meio ambiente.

Nos testes com células, verificou-se um aumento no número de células viáveis de fibroblastos (L-929) sobre as superfícies de titânio utilizando o Níquel como catalisados, provavelmente porque as nanopartículas do Ni estão presentes dentro dos nanotubos, praticamente sem nenhum contato com a cultura celular. Em relação aos resultados de baixa viabilidade celular apresentados, utilizando o ferro como catalisador, deve-se muito provavelmente a presença das nanopartículas estarem em contato com a cultura celular, devido a alta densidade de nanopartículas presentes e ao efeito catalítico do mesmo. Considerando-se entretanto aceitável os resultados obtidos em ambos os processos de crescimento, pelo fato de apresentarem viabilidade celular em torno de 70%, pelo fato das superfícies de titânio recobertas por nanotubos não passarem por nenhum processo de funcionalização ou purificação.

A partir de agora os testes de citotoxicidade serão refeitos para que se possa dar continuidade aos próximos experimentos de genotoxicidade.

CAPÍTULO 5

TRABALHOS FUTUROS

3.1. TESTES DE GENOTOXICIDADE: ENSAIO DE MICRONÚCLEO

No presente estudo, para determinação do potencial mutagênico dos MWCNTs, será realizado o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese em culturas de células CHO-K1, seguindo o protocolo descrito por Wang e Hung, com. Serão realizados três experimentos totalmente independentes. Em cada um dos experimentos, uma garrafa de cultivo celular, mantida como descrita anteriormente, terá seu meio de cultura descartado. Posteriormente, as células serão lavadas duas vezes com PBS, seguindo-se o processo de tripsinização. A tripsina (Gibco BRL – 0,005%) é uma enzima que cliva as proteínas da matriz extracelular, resultando no desprendimento das células da superfície interna do frasco. O conteúdo da garrafa será então removido, colocado em tubo de centrífuga (tipo Falcon, 15 mL) e centrifugado. O sobrenadante será descartado e o pellet será ressuscitado em 3 mL de meio de cultura completo. Dessa suspensão celular serão retirados 10 µL, os quais serão misturados à 90 µL de Azul de Trypan, para contagem e avaliação da viabilidade celular utilizando-se uma Câmara de Neubauer. Após a contagem celular, será feita uma diluição das células da cultura, para que se obtenha uma suspensão com 2×10^5 células viáveis por mL. Para cada experimento independente serão montadas 10 placas de cultura (35 mm de diâmetro), contendo uma lamínula (20 x 20 mm) e 1 mL da suspensão celular (2×10^5 células viáveis). Estas placas serão incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 25 horas (2 ciclos celulares completos). Transcorrido esse tempo, as células serão lavadas duas vezes com PBS e serão realizados os tratamentos. Serão estabelecidos 5 grupos experimentais, sendo que, para cada um deles, foram montadas 2 placas de cultura. As placas do grupo controle negativo receberão 1 mL de meio de cultura sem soro e as do grupo controle positivo serão preenchidas com 1 mL de meio de cultura sem soro contendo mitomicina C (0,3 µg/mL). Serão montadas 6 placas para os grupos de tratamento com o extrato da liga metálica, cada uma delas recebendo um volume de 1 mL. Duas delas serão preenchidas com 1 mL do extrato puro (extrato 100%); outras duas com 0,75 mL do extrato e 0,25 mL de meio de cultura sem soro (extrato 75%); mais duas placas receberam 0,5 mL do extrato e 0,5 mL de meio de cultura sem soro (extrato 50%). Após 2 horas do início dos tratamentos, o meio de cultura das placas será descartado e as células serão lavadas duas

vezes com PBS. Em cada uma das placas será adicionado 1 mL 36 de meio de cultura completo (com soro), contendo citocalasina B (2,1 µg/mL). Passadas mais 15 horas, o meio de cultura das placas será descartado, as células serão lavadas duas vezes com PBS e serão adicionados 2 mL de solução hipotônica de citrato de sódio 1%, por 10 minutos. Após a hipotonização as células serão fixadas em 2 mL de uma solução de metanol (Merck) e ácido acético (Dinâmica) (20:1). Após a fixação, as células aderidas às lamínulas serão secas ao ar e posteriormente coradas com giemsa 5% em tampão Sörensen (NA₂HPO₄ 0,06 M; KH₂PO₄ 0,06 M, pH 6,8) por 15 minutos. Após o período de coloração, as lamínulas serão lavadas em água destilada e secas ao ar, para posteriormente serem montadas lâminas permanentes para análise microscópica (Leica-DMLB). Para cada um dos tratamentos serão analisadas 1000 células binucleadas, observadas em objetiva de imersão, com um aumento de 1000 vezes, anotando-se o número de células micronucleadas.

3.2. RESULTADOS ESPERADOS

Através deste trabalho espera-se associar os resultados de genotoxicidade obtidos aos de citototoxicidade já bem explorados. Com isso pode-se comprovar ou não possíveis efeitos genéticos prejudiciais em culturas de células de mamíferos expostas aos MWCNTs verticalmente alinhados produzidos pelo processo MWCVD e funcionalizados com plasma de O₂. Contudo, caso não haja malefícios, essa nova e promissora categoria de nano-biomaterias poderão ser aceitos com mais segurança em várias aplicações na medicina, ciências biológicas e áreas da saúde. Além disso pretende-se confirmar o que já vem sendo reportado na literatura atual, que diz respeito ao fato dos CNTs não funcionalizados (comprimento, diâmetro e distribuição de quiralidade homogênea) serem indicados a biocompatibilidade, ao contrário dos CNTs funcionalizados, que vêm mostrando seus malefícios ao DNA.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASAKA, T. WATARI, F. CAPTURE OF BACTERIA BY FLEXIBLE CARBON NANOTUBES. *ACTA BIOMATERIALIA*, 2009,5, 607-612.

BAHR, J L; Mickelson E T, Bronikowski M J, Smalley R E and Tour J M 2001 *Chem. Commun.* **1** 193

BANERJEE, S and Wong S S 2002 *J. Am. Chem. Soc.* **124** 8940

CVETICANIN, Jelena; Gordana Joksic, Andreja Leskovic, Sandra Petrovic, Ana Valenta Sobot and Olivera Neskovic. Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. *Nanotechnology* 21 (2010) 015102 (7pp)

HELLAND, A; Wick, P.; Koehler A; Schmid, K. ; Som, C. Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes. *Ciênc. saúde coletiva* vol.13 no.2 Rio de Janeiro Mar./Apr. 2008

HERBST, M. H; Macedo, M.I.F; Rocco, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Quím. Nova** vol.27 no.6 São Paulo Nov./Dec. 2004

HU, H; Ni Y, Montana V, Haddon R C and Parpura V 2004 *Nano Lett.* **4** 507

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-1:** biological evaluation of medical devices. Part 1: guidance on selection of tests. Geneva, 1992.

IJIMA, S. 1991 *Nature* **354** 56

LAI, H S; ChenW J and Chiang L Y 2000 *World J. Surg.* **24** 450

LI, D. LYON, D.Y. LI, Q. AND ALVAREZ, P.J.J. EFFECT OF NATURAL ORGANIC MATTER ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FULLERENE WATER SUSPENSION, *ENVIRON. TOXICOL. CHEM.* 27 (2008), PP. 1888–1894.

LIN Y, Taylor S, Li H, Fernando S K A, Qu L, Wang W, Gu L, Zhou B and Sun Y P 2004 *J. Mater. Chem.* **14** 527

LOBO, A.O. **Biocompatibilidade de superfícies recobertas por nanotubos de carbono.** 2008. 175 f. Tese (Mestrado em Engenharia Aeronáutica e Mecânica – Física e Química dos Materiais Aeroespaciais) – Instituto Tecnológico de Aeronáutica – ITA, São José dos Campos, SP.

LOBO, A.O.; ANTUNES, E.F.; MACHADO, A.H.A.; PACHECO-SOARES, C.;

TRAVA-AIROLDI, V.J.; CORAT, E.J. **CELL VIABILITY AND ADHESION OF CARBON NANOTUBES FILMS**. JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING C. doi:10.1016/j.msec.2007.01.003, 2007.

LOBO, A.O.; ANTUNES, E.F.; PALMA, M.B.S.; PACHECO-SOARES, C.; TRAVAAIROLDI,

V.J.; CORAT, E.J. **BIOCOMPATIBILITY OF MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES GROWN ON TITANIUM AND SILICON SURFACES**. JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING C. doi: 10.1016/j.msec.2007.04.016, 2007.

MORETTI, P.E. MICROBIOLOGIA, SAÚDE & AMBIENTE, SECCÃO 1 BACTERIOLOGIA, PARTE 4 FISILOGIA. DISPONÍVEL EM: WWW.FAM.BR/MICROORGANISMO/INDEX_0.HTM. ACESSO EM 15 JAN 2009.

OLSEN, S.J. MACKINON, L.C. GOULDING, J.S. BEAN, N.H. SLUTSKER, L. SURVEILLANCE FOR FOODBORN DISEASE OUTBREAKS. MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT, V.49,N.SS01, P.1-51, MARCO 2000.

PALMA, Mariana Bernardes da S. **AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE IN VITRO DE SUPERFÍCIES RECOBERTAS POR NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA (MWCNT). RELATÓRIO FINAL DE PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC/CNPq/INPE), 2007.**

PANTAROTTO, D; Partidos C D, Hoebeke J, Brown F, Kramer E, Briand J P, Muller S, Prato M and Bianco A 2003 *Chem. Biol.* **10** 961

PANTAROTTO, D; Briand J, Prato M and Bianco A 2004 *Chem.*

POMPEO, F and Resasco D E 2002 *Nano Lett.* **2** 369

SALVETAT, J. P. et al. Mechanical properties of carbon nanotubes. **Applied Physics A: Materials Science & Processing**, v. 69, p. 255-260, 1999.

SILVA, N. SILVEIRA, N.F.A YOKOYA, F. OKAZAKI, M.M. OCORRÊNCIA DE ESCHERICHIA COLI 0157:H7 EM VEGETAIS COM RESISTÊNCIA AOS AGENTES DE DESINFECÇÃO DE VERDURAS. CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, V.23, N.2, P.167-173, MAIO/AGOSTO 2003.