

COMPÓSITO DE NANOCELULOSE BACTERIANA E NANOTUBOS DE CARBONO

G. COLLA¹, V. H. SOUZA¹, F. V. BERTI¹ e L. M. PORTO¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Alimentos
E-mail para contato: guilherme_collas@intelab.ufsc.br

RESUMO – A nanocelulose bacteriana (BNC) e os nanotubos de carbono (NTCs) possuem propriedades que instigam o uso desses materiais na área biomédica. No entanto, a utilização de dispositivos biomédicos contendo NTCs precisa ser acompanhada de estudos de citotoxicidade e biocompatibilidade. Foram produzidas membranas de BNC e de BNC+NTCs que indicaram visualmente a incorporação dos NTCs na membrana de BNC. As amostras também foram analisadas quanto à sua microestrutura, citotoxicidade e condutividade elétrica. Quanto à microestrutura do compósito de BNC+NTCs pode-se notar a incorporação e adesão superficial dos NTCs na membrana de BNC. A concentração de NTCs usada no inóculo demonstrou não ser citotóxica em linhagem de fibroblastos L929 e conseguiu-se atingir uma condutividade elétrica de $0,00040 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$ o que aponta que o método utilizado para obtenção do compósito pode ser um método alternativo para obtenção de compósitos eletroativos com base em BNC.

1. INTRODUÇÃO

A nanocelulose bacteriana (BNC) possui propriedades fisico-químicas interessantes para o seu uso na área biomédica em diversas aplicações, propriedades como capacidade de reter água, resistência à tração e rigidez, cristalinidade, porosidade, formação de uma rede de nanofibras, afinidade biológica e a possibilidade de ser modelada em diferentes estruturas tridimensionais por meio de seu modo de cultivo (Yan *et al.*, 2008). O uso da BNC em aplicações como biomaterial condutor ou dispositivo elétrico é impedido devido a algumas de suas características quando pura, tais como não possuir condutividade elétrica e magnetismo. À vista disso, melhorias devem ser estudadas para que o biomaterial possa se adequar a esse tipo de aplicações. (Erbas *et al.*, 2016)

Nanotubos de carbono (NTCs) são nanomateriais considerados parcialmente unidimensionais com elevadas propriedades mecânicas e elétricas. Dessa forma, os NTCs são estudados na área biomédica para aplicações como biosensores, *scaffolds*, dispositivo de liberação de fármacos, entre outros. No entanto, a utilização de dispositivos biomédicos contendo NTCs precisa ser acompanhada de estudos de citotoxicidade e biocompatibilidade. (Park *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2008) A viabilidade celular, por exemplo, está relacionada à atividade mitocondrial das células e indica, caso estudada em um biomaterial, a citotoxicidade do mesmo, podendo ser avaliada por diferentes métodos como a técnica fotocolorimétrica utilizando-se o reagente MTT. O MTT é um sal de tetrazólio que reduzido a um derivado formazan de cor roxa, devido à atividade oxidativa, indica a existência de função mitocondrial e, por conseguinte, a viabilidade celular (Montes-Fonseca *et al.*, 2012).

Considerando o contexto até aqui apresentado, o trabalho tem como objetivo a produção de um compósito de BNC e NTCs assim como a análise de sua estrutura, citotoxicidade dos NTCs e condutividade elétrica do compósito.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produção das membranas BNC+NTCs

As membranas foram preparadas em placas de 24 poços com 1 cm de diâmetro estéreis e 1 mL de inóculo da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* em meio manitol (25 g·L⁻¹ de manitol, 5 g·L⁻¹ de extrato de levedura e 3 g·L⁻¹ de peptona bacteriológica). O inóculo é preparado no próprio meio de cultura com um pré-inóculo de 10% do volume total onde são suspensas as bactérias até que o pré-inóculo possua aproximadamente 0,150 de absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm. A uma parte do inóculo também foi adicionado 0,05 mg·mL⁻¹ de NTCs comercial marca Bayer Materials Science. O crescimento bacteriano aconteceu em condição estática a temperatura ambiente durante 12 dias. Depois de 7 dias de cultivo, as membranas foram purificados em solução 0,1 mol·L⁻¹ de NaOH a 50 °C e após esse período as membranas foram lavadas com água destilada até que pH da água de enxágue fosse equivalente ao da água usada na lavagem. Esterilizou-se o material em autoclave (121 °C e 1,1 atm). As membranas de BNC obtidas, tanto com e sem NTCs, foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2.2. Teste de citotoxicidade

O protocolo utilizado neste experimento segue o que foi determinado pelo Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization -ISO 10993), sendo que o ensaio *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a bioatividade de qualquer substância para uso em dispositivos biomédicos.

Células de fibroblasto murino da linhagem L-929, na densidade de 2500 células por poço, foram incubadas em placas de cultura de 96 poços, contendo 100 µL por poço de meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL), 2 mM de L-glutamina, 4,5 g·L⁻¹ de glicose, 1,5 g·L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 10 mL de penicilina e estreptomicina e colocadas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂, à temperatura de 37°C. No grupo controle as células foram tratadas apenas com meio de cultura. Após as 24 horas iniciais de incubação o meio de cultura DMEM foi removido e as células foram tratadas com concentrações crescentes de NTC. Foram utilizadas cinco concentrações de NTC puro (0,01, 0,05, 0,1, 1 e 10 mg·mL⁻¹), todas dispersas em meio de cultura DMEM. Após 48 horas, as soluções foram removidas dos poços e a cada poço foram adicionados 100 µL de uma solução 5 mg·mL de reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiasol-2-il]-2,5-difeniltetrazol) em meio de cultura DMEM, a fim de observar a atividade mitocondrial das células viáveis. As células foram novamente incubadas por 2,5 horas à temperatura de 37°C. Logo após a remoção desses reagentes, foram adicionados 200 µL de solução dimetilsulfóxido (DMSO) por poço. A absorbância a 570 nm foi determinada em um

leitor de microplacas automático. Os resultados foram expressos em porcentagem, assumindo o controle (0% de NTC) como 100% de atividade metabólica.

2.3. Teste de condutividade elétrica

Para o teste de condutividade elétrica utilizou-se o método padrão quatro pontas onde uma corrente foi aplicada entre dois terminais externos, com uma fonte de tensão DC Keithley, modelo 6220. A diferença de potencial foi medida entre os terminais internos, com um eletrômetro da Keithley, modelo 6517A. O compósito foi posicionado entre os terminais externos para a medida da diferença de potencial, alterando-se a corrente no equipamento. A condutividade elétrica foi calculada a partir da Equação 1, substituindo-se os valores de corrente e diferença de potencial.

$$\sigma = \frac{I}{V} \times \frac{1}{d} \times \frac{\ln 2}{\pi} \quad (1)$$

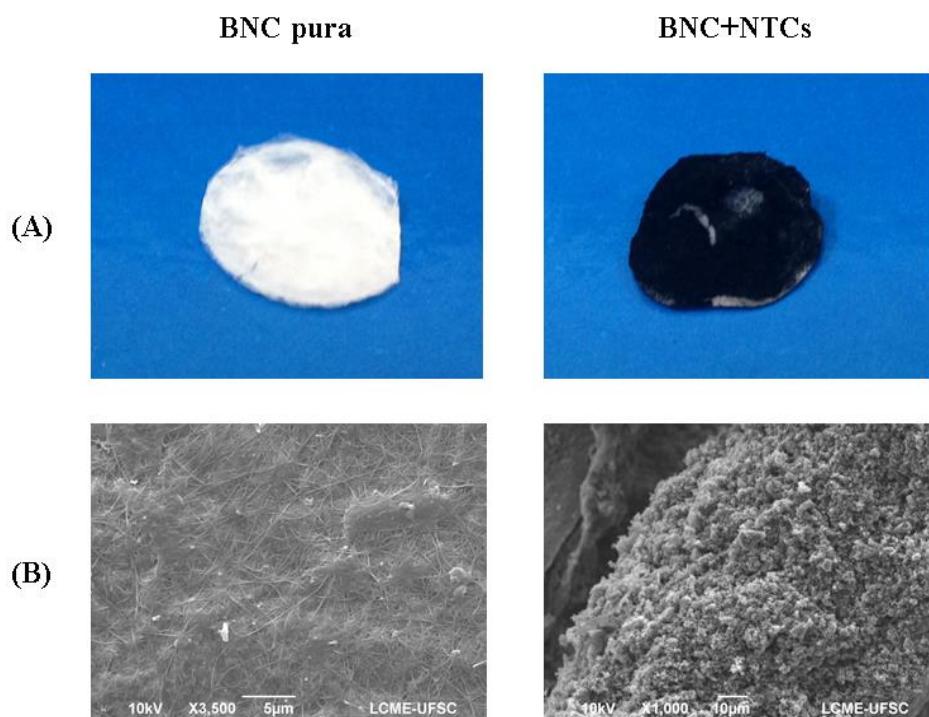
Na Equação 1, σ é a condutividade elétrica em $S \cdot cm^{-1}$; I é a corrente elétrica, em A; d é a espessura da amostra em cm; V é a Diferença de Potencial em V; e $\ln 2/\pi$ é o fator de correção.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção das membranas BNC/NTCs

As membranas geradas pelos inóculos podem ser observadas na Figura 1 (a), assim como as micrografias de MEV realizadas (b).

Figura 1 – (a) Imagem macroscópica da BNC e BNC+NTCs (b) micrografia das membranas



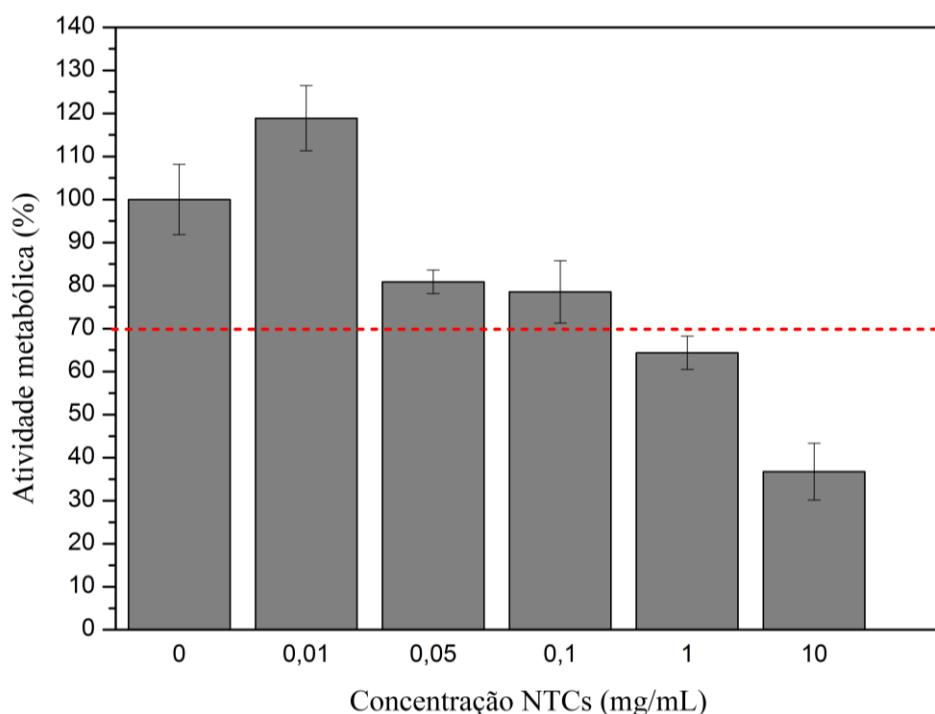
O aspecto visual das membranas de BNC pura e BNC+NTCs divergiu bastante. A membrana de BNC pura possui cor esbranquiçada e espessura fina enquanto a membrana de BNC+NTCs possui cor preta e espessura semelhante à membrana de BNC pura. A cor preta deve-se à incorporação dos NTCs na estrutura tridimensional da membrana, principalmente na superfície porosa que ficou em contato com o meio de cultivo contendo NTCs.

Em relação à microestrutura das membranas observadas nas micrografias pode-se perceber que a de BNC apresentou a estrutura de uma rede de alta densidade de fibras livremente orientadas, como a conhecida pela literatura (Godinho *et al.*, 2015). A microestrutura das membranas de BNC+NTCs apresentou uma forma fragmentada em toda a superfície, à qual foi atribuída aos NTCs aderidos superficialmente por toda a extensão da membrana.

3.2. Teste de citotoxicidade

A Figura 2 mostra os resultados de viabilidade celular das células L929 cultivadas em contato direto com as membranas de BNC e BNC+NTCs para as diversas concentrações de NTCs estudadas.

Figura 2 – Resultado da atividade metabólica dos fibroblastos L929, alterando-se as concentrações de NTCs após 24h de exposição



No gráfico a linha vermelha representa o 70% de viabilidade celular, sendo que todas as concentrações em que a viabilidade celular excede os 70% são consideradas não citotóxicas, e ainda na concentração de $0,01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ houve um estímulo no crescimento das células quando comparados com o controle positivo. Considerando-se o método testado, a concentração de 0,05% utilizada para a produção das membranas é considerada não citotóxica. Os NTCs apresentaram toxicidade a partir da concentração de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ após

24h de exposição. Além disso, sabe-se que a atividade metabólica das células L929 em BNC pura não excede o valor de 70% (Godinho *et al.*, 2015).

3.3. Teste de condutividade elétrica

A Tabela apresenta valores de compósitos de nanocelulose bacteriana e suas respectivas condutividades. O teste realizado resultou em uma condutividade média de $0,00040\text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$ para o compósito de BNC+NTCs.

Tabela 1 – Comparação entre a condutividade elétrica do presente trabalho e de outros que constam na literatura.

Compósito	Método de produção	Auxiliar de processo	Condutividade Elétrica ($\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Referência
BNC com 0,02%(m/v) NTCs	Adsorção de NTCs	Sulfactante (CTAB)	0,0000037	Zhang <i>et al.</i> , 2012
BNC com $0,05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de NTCs	Dispersão dos NTCs no inóculo	Nenhum	0,00040	Presente trabalho
BNC com 9,6% (m/v) de NTCs	Imersão da BNC em uma dispersão de NTCs	Sulfactante (CTAB)	0,14	Yoon <i>et al.</i> , 2006
BNC com 8,32% (m/v) de NTCs	Dispersão dos NTCs na superfície da BNC	Propanossulfonato e alginato de sódio	0,189	Fugetsu <i>et al.</i> , 2008.

Considerando a baixa complexidade do método utilizado, o fato de que não se adiciona nenhum auxiliar de processo, e a concentração utilizada de NTCs, que demonstrou não ser citotóxica, obteve-se uma condutividade elétrica baixa, mas considerável em relação aos outros métodos.

4. CONCLUSÕES

O compósito de Nanocelulose Bacteriana e Nanotubos de Carbono foi produzido com sucesso através da produção *in situ* de membranas de BNC associadas com NTCs. As membranas demonstraram a incorporação dos NTCs, principalmente na superfície, através das análises de MEV pode-se notar a presença dos NTCs aderidos uniformemente à microestrutura do BNC.

A citotoxicidade dos NTCs foi totalmente dependente da concentração. A utilização de NTCs na proporção de $0,05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ demonstrou não ser citotóxica para as células L929 após 24h de cultivo. O compósito apresentou uma condutividade elétrica de $0,0004 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$, o que aponta que o método utilizado para obtenção do compósito pode ser um método alternativo para obtenção de compósitos eletroativos com base em BNC.

6. REFERÊNCIAS

- ERBAS, E.; KIZILTAS, A.; RHODES, K.; EMANETOGLU, N. W.; BLUMENTRITT, M.; GARDNER, D. J.. Electrically conductive nano graphite-filled bacterial cellulose composites. *Carbohydrate Polymers*, v. 136, 1144–1151, 2016.
- FUGETSU, B.; SANO, E.; SUNADA, M.; SAMBONGI, Y.; SHIBUYA, T.; WANG, X. S. Electrical conductivity and electromagnetic interference shielding efficiency of carbon nanotube/cellulose composite paper. *Carbon*, v. 46, 1256–1258, 2008.
- GODINHO, J. F.; BERTI, F. V.; MÜLLER, D.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Incorporation of Aloe vera extracts into nanocellulose during biosynthesis. *Cellulose*, v. 23(1), 545-555, 2016.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity,” ISO 10993–5., vol. 5, pp. 1 – 52, 2009.
- MONTES-FONSECA, S. L.; ORRANTIA-BORUNDA, E.; AGUILAR-ELGUEZABAL, A.; HORTA, C. G.; TALAMÁS-ROHANA, P.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, B. Cytotoxicity of functionalized carbon nanotubes in J774A macrophages. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 8(6), 853–859, 2012.
- PARK, W.; KIM, H.; KWON, S.; HONG, Y.; JIN, H.. Synthesis of bacterial celluloses in multiwalled carbon nanotube-dispersed medium. *Carbohydrate Polymers*, v. 77(3), p. 457–463, 2009.
- YAN, Z.; CHEN, S.; WANG, H.; WANG, B.; JIANG, J. (2008). Biosynthesis of bacterial cellulose / multi-walled carbon nanotubes in agitated culture. *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 659–665, 2008.
- YOON, S. H.; JIN, H. J.; KOOK, M. C.; & PYUN, Y. R. Electrically conductive bacterial cellulose by incorporation of carbon nanotubes. *Biomacromolecules*, v. 7, 1280–1284, 2006.
- ZHANG, X.; LIU, X.; ZHENG, W.; ZHU, J. Regenerated cellulose/graphene nanocomposite films prepared in DMAC/LiCl solution. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, 26–30, 2012.