

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio
Anais do V Workshop 2009**

Odílio Benedito Garrido de Assis
Wilson Tadeu Lopes da Silva
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Editores

Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Capa: Manoela Campos e Valentim Monzane
Imagem da Capa: Imagem de AFM de nanofibra de celulose - Rubens Bernardes Filho
Editoração eletrônica: Manoela Campos e Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem 200

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

Anais do V Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao
agronegócio 2009 - São Carlos: Embrapa Instrumentação
Agropecuária, 2009.

Irregular
ISSN: 2175-8395

I. Nanotecnologia - Evento. I. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
II. Silva, Wilson Tadeu Lopes da. III. Mattoso, Luiz Henrique
Capparelli. IV. Embrapa Instrumentação Agropecuária

© Embrapa 2009

Os dados usados para identificar respostas adversas pelo Teste Exato de Fisher foram reunidos dos diversos exames patológicos. As patologias realizadas a olho nu e ao microscópio óptico foram realizadas sem o conhecimento prévio do patologista sobre os grupos a que pertenciam os animais. Apesar de a amostragem inicial de camundongos do grupo que recebeu hidrogel ter sido de 10 animais, um deles regurgitou parte do hidrogel pouco depois da administração e provavelmente parte do material deve ter obstruído as vias respiratórias, o que resultou na morte por insuficiência respiratória subsequente.

Tabela 1. Contabilização dos animais com ou sem efeitos adversos resultantes da administração oral (via sonda orogástrica – gavagem) do hidrogel de poli(acrilamida) a camundongos suíços. A probabilidade usando-se o Teste Exato de Fisher bilateral é de 1 (100%): aceita-se a hipótese nula.

Grupo	Nº de animais sem efeito adversos	Nº de animais com efeito adversos	Total
Controles	0	10	10
Hidrogel	0	9	9
Total	0	19	19

Usando-se um Teste Exato de Fisher bilateral (*two-tailed*), a probabilidade total de se obter dados tão ou mais extremos do que os que foram obtidos empiricamente é a probabilidade P de que as linhas e colunas sejam independentes (GLANTZ, 1997). Em nosso caso, os dados das colunas podem ser considerados independentes daqueles das linhas. Com isso, pode ser entendido que o grupo hidrogel não difere do grupo controle e a hipótese nula foi aceita.

Conclusões

Não houve alterações sobre essa dose limite nos nove camundongos. Portanto, o hidrogel de poli(acrilamida) pode ser considerado de baixa toxicidade aguda nos resultados preliminares deste estudo. É ainda necessário realizar um estudo de toxicidade crônica, haja vista a possibilidade teórica de que monômeros de acrilamida sejam liberados em longo prazo em quantidade suficiente para apresentar riscos tóxicos.

Agradecimentos

Reginaldo Trindade de Souza (Biotério da UFPA); CNPq, FINEP, EMBRAPA.

Referências

AZEVEDO, F. A. de.; CHASIN, A. A. da M. (Org.) **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Paulo: Rima, 2003.

BOLOGNA, L. S.; ANDRAWES, F. F.; BARWENIK, F. W.; LENTZ, R. D.; SOJKA, R. E. Analysis of residual acrylamide in field crops. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 37, p. 240-244, 1999.

BOYD, E. M.; KRUNEN, C. J.; PETERS, J. M. Lethal Amounts of Casein, Casein Salts and Hydrolyzed Casein Given Orally to Albino Rats. **J. NUTRITION**, Philadelphia, v. 93, n. 4, p. 429-437, 1967.

FRIEDMAN, M. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v. 51, n. 16, p. 4504-4526, 2003.

GLANTZ, A. S. **Primer of biostatistics.** 4th ed. New York: McGraw-hill, 1997. 473 p.

KOEPKE, S. R.; CREASIA, D. R.; KNUTSEN, G. L.; MICHEJDA, C. J. Carcinogenicity of Hydroxyalkylnitrosamines in F344 Rats: Contrasting Behavior of β - and γ -Hydroxylated Nitrosamines. **Cancer Research**, Baltimore, v. 48, p. 1533-1536, 1988.

MCCOLLISTER D. D.; HAKE, C. L.; SADEK, S. E.; ROWE, V. K. Toxicologic investigations of polyacrylamides. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 7, n. 5, p. 639-651, 1965.

DEPASS, L. R. Alternative Approaches in Median Lethality (LD50) and Acute Toxicity Testing. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 49, n. 2/3, p. 159-170, 1989.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals, nº 420.** Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Paris: OECD, 2001.

OVIEDO, I. R.; MENDEZ, N. A. N.; GOMEZ, M. P. G.; RODRIGUEZ, H. C.; MARTINEZ, A. R. Design of a physical and nontoxic crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Int. J. Polym. Mater.**, New York, v. 57, n. 12, p. 1095-1103, 2008.

SEYBOLD, C. A. Polyacrylamide review: Soil conditioning and environmental fate. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, n. 11/12, p. 2171 – 2185, 1994.

SMITH, E. A.; PRUEN, S. L.; OEHME, F. W. Environmental degradation of polyacrylamides. 1. Effects of artificial environmental conditions: temperature, light and pH. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 35, p. 121-135, 1996.

SMITH, E. A.; PRUES, S. L.; OEHME, F. W. Environmental degradation of acrylamides II. Effects of environmental (outdoor) exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 37, p. 76-91, 1997.

toxicidade se a quantidade de monômeros residuais de acrilamida for mínima (SEYBOLD, 1994).

O hidrogel desta pesquisa apresenta reatividade no organismo e digestibilidade desconhecidas. Haja vista que o hidrogel de poli(acrilamida) tem o potencial de ser utilizado para liberação controlada de insumos como fármacos, herbicidas e fertilizantes, é importante avaliação de sua toxicidade.

Materiais e métodos

Os hidrogéis constituídos por PAAm e polissacarídeo biodegradável MC foram obtidos por meio de polimerização química do monômero acrilamida (AAm) em solução aquosa contendo MC, agente de reticulação N'-N metileno-bisacrilamida (MBAAm) e catalisador N,N,N',N'- tetrametil-etilenodiamina (TEMED). Persulfato de sódio foi utilizado como iniciador da reação de polimerização via radical livre.

Os animais utilizados na pesquisa foram camundongos de seis semanas de idade. O teste laboratorial foi planejado levando em consideração toda informação disponível sobre a substância, tais como a estrutura química, propriedades físico-químicas, resultados de toxicidade *in vitro*, dados de toxicidade de substâncias semelhantes e o uso previsto para a substância. Essas considerações ajudam a avaliar a necessidade da realização do teste e a escolher uma dose inicial.

Tendo em vista a baixa toxicidade de polímeros semelhantes ao hidrogel em teste, adotou-se uma adaptação ao teste limite do *Guideline 420* da OECD (2001). Substâncias que não apresentem toxicidade aguda na dose de 2000 mg/Kg podem ser consideradas atóxicas. Assim, em casos em que há boas razões para se considerar a substância atóxica, pode-se iniciar os testes com a dose máxima. Seguindo essa noção, uma dose equivalente a 2000 mg de hidrogel seco por kg de massa corpórea do animal foi administrada a 10 camundongos (5 machos e 5 fêmeas) por via oral (gavagem), e os efeitos tóxicos observados por quatorze dias. A dose foi administrada aos animais em jejum, mas com água *ad libitum*. Após o tratamento, os animais continuaram em jejum por 3-4 horas. Um grupo controle de 10 animais recebeu água, em volume equivalente. O camundongo foi escolhido, e não o rato, devido à dificuldade de se sintetizar hidrogéis em quantidade apropriada na fase inicial da pesquisa.

O hidrogel seco é muito rígido para ser administrado. Depois de intumescido, continua rígido demais para passar por uma sonda de gavagem. Assim, o hidrogel foi moído e peneirado (ficando entre as malhas 0,50 mm e 0,25 mm). O hidrogel seco foi pesado, separando-se material na proporção de 2000 mg/Kg para cada animal do grupo Teste. Então, o hidrogel moído foi intumescido por 2

h com água (totalizando 40 vezes sua massa seca). É importante intumescer o hidrogel para evitar problemas diversos, tais como alterações no balanço hídrico do animal e obstrução intestinal, já que se trata de um material muito absorvente. Depois de intumescido, o material foi adicionalmente moído com cadinho para permitir passagem pela sonda. O material administrado (hidrogel + água) representava 8% da massa corpórea do animal. Porém, o grande aumento de volume decorrente da adição de água é também um risco a ser considerado, já que aumenta a probabilidade de o animal regurgitar, principalmente em se tratando de camundongo. Assim, a dose foi administrada lentamente e com cuidado. Eventualmente e a depender da necessidade, volumes ainda muito maiores foram administrados em alguns estudos (como em BOYD, 1967).

Todos os animais foram observados pelo menos uma vez nos primeiros 30 minutos; em especial nas primeiras 4 horas; periodicamente durante 24 horas e diariamente por 14 dias. Todas as observações foram registradas. Observou-se cuidadosamente o aparecimento de sinais claros de toxicidade. As observações incluíram mudanças na pele, pelagem, olhos, membranas mucosas, nos sistemas circulatório, respiratório, autônomo e nervoso, além de alterações no comportamento, entre outros sinais descritos no *Humane Endpoints Guidance Document*, da OECD. Após os 14 dias, os animais foram sacrificados para necropsia e exames histopatológicos de órgãos.

Com o objetivo de obter resultados estatísticos importantes com poucos animais, utilizou-se o **Teste Exato de Fisher**, na versão bilateral (*two-tailed*). O Teste exato de Fisher é usado na literatura de toxicologia para análises de frequência (por exemplo, KOEPKE, 1988). Uma importante vantagem do uso do Teste Exato de Fisher é que sua sensibilidade é alta, mesmo com amostras pequenas. Esse teste até mesmo transforma a desvantagem de se ter amostras pequenas em um benefício (GLANTZ, 1997 p. 140).

Resultados e discussão

Não foram observadas quaisquer alterações nos animais que fossem atribuídas à toxicidade do hidrogel. Alterações comportamentais menores foram observadas nos animais que receberam hidrogel, tais como redução do consumo de ração no dia seguinte, o que pode ser atribuído à ingestão de grande quantidade de material administrado.

Foi construída uma tabela de dados que simplesmente contabiliza o número de indivíduos que apresentam respostas adversas presumivelmente aplicáveis a efeitos tóxicos agudos (Tabela 1). "O efeito medido não precisa ser necessariamente a morte do animal, mas qualquer tipo de efeito que possa ser quantificado" (AZEVEDO, 2003 p. 145).

Os dados usados para identificar respostas adversas pelo Teste Exato de Fisher foram reunidos dos diversos exames patológicos. As patologias realizadas a olho nu e ao microscópio óptico foram realizadas sem o conhecimento prévio do patologista sobre os grupos a que pertenciam os animais. Apesar de a amostragem inicial de camundongos do grupo que recebeu hidrogel ter sido de 10 animais, um deles regurgitou parte do hidrogel pouco depois da administração e provavelmente parte do material deve ter obstruído as vias respiratórias, o que resultou na morte por insuficiência respiratória subsequente.

Tabela 1. Contabilização dos animais com ou sem efeitos adversos resultantes da administração oral (via sonda orogástrica – gavagem) do hidrogel de poli(acrilamida) a camundongos suíços. A probabilidade usando-se o Teste Exato de Fisher bilateral é de 1 (100%): aceita-se a hipótese nula.

Grupo	Nº de animais sem efeito adversos	Nº de animais com efeito adversos	Total
Controles	0	10	10
Hidrogel	0	9	9
Total	0	19	19

Usando-se um Teste Exato de Fisher bilateral (*two-tailed*), a probabilidade total de se obter dados tão ou mais extremos do que os que foram obtidos empiricamente é a probabilidade P de que as linhas e colunas sejam independentes (GLANTZ, 1997). Em nosso caso, os dados das colunas podem ser considerados independentes daqueles das linhas. Com isso, pode ser entendido que o grupo hidrogel não difere do grupo controle e a hipótese nula foi aceita.

Conclusões

Não houve alterações sobre essa dose limite nos nove camundongos. Portanto, o hidrogel de poli(acrilamida) pode ser considerado de baixa toxicidade aguda nos resultados preliminares deste estudo. É ainda necessário realizar um estudo de toxicidade crônica, haja vista a possibilidade teórica de que monômeros de acrilamida sejam liberados em longo prazo em quantidade suficiente para apresentar riscos tóxicos.

Agradecimentos

Reginaldo Trindade de Souza (Biotério da UFPA); CNPq, FINEP, EMBRAPA.

Referências

AZEVEDO, F. A. de.; CHASIN, A. A. da M. (Org.) **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Paulo: Rima, 2003.

BOLOGNA, L. S.; ANDRAWES, F. F.; BARWENIK, F. W.; LENTZ, R. D.; SOJKA, R. E. Analysis of residual acrylamide in field crops. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 37, p. 240-244, 1999.

BOYD, E. M.; KRUNEN, C. J.; PETERS, J. M. Lethal Amounts of Casein, Casein Salts and Hydrolyzed Casein Given Orally to Albino Rats. **J. NUTRITION**, Philadelphia, v. 93, n. 4, p. 429-437, 1967.

FRIEDMAN, M. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v. 51, n. 16, p. 4504-4526, 2003.

GLANTZ, A. S. **Primer of biostatistics.** 4th ed. New York: McGraw-hill, 1997. 473 p.

KOEPKE, S. R.; CREASIA, D. R.; KNUITSEN, G. L.; MICHEJDA, C. J. Carcinogenicity of Hydroxyalkylnitrosamines in F344 Rats: Contrasting Behavior of β - and γ -Hydroxylated Nitrosamines. **Cancer Research**, Baltimore, v. 48, p. 1533-1536, 1988.

MCCOLLISTER D. D.; HAKE, C. L.; SADEK, S. E.; ROWE, V. K. Toxicologic investigations of polyacrylamides. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 7, n. 5, p. 639-651, 1965.

DEPASS, L. R. Alternative Approaches in Median Lethality (LD50) and Acute Toxicity Testing. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 49, n. 2/3, p. 159-170, 1989.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals, nº 420.** Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Paris: OECD, 2001.

OVIEDO, I. R.; MENDEZ, N. A. N.; GOMEZ, M. P. G.; RODRIGUEZ, H. C.; MARTINEZ, A. R. Design of a physical and nontoxic crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Int. J. Polym. Mater.**, New York, v. 57, n. 12, p. 1095-1103, 2008.

SEYBOLD, C. A. Polyacrylamide review: Soil conditioning and environmental fate. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, n. 11/12, p. 2171 – 2185, 1994.

SMITH, E. A.; PRUEN, S. L.; OEHME, F. W. Environmental degradation of polyacrylamides. 1. Effects of artificial environmental conditions: temperature, light and pH. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 35, p. 121-135, 1996.

SMITH, E. A.; PRUES, S. L.; OEHME, F. W. Environmental degradation of acrylamides II. Effects of environmental (outdoor) exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 37, p. 76-91, 1997.