

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CITOCOMPATIBILIDADE DE FILMES NANOCOMPÓSITOS DE QUITOSANA E NANOFIBRAS DE CELULOSE

Rafaella Zanette¹, Leonara B.F. Almeida¹, Nelson L.G.D. Souza², Camila G. Almeida³, Luiz F.C. Oliveira¹, Cauê R. Oliveira³, Humberto M. Brandão³, Michele Munk¹

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 36036-900, Brasil

² Universidade Federal de Tocantins, Chácaras, 77402-9, Brasil

³ EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, 36038-330, Brasil

⁴ EMBRAPA Instrumentação, São Carlos, 13560-970, Brasil

E-mail de contato: rafaellazanette@gmail.com

Classificação: Desenvolvimentos de nanocompósitos a partir de fontes renováveis

Resumo

As nanofibras de celulose (NFC) são polímeros biodegradáveis que possuem propriedades mecânicas que as tornam muito atraentes para aplicações na construção de matrizes poliméricas para administração de medicamentos e cultura de células. Os filmes de nanobiocompósitos de NFC de algodão/quitosana foram preparados pelo método de evaporação do solvente e caracterizados pelas técnicas de Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia de força atômica (MFA). A biocompatibilidade foi estudada pela técnica de MTT em cultura de células de rim embrionário humano 293 (HEK293). A nanotopografia do filme de nanobiocompósito foi confirmada pela MFA. Os ensaios biológicos demonstraram que o nanobiocompósito permitiu a adesão e a proliferação celular.

Palavras-chave: Nanofibra de celulose; Nanobiocompósito; Células HEK293

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND CITOCOMPATIBILITY OF COTTON CELLULOSE NANOFIBERS/CHITOSAN NANOBIOCOMPOSITE FILM

Abstract

Cellulose nanofibers (CNF) are biodegradable polymers that have mechanical properties that make them very attractive for applications in the construction of polymeric matrices for drug delivery and cell culture. Cotton CNF/chitosan nanobiocomposites films were prepared by solution casting. Nanobiocomposites were characterized by the techniques of Fourier-Transform Infrared (FTIR) and atomic force microscopy (AFM). The biocompatibility was studied by assay MTT of cultures of Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) cells. Nanotopography on nanobiocomposite film is confirmed by atomic force microscopy (AFM). In vitro cytocompatibility demonstrated that the nanobiocomposite supported cell attachment and proliferation.

Keywords: Cellulose nanofiber; nanobiocomposite; HEK293 cell

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, filmes poliméricos nanobiocompósitos são utilizados para várias aplicações médicas e biotecnológicas, como veículos de entrega de moléculas, biossensores e engenharia de tecidos (JANA; SEM, 2017; RAMOS-RIVERA et al., 2017). Filmes baseados em biopolímeros como a quitosana têm sido produzidos e utilizados amplamente na área de embalagens e para fins biomédicos (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016; KACZMAREK et al., 2017). No entanto, o uso da quitosana como material formador de filme ainda é restrito pois apresenta baixa resistência mecânica.

Para superar essas limitações, a incorporação de nanomateriais (NMs) pode produzir compósitos com propriedades aprimoradas. Na cultura de células, nanobiocompósitos podem servir como uma matriz extracelular (MEC) para adesão e crescimento celular. A MEC natural é construída a

partir de diversas biomacromoléculas de tamanhos nanométricos, como colágeno e glicosaminoglicanos e, geralmente exibe sua topografia em nanoescala (YANG et al., 2017). Assim, a incorporação de NMs na matriz de polímero produz uma nanotopografia que pode influenciar o material biológico interligado, melhorando a adesão celular e o espalhamento das células para, posterior proliferação (SHI; WANG; YANG, 2016). Entre os vários NMs, as nanofibras de celulose (NFCs) de algodão, além de serem extraídas de fontes renováveis, exibem excelentes propriedades mecânicas, possibilitando seu uso no reforço de filmes poliméricos (DUFRESNE, 2017). O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar filmes de quitosana reforçados com NFCs, bem como avaliar sua citocompatibilidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As NFCs de algodão foram preparadas por hidrólise ácida como descrito previamente por MUNK et al. (2016). Os filmes de quitosana e os nanocompósitos NFCs de algodão/quitosana foram preparados pela técnica de evaporação do solvente. As soluções de quitosana (1% p/v) foram preparadas por dissolução da quitosana em ácido acético (1% v/v). Os filmes obtidos foram embebidos em 3 mL de solução aquosa de tripolifosfato de sódio (TPP) (0,1% p/v). Os nanobiocompósitos foram preparados misturando soluções de NFCs de algodão e quitosana. Alíquotas (10 mL) de solução formadora do filme foram então moldadas sobre placas de Petri e secas durante 72 h à temperatura ambiente.

A técnica de Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi feita para avaliar a interação entre as NFCs de algodão e a quitosana. Os espectros FTIR foram obtidos com um espectrômetro ALPHA FT-IR Bruker na região de número de onda 4000-600 cm^{-1} . A morfologia das NFCs de algodão e a nanotopografia da superfície do filme nanobiocompósito foram estudadas por MFA usando um instrumento Nanosurf easyScan 2 STM. A imagem topográfica (altura) foi obtida no modo contato. As amplitudes de oscilação livres do cantilever foram de 50 mV e a área de varredura foi de 5x5 μm .

Para avaliar a citotoxicidade do nanobiocompósito, foi feito um teste de contato direto com uma monocamada de células HEK293. Resumidamente, 4×10^5 células/poço foram cultivadas sob os filmes em placas de seis poços com meio de cultura DMEM e, após 72 h, a adesão e a morfologia das células foram avaliadas em microscópio óptica. A proliferação das células foi estimada pelo ensaio de MTT. As células foram cultivadas em placas de 96 poços durante 24 h e 72 h ($1,5 \times 10^3$ células/poço), antes de serem submetidas ao ensaio de MTT. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro a 570 nm. Os dados foram analisados por ANOVA e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças entre diferentes grupos foram consideradas estatisticamente significativas em $p < 0,05$. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espectroscopia de FTIR das amostras é mostrado na Figura 1A. Comparando os espectros de quitosana antes e depois da reticulação com TPP, é possível observar mudanças que comprovam a reticulação. A presença de ombro em 1195 e 967 cm^{-1} no espectro de quitosana reticulada, que não estava presente no espectro do filme de quitosana, pode ser atribuída em $\nu(\text{PO}_3)$ e $\nu(\text{POP})$, respectivamente, o que indica a presença do TPP na estrutura da quitosana reticulada (YU et al., 2012). No entanto, não é possível analisar a presença das NFCs de algodão no filme de quitosana, uma vez que as NFCs possuem um espectro de absorção infravermelha muito semelhante ao da quitosana e está presente na amostra em pequenas quantidades. Porém, avaliando apenas as NFCs é possível verificar a presença de algumas bandas características deste material. As bandas em 3305, 2903, 1365, 1158, 1108 e 897 cm^{-1} podem ser atribuídas respectivamente aos seguintes modos de vibração: $\nu(\text{OH})$, $\nu(\text{CH})$, $\nu(\text{CH})$, $\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{COC})$ no anel de glucosila e $\nu(\text{COC})$ a partir da ligação β -glicosídica (TIBOLLA et al., 2017).

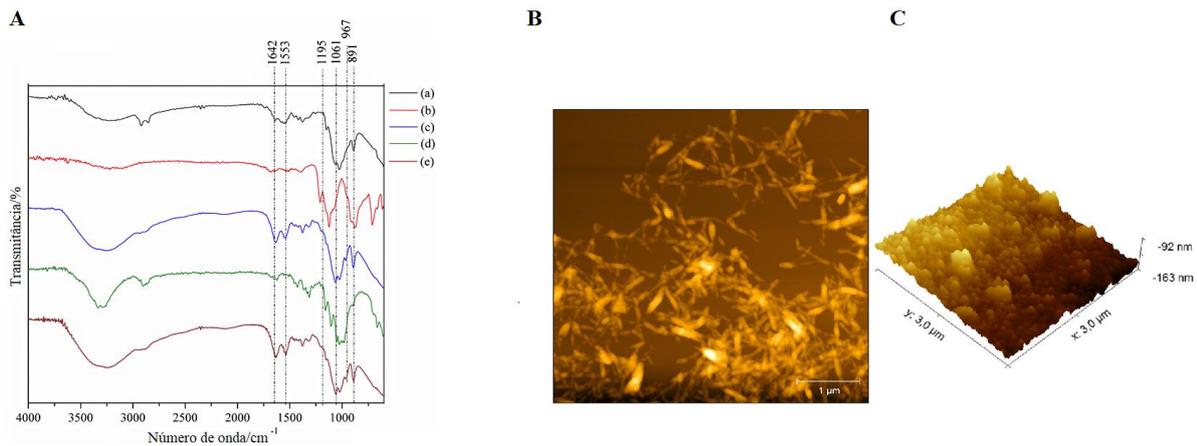


Figura 1. A: Espectroscopia de FTIR do filme de quitosana (a), do TPP (b), da quitosana reticulada (c), das NFCs de algodão (d) e do filme nanobiocompósito NFCs de algodão/quitosana reticulado. B: Imagens de MFA das NFCs. C: Imagens de MFA dos filmes nanobiocompósitos de NFCs de algodão/quitosana.

A topografia da superfície tridimensional do filme nanobiocompósito NFCs de algodão/quitosana é mostrada na Figura 1C. A nanotopografia possui 92 a 163 nm (Figura 1C). Devido à alta razão do aspecto (6-18 nm e comprimento 200-800 nm Figura 1B), não foi possível identificar as NFCs na matriz polimérica. Provavelmente, isso ocorreu devido ao fato das NFCs estarem fortemente conectadas ao polímero de quitosana, formando uma estrutura nanocompósita.

A microscopia óptica foi feita para avaliar a proliferação e morfologia das células HEK293 após serem cultivadas nos filmes produzidos. As células proliferaram mais no filme de quitosana e no filme nanobiocompósito quando comparados à placa de poliestireno (Figura 2). Na superfície do filme nanobiocompósito, as células parecem ter se espalhado mais e apresentaram mudanças morfológicas semelhantes às das células mantidas em um ambiente *in vivo*.

O teste de viabilidade de MTT foi utilizado para analisar a proliferação das células HEK293 (Figura 3). Nesse ensaio, a absorbância é proporcional ao número de células viáveis. Não foi observada variação da absorbância ($p > 0,05$), indicando uma biocompatibilidade dos filmes nanobiocompósitos.

A nanotopografia apresenta uma superfície tridimensional que favorece a adesão das células HEK293, fornecendo pontos para interações entre os receptores de membrana/citoesqueleto e a superfície de crescimento (ABDUL KAFI et al., 2012). Assim, possivelmente, o filme nanobiocompósito possui locais de adesão para receptores celulares, resultando em interações eficientes entre as células e o substrato. O desenvolvimento de filmes nanobiocompósitos biocompatíveis é primordial porque a manutenção das propriedades das culturas celulares *in vitro* que imitam o ambiente *in vivo* é necessária para efetivas aplicações biomédicas.

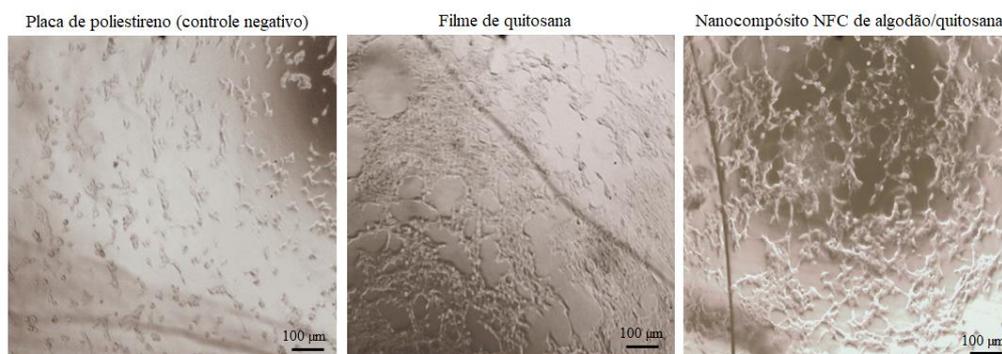


Figura 2. Imagens de microscopia óptica das células HEK293 após 72 h de cultivo

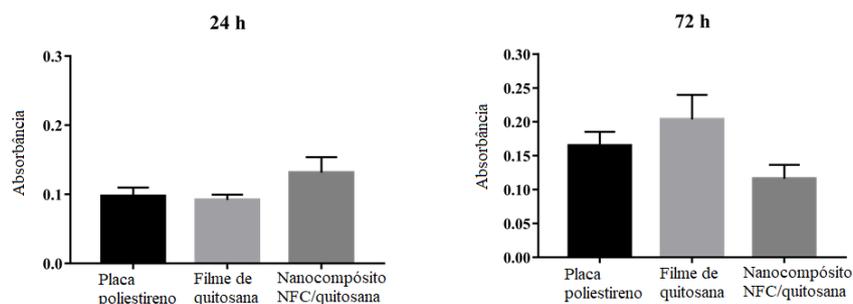


Figura 3. Proliferação celular avaliada pelo ensaio de MTT (B). Os valores foram não significativos ($p > 0.05$).

4 CONCLUSÃO

Em conclusão, os filmes nanobiocompósitos de NFC/quitosana foram biocompatíveis e forneceram uma superfície de crescimento que melhorou a adesão e morfologia celular.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG, CNPq, CAPES, Rede Agronano, Rede NANOBIOIMG e EMBRAPA Gado de Leite.

REFERÊNCIAS

- ABDUL KAFI, M. et al. Cell adhesion, spreading, and proliferation on surface functionalized with RGD nanopillar arrays. *Biomaterials*, v. 33, p. 731-739, 2012.
- DUFRESNE A. Cellulose nanomaterial reinforced polymer nanocomposites. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 29, p. 1-8, 2017.
- JANA, S.; SEN K.K. Chitosan - Locust bean gum interpenetrating polymeric network nanocomposites for delivery of aceclofenac. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 102, p. 878-884, 2017.
- KACZMAREK, B. et al. The cells viability study on the composites of chitosan and collagen with glycosaminoglycans isolated from fish skin. *Materials Letters*, v. 206, p. 166-168, 2017.
- MUNK, M. et al. Biocompatibility assessment of fibrous nanomaterials in mammalian embryos. *Nanomedicine*, v.5, n. 5, p. 1151-1159, 2016.
- RAMOS-RIVERA, L. et al. Electrophoretic deposition of anisotropic α -Fe₂O₃/PVP/chitosan nanocomposites for biomedical applications. *Materials Letters*, v. 200, p. 83-86, 2017.
- SHI, L.; WANG, K.; YANG, Y. Adhesion-based tumor cell capture using nanotopography. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 147, p. 291-299, 2016.
- SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, v. 61, p. 695-702, 2016.
- TIBOLLA, H. et al. Cellulose nanofibers produced from banana peel by enzymatic treatment: Study of process conditions. *Industrial Crops and Products*, v. 95, p. 664-674, 2017.
- YANG, Y. Biophysical regulation of cell behavior - cross talk between substrate stiffness and nanotopography. *Engineering*, v. 3, p. 36-54, 2017.
- YU, S.H. et al. Tripolyphosphate cross-linked macromolecular composites for the growth of shape- and size-controlled apatites. *Molecules*, v. 18, p. 27-40, 2012.