

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.



AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DE NANOFIBRAS

Monica Fernanda da Silva Santos¹, Marília Santiz Rizzi¹, Leandro Oliveira Feitosa¹, Eliangela M. Teixeira², Ana Carolina Corrêa², Luiz Henrique Caparelli Mattoso², Leonardo Fernandes Fraceto³, Renata de Lima¹

e-mail de contato: ninahruiz@hotmail.com

Projeto Componente: PC6

Plano de Ação:6

Resumo

A nanotecnologia cresce a cada dia em suas inovações e aplicações em diversas áreas do conhecimento. Porém para que um nanomaterial seja seguro para ser utilizado é preciso passar por testes de toxicidade para avaliar a sua segurança perante os organismos. Para este trabalho foi utilizado ensaio de citotoxicidade (MTT) em quatro tipos de nanofibras: algodão marrom, algodão branco, algodão rubi e algodão verde. Os ensaios realizados mostraram que o teste de MTT não é uma técnica adequada para análises de nanofibras, sendo necessária a utilização de outros tipos de ensaios.

Palavras-chave: Nanofibras, MTT, Citotoxicidade

Introdução

Nanoestruturas possuem diversas áreas e aplicações. Embora existam avanços de grande importância da nanotecnologia, também surge a preocupação com seu potencial efeito ao ambiente [1] [2].

Ao mudar a dimensão de um elemento, muda-se também sua estrutura, assim, um material nanoestruturado pode ter diferente comportamento de quanto em macroescala e devido às dimensões dos nanomateriais, que podem penetrar no corpo humano e se sedimentar em órgãos, trazendo malefícios ao organismo [1], como por exemplo, as nanopartículas atravessar as membranas celulares e interagir com as suas organelas, sendo esta interação relativamente desconhecida. Em testes feitos com animais mostraram que nanopartículas podem penetrar nos tecidos, cair na corrente sanguínea e assim se move pelo corpo causando danos bioquímicos resultando na produção de espécies reativas de oxigênio, que podem levar a lesões celulares de diversos níveis. O contato com as nanoestruturas podem acontecer de várias maneiras desde sua fabricação até seu uso com produto. Hoje se tem conhecimento relativo para sugerir que alguns nanomateriais possam apresentar riscos novos e incomuns, mas há pouca informação

sobre como estes riscos podem ser identificados, avaliados e controlados [2] [3].

Uma maneira de eliminar a necessidade de animais para teste de toxicidade são os testes *in vitro* sendo de grande relevância para a pesquisa e desenvolvimento. Modelos *in vitro* com culturas celulares, além de serem utilizados para avaliação de potencial de risco, são usados para estudar mecanismos de ação de drogas, tendo assim, um grande impacto sobre farmacologia e medicina. Os métodos que empregam a cultura celular e consta a viabilidade dessas células com o uso de diferentes corantes vitais como o vermelho neutro e é um dos parâmetros mais comentados na literatura. Nesses ensaios pode se utilizar tanto células humanas como animais, de diferentes órgãos ou tecidos, as quais podem se originar de tecidos ou células que venham a ser atingidas por substâncias quando testados *in vivo*. Métodos *in vitro* apresentam vantagens quanto ao *in vivo* como, por exemplo, pode-se limitar o número de variáveis experimentais, obterem dados significativos com mais facilidade, em muitas vezes o período de tempo que se utiliza para fazer os testes é mais curto e obtêm o mesmo resultado de citotoxicidade que significa causa de efeitos tóxicos a nível celular, como inibição enzimática, alteração

na permeabilidade da membrana celular, morte entre outros[1].

O teste MTT (redução do tetrazólio) foi desenvolvido para avaliar a viabilidade celular checando a ação de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. É um teste colorimétrico, que utiliza o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5- difeniltetrazólio (MTT), no qual a substância MTT é reduzida apenas por mitocôndrias viáveis. Essa redução da substância que possui uma coloração amarelada a azul de formazana, acontece somente com as células viáveis, assim sendo sua densidade diretamente proporcional ao número de células presentes [4].

Materiais e métodos

Inicialmente foi preparada uma placa de cultura de células com 96 poços para cada nanofibra testada, esta foi deixada em estufa a 37°C por 2 dias. Então as nanofibras foram colocadas em contato com a placa por 24 horas. Após este tempo foi retirada as nanofibras dos poços e preparada uma solução de 5mg/ml de MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-, 5-diphenyltetrazolium bromide) que foi distribuída na placa de cultura, sendo 100 µl da solução de MTT por poço. Foram utilizadas aproximadamente 10⁶ células/poço. A placa foi mantida por 3 horas na estufa de CO₂ a 37°C e em seguida foi adicionado 100 µl de etanol por poço para a fixação. A leitura foi realizada utilizando-se o equipamento de leitura de ELISA leitura à 570nm.

Resultados e discussão

Os resultados iniciais de viabilidade celular para a nanofibras de algodão marrom mostraram que com o aumento da concentração, também ocorreu um aumento da viabilidade celular, porém nas concentrações a partir de 4 e 4,5% apresentaram uma queda da viabilidade celular (Figura 1).

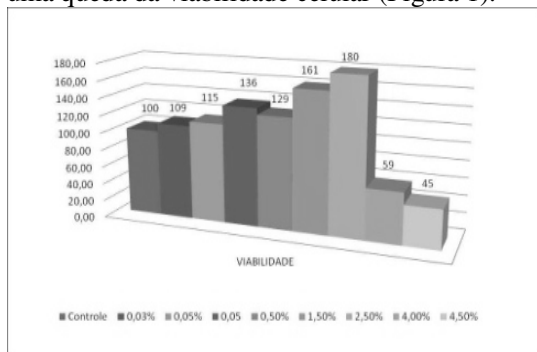


Figura 1 - Resultados do teste de MTT após tratamento de 24 horas com nanofibras de algodão marrom.

Na nanofibra de algodão branco os resultados mostraram um aumento da viabilidade celular conforme o aumento da concentração do tratamento, entretanto a partir da concentração de 2,5% pode se verificar uma diminuição da viabilidade celular e consequente citotoxicidade nas concentrações de 4,00% e 4,5%. Embora o esperado fosse uma menor viabilidade no tratamento 4,5%, não foi o ocorrido, sendo a concentração 4% a que apresentou maior citotoxicidade (Fig 2).

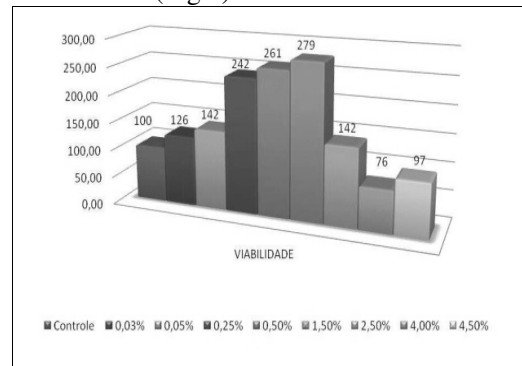


Figura 2 - Resultados do teste de MTT após tratamento de 24 horas com nanofibras de algodão branco

A partir do resultado obtido nas duas análises sugere que as nanofibras levam a um aumento da proliferação celular, que parece ser crescente até a concentração próxima a 2,5% quando ocorre uma queda brusca na viabilidade.

Pode-se pensar que as nanofibras estimulam a proliferação celular, porém um aumento tão intenso causou-nos estranheza e a desconfiança de que o material estivesse mascarando o teste, uma vez que as nanofibras apresentam grande aderência, comprometendo assim o resultado do teste realizado.

A diminuição da viabilidade celular em concentrações maiores poderia ser explicada pelo fato destas aderirem umas nas outras, formando aglomerados maiores que são mais facilmente retirados das placas quando se aspira ao meio para a colocação do MTT.

Devido a estas dúvidas foram realizados novos testes com nanofibras de Algodão Rubi e Algodão Verde, onde se resolveu em parte do experimento testar apenas as nanofibras sem as células. Os resultados deste teste com tratamento com alguns poços sem conter células mostrou o mesmo padrão das análises anteriores com as nanofibras de Algodão Rubi (Figura 3), onde se observa uma crescente viabilidade celular até a concentração de 1,5% seguida de queda na viabilidade células. Os resultados da nanofibra de algodão verde mostraram um padrão um pouco diferenciado do restante, apresentando inicialmente uma ligeira queda na

viabilidade celular seguido de aumento na viabilidade chegando ao valor máximo na concentração de 2,5% seguida de uma queda (Figura 4).

Com relação aos poços sem células e apenas com nanofibras pode-se observar uma viabilidade celular próxima a 91% para algodão Rubi (Figura 3) e 100% para algodão verde (Figura 4), o que nos leva a certeza de interferência das nanofibras nos resultados.

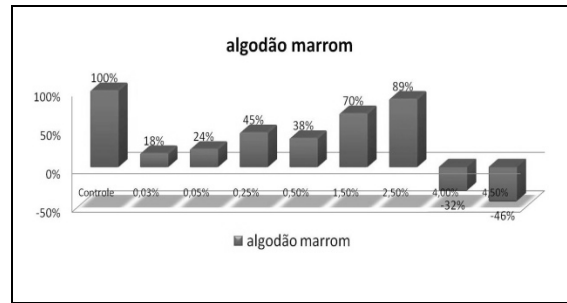
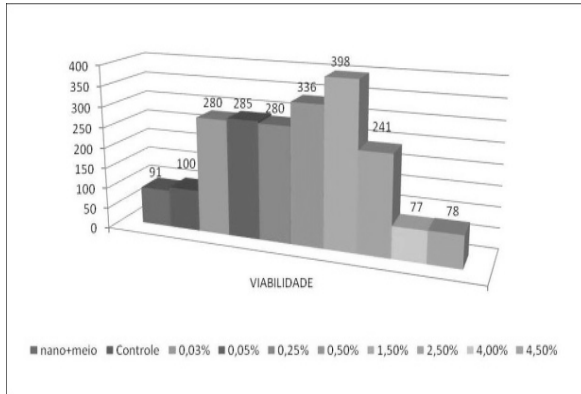


Figura 5 - Resultados do teste de MTT após tratamento de 24 horas com nanofibras de algodão marrom considerando-se o erro.

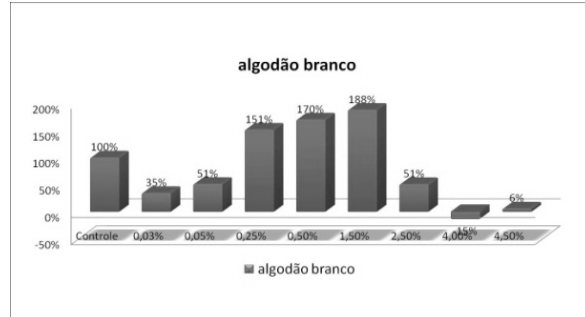


Figura 6 - Resultados do teste de MTT após tratamento de 24 horas com nanofibras de algodão branco considerando-se o erro.

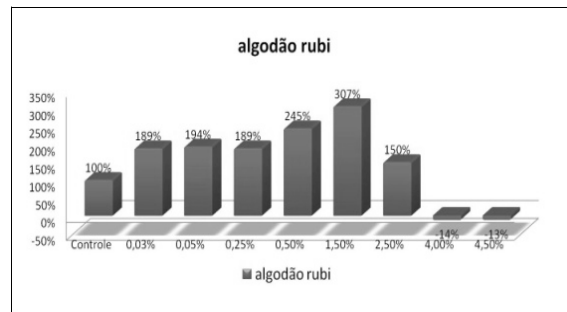


Figura 7 - Resultados do teste de MTT após tratamento de 24 horas com nanofibras de algodão rubi considerando-se o erro.

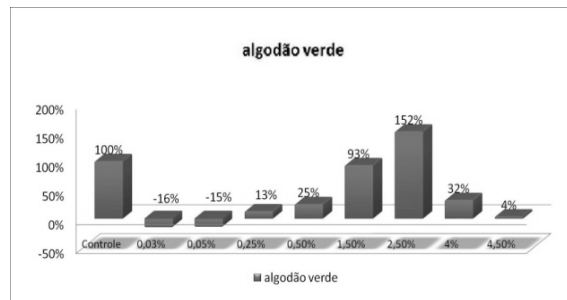


Figura 8 - Resultados do teste de MTT após tratamento de 24 horas com nanofibras de algodão verde considerando-se o erro.

Figura 3 - Resultados do teste de MTT após tratamento de 24 horas com nanofibras de algodão rubi.

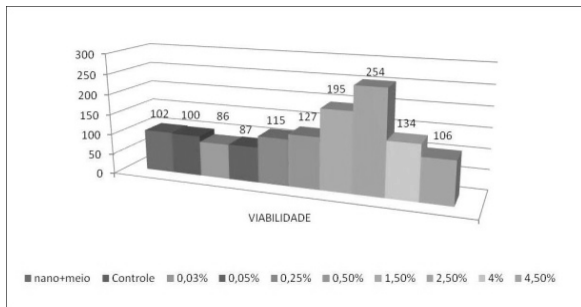


Figura 4 - Resultados do teste de MTT após tratamento de 24 horas com nanofibras de algodão verde.

A partir dos resultados que indicaram viabilidade celular onde não existiam células resolveu-se realizar o ajuste dos dados apenas para uma conferencia superficial, pois a concentração de nanofibras utilizada nesta verificação na placa sem células foi de 0,5%.

Os resultados considerando-se o erro das nanofibras foram calculados ($T = \text{valor de leitura} - \text{valor da leitura nano+meio}$) e são mostradas nas figuras 5, 6, 7 e 8.

Estes resultados não são considerados os ideais, uma vez que, os poços sem células foram testados

apenas na concentração 0,5%, sendo o ideal a realização de testes que considerassem todas as concentrações testadas.

Conclusões

Os dados mostrados neste trabalho refletem que o teste de MTT não é uma técnica adequada para análises de nanofibras, sendo necessária talvez a reformulação da técnica para garantir a não ocorrência de interferência das nanofibras na leitura final.

Agradecimentos

CNPq, FINEP, EMBRAPA, CAPESP.

Referências

1. CORRÊA, F. A. P. *Avaliação da biocompatibilidade de fluido magnético à base de nanopartículas maghemita recobertas por polifosfato em camundongos*. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
2. SILVA, G. F. B. L. *Nanotecnologia: avaliação e análise dos possíveis impactos à saúde ocupacional e segurança do trabalhador no manuseio, síntese e incorporação de nanomateriais em compósitos refratários de matriz cerâmica*. 2008. 91 f. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008
3. FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. *Rev. Química Nova*, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, ago. 2009.
4. CRUZ, A. S. *Teste de citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de draize na avaliação de produtos cosméticos*. 2003. 119 f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.