



Anais do VIII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio

2014

Editores:
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Caue Ribeiro de Oliveira
Humberto de Mello Brandão
Marlene de Barros Coelho
Daniel Souza Corêa
Marta Alice Martins

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-

liar os efeitos destas nanofibras na microbiota quanto a alteração na quantidade das diferentes espécies existentes no solo.

Palavras-chave: Nanofibras de celulose; ARDRA; Concentração inibitória mínima; Nanotoxicidade de solos.

EVALUATION OF THE SOIL MICROBIOTA EXPOSED TO CELLULOSE NANOFIBERS

Abstract

The nanofibers are materials with nanometric size obtained from special technical equipment to ensure the flexibility, toughness and high strength materials. Your prospects for use involve areas medical, textile and environmental, can be used in the production and release of new products such as packaging, pharmaceuticals, construction, among other systems. Specifically the cellulose nanofibers feature large diversity the materials available heterogeneity, resulting in a challenge as the different properties and performances, featuring importance with respect to sustainability because it is renewable material. In this work, cellulose nanofibers were analyzed (Cotton modified sup., Cotton unmodified, modified Kraft pulp sup. and Kraft pulp unmodified) with respect to activity in the soil microbiota techniques of molecular biology (ARDRA test) and microbiological (test agar diffusion and evaluation of minimum inhibitory concentration). The results show that the nanofibers in general didn't show drastic changes in the assessments, but studies continue on the intention to evaluate the effects of these nanofibers in the microbiota as a change species different in quantity in the soil.

Keywords: Cellulose nanofibers; ARDRA; Minimum inhibitory concentration; Soil nanotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

Nanofibras de celulose (NFC) tem origem de polpa de madeira e suas características são alto comprimento, alta rigidez e capacidade de formar redes através de fortes ligações secundárias, incluindo ligações de hidrogênio, permitindo liberdade significativa para o desenvolvimento de novos materiais (BENHAMOU et al., 2014). Com relação a sua origem as paredes celulares das plantas possuem hemiceluloses que interagem com as microfibrilas de celulose e lignina, as NFCs consistem de fibrilas liberadas a partir da estrutura da parede celular com dimensões muito menores que as de fibras de celulose tradicionais (ERONEN et al., 2011).

A ciência e a tecnologia nas últimas décadas começaram a mover-se em direção a produção de matérias-primas sustentáveis, logo biopolímeros como a celulose, foram avaliados positivamente não só como recursos sustentáveis, mas também como materiais com propriedades funcionais (GANDINI e BELGACEM, 2008), pois podem ser misturados a outros polímeros resultando em novos materiais diferenciados (FERNANDES et al., 2010).

Neste trabalho foram estudados a interferência de nanofibras algodão modificado sup, algodão não modificado, polpa kraft modificada sup e polpa Kraft modificada sup na microbiota de solos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Preparo das nanofibras

Para a produção das nanofibras foram utilizados algodão do branco comercial e polpa Kraft fornecida por Suzano Papel e Celulose. O algodão e polpa Kraft foram submetidas à hidrólise com solução de ácido sulfúrico 6M por 75min. e a 45°C sob agitação e para finalizar a reação foram adicionados água destilada gelada. Os whiskers foram centrifugados por 10min a 10000 rpm e posteriormente foram submetidos à diálise em água corrente até pH neutro, a modificação superficial foi realizada por esterificação das nanofibras utilizando ácido acético pelo período de 30 min, após este procedimento o material foi neutralizado, congelado e posteriormente passou por secagem por liofilização.

2.1.2 Obtenção das bactérias de solo

Inicialmente 1g de solo sem tratamento prévio foi adicionado a 10mL de solução de Pirofosfa-

tosendo mantido em agitação por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado e misturado a solução salina estéril na proporção (1:9) e distribuídas em placas de *petri* contendo meio de cultura TSA e deixada em estufa por 48h a 37°C, as colônias obtidas da cultura foram coletadas e transferidas para caldo *Brucella* para manutenção em freezer a -80°C.

2.2 Método de difusão com discos em ágar

Após o crescimento bacterianos 450µL (3×10^7 cfu/mL) de bactérias foram adicionados e espalhados na placa de Petri contendo meio de cultura *Mueller Hinton Agar*. A seguir discos de papel de 6 mm de diâmetro foram posicionados mantendo uma distância de pelo menos 15 mm até a lateral da placa e dos outros discos. Colocados os discos foram adicionados a estes 100µL do material de teste. As placas foram incubadas por 24h em estufa a 35°C.

2.3 Concentração inibitória mínima (MIC)

Após o período de 24h de pré-crescimento as bactérias foram contadas em câmara de Neubauer seguida de diluição concentração padrão de 5×10^6 cfu/mL, para utilização de 100µL de bactéria por poço de teste. Para a montagem da placa de teste de concentração inibitória mínima foram realizadas concentrações decrescentes, sendo a penúltima coluna um controle sem material a ser testado e a última coluna um controle para contaminação (ausente de bactérias). O indicador de crescimento de bactérias utilizado nos testes foi o Resazurin na concentração de 6,75 mg/mL por poço. Após o preparo da placa esta foi incubada por 24h a 35°C.

2.4 Análise Molecular de Toxicidade da Microbiota do Solo (ARDRA)

A técnica de ARDRA (Amplificado Ribossomal de DNA e Análise de Restrição) é baseada na digestão por enzimas de restrição do DNA da região 16S-RNA amplificado por PCR, seguido por separação com eletroforese em gel de agarose. Após o tempo de exposição de 1 mês em nanofibras uma amostra do material foi retirada para extração de DNA (*PowerSoil DNA isolation kit-Mobio*). Para o teste foram analisadas regiões dos genes 16S rDNA de bactérias utilizando *primers* universais 27F e 1492R (JUNG et al., 2012), os fragmentos amplificados foram expostos à restrição enzimática com enzima *HinfI* e *HhaI*. Para visualização dos resultados foi utilizado gel de agarose 2%, os fragmentos do controle negativo foram comparados aos fragmentos dos tratamentos para a realização das análises.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de difusão em disco Agar com bactérias de solo

Os resultados das análises de difusão de disco com nanofibras testadas a concentração 1% mostraram a formação de pequeno halo indicando interferência no crescimento celular (Tabela 1). Os materiais que mostraram maior interferência foram o Algodão Modificado Sup. e Polpa Kraft Modificada Sup. Mostrando a formação de halo superior as demais, porém a concentração testada foi de 100mg/mL considerada concentração alta para avaliação bactericida (Figura 1).

Tabela 1. Valores dos halos formados no teste de difusão em disco dos tratamentos com as diferentes nanofibras.

N=Nanofibra	media±desvio
Algodão Modificado S	15,6±2,37
Algodão Não Modificado	13,1±0,88
Polpa Kraft Modificada S	15,6±2,37
Polpa Kraft Não Modificada	11,7±2,03

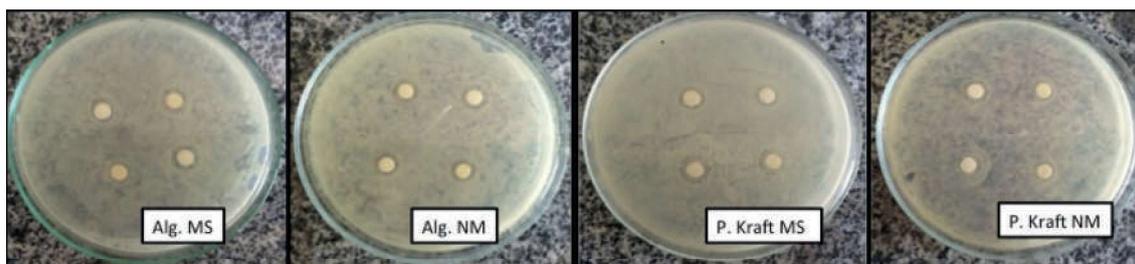


Figura 1. Resultados obtidos com o teste de difusão em Agar.

De acordo com Holetz et al., (2002) para extratos vegetais, aqueles que apresentam atividade antimicrobiana em concentrações acima de 500 μ g/mL possuem fraca atividade, sendo difícil aproveitamento para tratamentos de infecção bacterianas e fungicas. Aqui neste trabalho esta atividade não foi verificada utilizando-se bactérias patogênicas, e sim bactérias do solo, na intenção de verificar atividade bactericida nas mesmas, pensando na possibilidade das nanofibras atingirem o solo e causarem danos ao microbiota. Os resultados mostraram não haver efeito drástico aparente nas espécies presentes em solo.

3.2 Concentração inibitória mínima

Na avaliação da concentração inibitória mínima as concentrações testadas foram 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,15; 0,1; 0,05; 0,03; 0,02 e 0,01%. Para avaliação dos resultados utilizou-se como marcador o Resazurin, o qual passa da cor roxa para rosa na presença de baterias vivas, permanecendo da cor roxa na ausência de bactérias ou com morte celular. Os resultados mostram a não ocorrência de morte das bactérias testadas (Figura 2).

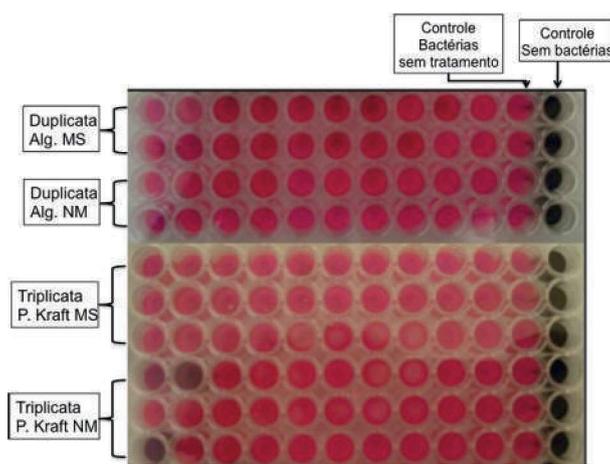


Figura 2. Resultados das análises de Concentração inibitória mínima realizada com bactérias extraídas do solo após 48h.

O teste de Resazurin é extremamente rápido e simples, porém existe a necessidade de adaptações, pois no teste em questão temos um *pool* de bactérias, que metabolizam de forma e tempos diferentes, logo temos que ter consciência de que dentro deste *pool* podem existir bactérias que são sensíveis as nanofibras, porém como estão juntas com outras bactérias, o metabolismo das demais pode acabar por interferir no resultado final, mostrando uma metabolização total do Resazurin realizada pelas bactéria que permaneceram vivas após tratamento. Logo lembramos que estes são as primeiras avaliações realizadas, sendo necessário novas avaliações ou avaliações complementares.

3.3 Resultados da Análise Molecular

A ideia principal do teste ARDRA foi comparar os resultados obtidos com o controle negativo. As enzimas de restrição utilizadas sub-fragmentam os fragmentos da PCR indicando locais que possam estar mutado. Os resultados mostram não haver diferenças visíveis entre os tratamentos e o controle negativo (Figura 3). Para estas análises os solos ficaram em exposição por 30 dias. As análises devem continuar sendo realizadas novas coletas a cada 60 dias pelo período de 1 ano.

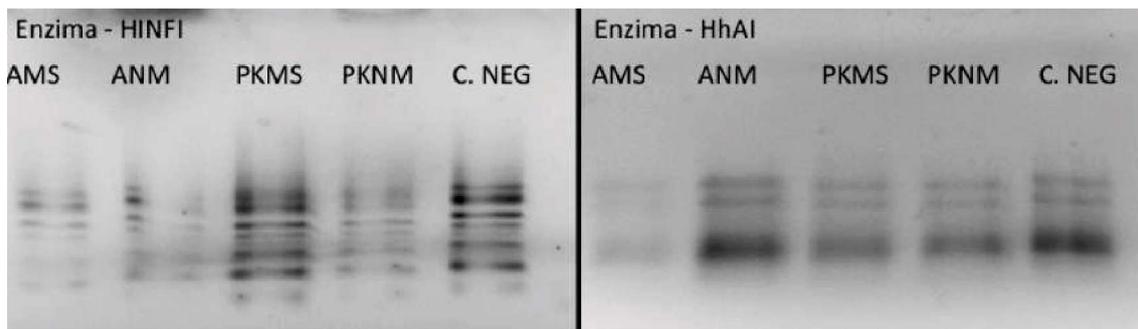


Figura 3. Resultados do teste ARDRA (HinfI e HhaI) em solos tratados por um período de 30 dias.

O uso de enzima de restrição da técnica de ARDRA permite que esta seja aplicada a amostras com alta diversidade de espécies, como é o caso de amostras de solo. Em geral espera-se menos bandas em comunidades menos abundantes e diferentes bandas em diferentes comunidades, sendo um teste utilizado para detecção de modificações estruturais em comunidades microbianas (TIEDJE et al., 1999; KIRK et al., 2004).

4 CONCLUSÃO

Os resultados iniciais mostram a não ocorrência de alteração na microbiota de solos expostos a nanofibras de celulose utilizadas neste estudo. Porém trata-se de um estudo inicial sendo necessários ajustes de protocolos e análises complementares, como por exemplo a quantificação das diferentes espécies da microbiota.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a EMBRAPA, Rede Agronano, Capes, Fapesp e Cnpq pelo auxílio financeiro ao trabalho realizado.

REFERÊNCIAS

- ERONEN, P; ÖSTERBERG, M; HEIKKINEN, S; TENKANEN, M; LAINE, J. Interactions of structurally different hemicelluloses with nanofibrillar cellulose. *Carbohydrate Polymers*, p. 1281-1290, jun. 2011.
- FAHNING, B; LOBÃO, E. Nanotecnologia aplicada a fármacos. 2011. Disponível em: <<http://www.cato-lica-es.edu.br/fotos/files/06.pdf>>. Acesso em: 22 jun 2014.
- FERNANDES, S; FREIRE, C; SILVESTRE, A; NETO, C; GANDINI, A; BERGLUND, L; SALMÉN, L. Transparent chitosan films reinforced with a high content of nanofibrillated. *Carbohydrate Polymers*, p. 394-401, fev. 2010.
- HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027-31, 2002.
- JUNG, J; YEOM, J.; HAN, J.; KIM, J.; PARK, W. Seasonal Changes in Nitrogen-Cycle Gene Abundances and in Bacterial Communities in Acidic Forest Soils. *The Journal of Microbiology*. Vol. 50, No. 3, pp. 365–373, 2012.
- Máquina de algodão-doce *high-tech* leva nanofibras para a indústria, 2010. Disponível em: BENHAMOU, K; DUFRESNE, A; MAGNIN, A; MORTHA, G; KADDAMI, H. Control of size and viscoelastic properties of nanofibrillated cellulose From palm tree by varying the TEMPO-mediated oxidation time. *Carbohydrate Polymers*, p. 74-83, ago. 2013