

Avaliação da citotoxicidade in vitro de filme nanocompósito à base de subprodutos industriais de laranja em células CHO para potenciais aplicações na cadeia produtiva do leite

Davi Glanzmann⁽¹⁾⁽⁵⁾, Letícia Ludmilla Oliveira Arakaki⁽²⁾, Rafael Marques⁽³⁾ e Humberto de Mello Brandão⁽⁴⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiário, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾E-mail: davi.glanz@gmail.com.

Resumo — Este trabalho aborda a avaliação citotóxica de um filme nanocompósito produzido a partir de resíduos industriais de laranja e nanocristais de celulose, investigando seu potencial como material alternativo para embalagens alimentares ativas, inteligentes, biodegradáveis e possivelmente comestíveis. O trabalho objetivou identificar eventuais efeitos tóxicos em células CHO-K1, por meio dos ensaios de absorção de Vermelho Neutro e exclusão por Azul de Tripán. Os resultados indicam que o ensaio de Azul de Tripán não apontou citotoxicidade significativa ($p > 0,05$), enquanto o Vermelho Neutro revela perda de viabilidade celular em concentrações iguais ou superiores a 3,125 mg/mL ($p < 0,03978$), com 12,5 mg/mL próximo ao ponto de inibição letal de 50% (IL 50). Conclui-se, que o material é promissor para uso em embalagens, mas requer aprimoramentos para garantir estabilidade e segurança adequadas.

Termos para indexação: azul de tripan, embalagens biodegradáveis, nanotoxicidade, resíduos agroindustriais, vermelho neutro.

In vitro evaluation of a nanocomposite filme derived from industrial orange by-products in CHO cells

Abstract — This study addresses the cytotoxic evaluation of a nanocomposite film produced from industrial orange by-products and cellulose nanocrystals, investigating its potential as an alternative material for active, intelligent, biodegradable, and possibly edible food packaging. The aim was to identify potential toxic effects on CHO-K1 cells through Neutral Red uptake and Trypan Blue exclusion assays. The results indicate that the Trypan Blue assay did not show significant cytotoxicity ($p > 0.05$), while the Neutral Red assay revealed a loss of cell viability at concentrations equal to or higher than 3.125 mg/mL ($p < 0.03978$), with 12.5 mg/mL approaching the 50% lethal inhibition point (IL50). It is concluded that the material is promising for packaging applications but requires further improvements to ensure adequate stability and safety.

Index terms: agro-industrial waste, biodegradable packaging, nanotoxicity, neutral red, trypan blue.

Introdução

A crescente preocupação com os impactos ambientais dos polímeros sintéticos tem impulsionado o desenvolvimento de materiais alternativos, renováveis, biodegradáveis e de menor pegada ambiental (Nilsen-Nygaard et al., 2021). Apenas cerca de 9% dos plásticos produzidos globalmente são reciclados, enquanto o restante se acumula em aterros ou no ambiente, agravando a poluição mundial (Singh; Walker, 2024). Nesse cenário, filmes poliméricos biodegradáveis despontam como alternativa promissora aos plásticos convencionais, especialmente quando incorporam funções adicionais, como

atividade antimicrobiana ou indicadores de qualidade — características de embalagens ativas e inteligentes (Melo et al., 2019). O uso de resíduos agroindustriais como matéria-prima para esses biopolímeros reforça a economia circular, agregando valor a subprodutos de descarte pouco valorizados ou onerosos (Perotto et al., 2018). Entre os resíduos agroindustriais, destaca-se a casca de laranja, abundante na indústria cítrica e rica em compostos bioativos, com potencial para formar filmes com propriedades funcionais (Figueira et al., 2023). A adição de nanocristais de celulose, devido à alta cristalinidade, propriedades renováveis e elevada razão de aspecto, reforça mecanicamente os filmes e aprimora suas barreiras físico-químicas (Genet et al., 2025). No entanto, avaliar a citotoxicidade desses nanocompósitos é fundamental para garantir sua segurança em contato com alimentos ou ingestão, como no caso de filmes comestíveis (Cockburn et al., 2012). Ensaios *in vitro* fornecem dados preliminares sobre a biocompatibilidade, sendo essenciais ao desenvolvimento e regulamentação de novos materiais para embalagens alimentícias (International Organization for Standardization, 2009).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade *in vitro* de um filme nanocompósito desenvolvido a partir de resíduos industriais de laranja e nanocristais de celulose, visando sua aplicação como embalagem ativa, inteligente e biodegradável, com potencial para embalar derivados lácteos, como queijos e demais derivados da cadeia produtiva do leite. Espera-se, com isso, contribuir para a expansão de alternativas sustentáveis ao plástico convencional, alinhadas às demandas ambientais e de segurança alimentar da sociedade contemporânea.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo no ODS 12- Consumo Responsável: Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O filme utilizado neste estudo foi obtido por meio de um projeto em parceria com o Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária e o Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Para a avaliação da citotoxicidade do filme nanocompósito, foi utilizada a linhagem celular CHO-K1 (células de ovário de hamster chinês), cedida pelo Laboratório de Nanobiotecnologia e Nanotoxicologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. As células foram cultivadas em meio DMEM-F12, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de aminoácidos não essenciais e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), em incubadora com 5% de CO₂, 90-95% de umidade e 37 °C.

A solução estoque da fração solúvel do filme foi preparada conforme o Guia 129 da OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development, 2010), considerando que esta é a maior fração do material em proporção de massa. O material foi pesado para alcançar uma concentração final de 100 mg/mL da fração solúvel, disperso em DMEM-F12 e agitado overnight. Então, a solução foi esterilizada por filtração (0,22 µm), diluída e ajustada para as concentrações de exposição. Ambos os ensaios de citotoxicidade foram conduzidos em duas etapas: preliminar e principal. A etapa preliminar seguiu as concentrações indicadas no guia (0,0001 a 1000 µg/mL). Com base nos resultados, as concentrações na etapa principal foram ajustadas para 1,56 a 50 mg/mL, respeitando o limite de solubilização do material.

O ensaio de absorção de Vermelho Neutro seguiu o Guia 129 da OECD. O corante foi preparado a 400 µg/mL em DMEM-F12 e diluído para 40 µg/mL no momento do uso. A solução de descoloração foi composta por etanol 96° (50%), água ultrapura (49%) e ácido acético glacial (1%). No teste preliminar, células CHO-K1 foram plaqueadas em 96 poços ($\approx 1 \times 10^4$ células/poço), incubadas por 24 h e expostas às concentrações definidas (1:1 entre tratamento e meio). Após 24h adicionou-se o corante, seguido de nova incubação por 2h. O excesso foi removido, os poços lavados com PBS, e adicionada a solução de descoloração. Após 15 minutos de agitação orbital, a absorbância foi lida a 540 nm. No ensaio principal, o protocolo foi mantido, com ajustes nas concentrações (1,56 a 50 mg/mL) e leituras em 490, 540 e 630 nm, para atender a requisitos técnicos internos relacionados às limitações dos equipamentos do laboratório.

O ensaio de exclusão por Azul de Tripán foi realizado conforme o protocolo de Crowley et al. (2016), com o objetivo de complementar os resultados obtidos no outro ensaio. No teste preliminar, as células foram semeadas em placas de 24 poços ($\approx 5 \times 10^4$ células/poço), incubadas por 24h e tratadas com concentrações de 0,0001 a 1000 µg/mL (proporção 1:1). Após 24h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em DMEM-F12. Em seguida, foram misturadas com o corante Azul de Tripán (10 µL de célula + 10 µL de corante), incubadas por 2 minutos e quantificadas em câmara de Neubauer. No ensaio principal, o mesmo procedimento foi seguido, com placas de 48 poços ($\approx 3 \times 10^4$ células/poço) e concentrações ajustadas para 1,56 a 50 mg/mL, mantendo-se a proporção 1:1 com volumes reduzidos (200 µL de meio e 200 µL de tratamento).

Foram realizados testes de normalidade (Shapiro-Wilk), análises de variância One-way ANOVA e testes post hoc de Tukey para comparação entre grupos, considerando $p < 0,05$ significativo.

Resultados e discussão

Nos testes preliminares, não foi constatado efeito citotóxico significativo em nenhum dos tratamentos testados (0,0001 até 1000 µg/mL) em comparação com o grupo controle ($p > 0,05$). Diante desse resultado, provou-se necessária a ampliação das concentrações testadas, motivando a realização de um ensaio principal com doses mais elevadas, variando de 1,56 mg/mL a 50 mg/mL.

O ensaio principal de absorção de Vermelho Neutro demonstrou que o filme nanocompósito apresentou efeito citotóxico dependente da concentração. Na Figura 1 é possível notar que na concentração de 1,56 mg/mL não foi observada diferença estatística significativa em relação ao controle ($p > 0,05$). Entretanto, a partir da concentração de 3,125 mg/mL, todas as doses resultaram em redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,05$). Destaca-se que na concentração de 12,5 mg/mL, a viabilidade foi reduzida para 50,22%, valor que se aproxima de uma concentração inibitória letal de 50% (IL_{50}) no período de exposição de 24h.

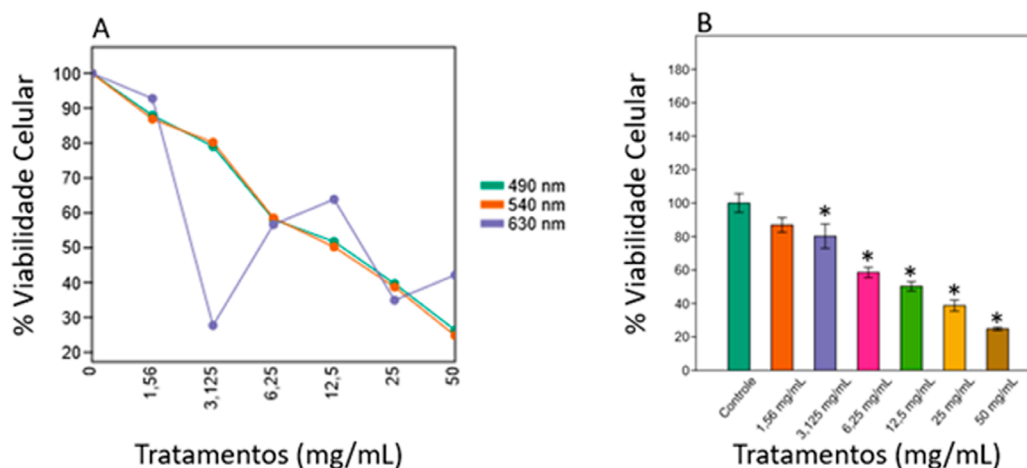


Figura 1. Viabilidade celular (%) medida pelo ensaio de absorção de vermelho neutro após 24h de exposição ao filme nanocompósito em várias concentrações, com leituras a 490 (verde), 540 (vermelho) e 630 (azul) nm. (A) Gráfico de linhas mostra a média dos controles e tratamentos em ordem crescente de concentração para cada comprimento de onda. (B) Gráfico de barras apresenta médias e desvios padrões, comparando os grupos. Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) foram encontradas a partir de 3,125 mg/mL (*) (ANOVA one-way; teste de Tukey).

Em contrapartida, o ensaio principal de exclusão por Azul de Tripán não demonstrou diferença estatística significativa em nenhuma das concentrações testadas no período de 24h (Figura 2), possivelmente pelos mecanismos distintos de cada corante e pela forma de análise de cada um.

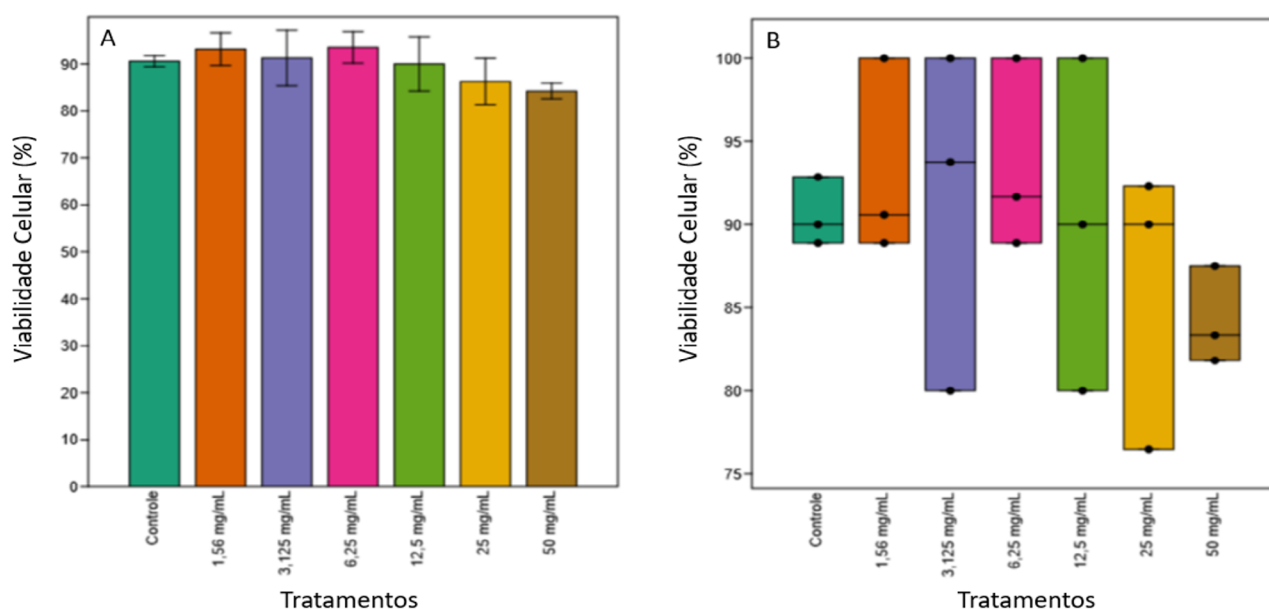


Figura 2. Viabilidade celular (%) obtida pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán após 24h de exposição ao filme nanocompósito em várias concentrações. (A) Gráfico de barras com médias e desvios padrões dos grupos controle e tratados, em ordem crescente de concentração. (B) Boxplot mostrando a distribuição dos valores individuais. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,6576$; ANOVA one-way; teste de Tukey).

Conclusões

Em conjunto, esses resultados indicam que o filme possui potencial para uso como material de embalagem alimentar ativa ou biodegradável, mas que ajustes por meio de testes complementares são recomendados para garantir níveis de segurança adequados ao contato com alimentos ou aplicações comestíveis.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brasil, pela concessão de bolsa Pibic. Parte do projeto Estudos de segurança de nanomateriais. SEG nº 20.22.03.013.00.02.005 e 20.22.03.013.00.03.006. À Embrapa Instrumentação pela disponibilidade do filme nanocompósito utilizado neste estudo. À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade de treinamento, o que nos proporcionou obter experiência e aprendizado; ao pesquisador Dr. Humberto de Mello Brandão pelo acompanhamento, orientação e apoio durante o período de estudos e capacitação.

Referências

COCKBURN, A.; BRADFORD, R.; BUCK, N.; CONSTABLE, A.; EDWARDS, G.; HABER, B.; HEPBURN, P.; HOWLETT, J.; KAMPERS, F.; KLEIN, C.; RADOMSKI, M.; STAMM, H.; WIJNHOFEN, S.; WILDEMAN, T. Approaches to the safety assessment of engineered nanomaterials (ENM) in food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 2224-2242, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.029>.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B.; CHRISTENSEN, M. E.; WATERHOUSE, N. J. Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087155>.

FIGUEIRA, O.; PEREIRA, V.; CASTILHO, P. C. A Two-step approach to orange peel waste valorization: consecutive extraction of pectin and hesperidin. **Foods**, v. 12, n. 20, p. 3834-3834, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12203834>.

GENET, M. B.; ZHUANG, X.; TAN, X.; ZHANG, Q.; MIAO, C.; ZHANG, Z.; JEMBERE, A. L. Cellulose nanocrystal-based synthetic biodegradable biopolymeric composites: A comprehensive review on recent progress. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 299, p. 140098, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140098>.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5:2009**: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, 2009.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests**. Paris, 2010. 54 p. (Series on Testing and Assessment, n. 129).

PEROTTO, G.; CESERACCIU, L.; SIMONUTTI, R.; PAUL, U. C.; GUZMAN-PUYOL, S.; TRAN, T.-N.; BAYER, I. S.; ATHANASSIOU, A. Bioplastics from vegetable waste via an eco-friendly water-based process. **Green Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 894-902, 2018.

MELO, P. E. F.; SILVA, A. P. M.; MARQUES, F. P.; RIBEIRO, P. R. V.; SOUZA FILHO, M. de S. M. de; BRITO, E. S. de; LIMA, J. R.; AZEREDO, H. M. C. de. Antioxidant films from mango kernel components. **Food Hydrocolloids**, v. 95, p. 487-495, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.061>.

NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 12**: Consumo e produção responsáveis. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/12>. Acesso em: 13 mar. 2025.

NILSEN-NYGAARD, J.; FERNÁNDEZ, E. N.; RADUSIN, T.; ROTABAKK, B. T.; SARFRAZ, J.; SHARMIN, N.; SIVERTSVIK, M.; SONE, I.; PETTERSEN, M. K. Current status of biobased and biodegradable food packaging materials: impact on food quality and effect of innovative processing technologies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 1333-1380, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12715>.

SINGH, N.; WALKER, T. R. Plastic recycling: a panacea or environmental pollution problem. **Materials Sustainability**, v. 2, n. 1, article 17, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s44296-024-00024-w>.