4 CONCLUSÃO

A toxicidade dos metais, em especial das nanopartículas metálicas, é largamente afetado por parâmetros de qualidade de água, tais como pH, temperatura e composição orgânica. Considerando as aplicações tecnológicas de AgNP, as investigações sobre os seus efeitos para organismos aquáticos são importantes para estabelecer protocolos para o uso e descarte adequado de AgNP sobre o meio ambiente, minimizando assim possíveis efeitos tóxicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CNPq, MCTI, FAPESP, CAPES, FINEP e Embrapa

REFERÊNCIAS

CHEN X, SCHLUESENER H. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. Toxicology letters 2008; 176: 1-12.

DURÁN N, MARCATO PD, CONTI RD, ALVES OL, COSTA F, BROCCHI M. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. Journal of the Brazilian Chemical Society 2010; 21: 949-959.

JO HJ, CHOI JW, LEE SH, HONG SW. Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against< i> Daphnia magna</i>: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. Journal of hazardous materials 2012; 227: 301-308.

KWOK KW, AUFFAN M, BADIREDDY AR, NELSON CM, WIESNER MR, CHILKOTI A, et al. Uptake of silver nanoparticles and toxicity to early life stages of Japanese medaka (< i> Oryzias latipes</ i>): Effect of coating materials. Aquatic Toxicology 2012; 120: 59-66.

ANGEL BM, BATLEY GE, JAROLIMEK CV, ROGERS NJ. The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. Chemosphere 2013; 93: 359-365.

BATLEY GE, KIRBY JK, MCLAUGHLIN MJ. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. Accounts of chemical research 2012; 46: 854-862.

BERNI NETO E, RIBEIRO C, ZUCOLOTTO V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. Embrapa Instrumentação Agropecuária. Comunicado Técnico 2008.

RIBEIRO F, GALLEGO-URREA JA, JURKSCHAT K, CROSSLEY A, HASSELLÖV M, TAYLOR C, et al. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to Pseudokirchneriella subcapitata, Daphnia magna and Danio rerio. Science of The Total Environment 2014; 466–467: 232-241.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the testing of chemicals – Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD guidelines for testing of chemicals 201, Paris, France, 2011.

ESTUDO DE CITOTOXICIDADE DAS NANOFIBRAS DE PVA/TiO_2 EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS BOVINOS

***Rodrigo Guerreiro Fontoura Costa[1], Michele Munk Pereira[2], Humberto de Mello Brandão[2], Caue Ribeiro[1], Luiz Henrique Capparelli Mattoso[1]**

[1]Laboratório Nacional de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP. [2]Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.
*guerreiro_rodrigo@yahoo.com.br

Classificação: Estudo dos aspectos de segurança em nanotecnologia.

Resumo
Nanofibras de PVA e PVA/TiO_2 anatase com diâmetros de aproximadamente 100 nm foram preparadas *via* eletrofiação. Testes preliminares de citotoxicidade em células de fibroblastos bovinos com as nanofibras foram realizados pelo método do contato direto. As imagens de microscopia ótica indicaram que estes materiais não possuem efeito citotóxico.
Palavras-chave: Nanofibras; Eletrofiação; Citotoxicidade; Fibroblastos bovinos.

STUDY OF PVA/TiO_2 NANOFIBER CYTOTOXICITY IN BOVINE FIBROBLAST CELLS

Abstract
Nanofibers of PVA and PVA/TiO_2 anatase with diameters of about 100 nm were prepared by the electrospinning technique. Preliminary cytotoxicity tests on bovine fibroblast cells with the nanofibers were performed by the direct contact method. The optical microscopy images indicated that these materials did not have a cytotoxic effect.
Keywords: Nanofibers; Electrospinning; Cytotoxicity; Bovine fibroblasts

1 INTRODUÇÃO

Os polímeros biocompatíveis que podem ser utilizados para o contato com meios biológicos são muito interessantes para aplicações biomédicas e médicas-veterinárias, como por exemplo, curativos superficiais [1,2]. A aplicação destes materiais como nanofibras permite aumentar em muito a área de contato, a adesibilidade superficial e a movimentação de fluidos, o que faz que não-tecidos de nanofibras sejam excelentes candidatos para estas aplicações. [1,2]. Além disso, a incorporação de nanopartículas inorgânicas, como o dióxido de titânio anatase (TiO_2), pode resultar em nanocompósitos com propriedades bactericidas, melhores propriedades térmicas e mecânicas, e alterar a permeação de líquidos e gases na estrutura das fibras [1]. Assim, dentre os materiais de grande interesse, nanocompósitos de poli(álcool vinílico) (PVA) com nanopartículas de TiO_2 são bons candidatos para tais aplicações. O objetivo deste trabalho foi realizar testes de citotoxicidade em células de fibroblastos bovinos com as nanofibras de PVA e PVA/TiO_2 anatase.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As soluções de PVA e PVA/TiO_2 (20 %) (massa /massa) foram eletrofiadas nas condições de 2,0 $KV.cm^{-1}$, 1,2 $mL.h^{-1}$ e 180 rpm [1]. As micrografias das nanofibras foram obtidas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura marca JEOL (modelo JSM -6510).

O teste de citotoxicidade com as nanofibras de PVA e PVA/TiO_2 (20%) foi feito utilizando o método de contato direto, com adaptação da ISO 10993-5 (2009) [3] e baseando-se na metodologia descrita por NOZAKI *et al*. [4]. Em uma capela de fluxo laminar preparou-se 100 mL de meio de cultura para fibroblasto bovino, contendo: 87 mL de DMEM (*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*), 10 mL de SFB (soro fetal bovino, 10%), 1 mL de L- Glutamina (2 mM),1 mL de Piruvato de Sódio (1 mM) e 1mL de *Pen/Strep* (1%). As células de fibroblastos bovinos (linhagem 3446 GIR) foram colocadas dentro de um tubo falcon de 15 mL com 5 mL de DMEM, este material foi centrifugado na rotação de 10 RPM e o sobrenadante foi descartado. As células foram colocadas numa placa de cultivo celular estéril (60 mm) com DMEM. Esta placa foi colocada na estufa a 37 ºC e 5,0% de CO_2.

Depois de 2 dias, as células atingiram 100% de confluência e foram tripsinizadas para uma placa de cultivo celular (100 mm), a qual foi lavada com 4 mL de PBS Ca Mg *Free*. Assim, colocou-se 1,5 mL de tripsina na placa para as células se destacarem por 2 minutos. Ao final desse tempo, adicionou-se 3 mL de DMEM na placa, o qual foi transferido para um tubo falcon de 15 mL e centrifugado a 10-11 RPM por 5 minutos. O *pellet* foi retirado e ressuspendido, e em seguida, foi transferido para placa de cultivo celular (100 mm), com 9 mL de DMEM e 1 mL das células, a placa foi colocada na estufa de CO_2.

Após 48 horas, as células de fibroblastos atingiram 100% de confluência e foram plaqueadas em duas placas de 6 poços, $26x10^4$ células\mL preparada em 0,85 µl por poço, mais 1,415 mL de meio completo. As placas contendo as nanofibras de PVA e PVA/TiO_2 (20%) foram colocadas na estufa à 37 ºC com 5% de CO_2 por 24 horas. Antes de colocar as nanofibras, foi retirado o sobrenadante dos poços para somente depois adicionar os nanomateriais [4]. Após os ensaios de citotoxicidade foram obtidas as

imagens das amostras com um Microscópio Primovert (Zeiss) com aumentos de 200x.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As Figuras 1*a* e 1*b* apresentam as micrografias obtidas por MEV das nanofibras de PVA e PVA/TiO_2 anatase (20 %), onde verifica-se que no nanocompósito (Fig. 1*b*) existem algumas contas (*beads*), as quais devem-se provavelmente a presença de alguns aglomerados das nanopartículas de TiO_2 nas soluções aquosas eletrofiadas.

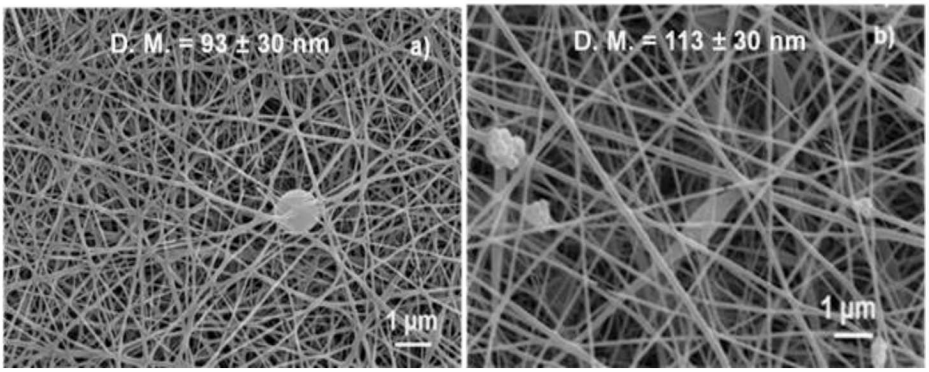

Figura 1. Micrografias obtidas por MEV das nanofibras: a) PVA, b) PVA/TiO_2 anatase (20 %).

3.2 Testes de Citotoxicidade em Fibroblastos Bovinos pelo Método do Contato Direto e Imagens de Microscopia Ótica

Nas Figuras 2*a* – *c* estão apresentadas as imagens obtidas após a exposição das células de fibroblastos bovinos por contato direto com o controle negativo, controle positivo e com a amostra de PVA/TiO_2 (20 %). As células foram coradas por 56 horas com o corante cristal violeta para uma melhor visualização das mesmas.

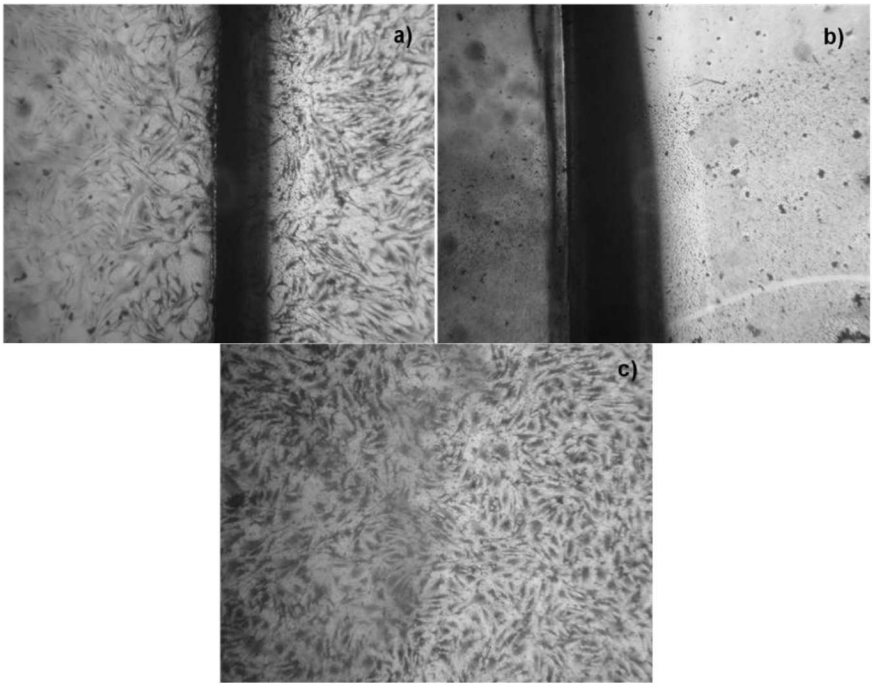

Figura 2. Imagens de microscopia ótica: a) controle negativo (polietileno de alta densidade, PEAD), b) controle positivo (PEAD + 0,4% de fenol), c) nanofibra de PVA/TiO_2 (20 %). Aumento de 200×.

Analisando as imagens de microscopia ótica, observa-se que não houve mudança significativa na morfologia das células expostas aos nanocompósitos (Fig. 2*c*) em relação às células mantidas em contato com o controle negativo (Fig. 2*a*). Já a imagem obtida pra o controle positivo (Fig. 2*b*) apresentou uma clara diminuição da quantidade e mudança da forma das células, passando a ter uma forma aproximadamente esférica, mostrando o efeito tóxico do fenol, como esperado. Estes resultados indicam que as nanofibras de PVA/TiO_2 (20 %) não possuem efeito citotóxico. JIN *et al.* [5] pesquisaram a citotoxicidade das nanopartículas de TiO_2 anatase frente às células de fibroblastos de camundongos (L929). Os autores verificaram que estas nanopartículas foram significativamente citotóxicas para as células de fibroblastos [5]. Logo, as nanofibras de PVA e PVA/TiO_2 precisam ser melhores estudadas em relação à sua toxicidade.

4 CONCLUSÃO

Os testes preliminares de citotoxicidade das nanofibras de PVA e PVA/TiO_2 anatase frente às células de fibroblastos bovinos (linhagem 3446 GIR) indicaram que estes materiais não são citotóxicos. Entretanto, para obter resultados conclusivos, estes materiais precisam ser melhores avaliados quanto a sua toxicidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FAPESP e CAPES.

REFERÊNCIAS

[1] COSTA, R. G. F.; RIBEIRO, C.; MATTOSO, L. H. C. Morphological and Photocatalytic Properties of PVA/TiO_2 Nanocomposite Fibers Produced by Electrospinning. Journal of Nanoscience and Nanotechnology (Print), v. 10, p. 5144-5152, 2010.

[2] CHUN, J. Y.; KANG, H. K.; JEONG, L.; KANG, Y. O.; OH, J. E.; YEOC, I. S.; JUNG, S. Y.; PARK, W. H; MIN, B. M. Epidermal cellular response to poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 78, p. 334–342, 2010.

[3] Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5, 2009.

[4] NOZAKI, C. M. A.; MARQUES, F. C. R.; DINIZ, M. A. I.; MARQUES, M. M.; MARCHI, J. Avaliação da citotoxicidade de membranas de colágeno visando à aplicação como biomaterial. In: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Natal – R.N., 2012.

[5] JIN, C. Y.; ZHU, B.S.; WANG, X.F.; LU, Q.H. Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. Chemical Research in Toxicology, v. 21, p. 1871-1877, 2008.

OBTENÇÃO DE HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA COM APLICAÇÃO PARA FERTILIZANTE E AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DE NANOTOXICIDADE

***Flávia Fontes Pereira[1,2], Daniel Souza Corrêa[1,2], Marcos David Ferreira[1,2], Elaine Cristina Paris[1]**

[1]Embrapa Instrumentação, São Carlos, São Paulo. [2]Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, São Carlos, SP.
*flabio08@gmail.com

Classificação: Estudo dos aspectos de segurança em nanotecnologia.

Resumo
O estudo tem por objetivo sintetizar e caracterizar hidroxiapatita nanoestruturada visando aplicação como nanofertilizante e avaliar a nanotoxicidade ambiental utilizando como organismo-teste a micro-