

REFERÊNCIAS

AZEREDO, H. M. C.; MATTOSO L.H.C.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; FILHO, G.C.; MUNFORD, M.L.; WOOD, D.; MCHUGH, T.H. Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. *Journal of Food Science*, Wiley Online Library, v. 75, p. 1-7, 2010.

BRAYNER, R.; DAHOUMANE, S.A.; YÉPRÉMIAN, C.; DJEDIAT, C.; MEYER, M.; COUTÉ, A.; FI-ÉVET, F. ZnO nanoparticles: synthesis, characterization, and ecotoxicological studies. *Langmuir*, ACS Publications, v. 26, n. 9, p. 6522-6528, 2010.

FANG, G.; MIN, G.; HE, J.; ZHANG, C.; QIAN, K.; WANG, S. Multiwalled carbon nanotubes as matrix solid-phase dispersion extraction absorbents to determine 31 pesticides in agriculture samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ACS Publications, v. 57, n.8, p. 3040-3045, 2009.

GAO, H.; PANG, Z.; JIANG, X. Targeted delivery of nano-therapeutics for major disorders of the central nervous system. *Pharmaceutical Research*, Springer, v.30, n.10, p. 2485-2498, 2013.

PHENRAT, T.; LONG, T.C.; LOWRY, G.V.; VERONESI, B. Partial oxidation (“aging”) and surface modification decrease the toxicity of nanosized zerovalent iron. *Environmental Science Technology*, ACS Publications, v. 43, n. 1, p. 195-200, 2009.

SCHWAB, F.; BUCHELI, T.D.; LUKHELE, L.P.; MAGREZ, A.; NOWACK, B.; SIGG L.; KNAUER, K. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? *Environmental Science and Technology*, ACS Publications, v.45, n. 14, p. 6136-6144, 2011.

AGREGAÇÃO E CARGA DE SUPERFÍCIE DE NANOFIBRAS DE CELULOSE: IMPLICAÇÕES CITOTÓXICAS

*Michele Munk Pereira¹, Juliana Carine Gern², Saulo Ribeiro da Silva³, Claude Yéprémian⁴, Alain Couté⁴, Ludovic Mouton⁵, José Manoel Marconcini⁶, Nádia Rezende Barbosa Raposo¹, Roberta Brayner⁵

¹Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ²Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ³Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG. ⁴Muséum National d’Histoire Naturelle, Paris, France. ⁵Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, Université de Paris Diderot, Paris, France. ⁶Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP.

*mimunkbio@gmail.com

Classificação: Estudo dos aspectos de segurança em nanotecnologia.

Resumo

As nanofibras de celulose (NFC) são promissoras nanomateriais (NMs) que se destacam devido a importantes características mecânicas e devido ao seu caráter renovável e abundante. Entretanto, materiais na escala nanométrica podem ser mais ecotóxicos que os mesmos materiais na escala natural, devido ao aumento da área de superfície e conseqüente maior exposição de grupos reativos na interface. O impacto das NFC na microalga *K. flaccidum* foi avaliado em função de diferentes concentrações (1, 50 e 100 µg mL⁻¹) e tempos de exposição (24, 48, 72 e 96h). Foram estudadas a carga de superfície, a agregação, a interação das NFC com as células e a viabilidade das microalgas expostas a esta nanofibras. Os resultados demonstraram que as células expostas às NFCs produziram exopolissacarídeos. Não foram encontradas NFC dentro das células após avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (MET), porém, de forma geral as NFCs diminuíram a viabilidade celular das microalgas em todas as concentrações (1; 50 e 100 µg mL⁻¹) e tempos avaliados (24, 48, 72 e 96h).

Palavras-chave: Nanomateriais; Ecotoxicologia; Bioindicadores

AGGREGATION AND SURFACE CHARGE: IMPLICATIONS FOR CYTOTOXICITY OF CELLULOSE NANOFIBERS

Abstract

Cellulose nanofibers (CNF) has attracted a lot of attention recently as a natural, abundant polymer with excellent mechanical properties and biodegradable. However, materials in nanoscale can be more ecotoxic than bulk materials with the same composition, mostly because of their increased specific surface area and consequent increased exposure of reactive groups. The impacts of CNF on *K. flaccidum* were measured as function of concentration (1, 50 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and time (24, 48, 72 and 96h). Responses such as surface charge, aggregation, cell uptake and cell viability were evaluated. It was observed that exposed cells to CNFs produced of exopolysaccharide (EPS). No particles were found inside the cells by transmission electron microscopy (TEM), however generally, CNF decreased cell viability at all concentrations (1, 50 and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and times (24, 48, 72 and 96h).

Keywords: Nanomaterials; Ecotoxicology; Bioindicators

Publicações relacionadas

PEREIRA, M. P. MOUTON, L.; YÉPRÉMIAN, C.; COUTÉ, A.; LO, J.; MARCONCINI, J. M.; LA-DEIRA, O. L.; RAPOSO, N. R. B.; BRANDÃO, H. M.; BRAYNER, R. Ecotoxicological effects of carbono nanotubes and celulose nanofibers in *Chlorella vulgaris*. *Nanobiotechnology*, v. 22, n. 1, p. 1-15, 2014.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos observa-se um grande aumento na produção dos mais diversos tipos de nanomateriais (NMs) pela indústria nanotecnológica, em especial as fibras de celulose destacam-se devido ao seu caráter renovável e abundante. Apesar da seu elevado caráter higroscópico e a tendência de formar agregados as nanofibras de celulose (NFCs) podem ser empregadas no reforço de matrizes poliméricas, na indústria alimentícia, na medicina humana e veterinária e no agronegócio (TEXEIRA et al., 2011). Todavia, para garantir o seguro uso das NFCs são necessários estudos toxicológicos, uma vez que a toxicidade dos NMs pode estar diretamente relacionada ao seu tamanho (KAGAN, BAYIR e SHEVEDOVA, 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possível ecotoxicidade das NFCs em microalgas da espécie *Klebsormidium flaccidum* e estudar o tamanho das NFCs ao longo do tempo, bem como a carga de superfície em diferentes valores pH.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As microalgas *K. flaccidum* (5×10^5 células ml^{-1}) foram obtidas na algoteca do Museu Nacional de História Natural da França e crescidas em meio Bold's basal (BB) em 20° C, iluminação de 50-80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (14h luz e 10h escuro) e aeração constante. As microalgas foram mantidos em contato com as NFC (diâmetro: 6-18nm; comprimento: 85-225 μm) nas concentrações de 0 (controle); 1; 50 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ por 24, 48, 72 e 96h.

O estado de dispersão e as forças de carga da superfície/interpartículas (Potencial Zeta, PZ) das NFCs nos meios de cultura (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) foram caracterizados usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Após 48 h de exposição às NFCs (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$), as microalgas foram coradas com tinta tipo nanquim para avaliação da produção exopolissacarídeos (EPS) e observadas com o auxílio de microscopia de luz (Zeiss Primo Star). Para a microscopia de varredura (MEV), as microalgas (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ em 48h de exposição) foram fixadas em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 1,0% de ácido pícrico, e tratadas com tetróxido de Ósmio 1% e desidratadas à temperatura ambiente em etanol (50%, 70%, 90% e 100%). Posteriormente, o material desidratado foi incluso em parafina e cortado em ultramicrotomo (Reichert, Jung Ultracut E, Leica). As imagens foram obtidas em um equipamento Hitachi H-700 operando com voltagem a 75kV e equipado com uma câmara Hamatsu. A viabilidade celular foi avaliada com auxílio do contador celular CelloMetter Auto T4 (Nexcelom Bioscience) utilizando o corante Azul de Tripán (0,01%).

Os resultados foram avaliados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de SNK. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias \pm EP da média.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da Figura 1A demonstraram que as NFCs são carregadas negativamente, e esta carga tende a diminuir em módulo com valores de pH altos.

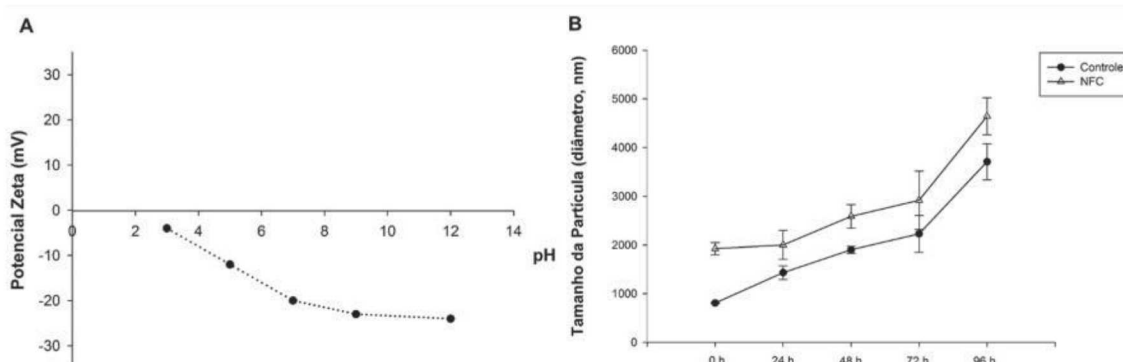


Figura 1. Avaliação do Potencial Zeta (PZ) e agregação das NFCs em diferentes condições. A: Variação do PZ na solução de *Klebsormidium flaccidum* expostas às NFCs em diferentes pHs após 48 horas. B: Tamanho hidrodinâmico das partículas após 24, 48, 72 e 96 horas. Dados apresentados pela média.

Esses valores sugerem que existem poucos sítios catiônicos nas microalgas para a adsorção de NMs carregados negativamente. Porém, a contrastação das microalgas por tinta nanquim demonstrou uma maior presença de EPS nas células expostas às NFCs (Figura 2B) quando comparada ao controle. Essa produção de EPS ocorre devido a interação entre os NMs e o fitoplâncton (BRAYNER et al., 2010) como resposta adaptativa ao estresse ambiental. Por outro lado, pode-se observar nos estudos de MET (Figura 2D, seta) que a interação entre as NFCs e as células das microalgas se restringiu à superfície externa da parede celular, provavelmente devido a repulsão eletrostática entre esses NMs e o interior das células das microalgas (WILHELM, 2003).

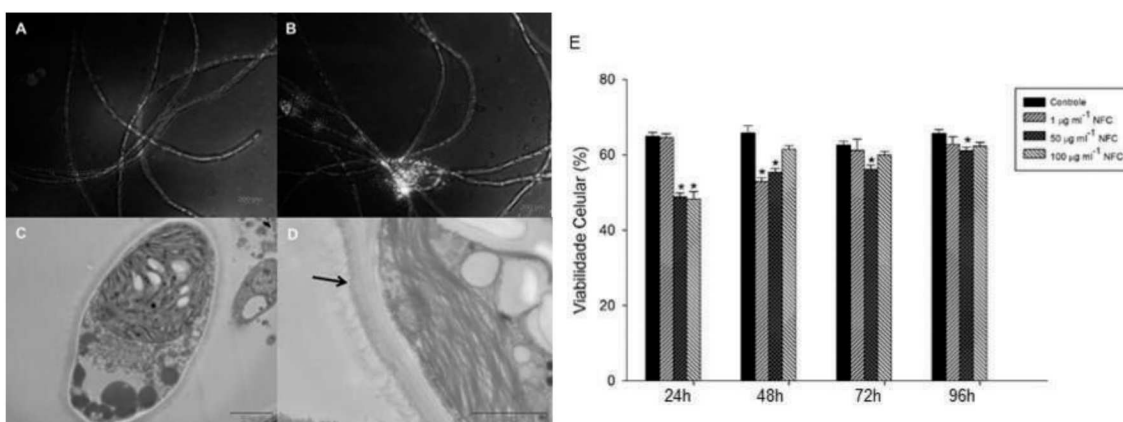


Figura 2. Efeitos citotóxicos da exposição de *Klebsormidium flaccidum* às NFCs. A, B: Visualização da produção de exopolissacarídeo por microscopia de luz (A: controle, B: células expostas a 100µg ml⁻¹ NFC). C, D: Microscopia eletrônica de transmissão de células controle (C) e expostas a 100µg ml⁻¹ NFC (D). A seta indica a adsorção de NMs na parede celular. E: Viabilidade celular de *K. flaccidum* expostas à NFC em diferentes condições. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Diferenças entre os grupos expostos às NFCs e o controle são indicados por *P<0,05.

De maneira geral, o estudo de viabilidade celular revelou que as NFCs são potencialmente citotóxicas para as microalgas *K. flaccidum* (Figura 2E). A diminuição da porcentagem da viabilidade causada pelas NFCs provavelmente ocorreu devido a obstrução da parede celular externa pela adsorção desses NMs. Isso pode acarretar em diminuição do fornecimento de nutrientes, aeração e iluminação no sistema de cultura para as microalgas. Sob essas circunstâncias, as células podem ter sofrido estresse pela restrição de nutrientes essenciais decorrente do aumento da competição entre as microalgas.

Por outro lado, como observado na Figura 2E há um aumento da viabilidade celular ao longo do tempo na concentração de 1 e 100µg ml⁻¹ de NFC. Tal fato pode ser explicado pela formação de agregados de NFCs devido à instabilidade eletrostática apresentada pelas mesmas (Figura 1B). O PZ

apresentado pelas NFCs assume valores abaixo de 30 mV em módulo, o que caracteriza um sistema eletronicamente instável (Figura 1A). Esse comportamento pode explicar o aumento do tamanho das NFCs ao longo do tempo (Figura 2B). A consequência desse fenômeno pode ser a diminuição da obstrução da parede celular das microalgas favorecendo seu crescimento. Portanto, a porcentagem de células viáveis em maiores tempos de exposição pode estar relacionada com o aumento da agregação das NFCs.

4 CONCLUSÃO

Os resultados confirmam que a exposição das microalgas *K. flaccidum* às NFCs afetam a viabilidade celular, principalmente nas primeiras 24 e 48h. Todavia, devido à instabilidade eletrostática apresentada pela NFCs, a viabilidade tende a aumentar nas concentrações de 1 e 100µg ml⁻¹ NFC, em função da agregação das NFCs ao longo do tempo (72 e 96h).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa. À CAPES Rede Nanobiotec-Brasil (Edital CAPES04/CII-2008), CNPQ, FINEP, EMBRAPA, Rede Agro-Nano e ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA).

REFERÊNCIAS

KAGAN, V.E.; BAYIR, H.; SHEVEDOVA, A.A. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of same coin. *Nanomedicine*, Elsevier, v. 1, n. 4, p. 313-316, 2005.

TEXEIRA, E. M.; CORREA, A. C.; MANZOLI, A.; LEITE, F. L.; OLIVEIRA, C. R.; MATTOSO, L. H. C. Cellulose nanofibers from white and naturally colored cotton fibers. *Cellulose*, Springer, v. 17, p. 595-606, 2010.

WILHELM, C. Intracellular uptake of anionic supermagnetic as a function of their surface coating. *Biomaterials*, Elsevier, v. 24, n. 6, o. 1001-1011, 2003.

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DE SOLOS EXPOSTOS A NANOFIBRAS CELULOSICAS

*Gabriela Sanches¹, Natália Bilesky¹, Ana C. Corrêa², Eliangela M. Teixeira², Kelcilene B. R. Teodoro², José M. Marconcini², Luiz H. C. Mattoso², Leonardo F. Fraceto³, Renata de Lima¹

¹Universidade de Sorocaba, Sorocaba-SP. ²Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio, LNNA, Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP. ³Unesp/Sorocaba, Sorocaba, SP.

*ga.sanches@yahoo.com.br

Classificação: Estudo dos aspectos de segurança em nanotecnologia.

Resumo

As nanofibras são materiais de tamanho nanométrico obtidos a partir de técnicas especiais que garantem ao material flexibilidade, dureza e resistência elevada. Suas perspectivas para uso envolvem as áreas, médica, têxtil e ambiental, podendo ser utilizada em sistemas de liberação e produção de novos produtos como embalagens, fármacos, construção civil, entre outros. As nanofibras de celulose especificamente apresentam uma grande diversidade com relação as matérias disponíveis com grande heterogeneidade, resultando em um desafio quanto as diferentes propriedades e desempenhos, apresentando importância com relação a sustentabilidade, pois trata-se de matéria prima renovável. No presente trabalho foram analisadas nanofibras celulósicas (Algodão modificado sup., Algodão não modificado, polpa Kraft modificada sup. e polpa Kraft não modificada) com relação a atividade na microbiota do solo utilizando técnicas de biologia molecular (teste ARDRA) e microbiológicas (teste de difusão em agar e avaliação da Concentração inibitória mínima). Os resultados mostram que as nanofibras em geral não apresentaram alterações drásticas nas avaliações realizadas, porém os estudos continuam com a finalidade de ava-