



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS

**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)**

Mariana Bernardes da S. Palma (UNIVP, Bolsista PIBIC/CNPq)

E-mail: mariana@las.inpe.br

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

COLABORADORES

Mestrando Anderson de O. Lobo (ITA/INPE)

Dr. Érica Freire Atunes (ITA/INPE)

Julho de 2007

Folha de aprovação

*“ O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar.”
(Albert Einstein)*

*Meus pais,
Mário J. R. Palma e
Ernestina B. da S. Palma*

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 José Corat, pelo conhecimento passado, pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

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

Ao Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares - UNIVAP, pela oportunidade de utilização de suas instalações.

Aos amigos de laboratório Dra Erica Freire Antunes e Mestrando Anderson de Oliveira Lobo, pelo conhecimento passado, paciência e ajuda na realização deste trabalho.

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE SUPERFÍCIES RECOBERTAS POR NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA (MWCNT)

RESUMO

Atualmente materiais nano-estruturados despertam grande interesse na área de bioengenharia. Suas configurações, dimensões e propriedades físico-químicas influenciam nas interações celulares que conduzem à regeneração de tecidos, sendo vistos como um avanço em superfícies implantáveis. Dentro da classe dos materiais nanoestruturados os nanotubos de carbono tem grande potencial em aplicações biomédicas, devido as suas propriedades únicas, tais como, alta condutividade elétrica, alta estabilidade química, e alta resistência mecânica. Para que um novo material possa ser incorporado em aplicações biomédicas, torna-se necessário que sejam pesquisadas a citotoxicidade e a biocompatibilidade, onde são avaliados a habilidade e o desempenho do material em meios biológicos. O objetivo deste trabalho será analisar a influência da partícula catalisadora (Fe e Ni) na viabilidade e adesão celular “*in vitro*” de superfícies de titânio (Ti) recobertas com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês, MWCNT). Para a obtenção das amostras de MWCNT sobre Ti serão necessárias três etapas, sendo elas: deposição dos filmes metálicos (Fe e Ni), pré-tratamento das superfícies para a formação de nanopartículas e deposição. A deposição dos filmes metálicos (Fe e Ni) sobre as superfícies das amostras foi realizada no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS/INPE) em uma evaporadora por feixe de elétrons (Auto 306 – EB3 Multihearth Electron Beam Source) com espessura definida de 7nm. Os filmes de nanotubos de carbono foram crescidos no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS/INPE) em duas etapas, sendo elas: Pré-Tratamento e Deposição, onde se definem como processo de formação de nanopartículas e crescimento de MWCNT, respectivamente. Os testes de biocompatibilidade e citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares (UNIVAP). Para os testes foi utilizada linhagem de fibroblastos (L-929-tecido conjuntivo de camundongo) e osteoblastos (OFCOL-2 osteoblasto de camundongo). Como resultado observou-se, que o catalisador teve pouca influencia na viabilidade celular, havendo algumas alterações apenas na adesão celular.

ABSTRACT

Currently, nano-structured materials are of great interest in the bioengineering. Its physicochemical properties influence cellular interactions that lead to tissue regeneration. It is seen as an advance for implanted surfaces. Among nano-structured materials the Carbon Nanotubes has great potential for biomedical applications, due to its singular properties, such as, high electrical conductivity, high chemical stability, and high mechanical strength. For this new material incorporation in biomedical applications, it is necessary research on its toxicity and biocompatibility, to evaluate its ability and performance in biological systems. The objective of this work was to analyze the influence of the catalytic particle (Fe and Ni) in the viability and cellular adhesion “in vitro” of titanium surfaces (Ti) recovered with multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). The MWCNT had been grown in three stages denominated: deposition of the metallic films (Fe and Ni), pre-treatment for the formation of nanoparticles and deposition. The deposition of the metallic films (Fe and Ni) on the surfaces of the samples was carried through in the Associated Laboratory of Sensors and Materials (LAS/INPE) in a electron beam (Auto 306 - EB3 Multihearth Electron Beam Source), with thickness of 7nm. The biocompatibility tests had been carried through in the Laboratory of Dynamics Compartment Cells (UNIVAP). For the tests was used fibroblastes (L-929 - conjunctive of mouse) and osteoblasts cells (OFCOL-2 osteoblastes of mouse). The different behavior is most probably related to excess iron contamination present in the case of titanium substrate, while nickel catalyst is probably enclosed by the nanotubes.

SUMÁRIO

| | PÁG. |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | 15 |
| LISTA DE TABELAS..... | 16 |
| CAPITULO 1: INTRODUÇÃO..... | 19 |
| CAPITULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS..... | 22 |
| 2.1 Produção de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT)..... | 22 |
| 2.2 Linhagem celular..... | 23 |
| 2.2.1 Fibroblastos..... | 23 |
| 2.2.2 Osteoblastos..... | 23 |
| 2.3 Manutenção da cultura celular..... | 23 |
| 2.4 Teste de citotoxicidade..... | 24 |
| 2.4.1 Teste de citotoxicidade pelo metodo direto (MTT)..... | 24 |
| 2.4.2 Teste de adesão celular..... | 25 |
| CAPITULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 27 |
| 3.1 Formação de nanopartículas e nanotubos de carbono obtidos..... | 27 |
| 3.2 Teste de citotoxicidade pelo método direto (MTT)..... | 28 |
| 3.3 Teste de adesão celular..... | 31 |
| CAPITULO 4: CONCLUSÃO..... | 35 |
| CAPITULO 5: TRABALHOS FUTUROS..... | 36 |
| CAPITULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 37 |
| ANEXO..... | 41 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Reator de microondas para o crescimento de nanotubos de carbono..... | 22 |
| Figura 2: Nanopartículas formadas durante o processo de pré-tratamento, a esquerda amostras recobertas com filme de ferro e a direita recobertas com filme de níquel..... | 27 |
| Figura 3: NTC alinhados obtidos utilizando ferro (esquerda) e níquel (direita) como catalisador..... | 28 |
| Figura 4: Densidade óptica utilizando Fe como catalisador..... | 29 |
| Figura 5: Viabilidade celular após os respectivos tempos de incubação com NTC, látex e papel de filtro..... | 29 |
| Figura 6: Densidade óptica utilizando Ni como catalisador..... | 30 |
| Figura 7: Viabilidade celular após os respectivos tempos de incubação com NTC, látex e papel de filtro..... | 30 |
| Figura 8: Adesão celular após incubação de 48hrs de fibroblastos, a esquerda amostras utilizando Ni como catalisador e a direita Fe..... | 32 |
| Figura 9: Adesão celular após incubação de 48hrs de osteoblastos, a esquerda amostras utilizando Ni como catalisador e a direita Fe..... | 33 |
| Figura 10: Adesão celular após incubação de 7 dias de osteoblastos, a esquerda amostras utilizando Ni como catalisador e a direita Fe..... | 34 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Divisão dos grupos para os testes de citotoxicidade pelo método direto (MTT) | 26 |
|---|----|

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

São encontrados vários estudos que relatam a aplicação de ligas metálicas para aplicações biomédicas, como podemos citar o titânio e o cromo-cobalto (Cr-Co). O titânio apresenta importantes propriedades, como boa resistência a corrosão, resistência à fadiga, formabilidade e mecanibilidade, além de uma densidade razoavelmente baixa (NISHIGUCHI,2001).

Ligas de Ti-Al-4V são consideradas biocompatíveis pelo fato de possuírem propriedades mecânicas essenciais próximas ao osso humano (WILLIAMS, 1995), sendo desta forma muito utilizada durante muitos anos por fabricantes e cirurgiões (AGINS, 1988; LOMBARDI, 1989). Porém, o desgaste e a biocompatibilidade estavam longe de satisfazerem às exigências, demonstrando desgastes e instabilidade em próteses (SHENHAR, 2000), além de possíveis efeitos tóxicos da dissolução de íons do alumínio e do vanádio (HÜBLER, 1999).

Filmes de DLC (Diamond-like carbon) despertaram interesse para recobrimento de próteses devido às suas excelentes propriedades mecânicas, resistência ao desgaste e baixo coeficiente de fricção (GRILL, 1994). O potencial citotóxico dos filmes de DLC foi amplamente estudado por diversos grupos de pesquisa, sendo comprovada a sua resistência ao meio biológico ao qual seria implantado, tornando possível sua utilização como recobrimento em próteses (DEARNALEY, 2005).

Os nanotubos de carbono (NTC) vêm surgindo como uma classe de nanomateriais com grande potencial para aplicações biomédicas, devido às suas propriedades únicas, tais como, alta condutividade elétrica, alta estabilidade química, e alta resistência mecânica (SALVETAT, 1999). Estas propriedades especiais são designadas aos nanotubos de carbono de paredes simples (SWNTs) e aos nanotubos de paredes múltiplas (MWCNT).

Entretanto, para que um novo material possa ser incorporado em aplicações biomédicas exige-se uma avaliação completa de possíveis danos que possam vir a causar em organismos vivos. Desta forma, torna-se extremamente necessário que sejam pesquisadas a toxicidade e a biocompatibilidade, onde serão avaliadas a habilidade e o desempenho do material em meios biológicos.

Atualmente, procura-se, através da bioengenharia, o desenvolvimento de biomateriais e revestimentos que sejam capazes de auxiliar no desenvolvimento, ou mesmo na substituição, de órgãos e sistemas biológicos para cada vez mais auxiliarem no tratamento e controle de disfunções.

A biocompatibilidade e a citotoxicidade dos NTC já vêm sendo amplamente avaliadas por diversos grupos de pesquisa, onde estão sendo realizados tanto estudos “*in vitro*” como “*in vivo*”. Esta é uma área de pesquisa extremamente recente em que, vários artigos têm sido publicados nos últimos meses.

Estudos envolvendo a biocompatibilidade dos NTC vêm sendo cada vez mais aplicados, entre eles podemos citar suas interações entre células neuronais (GABAY, 2005), osteoblastos (WEBSTER, 2005), fibroblastos (CORREA-DUARTE, 2004), anticorpos e sistema imune (NAGUIB, 2005), canais de íons e membranas celulares (PARK, 2003; SMART, 2006).

Outros estudos também envolvendo células neuronais mostraram a biocompatibilidade de NTC “puros” (sem nenhum processo de ataque químico) e quimicamente funcionalizados, ocasionando um impacto positivo no crescimento de neurônios (HU,2004;GABAY,2005). Camadas confluentes de neurônios foram disseminadas em modelos de superfícies de NTC litografadas (crescimento de NTC no formato de “ilhas” por CVD sobre substrato de quartzo). Depois de um período de incubação, as células foram encontradas ao redor das “ilhas”, inclusive interconexões axônicas entre as redes formadas, decorrentes da distribuição dos NTC (GABAY,2005). Os NTC purificados e quimicamente funcionalizados com ácido carboxílico, também foram estudados como substrato para a extensão neuronal (HU,2004).

Foi examinada a adesão em função da formação de osso com células de osteoblastos para a possível utilização dos NTC em superfícies de implantes ortopédicos (WEBSTER,2004;PRICE,2003; ELIAS,2002; ZANELLO, 2006). O estudo se centralizou na proliferação de células de osteoblastos em comparação com os diâmetros das nanofibras de carbono (ELIAS,2002).

Diversos estudos envolvendo propriedades de adesão e proliferação de osteoblastos, fibroblastos e células musculares, sobre nanocompósitos de polímeros e NTC vêm sendo amplamente explorados. Estudos comparativos entre nanocompósitos e materiais usualmente utilizados em implantes ortopédicos (Ti6Al4V e CoCrMo), mostraram uma melhor adesão dos osteoblastos nos nanocompósitos, e também não

apresentaram efeitos citotóxicos (WEBSTER,2004;PRICE,2003;SUPRONOWICZ,2002).

Investigou-se a adesão e a proliferação celular em superfícies modificadas e funcionalizadas de MWCNT alinhados por meio de processo oxidativos (LIU,2004), onde formaram-se estruturas poligonais e piramidais. As células foram espalhadas por todas as superfícies e incubadas por um período de sete dias. As imagens utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram células isoladas (uma célula por polígono) depois de um dia e, camadas confluentes após o período de sete dias. No entanto, não foi observado nenhum potencial citotóxico (CORREA-DUARTE,2004).

A toxicidade de nanotubos de carbono de paredes únicas (SWNTs) foram avaliadas em células de queratinócitos humanas. Os resultados mostraram um aumento do stress oxidativo e a inibição de proliferação celular em resposta ao tratamento de células de queratinócitos expostas às partículas de SWNTs (MANNA et al, 2005) . Em estudos mais avançados, utilizou-se testes “*in vivo*” em ratos, onde induziu-se animais a inalarem os NTC, onde os resultados mostraram injúria pulmonar, gerando granulomas multifocais (LAM, 2003). A influência dos SWNTs em células queratinócitas humanas (HEK293) foram investigadas com a intenção de explorar até que ponto os SWNTs são biocompatíveis. Os resultados mostraram que SWNTs podem inibir a proliferação de HEK293 podendo induzir a apoptose e decréscimo na habilidade de adesividade celular. No retorno, as células HEK293 podem também mobilizar a atividade de resposta para a secreção de “pequenas” proteínas isoladas (CUI et al, 2005).

Observando os estudos de biocompatibilidade realizados com NTC, nota-se que há uma grande controvérsia em relação aos seus resultados. Alguns apresentam problemas relacionados com a compatibilidade, quando a dispersão de NTC colocados em cultura celular, indicando a morte celular por problemas físicos e não químicos (apoptose celular, devido ao fato das mesmas englobarem os NTC). Porém, em testes de adesão celular as células se fixam sobre eles, e alta viabilidade celular.

Com os avanços na área de bioengenharia, torna-se cada vez mais importante estudar até que ponto as superfícies dos NTC e os materiais precursores para sua nucleação possam vir a influenciar no crescimento das células. Frequentemente utilizam-se NTC funcionalizados, com o objetivo de facilitar o reconhecimento celular, ou até mesmo ataques químicos para ter um melhor controle sobre as dimensões dos tubos, já que estes fatores podem estar relacionados a melhores interações com o meio biológico.

Neste trabalho utilizou-se como catalisadores Fe e Ni e como substrato Titânico ao invéz de Silício, que é considerado biocompatível. Vários catalisadores metálicos são usados para o crescimento dos NTC utilizando a técnica CVD (DECK,2006). O crescimento de NTC verticalmente alinhados pela técnica CVD utilizando o ferro como catalisador já foram estudados (FASI,2006;KATOK,2006). Lee et al utilizou o Fe como catalisador em substratos de SiO₂ e Ti para o crescimento dos NTC. Comparou-se métodos de CVD intermitentes e convencionais, demonstrando que o método CVD intermitente com multicamadas de Fe/Al é um método versátil para obtenção de NTC verticalmente alinhados com comprimento moderado.

Para avanços na área recobrimentos em próteses, seria importante avaliar o substrato/catalisador em que os NTC serão nucleados, onde desta forma poderia avaliar a influência que tais substratos teriam com o meio biológico e até que ponto estes aspectos influenciariam na aderência e proliferação celular, para possíveis aplicações da nanotecnologia em superfícies implantáveis.

CAPITULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS (MWCNT)

Os NTC são crescidos em duas etapas, no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS/INPE), as quais denominam Pré-Tratamento e Deposição. Para a deposição em substratos de titânio são necessários lixar as amostras (lixa 600) e fazer uma intercamada bem fina de TiN, realizada pelo aquecimento dos substratos a uma temperatura próxima de 400°C, após esta etapa faz-se a deposição de ferro e níquel (7nm de espessura). A deposição de Ni e Fe (7nm) no substrato de titânio foram realizados em uma evaporadora por feixe de elétrons (Auto 306 –EB3 Multihearth Electron Beam Source – BOC Edwards). Para deposição dos NTC, utilizou-se um reator de plasma de microondas, onde inicialmente as amostras foram submetidas a uma etapa de pré-tratamento, a fim de criar “nanoclusters” de níquel e ferro, a partir dos quais os NTC serão nucleados.

Na figura 1 segue o esquema do reator de plasma de microondas onde é feita a etapa de pré-tratamento e deposição dos NTCs.

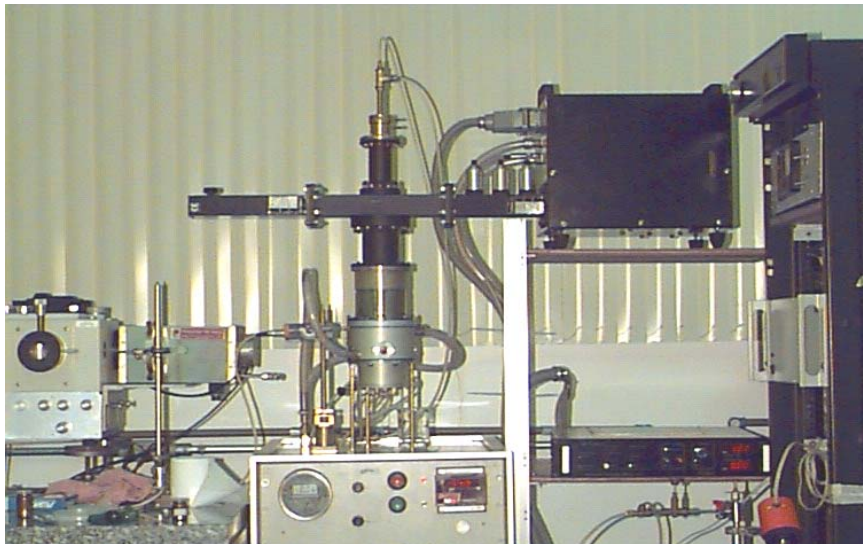


Figura 1: reator de microondas para o crescimento de nanotubos de carbono.

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 são 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 25cm³.

2.2.2. Osteoblastos

A linhagem celular utilizada foi o osteoblasto de camundongo, designado como OFCOL – 2. As células foram cultivadas em DMEM – mistura de sais minerais e aminoácidos – suplementado com 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 25cm³. As células serão mantidas no Laboratório de Cultura de Células da Universidade do Vale do Paraíba.

2.3 MANUTENÇÃO DA CULTURA CELULAR

Ambas as células foram mantidas, como estoque, em nitrogênio Líquido. Partindo deste, foi preparada uma garrafa de cultura de 25cm³, contendo 1 ml de cultura de células (10⁶ células/ml), adicionando-se 2 ml de meio de cultura MEM, enriquecido com 10% SFB, no caso dos fibroblastos, e DMEM, enriquecido com 10% SFB, no caso dos osteoblastos. 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 2ml de tripsina as mesmas foram retiradas, adicionando-se 3 ml de meio de cultura MEM suplementado com 10 % de SFB, ou DMEM suplementado com 10% SFB. Para liberação das células da parede da garrafa, utilizou-se jato forte com o auxílio de pipetador automático. Deste volume serão retiradas alíquotas de 1 ml e passados 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 ágar. 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)

A técnica de MTT é um ensaio quantitativo para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazana, produto formado pela redução de tetrazolium MTT (MOSMANN,1983; LOBNER,2000). A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida de função mitocondrial. Para a realização do ensaio necessita-se de reagentes, sendo estes:

- MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma) Dimetil Sulfoxido DMSO – (Synth)
- Tampão Fosfato PBS – Preparado a partir de 50 ml de tampão fosfato, 950 ml de água Destilada e 99 NaCl (Merck)

Para a realização dos testes foram utilizadas várias amostras com área de 1 cm^2 , onde foram divididas em seus respectivos grupos, de acordo com o intervalo de dias aos quais serão avaliados. Foram utilizados um controle positivo (latex com 1 cm^2), e controle negativo (papel de filtro com 1 cm^2) e o crescimento celular sem a imersão do biomaterial para a validação do teste. As amostras foram divididas em 5 grupos, em placas para cultura de células com 24 cavidades estereis e tratadas, sendo que juntamente às amostras, foram adicionados $30\mu\text{L}$ de concentrado celular (1×10^5 células/ml) em cada poço, completando com $470\mu\text{L}$ de MEM, onde posicionou-se as

amostras. Abaixo segue a tabela da distribuição das amostras com seus respectivos tempos de incubação antes dos testes.

| Placas | Tempos (Hrs) | NTC/Titânio (quantidade) | Controle Positivo (quantidade) | Controle Negativo (quantidade) |
|--------|--------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 0 | 3 | 3 | 3 |
| 2 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| 3 | 24 | 3 | 3 | 3 |
| 4 | 48 | 3 | 3 | 3 |
| 5 | 72 | 3 | 3 | 3 |
| 6 | 96 | 3 | 3 | 3 |

Tabela 1: Divisão dos grupos para os testes de citotoxicidade pelo método direto (MTT)

Após o período de incubação, as amostras foram retiradas, e em seguida os poços foram lavados com 300µL de PBS, e colocou-se 200µL de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazom bromide), numa concentração final de 0,5 mg/ml de MTT-formazana, deixando-as incubadas por um período de 1h em estufa

Após esta etapa retirou-se o MTT, e colocou-se 400µL do solvente DMSO sobre os precipitados de formazana, em seguida a placa foi 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, foi feita utilizando um leitor de ELISA Spectra Count com comprimento de onda de 570 nm. Os testes foram realizados em triplicata e em seguida normalizados conforme a fórmula abaixo:

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

2.4.2 TESTE DE ADESÃO CELULAR

Para a realização dos testes de adesão celular foram utilizadas 2 amostras de MWNTs. Os testes foram realizados em placa de petri, onde foi adicionado sobre o material 200µL de concentrado de células (1×10^6 células/ml) e 800µL de meio nutritivo, incubados por 48 h e 7 dias. Para a fixação das células utilizou-se uma solução de 1,1

ml de tampão cacodilato e 100 μ L de glutaraldeído e 800 μ L de paraformaldeído 4%, adicionando-se 1 mL em cada placa. Após esta etapa, desidratou-se a amostra, fazendo-se a remoção do cacodilato acrescentando-se e retirando-se soluções de etanol de 50 a 100%, com intervalos de 10 minutos por etapa. Em seguida, retirou-se a solução de etanol a 100% e adicionou-se uma solução de 50% de etanol e 50% de HMDS por 10 minutos. Após estas etapas retirou-se a solução de etanol e HMDS e adicionou-se 500 μ L de HMDS em cada poço deixando-se secar em temperatura ambiente. Para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura necessitou-se depositar a um filme de ouro sobre as amostras para melhor visualização das imagens.

CAPITULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS E NANOTUBOS DE CARBONOS OBTIDOS

Conforme descrito no capítulo de materiais e métodos, para a obtenção dos nanotubos de carbono são necessários duas etapas, denominadas: pré-tratamento e deposição.

A figura 2a e 2b mostram as nanopartículas formadas durante o processo de pré-tratamentos das amostras de titânio recobertas com filmes de ferro e níquel (7nm). Observa-se uma alta densidade de partículas presentes nas amostras de titânio recobertas com ferro (7nm), comparando-se aos recobertos com níquel (7nm).

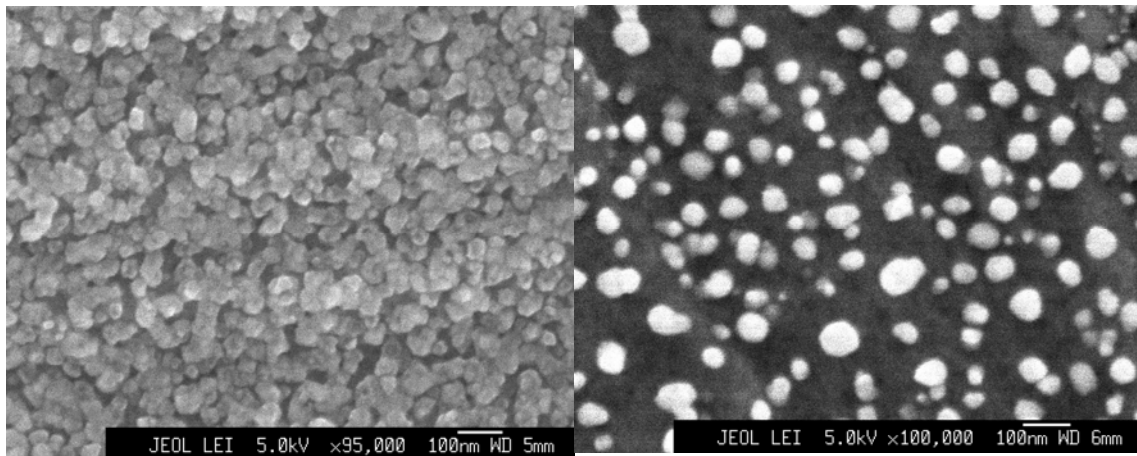


Figura 2: Nanopartículas formadas durante o processo de pré-tratamento, a esquerda amostras recobertas com filme de ferro e a direita recobertas com filme de níquel.

A figura 3a e 3b mostra os MWCNT alinhados obtidos utilizando o titânio recoberto com ferro (7nm) e níquel (7nm), respectivamente. A influência da densidade de nanopartículas aumenta consecutivamente a densidade de MWCNT produzidos, tornando-o um processo mais eficiente.

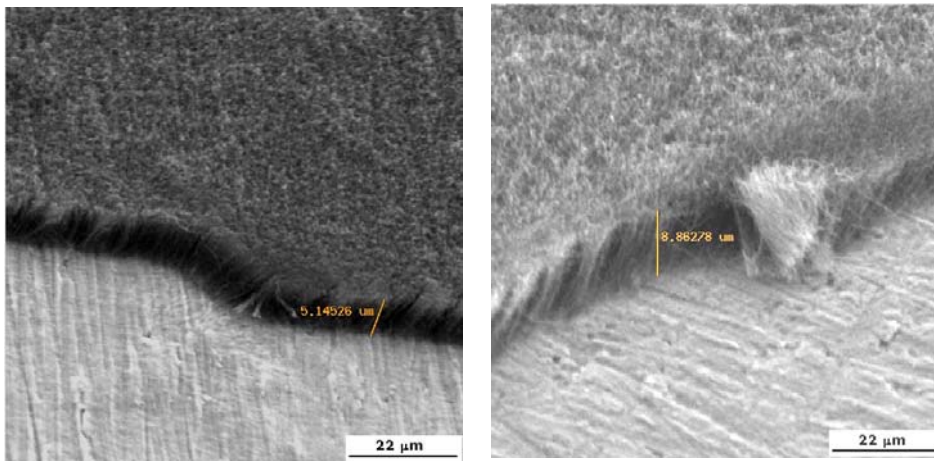


Figura 3: NTC alinhados obtidos utilizando ferro (esquerda) e níquel (direita) como catalisador.

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.

A figura 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.

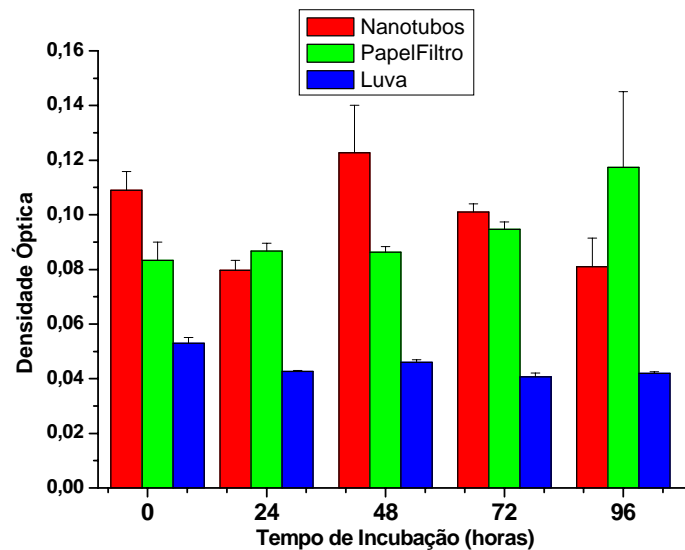


Figura 4: Densidade óptica utilizando Fe como catalisador.

A figura 5 mostra os os valores viabilidade celular, utilizando Fe como catlisador após os respectivos tempos de incubação com as amostras.

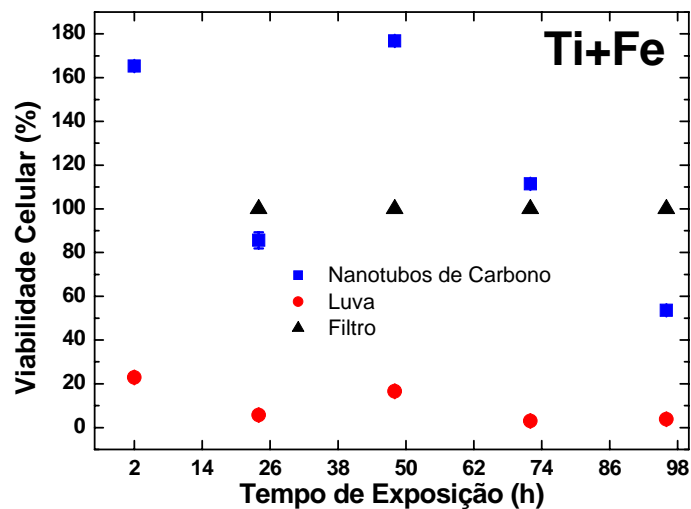


Figura 5: Viabilidade celular após os respectivos tempos de incubção com NTC, latéx e papel de filtro

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

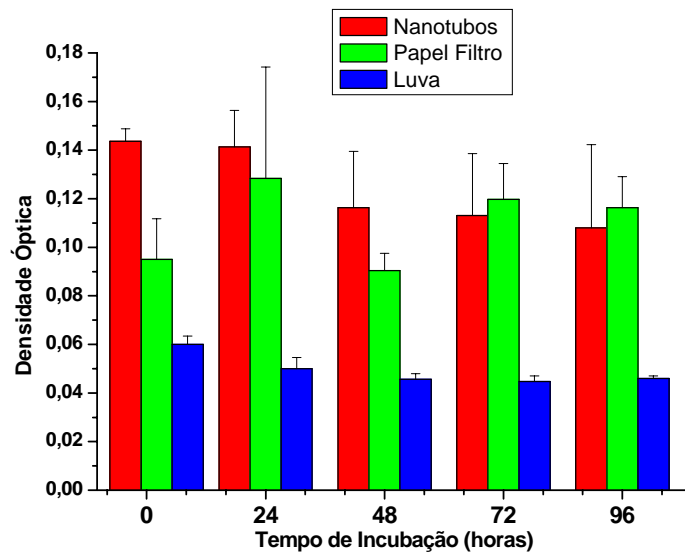


Figura 6: Densidade óptica utilizando Ni como catalisador.

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

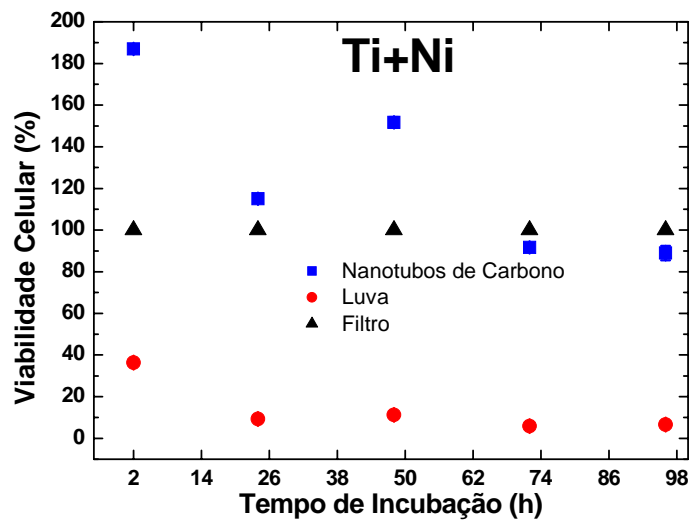


Figura 7: Viabilidade celular após os respectivos tempos de incubação com NTC, látex e papel de filtro

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.

3.3 TESTE DE ADESÃO CELULAR

As imagens mostram que a atração celular provavelmente está relacionada as propriedades físico-químicas dos NTC, que acontece por forças iônicas e de Van der Walls (ANSELME, 1999). A adesão celular no material é evidenciada pelo formato em que as células se mostram, pois quando as mesmas estão procurando pontos de ancoragem seu formato é oval, e quando aderidas se espalham apresentando o formato planar. A figura 8 mostra a adesão celular dos fibroblastos após 48 hrs de incubação. E, nas figuras 9 e 10 adesão de osteoblastos de 48 hrs e 7 dias, respectivamente. Com alta resolução consegue-se visualizar a interação das projeções citoplasmáticas das células com as pontas dos MWCNT alinhados. Em ambos os casos podemos notar a interação celular após 48 horas e 7 dias de incubação com as células, onde evidencia-se a preferência celular em se aderir em superfícies nanoestruturadas. Estas disposições planares das células sob um determinado material mostra a alta adesão e biocompatibilidade. A alta adesão celular dos fibroblastos e osteoblastos acontece em ambas as amostras de titânio, tanto utilizando o ferro como o níquel como catalisadores, onde demonstra-se a preferência das células em se aderirem ao NTC alinhados crescidos sobre Ti.

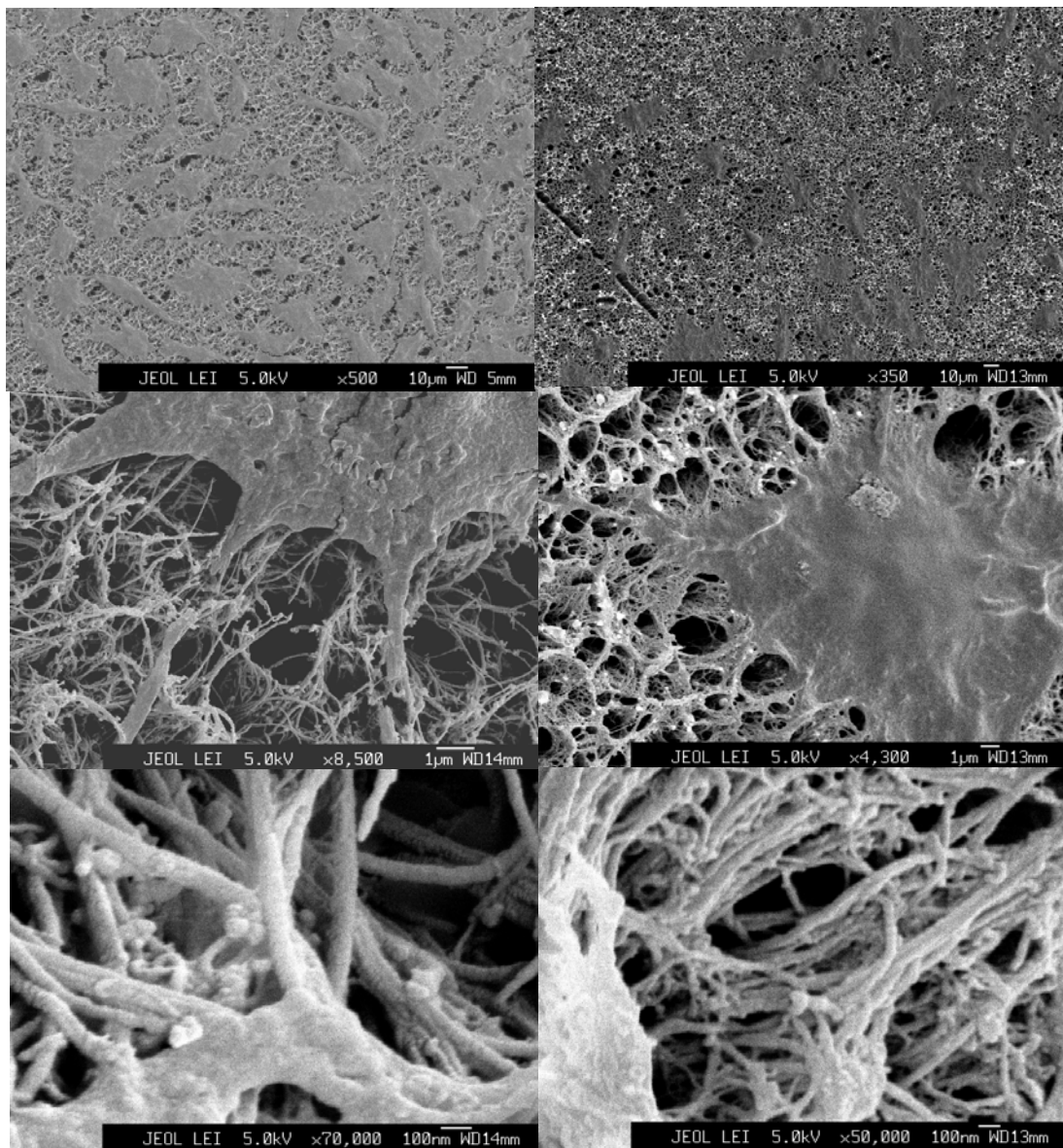


Figura 8: Adesão celular após incubação de 48hrs de fibroblastos, a esquerda amostras utilizando Ni como catalisador e a direita Fe.

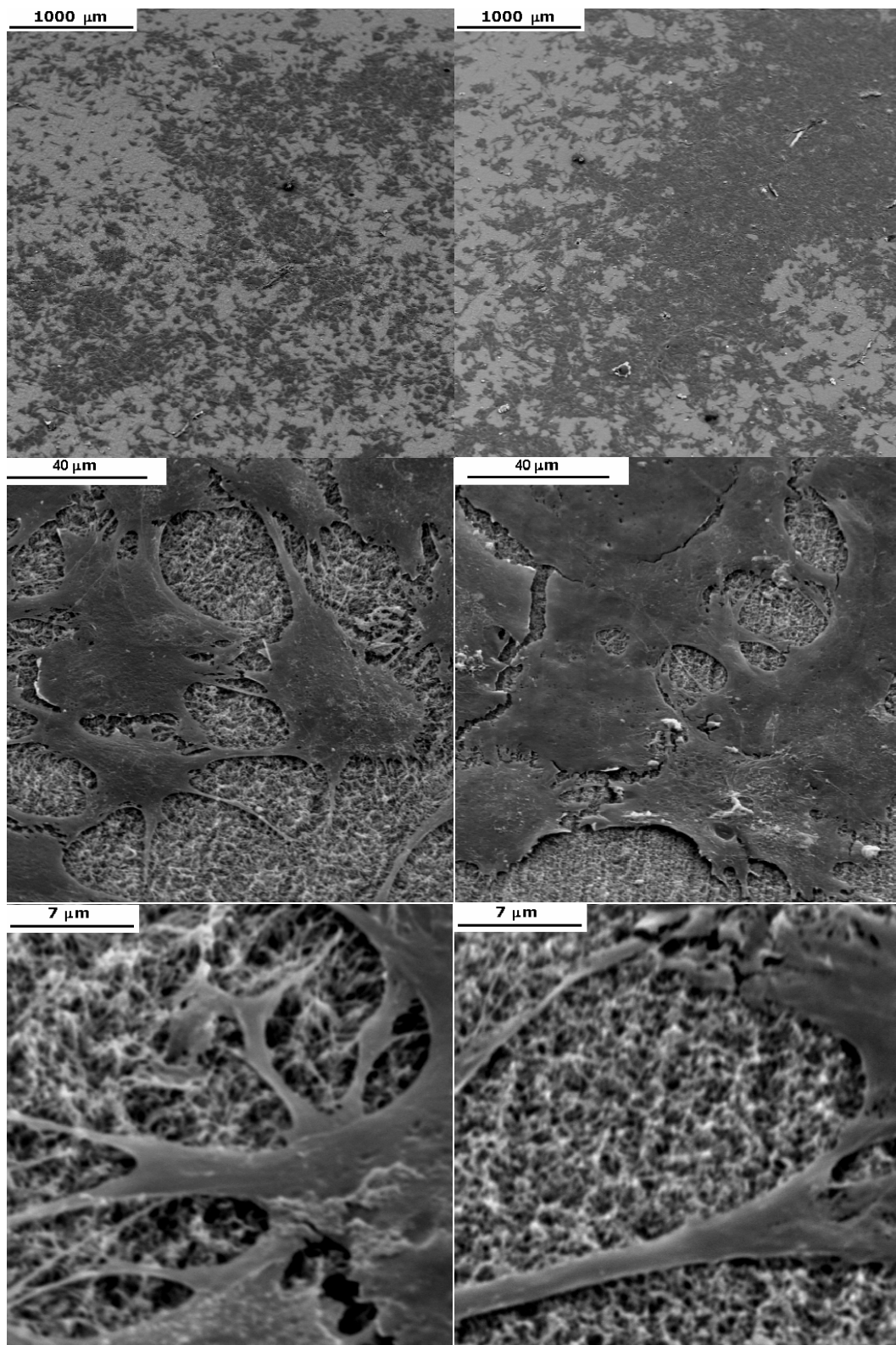


Figura 9: Adesão celular após incubação de 48hrs de osteoblastos, a esquerda amostras utilizando Ni como catalisador e a direita Fe.

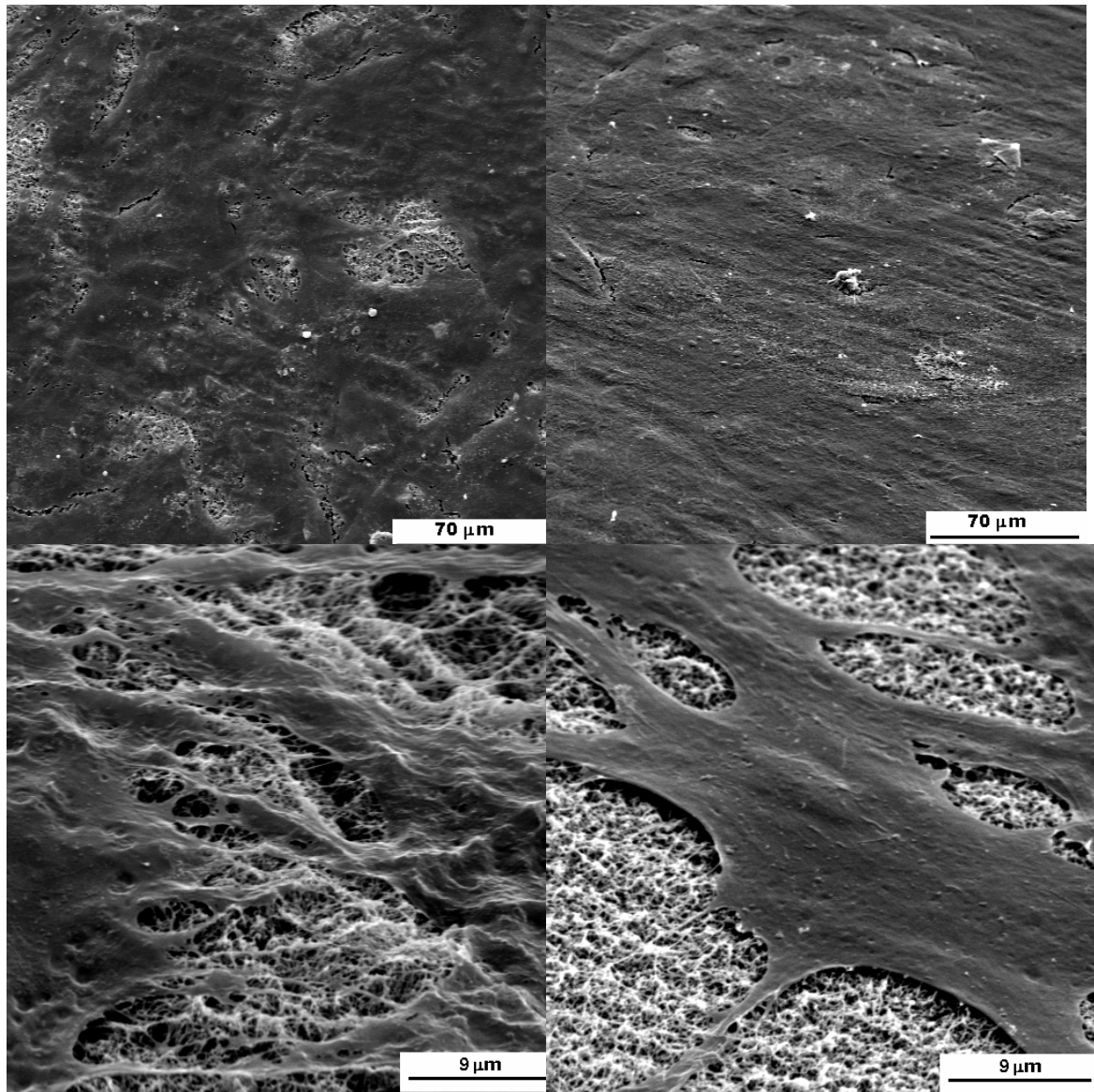


Figura 10: Adesão celular após incubação de 7 dias de osteoblastos, a esquerda amostras utilizando Ni como catalisador e a direita Fe.

CAPITULO 4

CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

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.

Quanto a adesão celular podemos verificar que em ambos os casos, as células de fibroblastos e osteoblastos se interagem diretamente com as pontas nanométricas dos nanotubos de carbono alinhados, aumentando e se espalhando consideravelmente por toda a superfície durante o período de 7 dias, formando praticamente uma monocamada de células sob a superfície.

CAPÍTULO 5

TRABALHOS FUTUROS

- Utilização de nanocompósitos de nanotubos de carbono alinhados e polímeros biocompatíveis;
- Utilizar outros testes de biocompatibilidade – Atividade enzimática;
- Testes de Cinética do Crescimento Celular;
- Imagens de Fluorescência para verificar as estruturas celulares – Diferenciação Celular;
- Comparação dos testes com outros materiais implantáveis.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGINS, H.J.; ALOCK, N.W.; BASAL, M; ET AL. **METALLIC WEAR IN FAILED TITANIUM-ALLOY TOTAL HIP REPLACEMENTS - A HISTOLOGICAL AND QUANTITATIVE-ANALYSIS.** J. BONE JOINT. SURG. A 70:347–356, 1988.

ANSELME, K. **OSTEOBLAST ADHESION ON BIOMATERIALS.** BIOMATERIALS 2:667-681, 2000.

CORREA-DUARTE, M.A.; WAGNER, N.; ROJAS-CHAPANA, J. ET AL. **FABRICATION AND FIOCOMPATIBILITY OF CARBON NANOTUBE-BASED 3D NETWORKS AS SCAFFOLDS FOR CELL SEEDING AND GROWTH.** NANO LETTERS 4(11):2233-6, 2004.

CUI, D.; TIAN, F.; OZKAN, C.S.; WANG, M.; GAO, H.. **EFFECT OF SINGLE WALL CARBON NANOTUBES ON HUMAN HEK293 CELLS.** TOXICOLOGY LETTERS, 155:73–85, 2005.

DEARNALEY, G. ARPS, J.H. **BIOMEDICAL APPLICATIONS OF DIAMOND-LIKE CARBON (DLC) COATINGS: A REVIEW.** SURFACE & COATINGS TECHNOLOGY 200 (7): 2518-2524, 2005.

DECK, C.P.; VECCHIO, K. **PREDICTION OF CARBON NANOTUBE GROWTH SUCCESS BY THE ANALYSIS OF CARBON-CATALYST BINARY PHASE DIAGRAMS.** CARBON 44 (2): 267-275, 2006

ELIAS, K.E.; PRICE, R.L.; WEBSTER, T.J. **ENHANCED FUNCTIONS OF OSTEOBLASTS ON NANOMETER DIAMETER CARBON FIBERS.** BIOMATERIALS 23: 3279-87, 2002.

GABAY, T; JAKOBS, E.; BEM-JACOB, E. ET AL. **ENGINEERED SELF-ORGANIZATION OF NEURONAL NETWORKS USING CARBON NANOTUBE CLUSTERS.** PHYSICA A, 21 ; 350 (2-4): 611-21, 2005.

GRILL, A. AND MEYERSON, B.S. IN: K.E. SPEAR AND J.P. DISMUKES. EDITORS. **SYNTHETIC DIAMOND: EMERGING CVD SCIENCE AND TECHNOLOGY**, WILEY, NEW YORK p.91, 1994.

HÜBLER, R. **CHARACTERIZATION OF GRADIENT INTERFACES IN THIN FILM MULTILAYERS USED TO PROTECT ORTHOPAEDIC IMPLANTS**, SURF. COAT. TECHNOL. 116–119: 1116–1122, 1999.

KATOK, K.V.; TERTYKH, V.A.; BRICHKA, S.Y. ET AL. **PYROLYTIC SYNTHESIS OF CARBON NANOSTRUCTURES ON NI, CO, FE/MCM-41. CATALYSTS MATERIALS CHEMISTRY AND PHYSICS** 96 (2-3): 396-401, 2006.

LAM, C.; JAMES, J. T.; MCCLUSKEY, R.; HUNTER, R. L. **PULMONARY TOXICITY OF CARBON NANOTUBES IN MICE 7 AND 90 DAYS AFTER INTRATRACHEAL INSTILLATION**. TOXICOLOGICAL SCIENCES 72 (1):44, 2003.

LIU, C.; BI, Q.; MATTHEWS, A. **TRIBOLOGICAL AND ELECTROCHEMICAL PERFORMANCE OF PVD TIN COATINGS ON THE FEMORAL HEAD OF TI-6AL-4V ARTIFICIAL HIP JOINTS**. SURF. COAT. TECHNOL. 163–164:597–604, 2004.

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.; TRAVA-AIROLDI, 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.

LOMBARDI, A.V.; MALLORY, T.H.; RAUGHN, B.K. ET AL. **ASEPTIC LOOSENING IN TOTAL HIP-ARTHROPLASTY SECONDARY TO**

OSTEOLYSIS INDUCED BY WEAR DEBRIS FROM TITANIUM-ALLOY MODULAR FEMORAL HEADS, P. J. BONE JOINT. SURG. A 71:PP. 1337–1342, 1989.

MANNA, S.K.; SARKAR, S.; BARR, J.; ET AL. SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBE INDUCES OXIDATIVE STRESS AND ACTIVATES NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR-KAPPA B IN HUMAN KERATINOCYTES. NANO LETTERS 5 (9):1676-1684, 2005.

MOSMANN, T. RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELLULAR GROWTH AND SURVIVAL: APPLICATION TO PROLIFERATION AND CYTOTOXICITY ASSAYS. JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 65 (1-2): 55-63, 1983.

NAGUIB, N.N.; MUELLER, Y.M.; BOJUCZUC, P.M. ET AL. EFFECT OF CARBON NANOTUBE STRUCTURE ON THE BINDING OF ANTIBODIES. NANOTECH. 16(4):567-71, 2005.

NISHIGUCHI, S.; KATO, H.; FUJITA, H.; OKA, M. ET AL. TITANIUM METALS FORM DIRECT BONDING TO BONE AFTER ALKALI AND HEAT TREATMENTS. BIOMATERIALS 22:2525–2533, 2001.

PRICE, R.A.; WAID, M.C.; KAREN M. HABERSTROH, K.M.; ET AL. SELECTIVE BONE CELL ADHESION ON FORMULATIONS CONTAINING CARBON NANOFIBERS. BIOMATERIALS 24 (11) 1877-1887, 2003.

SALVETAT, J.P.; BONARD, J.M.; THOMSON, N.H. ET AL. MECHANICAL PROPERTIES OF CARBON NANOTUBES. APPLIED PHYSICS A: MATERIALS SCIENCE & PROCESSING, 69 (3): 255-60, 1999.

SHENHAR, A.; GOTMAN, I.; RADIN, S. ET AL. MICROSTRUCTURE AND FRETTING BEHAVIOR OF HARD TIN-BASED COATINGS ON SURGICAL TITANIUM ALLOYS. CERAM. INT. 26:709–713, 2000.

SMART, S.K.; CASSADY, A.I.; LU, G.Q. ET AL. **THE BIOCOMPATIBILITY OF CARBON NANOTUBES.** CARBON 44 1034-1047, 2006

WEBSTER, T.J.; WAID, M.C.; MCKENZIE, J.L.; ET AL. **NANOBIO TECHNOLOGY: CARBON NANO-FIBERS AS IMPROVED NEURAL AND ORTHOPEDIC IMPLANTS.** NANOTECH. 15 (1): 48-54, 2005.

WILLIAMS, J.M. and BUCHARAN, R.A. **ION-IMPLANTATION OF SURGICAL TI-6AL-4V ALLOY.** MATER. SCI. ENG. 69:237-246, 1995.

ANEXO

Artigos publicados

1. LOBO, A. O. ; ANTUNES, E. F. ; PALMA, M. B. S. ; PACHECO-SOARES, C. ; TRAVA-AIROLDI, V. J. ; CORAT, E. J. . Cell Viability and Adhesion on as Grown Vertically Aligned Carbon Nanotubes. Materials Research Society Symposium Proceedings, v. 950E, p. 0950-D04-16-0950-D04-18, 2007.
2. LOBO, A. O. ; ANTUNES, E. F. ; PALMA, M. B. S. ; PACHECO-SOARES, C. ; TRAVA-AIROLDI, V. J. ; CORAT, E. J. . Biocompatibility of Multi-Walled Carbon Nanotubes grown on titanium and silicon surfaces. Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems, v. XX, p. 1-7, 2007.