

Caracterização de Nanopartículas de Prata e Citocompatibilidade em Células Epiteliais Mamárias de Bovinos¹

Geovana de Carvalho Onorato², Renison Teles Vargas³, Michele Munk⁵, Camila Guimarães de Almeida⁴, Juliana Carine Gern⁴, Alessandro de Sá Guimarães⁴, Miche Munk⁶, Wanessa de Carvalho Araújo⁴, Humberto de Mello Brandão^{4, 6}

¹Agradecimento ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. (a) Trabalho realizado com o apoio da Fapemig, (APQ03229/15). (b) Parte do projeto “Determinação da excreção e biodistribuição de prata nanoparticulada (coloidal) administradas pela via intramamária em bovinos”, liderado por Humberto de Mello Brandão; (c) Parte da tese de Doutorado de Renison Teles Vargas, (d) Iniciação Científica de Geovana de Carvalho Onorato

²UFJF/Juiz de Fora. Bolsista do CNPq. E-mail: geovana.onorato@gmail.com

³Pesquisador, Departamento de Ciências Agrárias – IFMG/Bambuí. E-mail: renilson.vargas@ifmg.edu.br

⁴Pesquisador, Laboratório de Nanotecnologia – Embrapa Gado de Leite/Juiz de Fora

⁵Docente UFJF/Juiz de Fora

⁶Orientador. E-mail: humberto.brandao@embrapa.br

Resumo: A mastite, principal doença dos rebanhos leiteiros, é responsável por até 40% de todas as doenças infecciosas. O uso de composto nanoestruturados tem se mostrado uma alternativa eficiente para o controle de agente microbianos. O presente trabalho evidenciou características físico-químicas das nanopartículas de prata (AgNp) e seus efeitos citotóxicos em células epiteliais mamárias de bovinos (MAC-T). O tamanho e potencial Zeta das AgNps foi realizado através da técnica de DLS. Outras técnicas usadas foram a microscopia de força atômica (AFM) e a microscopia de varredura (MEV). Para o ensaio de citotoxicidade foi usada a técnica de coloração por Azul de Tripán, para acessar células vivas e mortas. O tamanho médio das nanopartículas foi de 946,99 nm, e seu potencial Zeta foi -16mV. Por AFM pode-se observar que as AgNps se encontram monodispersas e esféricas. Imagens obtidas em MEV evidenciaram a formação de grandes clusters. O teste de citotoxicidade identificou em um resultado pouco preciso, uma vez que houve precipitação das AgNP, sugerindo o efeito citotóxico ocorreu por compressão das AgNp sobre as células MAC-T. Este fato dificultou a quantificação de células viáveis. Nas condições apresentadas, as AgNps se mostraram pouco estáveis, o que contribuiu para a formação dos agregados evidenciados por MEV, impactando diretamente na medida de raio hidrodinâmico durante a avaliação por DLS. Por ter a formação desses grandes *clusters*, as AgNps sofreram grande precipitação e potencialmente reduziram a viabilidade celular por compressão.

Palavras-chave: Citotoxicidade, MAC-T, mastite, nanopartículas, prata

Characterization of Silver Nanoparticles and Citocompatibility in Bovine mammary Epithelial Cells

Abstract: Mastitis, the major disease of dairy herds, accounts for up to 40% of all infectious diseases. The use of nanostructured compounds has been shown to be an efficient alternative for the control of microbial agents. The present work demonstrated the physical-chemical characteristics of silver nanoparticles (AgNp) and their toxicological effects on bovine mammary epithelial cells (MAC-T). The size and zeta potential of the AgNps was done through the DLS technique. Other techniques used were atomic force microscopy (AFM) and scanning microscopy (SEM). For the cytotoxicity assay, the technique of Tripán Blue staining was used to access living and dead cells. The average size of the nanoparticles was 946.99 nm, and their zeta potential was -16mV. Through the AFM it can be observed that the AgNps are monodisperse and spherical. Images obtained in MEV evidenced the formation of large clusters. The toxicity test resulted in a subjective observation suggesting that the compression of the AgNp at the bottom of the plates is killing the MAC-T cells, and quantification is not possible. Under the conditions presented, the AgNps showed low stability, which contributed to the formation of the aggregates evidenced in MEV that resulted in a large size in the DLS technique. Due to the formation of these large clusters, the AgNps underwent great precipitation and killed the cells by compression.

Keywords: Citotoxicity, MAC-T, mastitis, nanoparticles, silver

Introdução

A mastite, principal doença dos rebanhos leiteiros, é responsável por até 40% de todas as doenças infecciosas e por importantes perdas econômicas em função da diminuição da produção, gastos com medicamentos, serviços veterinários e descarte de leite. Uma alternativa recente para diminuir o uso de antimicrobianos, principalmente nos casos de mastite em vacas leiteiras, é o uso de compostos nanoestruturados, como alguns antimicrobianos e formulações como as nanopartículas de prata (AgNp).

As nanopartículas de prata (AgNp) vêm ganhando atenção para incorporação em produtos de uso cotidiano ou mesmo em medicamentos (Chen et al., 2008), graças à sua ação antimicrobiana superior aos sais de prata (Cavassin et al., 2015). Contudo, previamente ao uso terapêutico da AgNp, são necessários estudos para mensurar seus eventuais efeitos citotóxicos em células de úbere bovino. Assim, o objetivo desse estudo foi caracterizar as nanopartículas de prata e avaliar seu possível efeito tóxico em células MAC-T.

Material e Métodos

1 – Caracterização das AgNp

1.1 - Espalhamento de luz dinâmico

O tamanho das AgNp foi determinado, pesando-se 1 mg de AgNp e suspendeu-se em 10 mL de água ultrapura por osmose reversa e colocada em equipamento de ultrassom na potência de 400 W e um ciclo de 80% por 10 min, em banho em temperatura ambiente. Pipetou-se 1 mL da suspensão e fez-se uma avaliação em equipamento de DLS (*Dynamic Light Scattering*) (Malvern Zetasizer Nano-ZS).

1.2 - Microscopia de força atômica

Uma pequena porção de AgNp foram retiradas dos respectivos frascos, colocadas dentro de um *Eppendorf* junto a uma mistura de álcool isopropílico e Água Milli Q em uma proporção 1:1, homogeneizadas e sonicadas em equipamento de ultrassom na potência de 400 W e um ciclo de 80% por 10 min, em banho em temperatura ambiente. Após a sonicação, uma gota de cada suspensão de AgNp foi colocada em uma placa de vidro revestida de mica e desidratada sob atmosfera de nitrogênio. As imagens foram obtidas via modo intermitente em aparelho *Nanosurf easy Scan 2* (*Nanosurf Instruments*), em ar. As amplitudes de oscilação livres do *cantilever* eram tipicamente 50 mV e o tamanho de varredura da sonda do microscópio era de 5 x 5 μm . A resolução do AFM (*Atomic Force Microscopy*) era de 512 x 512 *pixels*. O comprimento e o raio da ponta eram de 225 μm e < 10 nm, respectivamente.

1.3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise por MEV foi realizada na Embrapa Instrumentação em São Carlos – SP, de acordo com metodologia de Castro (2001).

2 – Testes de toxicidade

Com o objetivo de avaliar a toxicidade das AgNp em células do úbere bovino, cultivaram-se células MAC – T bovinas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) acrescido de 4 mM de L-glutamina; 1 mM de piruvato de sódio; 5 ug/mL de insulina; 1 ug/mL de hidrocortisona; 10% de soro fetal bovino; 100 U/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Amostras de AgNp foram dispersas em meio de cultura celular DMEM com auxílio de ultrassom com ciclos de 0,7 e amplitude de 75%, sonicando por 5 minutos para a completa dispersão das NPs. As culturas foram expostas por 24 horas a três concentrações das NPs (250 ug/mL, 500 ug/mL, 750 ug/mL). Após, avaliou-se a citocompatibilidade utilizando solução de azul de Tripán a 0,4%.

Resultados e Discussão

A composição, tamanho, forma e área de superfície das Np são variáveis importantes que determinam o comportamento dessas partículas e suas interações com os sistemas biológicos. (El-Kheshen et al., 2012; Paredes et al., 2014). O valor médio do raio hidrodinâmico das AgNP foi de 946,99 nm. Na leitura do potencial Zeta, as AgNp apresentaram carga de -16 mV, indicando a baixa estabilidade das suspensões, uma vez que este valor se encontra com módulo abaixo de 30mV. Analisando a imagem obtida por AFM (Figura 1), pode-se observar que as mesmas se encontram com tamanho homogêneo e com forma esférica. Estes dados corroboram com os obtidos por microscopia eletrônica de varredura (Figura 2). Paredes et al. (2014) observaram sedimentação em suspensões de AgNp preparadas sob forte agitação e atribuíram isso à maior coalescência, que provocou rápida agregação das partículas e induziu a formação de grandes *clusters*. Fato também identificado no presente trabalho e o que explica a diferença de tamanho observada entre as técnicas de análise direta e indireta.

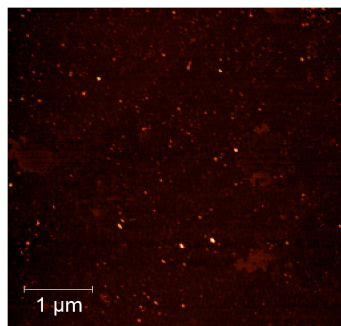


Figura 1. Imagem de microscopia de força atômica de uma suspensão de AgNp em uma mistura de água e álcool isopropílico.

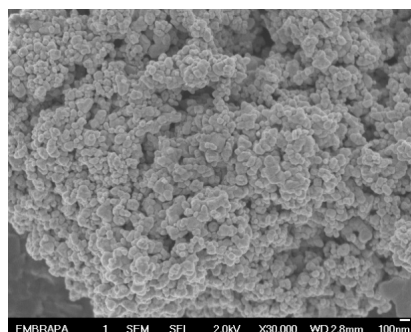


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de AgNp.

O teste de exclusão de corantes baseia-se no princípio de que as células vivas possuem membranas celulares intactas que excluem certos corantes, como o Azul de Tripán, enquanto que as células mortas não. No teste utilizando o Azul de Tripán, a suspensão celular de Mac-T tratadas com AgNp foi misturada com o corante e, em seguida, examinada visualmente para determinar se as células ocupam ou excluem o corante.

De acordo com a metodologia utilizada, nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ foram observadas células vivas pelo microscópio, depois sendo necessário corar as células com Azul de Tripán e fazer a contagem. Isto resultou em uma observação pouco precisa, sugerindo que a compressão das AgNp no fundo das placas esteja reduzindo a viabilidade das células Mac-T, pois a agregação das AgNp utilizadas fez com que as mesmas precipitassem e comprimissem das células no fundo da placa (Figura 3). Outro fato observado é que a alta concentração de azul de Tripán, retido junto aos *clusters*, pode estar camuflando a observação das células ainda viáveis (Figura 4).

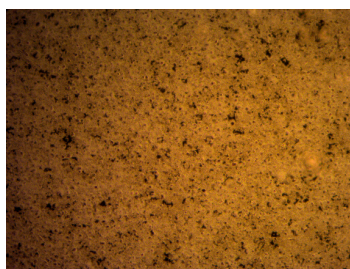


Figura 3: Células Mac-T impregnadas com AgNp na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$.

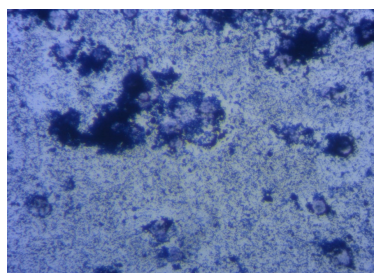


Figura 4: Células Mac – T coradas com Azul de Tripán na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$.

Conclusões

Nas condições apresentadas, as AgNps se mostraram pouco estáveis, o que contribuiu para a formação dos agregados evidenciados em MEV e pela técnica de DLS. Por ter a formação desses grandes *clusters*, as AgNps precipitaram e potencialmente reduziram a viabilidade celular por compressão.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos à Fapemig (APQ03229/15), CNPq, Capes, Rede Agronano e NanoREG.

Referências

CASTRO, L. A. S. Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura - Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, Doc. 93, 2001. 37p.

CAVASSIN, E. D.; FIGUEIREDO, L. F. P.; OTOCH, J. P.; SECKLER, M. M.; OLIVEIRA, R. A.; FRANCO, F. F.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTI, V.; LEVIN, A. S. S.; COSTA, S. F. Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. **Journal of Nanobiotechnology**, v.13, n.64, p.1-16, 2015.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H.J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**, n.176, p.1–12, 2008.

EL-KHESHEN, A. A.; EL-RAB, S. F. G. Effect of reducing and protecting agents on size of silver nanoparticles and their anti-bacterial activity. **Der Pharma Chemica**, v.4, n.1, p.53-65, 2012.

PAREDES, D.; ORTIZ, C.; TORRES, R. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Nanomedicine**, v.9, p.1717–1729, 2014.