

ISSN 2175-8395

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

**ANAIS DO VII WORKSHOP DA REDE DE
NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO**

Maria Alice Martins
Odílio Benedito Garrido de Assis
Caue Ribeiro
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Editores

Embrapa Instrumentação
São Carlos, SP
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
www.cnpdia.embrapa.br
E-mail: cnpdia.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: João de Mendonça Naime
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Sandra Protter Gouvea
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dra. Lucimara Aparecida Forato

Revisor editorial: Valéria de Fátima Cardoso
Capa - Desenvolvimento: NCO; criação: Ângela Beatriz De Grandi
Imagem da capa: Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus
Loures Mourão, Viviane Soares

1ª edição

1ª impressão (2013): tiragem 50

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 VII Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio –
2012 - São Carlos: Embrapa, 2012.

Irregular
ISSN 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
III. Ribeiro, Caue. IV. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. V. Embrapa Instrumentação.

© Embrapa 2013

AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE DE NANOFIBRAS DE CELULOSE UTILIZANDO TESTE *ALLIUM CEPA*

Jéssica Macedo, Renata de Lima, Ana Carolina Corrêa, Eliangela de Moraes Teixeira, Kelcilene Bruna Ricardo Teodoro, José Manoel Marconcini, Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Universidade de Sorocaba
Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA), Embrapa Instrumentação,
Rua 15 de novembro, 1452, CEP: 13560-970, São Carlos, SP.
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Dep. de Química, Caixa Postal: 676, CEP: 13565-905,
São Carlos, SP.
jessicamacedo8@gmail.com, renata.lima@prof.uniso.br

Projeto Componente: PC6 **Plano de Ação:** PA2

Resumo

Com o crescente uso de nanopartículas pelas indústrias, cresce também a preocupação com os seus efeitos nocivos, gerando danos ao ambiente, solo, água, atmosfera e, também, a saúde humana. Com isso se torna importante avaliar o potencial tóxico dessas partículas, levando em consideração seu tamanho e método de síntese. Devido ao seu tamanho reduzido, as nanopartículas podem penetrar no interior das células e interagir com suas organelas e com o DNA. Assim, este trabalho tem por objetivo analisar o potencial genotóxico de nanoestruturas celulósicas no formato de whiskers, utilizando para isso ensaios de genotoxicidade como o ensaio *Allium cepa*.

Palavras-chave: Nanopartículas, potencial genotóxico, *Allium cepa*.

Introdução

A celulose é o componente orgânico mais abundante na terra, sendo um polissacarídeo de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. A unidade repetitiva da celulose é composta por duas moléculas de glucose esterificadas por ligações β -1,4-glucosídicas, conhecidas como celobiose, que contém seis grupos hidroxila estabelecendo interações por ligações de hidrogênio intra e intermolecular. Devido a essas ligações de hidrogênio há uma forte tendência de a celulose formar cristais que a tornam completamente insolúveis em água e na maioria dos solventes orgânicos (HUBBE et al., 2008).

Nanoestruturas de celulose podem ser obtidas a partir de fibras lignocelulósicas, como o algodão e polpa Kraft de eucalipto, por hidrólise ácida sob condições controladas de tempo e temperatura. Este processo causa a remoção das regiões amorfas, mantendo as regiões cristalinas intactas. Após a hidrólise, são obtidas partículas com aspecto

acicular, conhecidas como whiskers, com comprimento da ordem de 100 a 500 nm e diâmetros de até 20 nm (HUBBE et al., 2008; EICHHORN, 2011).

A necessidade da investigação da toxicidade dos nanomateriais se dá devido à grande expansão da nanobiotecnologia nas duas últimas décadas, quando os nanomateriais passaram a ser utilizados em escala industrial (MONTEIRO et al., 2007).

A grande dificuldade com relação ao potencial toxicológico dos nanomateriais é dada devido à impossibilidade de se generalizar o tema, pois diferentes nanomateriais exibem perfis toxicológicos diferenciados (GRIFFITT et al., 2009).

Embora seja um desafio avaliar os riscos dos nanomateriais projetados antes que os produtos sejam comercializados, a pesquisa pró-ativa é fundamental para garantir uma indústria de nanotecnologia sustentável. Muita especulação

existe com relação ao tema, principalmente pela ausência de resultados de investigação toxicológica.

O panorama com relação à toxicidade dos nanocompostos é promissor, pois novas formas de análises devem ser realizadas na tentativa de garantir a segurança, podendo existir a necessidade de desenvolvimento também de novas metodologias. A análise “in vitro” é uma opção promissora, pois possibilita testes que visam alteração tanto na estrutura como na expressão dos genes, e também de sinalização de células específicas. Embora a nanociência tenha desenvolvido técnicas que visam à melhoria do produto final, essa tecnologia também desperta preocupações quanto a perigos com relação ao ambiente, devido às características intrínsecas das NPs, como tamanho, área superficial, capacidade de aglomeração/dispersão e entre outras características.

Diante deste panorama apresentado acredita-se que maiores e mais aprofundados estudos devam ser realizados, investigando as respostas celulares a exposição a diferentes nanocompostos (SIMKÓ et al. 2010).

Materiais e métodos

Materiais: o algodão utilizado na obtenção de nanofibras foi o branco comercial (Apolo), e a polpa Kraft foi fornecida por Suzano Papel e Celulose. Ácido sulfúrico (Synth) foi usado na hidrólise e membrana de celulose (Sigma-Aldrich) para diálise e ácido acético glacial (Qhemis) na modificação superficial. No teste de genotoxicidade, foram utilizados ácido clorídrico (Synth), e reativo de Schiff e Carmim Acético para coloração.

Hidrólise ácida: as fibras de algodão e de polpa Kraft foram submetidas à hidrólise com solução de ácido sulfúrico 6M sob agitação à 45°C por 75min. A reação foi finalizada com a adição de água destilada gelada. A suspensão de whiskers foi centrifugada a 10000 rpm por 10 min e submetidos à diálise em água corrente até pH neutro e seca por liofilização. A modificação superficial se deu por esterificação das nanofibras com ácido acético por 30 min, seguido de neutralização, congelamento e secagem por liofilização.

Teste de genotoxicidade: foi realizado colocando sementes de *Allium cepa* para germinar atingindo 2 cm de raiz. Após, as raízes foram expostas as soluções aquosas de whiskers de celulose (1% m/v) de algodão não modificadas e modificadas superficialmente; e de polpa Kraft não modificadas e modificadas superficialmente, e ao controle negativo por 24h. As sementes foram fixadas e posteriormente tratadas com HCl. Após tratamento com HCl foi realizado a coloração com reativo de Schiff e Carmim Acético sendo o material fixado em lâmina através da técnica de esmagamento das raízes em lâminas para posterior visualização em microscópio ótico.

As análises estatísticas foram realizadas no programa Grafic Prism5. O índice mitótico foi calculado dividindo-se o número de células em divisão pelo total de células (Eq. 1).

$$\text{Índice Mitótico} = \frac{\text{númerodecélulasemdivisão}}{\text{totaldecélulas}} \quad (1)$$

O Índice de alteração foi calculado dividindo-se a média do índice de alteração das nanopartículas dividido pela média dos negativos (Eq.2)

$$\text{Índice de alteração} = \frac{\text{totaldealterações}}{\text{celulasemdivisão}} \quad (2)$$

O Índice de alteração relativo foi calculado dividindo-se a média do índice de alteração das nanopartículas dividido pela média dos negativos (Eq.3)

$$\text{Índice de alteração relativo} = \frac{\text{médiaíndice de alteração}}{\text{média do negativo}} \quad (3)$$

Resultados e discussão

A análise de *Allium cepa* foi realizada em triplicata. Foram avaliados os índices mitóticos e índice de alteração de cada tratamento.

Tab. 1 Resultados da análise do índice mitótico e o índice de alteração com as nanopartículas.

| Tratamento | Total de Células Média ± Desvio | Índice Mitótico Média ± Desvio | Índice de Alteração Média ± Desvio |
|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Negativo | 934 ± 32 | 1,04 ± 0,02 | 0,04 ± 0,02 |
| NF algodão modif. sup. 1% | 966 ± 26 | 1,03 ± 0,02 | 0,04 ± 0,02 |
| NF algodão não modificado 1% | 964 ± 8 | 1,03 ± 0,02 | 0,05 ± 0,02 |
| NF polpa Kraft modif. sup. 1% | 966 ± 11 | 1,04 ± 0,00 | 0,04 ± 0,02 |
| NF polpa Kraft não modificado 1% | 960 ± 7 | 1,04 ± 0,00 | 0,04 ± 0,02 |

Podemos ver no gráfico (Fig.1) que as diferenças observadas em cada tratamento foram significativas quanto o índice de alteração relativo, é comparado ao controle negativo, com o auxílio do programa estatístico Gráfico Prism5.

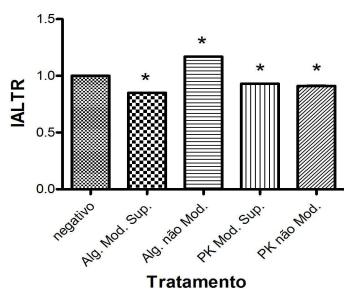


Fig. 1- Gráfico da análise do tratamento com as nanopartículas com o índice mitótico relativo comparados ao negativo.

Conclusões

A análise do gráfico obtida através do teste *Allium cepa*, mostrou que as nanofibras na concentração testada (1%) apresentaram genotoxicidade, pois seus resultados foram significativos comparados ao controle.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes, Fapesp (processo nº 2008/03606-9) e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa.

Referências

- EICHHORN, S.J. *Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications*. Soft Matter, 7, 303–315, 2011
- GRIFFITT, R. J. *et al.* Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles. Toxicological sciences. v. 107, n. 2,p. 404–415, 2009.
- HUBBE, M.A.; ROJAS, O.J.; LUCIA, L.A.; SAIN, M. *Cellulosic nanocomposites, review*. BioResources, 3 (3), 929-980, 2008
- MONTEIRO-RIVIERE, N.A. & TRAN, C.L. *Nanotoxicology Characterization, Dosing and Health Effects*. New York: Informa Healthcare USA, 450p., 2007
- SIMKÓ, M; MATTSSON, M. Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: A critical review. *Particle and Fibre Toxicology*. v. 7, p. 42-56, 2010