

ISSN 2175-8395

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO

ANAIS DO VI WORKSHOP – 2012

Maria Alice Martins
Morsyleide de Freitas Rosa
Men de Sá Moreira de Souza Filho
Nicodemos Moreira dos Santos Junior
Odílio Benedito Garrido de Assis
Caue Ribeiro
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Editores

Fortaleza, CE
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452,
CEP 13560-970 – São Carlos, SP
Fone: (16) 2107-2800
Fax: (16) 2107-2902
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra. Sara Mesquita, 2270,
CEP 60511-110 – Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109
<http://www.cnpat.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpat.embrapa.br

**Comitê de Publicações da Embrapa
Instrumentação**

Presidente: João de Mendonça Naime
Membros: Débora Marcondes Bastos Pereira
Milori, Washington Luiz de Barros Melo, Sandra
Protter Gouvêa, Valéria de Fátima Cardoso.
Membro suplente: Paulo Sérgio de Paula
Herrmann Júnior

**Comitê de Publicações da Embrapa
Agroindústria Tropical**

Presidente: Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior
Secretário-Executivo: Marcos Antonio Nakayama
Membros: Diva Correia, Marlon Vagner Valentim
Martins, Arthur Cláudio Rodrigues de Souza, Ana
Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Adriano
Lincoln Albuquerque Mattos e Carlos Farley
Herbster Moura

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto

Capa: Mônica Ferreira Laurito, Pedro Hernandes Campaner

Imagens da capa:

Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus Loures
Mourão, Viviane Soares

Imagem de MEV de Eletrodeposição de cobre – Luiza Maria da Silva Nunes, Viviane Soares

Imagem de MEV de Colmo do sorgo – Fabrício Heitor Martelli, Bianca Lovezutti Gomes,
Viviane Soares

Imagem de MEV-FEG de HPMC com nanopartícula de quitosana – Marcos Vinicius Lorevice,
Márcia Regina de Moura Aouada, Viviane Soares

Imagem de MEV-FEG de Vanadato de sódio – Waldir Avansi Junior

Imagem de MEV de Fibra de pupunha – Maria Alice Martins, Viviane Soares

1ª edição

1ª impressão (2012): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui
violação dos direitos autorais (Lei nº. 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação na publicação.

Embrapa Instrumentação

Anais do VI Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio 2012 – São
Carlos: Embrapa Instrumentação; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

Irregular

ISSN: 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Rosa. Morsyleide de
Freitas. III. Souza Filho, Men de Sá Moreira de. IV. Santos Junior, Nicodemos Moreira
dos. V. Assis, Odílio Benedito Garrido de. VI. Ribeiro, Caue. VII. Mattoso, Luiz
Henrique Capparelli. VIII. Embrapa Instrumentação. IX. Embrapa Agroindústria
Tropical.

© Embrapa 2012



ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE E FIBROBLASTOS BOVINOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Michele Munk Pereira¹; Humberto de Mello Brandão^{2*}; Nádia Rezende Barbosa Raposo¹; Juliane Dornellas Nunes²; Eliangela de Moraes Teixeira³; Luiz Sérgio de Almeida Camargo²; Luiz Henrique Capparelli Mattoso³.

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil

² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

³ Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, Brasil

*e-mail de contato; humberto@cnpqgl.embrapa.br

Projeto Componente: PC6 Plano de Ação: PA2

Resumo

A citometria de fluxo é uma técnica que vem sendo utilizada intensivamente em vários estudos de atividade celular e, mais recentemente, na interação de nanomateriais com as células. O objetivo deste estudo foi avaliar a interação de nanofibras de celulose (NFC) e fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* por citometria de fluxo. Em altas concentrações (>100 µg/mL), as NFC induziram mudanças no tamanho e granularidade dos fibroblastos. Os resultados apresentados demonstraram que a citometria de fluxo pode ser usada como uma alternativa metodológica na avaliação da morfologia de células de mamíferos expostas a NFC auxiliando nos estudos de toxicidade.

Palavras-chave: nanofibras de celulose, morfologia, granularidade, citotoxicidade.

Introdução

A citometria de fluxo é um método quantitativo que vem sendo amplamente utilizado para monitorar interações físicas entre nanomateriais e células [1, 2, 3, 4]. Essa técnica possibilita a análise de um grande número de células em pouco tempo (10.000 células/s) [5].

A leitura das células pelo citômetro é baseada na dispersão da luz que fornece diversas informações acerca da célula. Por exemplo, o parâmetro FSC (*Forward Scatter Signal*) é relativo ao tamanho da célula e o SSC (*Side Scatter Signal*) representa a complexidade intracitoplasmática que caracteriza a granularidade interna da célula. Utilizando estes parâmetros, o objetivo deste estudo foi avaliar quantitativamente, por citometria de

fluxo, a interação de nanofibras de celulose (NFC) e fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*.

Materiais e métodos

As amostras de NFC, obtidas por hidrólise ácida empregando-se solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 60% (v/v)), foram produzidas e caracterizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA) na sede da Embrapa Instrumentação Agropecuária em São Carlos (SP).

Fibroblastos bovinos adultos foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubados a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Após atingir a confluência de 60%, as células foram expostas as NFC (diâmetro: 6-18 nm; comprimento: 85-225

μm) por 24h em diferentes concentrações: 0 (controle); 0,02; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 100; 200; 400; 800; 1000; 2000; 3000 e 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, as células foram coradas com iodeto de propídio (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e avaliadas por citometria de fluxo, empregando o equipamento FACScalibur (Becton Dickinson, São Jose, CA) equipado com um laser de 585 \pm 42nm. Foram realizadas três repetições em triplicata. A análise foi realizada após contagem de 10.000 eventos por replicata e os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software WinMDI versão 2.9.

A análise estatística foi realizada por ANOVA e as medias comparadas pelo teste de *Student Newman Keus*.

Resultados e discussão

As células exposta a baixas concentrações de NFC (0,02 a 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não apresentaram alterações nos parâmetros FSC e SSC quando comparado ao grupo controle (Fig. 1). Entretanto, as células cultivadas com altas doses de NFC (>100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentaram diminuição do FSC e aumento do SSC (Fig. 2).

FSC e SSC são parâmetros citométricos rotineiramente utilizados para mensurar tamanho e granularidade celular e revelam a internalização e acúmulo de nanomateriais dentro das células [3]. Em especial, o aumento de SSC pode ser devido à presença de nanomateriais adsorvidos ou endocitados à célula [4]. A avaliação desses parâmetros citométricos é importante, uma vez que outros estudos revelaram que o acúmulo de nanomateriais altera a morfologia celular produzindo efeitos endotóxicos [6]. Além disso, a diminuição de FSC indica encolhimento celular e alterações citoplasmáticas que são características da fase inicial da apoptose [2].

No presente estudo, a alteração de FSC e SSC foi evidente em maiores concentrações de NFC, possivelmente por maior adsorção de nanofibras na membrana plasmática ou seu acúmulo no citoplasma.

Os resultados apresentados demonstraram que a citometria de fluxo pode ser usada como uma alternativa metodológica na avaliação da morfologia de células de mamíferos expostas a NFC. Esses dados são úteis em estudos de toxicidade, uma vez que a interação de NFC com células podem ter implicações citotóxicas.

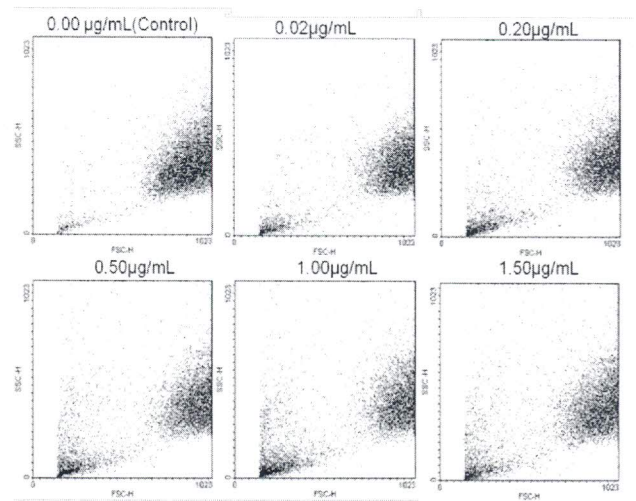


Fig 1. Influência de NFC sobre a morfologia de fibroblastos bovinos. Citograma bidimensional em *dot plot* de FSC (escala linear) X SSC (escala logarítima) demonstrando que células tratadas com NFC nas concentrações de 0,02; 0,20; 0,50; 1,00 e 1,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não apresentaram alterações nos parâmetros avaliados quando comparadas ao grupo controle.

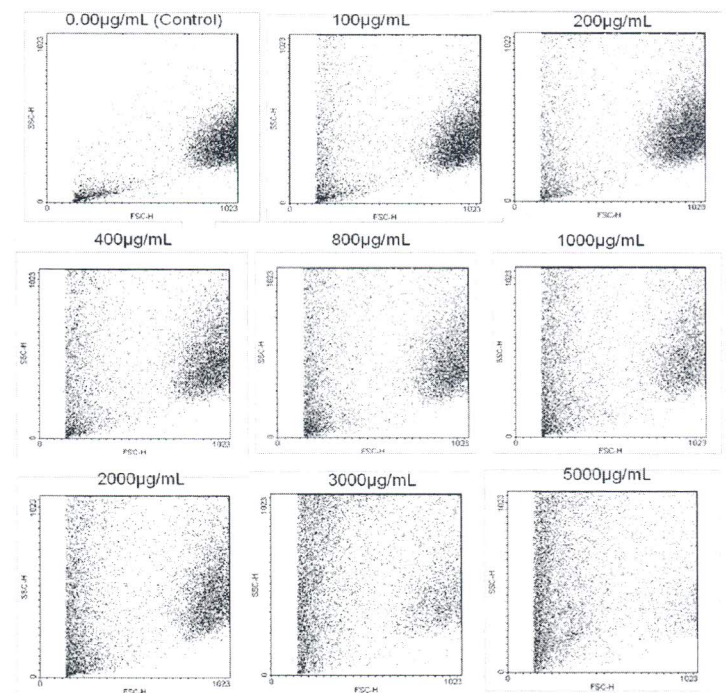


Fig 2. Influência de NFC sobre a morfologia de fibroblastos bovinos. Citograma bidimensional em *dot plot* de FSC (escala linear) X SSC (escala logarítima) demonstrando que células tratadas com NFC nas concentrações de 100, 200, 400, 800, 1000, 2000, 3000 e 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram alterações nos parâmetros avaliados quando comparadas ao grupo controle.

Conclusões

Em altas concentrações (>100 µg/mL), as NFC induziram mudanças no tamanho e granularidade dos fibroblastos.

Agradecimentos

À CAPES Rede Nanobiotec-Brasil (Edital CAPES 04/CII-2008), CNPQ, FINEP, EMBRAPA, Rede AgroNano e ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA).

Referências

1. D. Cai; D. Blair; F.J. Dufort; M.R. Gumina; Z. Huang; G. Hong; D. Wagner; D. Canahan; K. Kempa; Z.F. Ren; T.C. Chiles. *Nanotechnology*. 2008, 19, 1.
 2. C.I. Vamanu; M.R. Cimpan; P.J. Høl; S. Sørnes; S.A. Lie; N.R. Gjerdet. *Toxicol. In Vitro*. 2008, 7, 1689.
 3. R.M. Zucker; E.J. Massaro; K.M. Sanders; L.L. Degn, W.K. Boyes. *Cytometry A*. 2010, 77, 677.
 4. S.K. Sohaebuddin; P.T. Thevenot; D. Baker; J.W. Eaton, L. TANG. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part. Fibre Toxicology*. 2010, 7.
 5. R. Elbez; B.H. McNaughton; L. Patel; K.J. Pienta; R. Kopelman. *PLoS ONE*. 2011, 6, 28475.
 6. H. Suzuki; T. Toyooka; Y. Ibuki. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41, 3018.
-