

ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DAS NANOFIBRAS DE CELULOSE DE ALGODÃO

Rafaella Zanette¹, Leonara B.F. Almeida¹, Camila G. Almeida², Cauê R. Oliveira³, Humberto M. Brandão², Michele Munk¹

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 36036-900, Brasil

² EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, 36038-330, Brasil

³ EMBRAPA Instrumentação, São Carlos, 13560-970, Brasil

E-mail de contato: rafaellazanette@gmail.com

Classificação: Avaliação de Segurança de Nanoprodutos.

Resumo

As nanofibras de celulose (NFCs) são importantes nanomaterias (NMs) que possuem diversas aplicações na agroindústria. Porém, o desenvolvimento desta área está relacionado à padronização de sistemas para avaliar o potencial impacto dos NMs na saúde humana e ambiental. O objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade das NFCs de algodão em células-tronco da polpa dentária humana. Análises de Raman e o Potencial Zeta das NFC de algodão foram feitos para caracterizar esse NM. Para avaliar a biocompatibilidade, as células foram expostas às várias concentrações de NFC de algodão (0,1; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 e 48 h e, então, submetidas aos ensaios de redução do corante metil tiazol tetrazólio (MTT) e de avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) extracelular. As NFCs apresentaram carga negativa em sua superfície (-10 mV). Nas condições testadas, não houve diferença ($p < 0,05$) nas taxas de proliferação e viabilidade celular. Os níveis de SOD extracelular não foram alterados após exposição às NFCs de algodão, indicando a biocompatibilidade desse NM.

Palavras-chave: Nanofibras de celulose; Células-tronco; Biocompatibilidade.

ANALYSIS OF CYTOTOXICITY *IN VITRO* OF COTTON CELLULOSE NANOFIBERS

Abstract

Cellulose nanofibres (NFCs) are important nanomaterials (NMs) that have several applications in agroindustry. However, the development of this area is related to standardization of systems to assess the potential impact of NMs on human health and environmental. The objective of this study was to evaluate the toxicity of cotton NFCs in human dental pulp stem cells. Raman and Zeta Potential analyzes of cotton NFC were made to characterize this NM. To evaluate the biocompatibility, the cells were exposed to the various concentrations of cotton NFC (0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 24 and 48 h and then submitted to dye reduction methyl thiazole tetrazolium (MTT) and activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) extracellular SOD assays. NFCs showed negative charge on their surface (-10 mV). Under the conditions tested, there was no difference ($p < 0.05$) in proliferation rates and cell viability. Extracellular SOD levels were not altered after exposure to cotton NFCs indicating the biocompatibility of this NM.

Keywords: Cellulose nanofiber; Stem-cells; Biocompatibility.

1 INTRODUÇÃO

As nanofibras de celulose (NFCs) são materiais de fibrilas de celulose e podem ser extraídas de fontes renováveis, tais como o algodão (MUNK et al., 2015). Além de serem biodegradáveis, possuem rigidez e resistência mecânica (POOYAN et al., 2013) podendo ser usadas como revestimentos ou filmes na indústria alimentícia (AZEREDO; ROSA; MATTOSO, 2017). No cenário agrícola, a NFC tem sido usada em revestimentos protetores para sementes, plantas e produtos alimentares frescos ou processados (IAVICOLI et al., 2017). Estudos preliminares estão sendo feitos para desenvolver e validar revestimentos hidrofóbicos à base de NFC (Innofresh™) para reduzir a queima pelas chuvas em cerejas (JUNG et al., 2016).

Apesar do crescente interesse no desenvolvimento de produtos utilizando NFC, existem poucos estudos que abordem seu potencial citotóxico. Alguns estudos *in vitro* demonstraram que a exposição à celulose nanocristalina e microfibrilada não causaram a morte celular nem citotoxicidade em células de mamíferos (DONG et al., 2012; NI et al., 2012; YANG et al., 2013). Enquanto outros relataram uma redução significativa na viabilidade celular em células de mamíferos (CLIFT et al., 2011; PEREIRA et al., 2013). Porém, não há nenhum estudo sobre o potencial de toxicidade das NFCs de algodão em células-tronco humanas. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a biocompatibilidade *in vitro* das NFCs de algodão em células-tronco da polpa dentária humana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As NFCs de algodão foram preparadas por hidrólise ácida de fibras de algodão comerciais de acordo com trabalhos anteriores (MUNK et al., 2015). As análises de Raman foram realizadas com um espectrômetro Bruker RFS 100 excitado com um laser Nd + 3 / YAG a 1064 nm, equipado com um detector InGaAs arrefecido com nitrogênio líquido. Os espectros foram adquiridos a uma resolução de 4 cm^{-1} . Uma média de 1024 varreduras foram coletadas com uma potência de laser de 80 mW.

Para determinar o potencial Zeta (PZ) por dispersão de luz dinâmica (DLS) utilizando o Zetasizer Nano ZS (Malvern), as NFCs de algodão foram diluídas ($100\ \mu\text{g mL}^{-1}$) em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v/v) de antibióticos ($100\ \text{U mL}^{-1}$ de penicilina e $100\ \text{mg mL}^{-1}$ de estreptomicina), e sonicadas duas vezes por 1 minuto.

Uma solução estoque de NFC de algodão ($1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada por suspensão do nanomaterial em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos e sonicada duas vezes por 1 minuto para dispersar os aglomerados. As células-tronco da polpa dentária humana foram expostas às NFCs de algodão em diferentes concentrações: 0 (veículo controle), 0,1, 1, 10, 50, $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ por 24 e 48 h e incubadas em atmosfera umidificada contendo 5% CO_2 à 37°C .

A avaliação da proliferação e viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de MTT em placas de 96 poços e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro empregando o comprimento de onda de 570 nm. A proliferação das células é mostrada graficamente como média da absorbância e a viabilidade celular é mostrada como porcentagem em relação ao veículo controle ($0\ \mu\text{g mL}^{-1}$).

A atividade SOD extracelular foi medida utilizando o kit SOD de acordo com as instruções do fabricante e a absorbância foi medida a 450 nm utilizando o espectrofotômetro. A atividade da enzima SOD (% taxa de inibição) foi calculada utilizando a equação fornecida pelo próprio kit descontando os valores dos brancos.

Os experimentos foram realizados em triplicatas com nove repetições. Os resultados foram avaliados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bandas de dispersão Raman características da celulose podem ser observadas na Figura 1. As bandas da faixa de $1292\text{-}2897\ \text{cm}^{-1}$ podem ser atribuídas a: estiramento (CH_2) a 2897cm^{-1} , na vibração no plano de flexão (CH) mais a vibração fora do plano (CH_2) a $1481\ \text{cm}^{-1}$, na vibração no plano de flexão ($\text{HO}\cdots\text{H}$) a $1292\ \text{cm}^{-1}$. A banda de $1097\ \text{cm}^{-1}$ na molécula de celulose é atribuída à estiramentos das ligações C-O e C-C, enquanto a de $380\ \text{cm}^{-1}$ à vibração do anel piranóico fora do plano (ZAJAC et al., 2015). De acordo com Fischer et al. (2005), a intensidade das bandas $381\ \text{cm}^{-1}$ e $1481\ \text{cm}^{-1}$ representa a ordem de cristalinidade da celulose. O alargamento dessas bandas pode ser associado à maior quantidade de estrutura de desordem. Como esperado, a banda a $1462\ \text{cm}^{-1}$, atribuída à celulose amorfa, não foi observada.

O potencial Zeta foi usado para determinar a carga superficial das NFCs de algodão em DMEM. A NFC demonstrou exibir cargas de superfície negativas por DLS ($-10\ \text{mV}$). A carga superficial dos nanomateriais é um parâmetro importante que indica a estabilidade da suspensão. O valor de $-10\ \text{mV}$ indica instabilidade da solução devido à baixa repulsão eletrostática (ADABI et al., 2016).

O ensaio de MTT foi utilizado para analisar a proliferação e viabilidade das células-tronco da polpa dentária humana (Figura 2). As células conseguiram se proliferar em todas as concentrações

testadas, pois a absorbância aumentou de 24 h para 48 h (Figura 2A) e viabilidade celular não foi alterada ($p > 0,05$) dentro dos tempos testados (Figura 2B).

A enzima SOD é uma das mais importantes enzimas antioxidantes, pois catalisa a dismutação do superóxido (O_2^-) em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Essa ação é crucial para a proteção das células contra a ação nociva de espécies reativas de oxigênio. Não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) nos níveis da SOD extracelular (Figura 3), indicando a biocompatibilidade das NFCs de algodão.

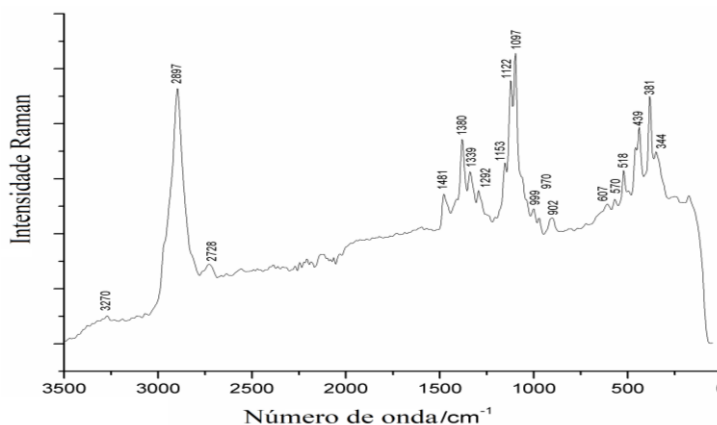


Figura 1. Espectros Raman de nanofibra de celulose.

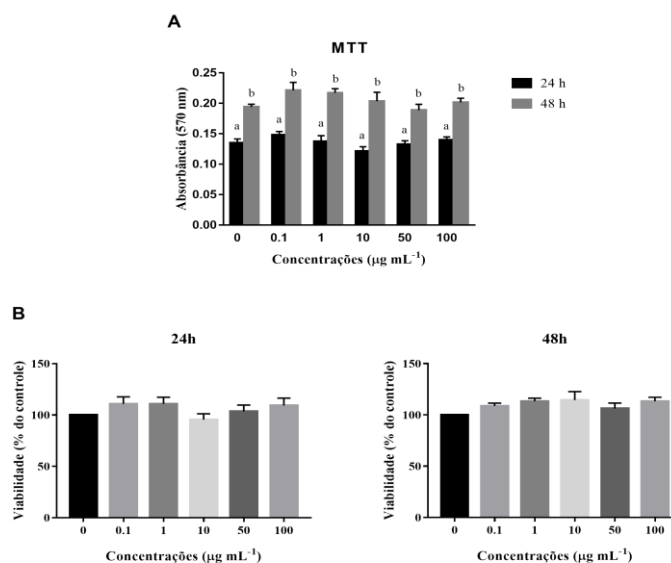


Figura 2. Proliferação (A) e viabilidade (B) das células-tronco de polpa dental humana expostas às NFCs de algodão com diferentes concentrações de exposição determinadas pelo ensaio MTT.

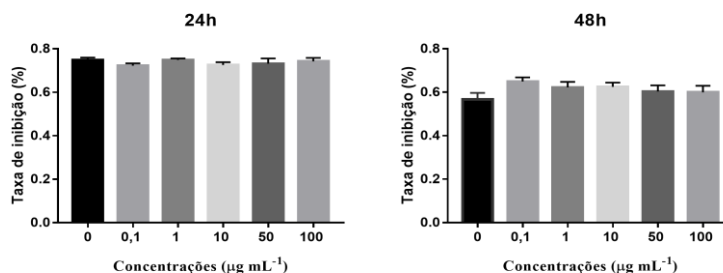


Figura 3. A atividade de SOD extracelular das células-tronco da polpa dentária humanas expostas às diferentes concentrações de NFCs de algodão.

4 CONCLUSÃO

Nas condições testadas, a exposição *in vitro* às NFCs não alteraram a viabilidade, a proliferação e atividade de SOD extracelular das células-tronco da polpa dentária humana.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG, CNPq, CAPES, Rede Agronano, Rede NANOBIOIMG e EMBRAPA Gado de Leite.

REFERÊNCIAS

ADABI, M. et al. Biocompatibility and nanostructured materials: applications in nanomedicine. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 45, n. 4, p. 833-842, 2016.

AZEREDO, H. M. C.; ROSA, M. F.; MATTOSO, L. H. C. Nanocellulose in bio-based food packaging applications. *Industrial Crops and Products*, v. 97, p. 664-671, 2017.

CLIFT, M.J.D. et al. Investigation of the interaction of cellulose nanofibers derived from cotton with a sophisticated human lung cell coculture. *Biomacromolecules*, v. 12, p. 3666-3673, 2011.

DONG, P. et al. Cytotoxicity and Cellular uptake of Cellulose Nanocrystals. *Nano LIFE*, v. 02, n. 03, p. 1241006, 2012.

FISCHER, S. et al. Applications of FT Raman spectroscopy and micro spectroscopy characterizing cellulose and cellulosic biomaterials. *Macromolecular Symposia*, v. 1, p. 41-56, 2005.

IAVICOLI, I. et al. Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 329, p. 96-111, 2017.

JUNG, J. et al. Development and preliminary field validation of water-resistant cellulose nanofiber based coatings with high surface adhesion and elasticity for reducing cherry rain-cracking. *Scientia Horticulturae*, v. 200, p. 161-169, 2016.

MUNK, M. et al. Direct and indirect toxic effects of cotton-derived cellulose nanofibras on filamentous green algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 122, p. 399-405, 2015.

NI, H. et al. Cellulose nanowhiskers: preparation, characterization and cytotoxicity evaluation. *Bio-Medical Materials and Engineering*, v. 22, p. 121-127, 2012.

PEREIRA, M.M., et al. Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. *Nanotechnology*, v. 24, p. 075103, 2013.

POOYAN, P. et al. Design of a cellulose-based nanocomposite as a potential polymeric scaffold in tissue engineering. *Polymer*, v. 54, p. 2105-2114, 2013.

YANG, X. et al. Injectable polysaccharide hydrogels reinforced with cellulose nanocrystals: morphology, rheology, degradation, and cytotoxicity. *Biomacromolecules*, v. 14, p. 4447-4455, 2013.

ZAJĄC, A. et al. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 134, p. 114-120, 2015.