

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

- KOLAKOVIC, R.; PELTONEN, L.; LAAKSONEN, T.; PUTKISTO, K.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J. Spray-dried cellulose nanofibers as novel tablet excipient. *AAPS PharmSciTech*, Springer, v.12, n. 4, p. 1366-1373, 2011.
- LEIDENFROST, S.; BOELHAUVE, M.; REICHENBACH, M.; GÜNGÖR, T.; REICHENBACH, H.D.; SINOWATZ, F.; WOLF, E.; HABERMANN, F.A. Cell arrest and cell death in mammalian preimplantation development: lessons from the bovine model. *PLoS One*, v. 6, n. 7, p. e22121, 2011.
- LING, M.P.; LIN, W.C.; LIU, C.C.; HUANG, Y.S.; CHUEH, M.J.; SHIH, T.S. Risk management strategy to increase the safety of workers in the nanomaterials industry. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier, v. 229-230, p. 83-93, 2012.
- PEREIRA, M.M.; BRANDÃO, H.M.; BARBOSA, N.R.; SERAPIAO, R.V.; CARVALHO, B.C.; CAMARGO, L.S.A.; LADEIRA, L.O. Gene expression and apoptosis in bovine preimplantation embryo exposed to carbon nanotubes. In: NANOAGRI, 2010, São Pedro. Anais... International Conference on Food and Agriculture Applications of Nanotechnologies, 2010a. p. 238-238.
- PEREIRA, M.M.; MACHADO, M.A.; COSTA, F.Q.; SERAPIAO, R.V.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, Csiro Publishing, v. 22, n. 7, p. 1074-1082, 2010b.
- ZALGEVIČIENĖ, L.; KULVIETIS, V.; BULOTIENĖ, D.; DIDŽIAPETRIENĖ, J.; ROTOMSKIS, R. The effect of nanoparticles in rats during critical periods of pregnancy. *Medicina (Kaunas)*. v. 48, n. 5, p. 256-264, 2012.

ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITOS DE NANOPARTICULAS DE TITANATO DE BÁRIO EM LEUCÓCITOS

***Michele Munk Pereira¹, Wanessa Araújo Carvalho², Mariana Machado Araujo do Nascimento³, Saulo Ribeiro da Silva⁴, Juliana Carine Gern², Alessandro de Sá Guimarães², Humberto de Mello Brandão²**

¹Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ²Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ³Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. ⁴Ciências Farmacêutica da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG.

*mimunkbio@gmail.com

Classificação: Estudo dos aspectos de segurança em nanotecnologia.

Resumo

Nanopartículas de Titanato de Bário (TB) têm propriedades físicas e químicas que possuem aplicações interessantes em sondas de imagens, entrega de fármacos e engenharia tecidual. Entretanto, pouco se conhece sobre os possíveis impactos tóxicos desta nanopartícula em sistemas biológicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de nanopartículas de TB em cultura *in vitro* de leucócitos bovinos. As células foram expostas as nanopartículas em concentrações crescentes de 5, 25, 50, e 100 µg ml⁻¹ por 24 e 48h. Não foram observadas alterações na viabilidade celular após a exposição às nanopartículas de TB até a concentração de 25 µg ml⁻¹ (P>0,05). Porém, concentrações acima de 50 µg ml⁻¹ diminuíram a via-

bilidade celular ($P < 0,05$). Nas condições testadas, os resultados evidenciaram que altas concentrações de nanopartículas de TB (50 e $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) são citotóxicas para leucócitos bovinos cultivados *in vitro*.

Palavras-chave: Nanopartículas; Citotoxicidade; Viabilidade Celular

IN VITRO EFFECTS OF BARIUM TITANATE NANOPARTICLES ON LEUCOCYTES CELLS

Abstract

Nanoparticle of Barium Titanate (BT) have physical and chemical properties that make them very attractive for applications in the imaging probes, drug delivery and tissue engineering. However, little is known about its toxic impact on biological systems. The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity of BT nanoparticles on leukocytes cultured *in vitro*. Cells were exposed to nanoparticles in increasing concentrations of 5 , 25 , 50 , and $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ for 24 and 48 hr. No significant changes were observed in cell viability up to nanoparticle concentrations of $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($P > 0,05$). However, at concentrations above $50 \mu\text{g ml}^{-1}$, the BT nanoparticles significantly decreased cell viability ($P < 0,05$). The current study concludes that, under the conditions tested, high concentrations (50 and $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) of BT nanoparticles cause decreased cell viability.

Keywords: Nanoparticles; Citotoxicity; Cell viability

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia oferece a perspectiva de grandes avanços que prometem melhorar a qualidade de vida e ajudar a preservar o meio ambiente. Entretanto, como qualquer área da tecnologia que faz uso intensivo de novos materiais e substâncias químicas, ela traz consigo alguns riscos ao meio ambiente e à saúde humana (QUINA, 2004).

Dentre os materiais que podem ser utilizados na escala nano destaca-se o Titanato de Bário (TB) considerado estratégico e com grande interesse tecnológico, graças às suas propriedades piezo-elétricas/dielétricas peculiares (CIOFANI et al., 2013). Na área da saúde, alguns estudos utilizaram nanopartículas de TB como nanocarreadores intracelulares para proteínas e fármacos de baixo peso molecular, tais como doxorrubicina (CIOFANI et al., 2010a; 2010b), como biomarcadores, através da bioconjugação dos seus nanocristais com anticorpos imunoglobulina G para sondas de imagem (HSIEH et al., 2010) e como matéria prima para enxertos ósseos (BALL et al., 2014).

Embora exista um grande potencial de aplicações de nanopartículas de TB, dados relativos à sua toxicidade são raros (CIOFANI et al. 2010a; BALL et al. 2014). Diante disso, o objetivo deste foi avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações de nanopartículas de TB sobre leucócitos bovinos cultivados *in vitro*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As nanopartículas de TB foram obtidas da Sigma-Aldrich (CAT n. 467634, lot MKBF7837V, < 100 nm). As amostras foram esterilizadas por autoclave durante 15 min, e após este período, foram preparadas soluções estoques das nanopartículas (5 mg ml^{-1}) em meio de cultura *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI; INLAB), suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell) com auxílio de ultrassom por 2 min, para a completa dispersão das nanopartículas.

Amostras de sangue periférico foram coletadas de bovinos da raça Girolando e centrifugadas a 2000 rpm, por 10 min, para separar o plasma, a camada de leucócitos (*buffy coat*) e as hemácias. Após centrifugação o anel de leucócitos foi removido da interface e transferido para outro tubo. Posteriormente, foi feita a lise de hemácias com 2 mL de água destilada estéril seguida de reconstituição da osmolaridade com 10 mL de tampão PBS. As amostras foram submetidas a centrifugação por 10 min a 1.440 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado celular resultante foi ressuscitado em meio RPMI.

A densidade da cultura foi de 5×10^5 células/poço em meio RPMI acrescido de 10% de SFB e 1% antibióticos ($10.000 \text{ units ml}^{-1}$ penicilina e $10.000 \mu\text{g ml}^{-1}$ estreptomicina). Os leucócitos foram cultivados em placas de 24 poços (Corning), em estufa incubadora a 37°C , 5% de CO_2 em ar atmosférico, 95% de umidade e contato com as nanopartículas nas concentrações de 0 (controle), 5 , 25 , 50 e $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ por 24 e 48 h.

Para a avaliação da viabilidade celular 24 e 48 h após a incubação com TB as células foram coradas com Azul de Tripán ($0,04\%$) diluídos em PBS. Foram contadas as células viáveis e inviáveis com auxílio de uma câmara de Neubauer e de um microscópio de luz (Carl Zeiss). Os dados foram avaliados por ANOVA e SNK. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade das células mantidas em contato com as diferentes concentrações de nanopartículas de TB por um período de 24 e 48h pode ser observada na Figura 1. A medida que se aumentou a concentração a viabilidade celular foi afetada ($P<0,05$).

Semelhantemente ao presente estudo, trabalhos anteriores demonstraram que de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de TB não afetaram o metabolismo e a viabilidade de células H9C2 cultivadas *in vitro* (CIOFANI et al., 2010a). Mais recentemente Ball e colaboradores (2014) não observaram efeitos citotóxicos em *scaffolds* poliméricos contendo nanopartículas de TB em osteoblastos de rato. Portanto, sob determinadas condições essas NPs não são tóxicas para alguns tipos de células de mamíferos cultivadas *in vitro*.

Por outro lado, no presente estudo, a medida que foi aumentada a concentração (50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) a viabilidade celular dos leucócitos foi diminuída em ambos os tempos avaliados, 24 e 48h (Figura 1). Outros estudos já evidenciaram que a concentração parece ser determinante para a toxicidade de diferentes NPs (SOHAEBUDDIN et al., 2010; ZHAO e LIU, 2012), principalmente por aumentar a interação e a endocitose das nanopartículas pelas células. A entrada de nanopartículas nas células pode causar danos as membranas plasmáticas, ao DNA e ao compartimento endossômico (NEL et al., 2009; LIMA et al., 2012). Nesse estudo, possivelmente, o aumento da concentração de nanopartículas de TB pode ter resultado em proporcional entrada destes nas células e causado lesões em organelas e estruturas celulares, resultando em uma perda de viabilidade celular dose dependente.

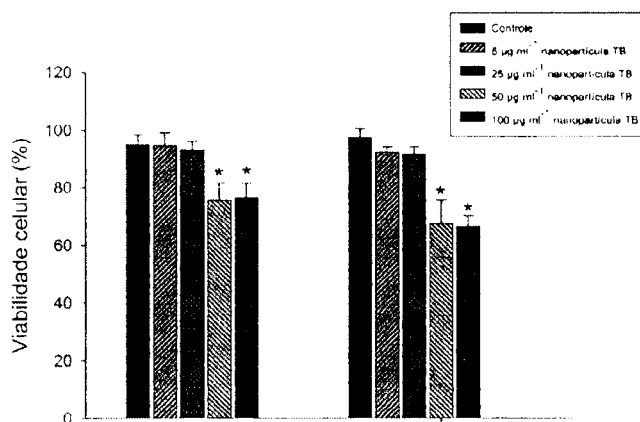


Figura 1. Viabilidade celular de leucócitos bovinos cultivados *in vitro* expostos a diferentes concentrações de nanopartículas Titanato de Bário (TB) (5 , 25 , 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) em função do tempo (24 e 48 horas). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos expostos as nanopartículas e o controle são indicados por $*P<0,05$.

De fato, estudos anteriores corroboram essa hipótese. Suzuki, Toyooka e Ibuki (2007) constataram que houve maior incorporação de nanopartículas de TiO_2 por células ovarianas de hamster, quando estas células foram expostas a elevadas concentrações desta NP.

Outros aspectos podem estar envolvidos na citotoxicidade de NP. Em altas concentrações, possivelmente fatores adicionais influenciam na intensidade das alterações na homeostase celular. Alguns estudos relataram que os NPs podem alterar a disponibilidade de componentes dos meios de cultura importantes para a manutenção das atividades celulares (CASEY et al., 2008; GUO et al., 2008). Portanto, altas concentrações de NPs podem desencadear a morte celular por diminuir a disponibilidade de fatores de crescimento ou nutrientes nos sistemas de cultivo *in vitro*.

Contudo, estudos adicionais ainda são necessários para determinar os mecanismos pelos quais as nanopartículas de TB induzem a citotoxicidade em leucócitos bovinos cultivados *in vitro*.

4 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais avaliadas, as nanopartículas de TB diminuíram a viabilidade celular de leucócitos bovinos cultivados *in vitro*.

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

- BALL, J.P.; MOUND, B.A.; NINO, J.C.; ALLEN, J.B. Biocompatible evaluation of barium titanate foamed ceramic structures for orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Wiley OnLine Library, v. 102, n. 7, p. 2089-2095.
- CASEY, A.; HERZOG, E.; LYNG, F.M.; BYRNE, H.J.; CHAMBERS, G.; DAVOREN, M. Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells. *Toxicology Letters*, Elsevier, v. 179, n. 2, p. 78-84, Jun 2008.
- CIOFANI, G.; DANTI, S.; MOSCATO, S.; ALBERTAZZI, L.; D’ALESSANDRO, D.; DINUCCI, D.; CHIELLINI, F.; PETRINI, M.; MENCIASSI, A. Preparation of stable dispersion of barium titanate nanoparticles: Potential applications in biomedicine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier, v. 76, n. 2, p. 535-543, 2010a.
- CIOFANI, G.; DANTI, S.; D’ALESSANDRO, D.; MOSCATO, D.; PETRINI, M.; MENCIASSI, M. Barium titanate nanoparticles: highly cytocompatible dispersions in glycol-chitosan and doxorubicin complexes for cancer therapy. *Nanoscale research letters*, Springer, v. 5, n. 7, p. 1093-1101, 2010b.
- CIOFANI, G.; RICOTTI, L.; CANALE, C.; D’ALESSANDRO, D.; BERRETTINI, S.; MAZZOLAI, B.; MATTOLI, V. Effects of barium titanate nanoparticles on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier, v. 102, p. 312-320, 2013.
- GUO, L.; VON DEM BUSSCHE, A.; BUECHNER, M.; YAN, A.; KANE, A.B.; HURT, R.H. Adsorption of essential micronutrients by carbon nanotubes and the implications for nanotoxicity testing. *Small*, Wiley OnLine Library, v. 4, n. 6, p. 721-727, 2008.
- LIMA, R.; FEITOSA, L.O.; MARUYAMA, C. R.; BARGA, M. A.; YAMAWAKI, P. C.; VIEIRA, I. J.; TEIXEIRA, E. M.; CORRÊA, A. C.; MATTOSO, L.H.C.; FRACETO, L.F. Evaluation of the genotoxicity of cellulose nanofibers. *International Journal Nanomedicine*, v.7, p. 3555-3565, 2012.
- NEL, A. E; MÄDLER, L.; VELEGOL, D.; XIA, T.; HOEK, E.M.; SOMASUNDARAN, P.; KLAESIG, F.; CASTRANOVA, V.; THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 7, p. 543-557, 2009.
- QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. *Química Nova*, Scielo, v. 27, n.6, p. 1028-1029, 2004.
- SOHAEBUDDIN, S. K.; THEVENOT, P.T.; BAKER, D.; EATON, J.W.; TANG, L. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology*, BioMed Central, v. 7, p.22, 2010.
- SUZUKI, H.; TOYOOKA, T.; IBUKI, Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environmental Science & Technology*, v. 41, n. 8, p. 3018-3024, 2007.
- ZHAO, X.; LIU, R. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. *Environment International*, Elsevier, v. 40, p. 244-256, 2012.