

NANOCOMPÓSITOS DE CARBONO COMO SUPORTE NA BIOENGENHARIA TECIDUAL – NANOGBIOTEC

Ingrid Rosales Costa¹; Natália Zago Sentena²; Altevir Rossato Viana³; Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden⁴; Francine Carla Cadoná⁵; Sergio Roberto Mortari⁶

RESUMO

O óxido de grafeno (GO) é um nanomaterial que possui na sua superfície grupos epóxi, hidroxilas, carbonilas e carboxilas e esses grupos promovem interações biológicas sendo possível a utilização como revestimento na engenharia tecidual. Sendo assim o presente trabalho teve como objetivo produzir nanocompositos contendo polímeros e GO como suporte, afim de avaliar o crescimento tridimensional de células, matriz extracelular e diferenciação celular. O GO foi produzido segundo Salles (2020), onde o grafite foi oxidado com KMnO₄ em meio de ácido sulfúrico. Para os nanocompositos, duas técnicas foram utilizadas: evaporação de solvente e prensa hidráulica. Após, os mesmos foram caracterizados pela técnica de Difração de Raios X (DRX) e ensaios de viabilidade celular *in vitro* de MTT. Pelos resultados obtidos, o método de evaporação de solvente não foi eficaz para a formação dos nanocompósitos. Já o método de prensagem do polímero:GO mostrou-se rápido e eficiente.

Palavras-chave: Cultura Celular; Nanomateriais de Carbono; Polímeros.

Eixo Temático: Tecnologia, Inovação e Desenvolvimento Sustentável (TIDS).

1. INTRODUÇÃO

O carbono é um dos elementos mais abundantes existentes na natureza e pode ser encontrado em diversas formas alotrópicas estáveis que variam do diamante, o carbono amorfo, grafite, nanotubo de carbono, fulereno e o grafeno (DRESSELHAUS, 2004).

O grafeno consiste em uma folha plana de átomos de carbono, densamente compactados e com espessura de apenas um átomo, configurados em uma estrutura cristalina hexagonal semelhante a favos-de-mel, possuindo propriedades únicas, como alta condutividade térmica e mobilidade de carga, elevada resistência mecânica, módulo de elasticidade e alta área superficial (NUNES FILHO, 2021).

Já o óxido de grafeno (GO) é um nanomaterial que possui em sua superfície grupos epóxi, hidroxilas, carbonilas e carboxilas, esses grupos promovem interações biológicas, permitindo a sua utilização como revestimento na Engenharia Tecidual, a partir disto, diversas pesquisas avaliam a incorporação de cargas de GO em polímeros e avaliam a sua influência sobre o nanocompósito resultante (Rhoden et al, 2017).

Os nanocompósitos poliméricos têm atraído grande interesse, visto que estes apresentam propriedades físico-químicas diferentes entre os micro e macro-compósitos, em comparação com os polímeros puros, os nanocompósitos poliméricos apresentam uma série de propriedades diferenciadas, tais como propriedades de

¹ Ingrid Rosales Costa – Universidade Franciscana ingrid.costa@ufn.edu.br

² Natália Zago Sentena – Universidade Franciscana natalia.zago@ufn.edu.br

³ Altevir Rossato Viana – Universidade Franciscana altevir.viana@ufn.edu.br

⁴ Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden – Universidade Franciscana cristianorbr@ufn.edu.br

⁵ Francine Carla Cadoná – Universidade Franciscana f.cadona@ufn.edu.br

⁶ Sergio Roberto Mortari – Universidade Franciscana mortari@ufn.edu.br

barreira, aumento do módulo de elasticidade e da força de tração, retardância a chama, resistência à corrosão (Rhoden et al, 2021).

Além disso os biopolímeros são bastante utilizados por sua boa biocompatibilidade e biodegradabilidade como por exemplo a quitosana que vem sendo bastante investigada por ser um biopolímero natural encontrado em exoesqueletos de crustáceos, que se dissolve facilmente em ácidos orgânicos diluídos e que tem capacidade de formar filmes, fibras ou géis (LAVORGNA, 2010).

Além dos biopolímeros também são utilizados copolímeros, como o Eudragit sendo derivado do ácido acrílico e éster metílico do ácido metacrílico. Atualmente, esse copolímero possui aplicação na área de liberação controlada de fármacos, citocompatibilidade, biodegradabilidade e estabilidade em meio aquoso (em soluções de pH < 6.5) (PATRA, 2017)

2. METODOLOGIA

Produção do óxido de grafeno (GO)

O GO foi preparado conforme Salles et al (2020), um método adaptado de Hummers. Neste método o grafite é oxidado pelo tratamento com KMnO_4 na presença de H_2SO_4 concentrado.

Inicialmente foram pesados em um bequer de 500 mL 1,0 g de grafite em pó (Sigma-Aldrich, <20 μm , flakes) e adicionados 23,0 mL de H_2SO_4 concentrado (P.A, 95-98%, Synth) e 0,5 g de NaNO_3 (P.A, Merck) (Figura 1 a). O bequer contendo a mistura mencionada acima foi colocado em banho de gelo e com agitação magnética. Lentamente foram adicionados 3,0 g de KMnO_4 (P.A., Synth), mantendo-se a mistura sob forte agitação magnética por 60 minutos, em seguida, 46,0 mL de água destilada foram adicionados, lentamente, evitando aquecimento no meio reacional (temperatura não ultrapasse 90°C).

A mistura foi mantida em agitação por 15 minutos, e após foram adicionados 10,0 mL de H_2O_2 (P.A., 30% v/v, Vetec) e 140,0 mL de água deionizada (Figura 1 b). O material resultante sólido (GO) foi filtrado e lavado com 250,0 mL de uma solução 5,0% v/v de HCl (P.A., Synth) e então lavado com água destilada inúmeras vezes, até atingir pH neutro (Figura 1 c).

Após esta etapa o mesmo foi mantido em temperatura ambiente para secagem total, para então dar início as caracterizações e produção dos nanocompósitos.

Produção dos nanocompósitos

Na produção dos nanocompósitos, foram utilizadas duas técnicas, sendo elas: a técnica de evaporação de solvente e produção com uso da prensa hidráulica.

Nanocompósitos por evaporação de solvente

Inicialmente foram utilizados os polímeros Quitosana de baixo peso molecular e Eudragit RS 100, na proporção de 1:0,05 e 2:0,05 de polímero:GO. Nesta técnica houve uma dificuldade com os nanocompósitos contendo o polímero Eudragit, pois o

¹ Ingrid Rosales Costa – Universidade Franciscana ingrid.costa@ufn.edu.br

² Natália Zago Sentena – Universidade Franciscana natalia.zago@ufn.edu.br

³ Altevir Rossato Viana – Universidade Franciscana altevir.viana@ufn.edu.br

⁴ Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden – Universidade Franciscana cristianorbr@ufn.edu.br

⁵ Francine Carla Cadoná – Universidade Franciscana f.cadona@ufn.edu.br

⁶ Sergio Roberto Mortari – Universidade Franciscana mortari@ufn.edu.br

filmes formados após eliminar o solvente, ficou aderido a placa de petri, sendo difícil a retirada do mesmo, obtendo-se apenas filmes de GO:Quitosana.

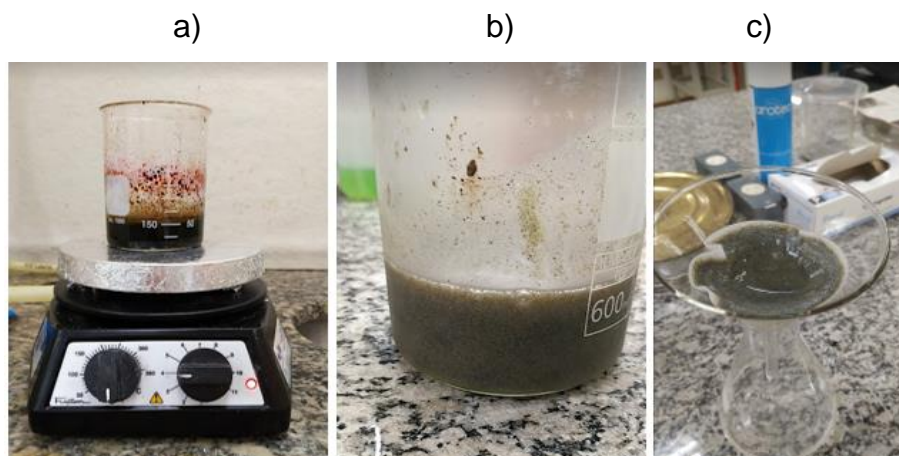


Figura 1: a) produção do óxido de grafeno (GO) b) GO antes da filtragem c) Processo de filtragem do GO.

Nanocompósito contendo Quitosana

Para solubilização da quitosana foi em uma solução contendo 1% de ácido acético em água destilada. Ambos foram mantidos em agitação constante até a solubilização completa do polímero, para então unir o GO onde esta solução foi despejada em uma placa de petri até evaporação total do solvente.

Nanocompósito contendo Eudragit RS 100

Para solubilização do Eudragit foram utilizados 10mL de acetona, sendo uma parte para solubilização do polímero e outra para dispersão do GO, ambos foram levados em agitação constante até solubilização total do polímero, e então feita a união com o GO, após isso a solução foi despejada em uma placa de petri para evaporação do solvente, conforme figura 2.



Figura 2: Nanocompósitos contendo eudragit e GO

¹ Ingrid Rosales Costa – Universidade Franciscana ingrid.costa@ufn.edu.br

² Natália Zago Sentena – Universidade Franciscana natalia.zago@ufn.edu.br

³ Alteviro Rossato Viana – Universidade Franciscana alteviro.viana@ufn.edu.br

⁴ Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden – Universidade Franciscana cristianorbr@ufn.edu.br

⁵ Francine Carla Cadoná – Universidade Franciscana f.cadona@ufn.edu.br

⁶ Sergio Roberto Mortari – Universidade Franciscana mortari@ufn.edu.br

Nanocompósitos produzidos por prensa

Nesta técnica é utilizado o equipamento chamado de prensa hidráulica manual, o qual consiste em formação de um fime, conforme mostrada na figura 3. Foram utilizadas as mesmas proporções de polímero:GO (1:0,05 e 2:0,05). Nesta técnica a amostra foi prensada utilizando uma carga de 5 toneladas para a produção dos nanocompósitos, mantidos por 3 minutos.

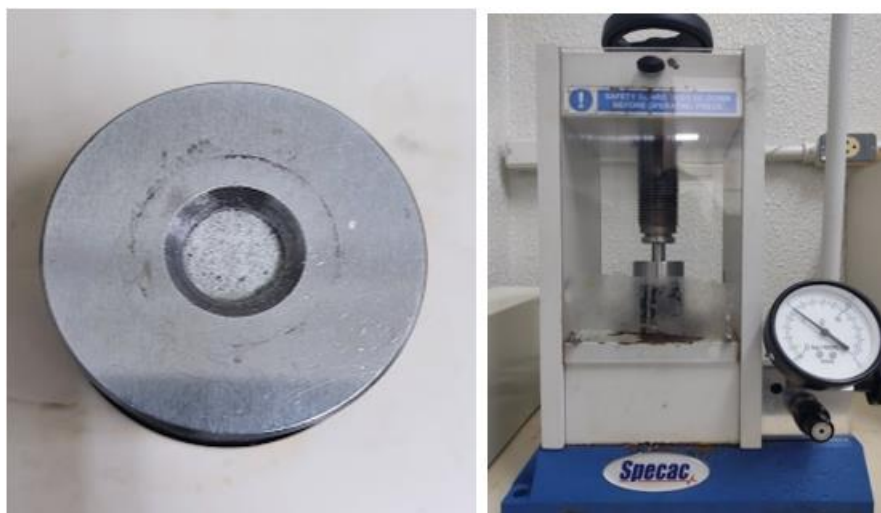


Figura 3: imagem do equipamento e porta amostra contendo polímero

Os nanocompósitos obtidos estão apresentados na figura 4.

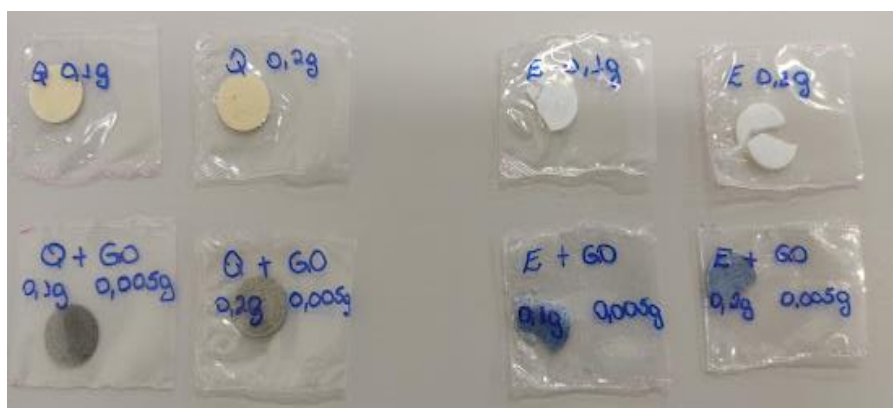


Figura 4: Nanocompósitos obtidos por meio da prensa hidráulica

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Caracterização dos nanocompósitos

Os nanocompósitos foram caracterizados pela técnica de difração de Raio X (DRX), o qual nos permite identificar os picos característicos de cada material presente na amostra e também conhecer o tipo de estrutura cristalina dos materiais.

¹ Ingrid Rosales Costa – Universidade Franciscana ingrid.costa@ufn.edu.br

² Natália Zago Sentena – Universidade Franciscana natalia.zago@ufn.edu.br

³ Alteviro Rossato Viana – Universidade Franciscana alteviro.viana@ufn.edu.br

⁴ Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden – Universidade Franciscana cristianorbr@ufn.edu.br

⁵ Francine Carla Cadoná – Universidade Franciscana f.cadona@ufn.edu.br

⁶ Sergio Roberto Mortari – Universidade Franciscana mortari@ufn.edu.br

Na caracterização dos nanocompósitos produzidos pela técnica de evaporação de solvente foi possível perceber que na proporção 1:0,05 (quitosana:GO) (figura 5 a), o difratograma não apresentou o pico característico da quitosana ($2\theta \approx 20^\circ$). Já na concentração de 2:0,05 (quitosana:GO) foi possível identificar o pico característico da quitosana e do GO ($2\theta \approx 11^\circ$) pelo difratograma da figura 5 b.

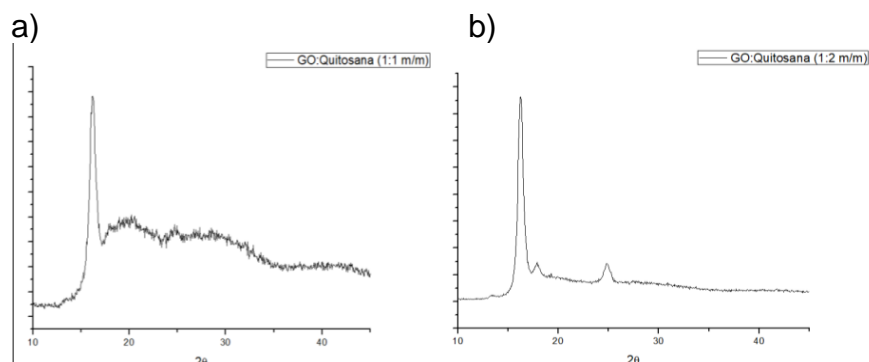


Figura 5: a) Difratograma quitosana:GO (1:0,05) b) Difratograma quitosana:GO (2:0,05).

Na caracterização dos nanocompósitos obtidos pela prensa hidráulica, foram obtidos resultados de 8 amostras, sendo elas brancas e contendo GO. A figura 6 apresenta o difratograma da amostra contendo 0,1g (a) e 0,2g (b) de quitosana ($2\theta \approx 20^\circ$), e GO:Quitosana 1:0,05 (c) e 2:0,05 (d) ($2\theta \approx 11^\circ$).

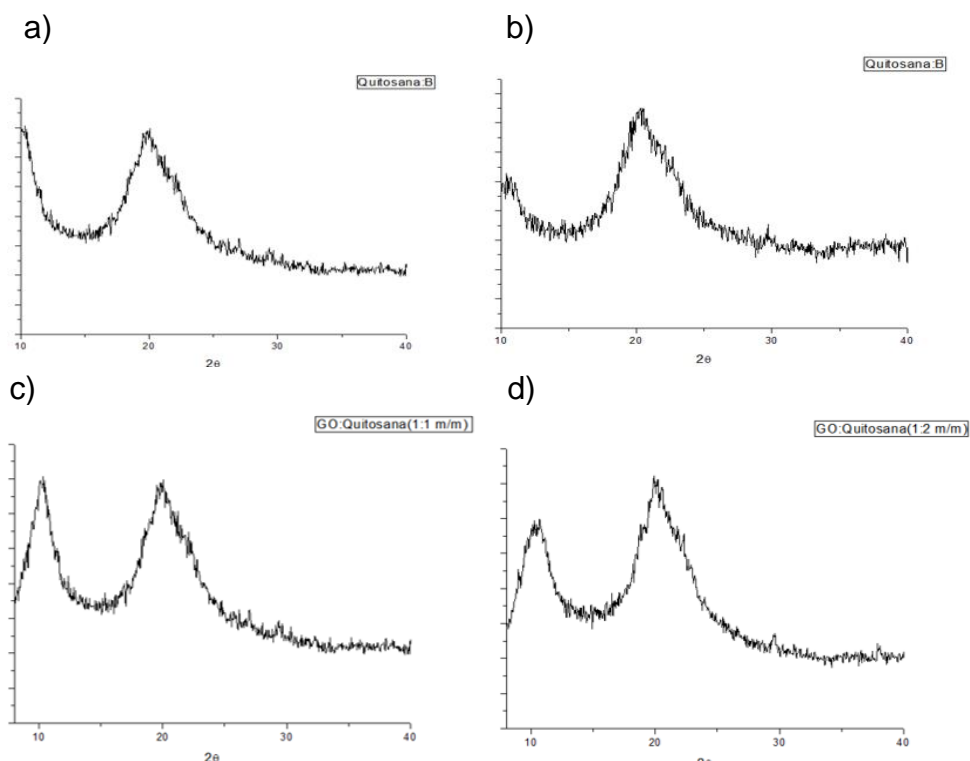


Figura 6: a) Difratograma 0,1g de quitosana b) Difratograma 0,2g de quitosana c) Difratograma 0,1g de GO:Quitosana b) Difratograma 0,2g de GO:Quitosana.

Nanocompósitos de Eudragit

- ¹ Ingrid Rosales Costa – Universidade Franciscana ingrid.costa@ufn.edu.br
- ² Natália Zago Sentena – Universidade Franciscana natalia.zago@ufn.edu.br
- ³ Altevir Rossato Viana – Universidade Franciscana altevir.viana@ufn.edu.br
- ⁴ Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden – Universidade Franciscana cristianorbr@ufn.edu.br
- ⁵ Francine Carla Cadoná – Universidade Franciscana f.cadona@ufn.edu.br
- ⁶ Sergio Roberto Mortari – Universidade Franciscana mortari@ufn.edu.br

O difratograma da figura 7 apresenta a difração de Raio X do nanocompósito Eudragit 0,1g (a) e 0,2g (b) e GO:Eudragit (c-d). Segundo a literatura Aceves (2000), a falta de picos definidos resulta em um caráter amorfo, esperado para o polímero. Nos difratogramas foi possível identificar o pico característico do GO em $2\theta = 11^\circ$.

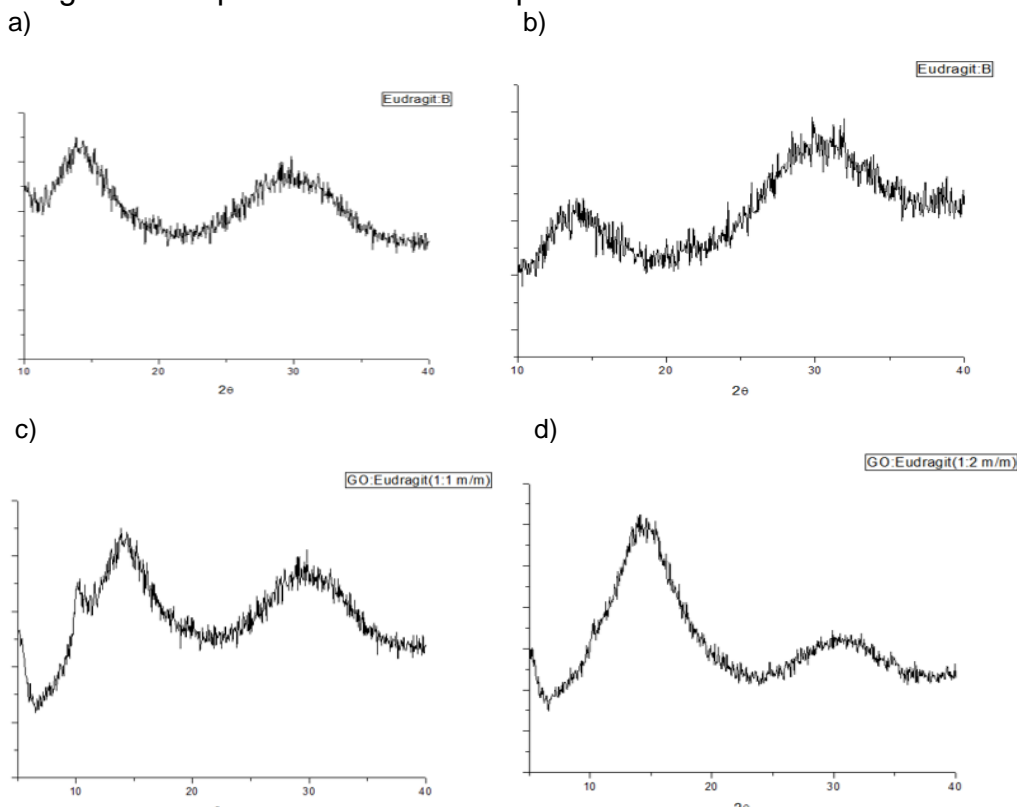


Figura 7: a) Difratograma 0,1g de Eudragit b) Difratograma 0,2g de Eudragit c) Difratograma 0,1g de GO:Eudragit b) Difratograma 0,2g de GO:Eudragit

Ensaio *In vitro*

Para o ensaio de MTT as amostras foram testadas em células de queratinócitos humanos (figura 8). O método foi realizado de acordo com Mosmann (1983). A enzima succinate desidrogenase presente em células viáveis que metabolizam o reagente MTT é adicionado nos poços 20 μ L (5 mg/mL de PBS) onde é convertido em MTT formazan após 4 horas de incubação. O sobrenadante é retirado e então adicionado 200 μ L de dimetilsulfóxido para solubilizar os cristais de cor púrpura. A leitura é feita em aparelho de ELISA no comprimento de onda de 570 nm.

¹ Ingrid Rosales Costa – Universidade Franciscana ingrid.costa@ufn.edu.br

² Natália Zago Sentena – Universidade Franciscana natalia.zago@ufn.edu.br

³ Alteviro Rossato Viana – Universidade Franciscana alteviro.viana@ufn.edu.br

⁴ Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden – Universidade Franciscana cristianorbr@ufn.edu.br

⁵ Francine Carla Cadoná – Universidade Franciscana f.cadona@ufn.edu.br

⁶ Sergio Roberto Mortari – Universidade Franciscana mortari@ufn.edu.br

Quanto ao teste de viabilidade celular, o nanocompósito apresentou diminuição celular na maior proporção de 0,2g de Quitosana, nas maiores concentrações (30 e 100 $\mu\text{g/mL}$), conforme figura 8 (b).

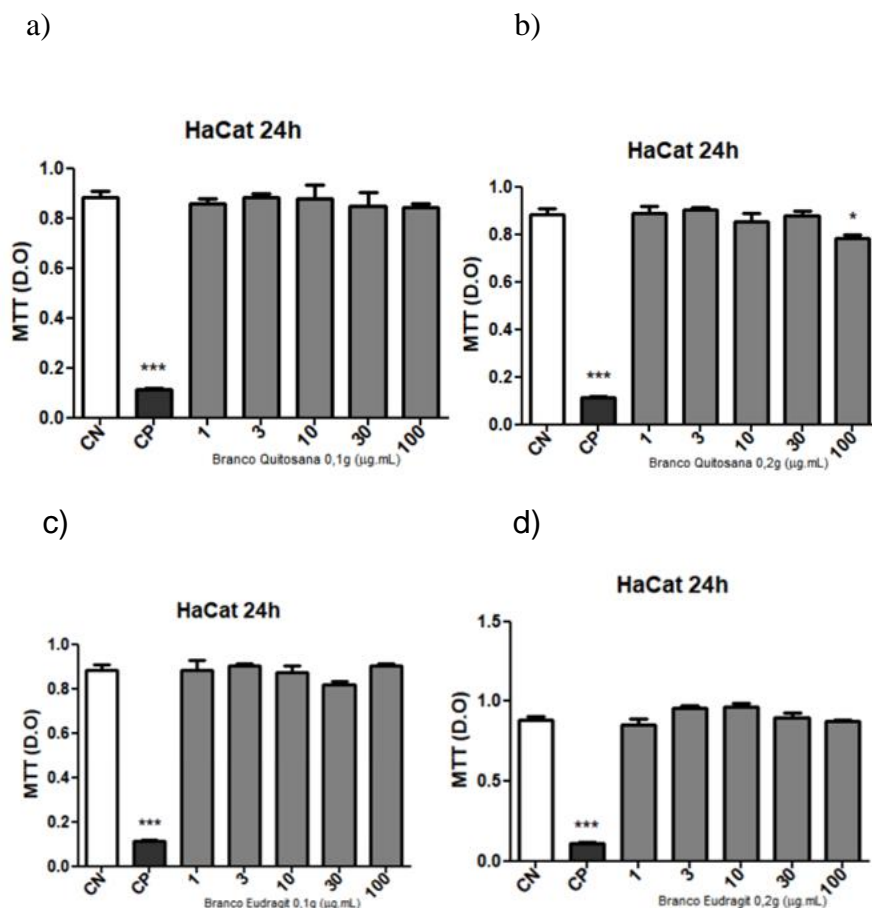
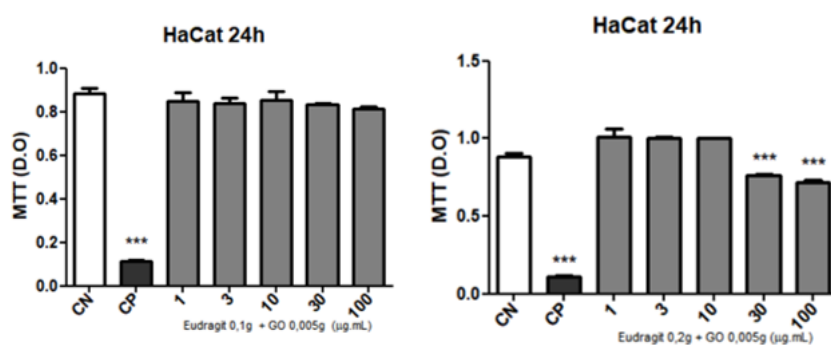


Figura 8: Teste de MTT:Eudragit 0,1 e 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (a-b), Quitosana 0,1 e 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (c-d)



¹ Ingrid Rosales Costa – Universidade Franciscana ingrid.costa@ufn.edu.br

² Natália Zago Sentena – Universidade Franciscana natalia.zago@ufn.edu.br

³ Altevira Rossato Viana – Universidade Franciscana altevira.viana@ufn.edu.br

⁴ Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden – Universidade Franciscana cristianorbr@ufn.edu.br

⁵ Francine Carla Cadoná – Universidade Franciscana f.cadona@ufn.edu.br

⁶ Sergio Roberto Mortari – Universidade Franciscana mortari@ufn.edu.br

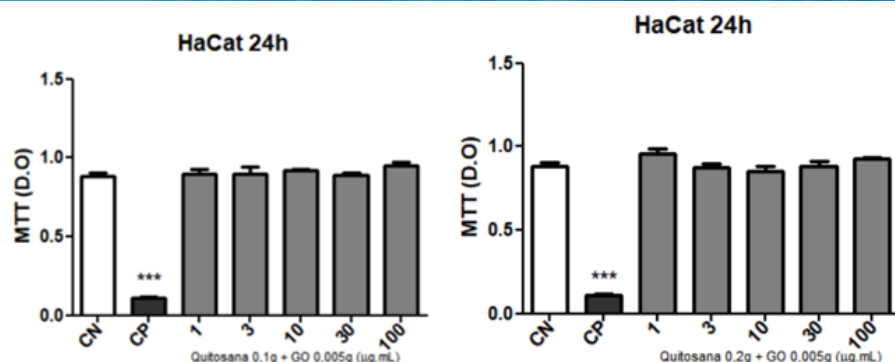


Figura 9: GO:Eudragit 1:0,05 (a) GO:Eudragit 2:0,05 (b) GO:Quitosana 1:0,05 (c) GO:Quitosana 2:0,05 (d).

Para os nanocompósitos contendo GO, apenas a amostra contendo 2:0,05 de GO:Eudragit sendo testada nas duas maiores concentrações (30 e 100 µg/mL) apresentou diminuição na viabilidade celular, conforme apresenta a figura 9.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o nanocompósito obtido por meio de prensa hidráulica proporcionou melhores resultados, pois pelo método de evaporação do solvente, o filme fica aderido ao recipiente, dificultando a sua retirada. A técnica de difração de raios X mostrou o quanto o Eudragit é amorfo assim como a presença do GO no nanocompósito. Quanto a avaliação *in vitro*, os resultados mostraram que somente o GO:Eudragit 0,2g e quitosana 0,2g causaram citotoxicidade nas maiores concentrações utilizadas (30 e 100 µg/mL). Para o nanocompósito formado por GO:Quitosana, não houve morte celular nas proporções avaliadas e tão pouco nas concentrações até 100 µg/mL. Ainda são necessários mais ensaios *in vitro* para avaliar a segurança do nanocompósito.

AGRADECIMENTOS FAPERGS/UFN

¹ Ingrid Rosales Costa – Universidade Franciscana ingrid.costa@ufn.edu.br

² Natália Zago Sentena – Universidade Franciscana natalia.zago@ufn.edu.br

³ Alteviro Rossato Viana – Universidade Franciscana alteviro.viana@ufn.edu.br

⁴ Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden – Universidade Franciscana cristianorbr@ufn.edu.br

⁵ Francine Carla Cadoná – Universidade Franciscana f.cadona@ufn.edu.br

⁶ Sergio Roberto Mortari – Universidade Franciscana mortari@ufn.edu.br

5. REFERÊNCIAS

ACEVES, J. M, *et al.* Preparation and characterization of Furosemide-Eudragit controlled release systems. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 195, n. 1-2, p. 45-53, fev. 2000.

DRESSELHAUS, G.; *et al.*, UNUSUAL PROPERTIES AND STRUCTURE OF CARBON NANOTUBES. *Annual Review of Materials Research*, p. 34-247, 2004.

FIORI, A. P. S; *et al.*, Preparação e caracterização de nanocompósitos poliméricos baseados em quitosana e argilo minerais. **Polímeros**, [S.L.], v. 24, n. 5, p. 628-635, 30 set. 2014.

LAVORGNA, M.; *et al.*, Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 82, n. 2, p. 291-298, set. 2010.

NOGUEIRA, N. M. B. Síntese de nanomateriais de grafeno para utilização em nanocompósitos poliméricos. 22f. Trabalho de conclusão de curso. Engenharia de Materiais – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2019.

NUNES FILHO, F. G.; *et al.*, Híbridos de grafeno/montmorillonita e óxido de grafeno/montmorillonita como nanomateriais funcionais: uma visão da literatura atual. **Cerâmica**, [S.L.], v. 67, n. 382, p. 210-229, jun. 2021.

RHODEN, C. R. B.; *et al.* Síntese fácil e direta do óxido de grafeno magnético. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 18, n. 2, p. 389-397, ago. 2017.

RHODEN, C. R. B.; *et al.* Study from the influence of magnetite onto removal of hydrochlorothiazide from aqueous solutions applying magnetic graphene oxide. **Journal Of Water Process Engineering**, [S.L.], v. 43, p. 102-262, out. 2021.

SALLES, T.R; *et al.*, Graphene oxide optimization synthesis for application on laboratory of Universidade Franciscana. **Disciplinarum Scientia - Ciências Naturais e Tecnológicas**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 15-26, 2020.

¹ Ingrid Rosales Costa – Universidade Franciscana ingrid.costa@ufn.edu.br

² Natália Zago Sentena – Universidade Franciscana natalia.zago@ufn.edu.br

³ Alteviro Rossato Viana – Universidade Franciscana alteviro.viana@ufn.edu.br

⁴ Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden – Universidade Franciscana cristianorbr@ufn.edu.br

⁵ Francine Carla Cadoná – Universidade Franciscana f.cadona@ufn.edu.br

⁶ Sergio Roberto Mortari – Universidade Franciscana mortari@ufn.edu.br