

**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

1. 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



ANÁLISE GENOTÓXICA DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA/ÁCIDO POLIMETACRÍLICO COM DIFERENTES TAMANHOS

Márcia R. de Moura¹, Renata de Lima², Leandro Feitosa², Fauze A. Aouada¹, Leonardo F. Fraceto³, Luiz H. C. Mattoso¹

¹Laboratório Nacional de Nanotecnologia-Embrapa-CNPDI São Carlos, SP, Mregina@cnpdia.embrapa.br ;

²Departamento de Biotecnologia, Universidade de Sorocaba;

³Departamento de Engenharia Ambiental, Unesp/Campus Sorocaba

Projeto Componente: PC4

Plano de Ação: 01.05.01.001.04.02

Resumo

Neste trabalho foi realizado estudo citogenético em células de linfócitos para avaliar a genotoxicidade de nanopartículas de quitosana/ácido polimetacrílico (QS/PMAA) com diferentes tamanhos (60 nm e 82 nm). A genotoxicidade das nanopartículas foi avaliada utilizando três diferentes concentrações de nanopartículas (0,018%, 0,0018%, 0,00018%). Nos resultados obtidos não foram observadas alterações morfológicas nos cromossomos das células de linfócitos. Os valores de índice mitóticos relativos sofreram um aumento quando da exposição das células às nanopartículas de QS/PMAA com 60 nm de tamanho, indicando que ocorreu um aumento na divisão celular. Os testes realizados contribuem de forma positiva para avaliação da segurança das nanopartículas de QS/PMAA.

Palavras-chave: nanotecnologia, nanopartículas poliméricas, citogenética, mutagênese.

Introdução

Nos últimos anos a nanotecnologia tem apresentado um grande avanço nas mais diferentes áreas do conhecimento, uma vez que estão sendo desenvolvidos vários materiais nanoestruturados (ROCO, 2003; SUH *et al.*, 2009). Dentre os materiais nanoestruturados destacam-se as nanopartículas poliméricas, que são estruturas que apresentam tamanho entre 1 e 100 nm e tem sido amplamente preparadas, para, por exemplo, carrear compostos bioativos (fármacos, proteínas, pesticidas, nutrientes, etc). No entanto a avaliação dos impactos das nanopartículas aos seres vivos e ambiente se faz necessária para a garantia da segurança de sua utilização (WANG *et al.*, 2007). Neste trabalho foi realizada a análise citogenética

das nanopartículas poliméricas Quitosana/Ácido polimetacrílico (QS/PMAA) com diferentes tamanhos (60 nm e 82 nm) para verificar sua possível genotoxicidade. Para o trabalho foram utilizadas culturas de linfócitos humanos, que foram expostas a soluções contendo nanopartículas em três concentrações distintas 0,018 %, 0,0018 % e 0,00018 %.

Materiais e métodos

Síntese e caracterização das nanopartículas de QS/PMAA

As nanopartículas (NPs) de QS-PMAA foram preparadas por polimerização do ácido metacrílico em solução de quitosana, a partir de duas

etapas (MOURA et al., 2008). Na primeira etapa, a quitosana foi solubilizada em solução de ácido metacrílico por 12 horas, sob agitação magnética. As concentrações de quitosana utilizada na síntese foram de 0,2; 0,5 e 0,8 (% m/v). Na segunda etapa, adicionou-se sob a solução previamente solubilizada persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) com agitação mecânica. O sistema foi fechado e mantido a 70 °C por 1 hora, para que ocorresse a polimerização do ácido metacrílico e formação das nanopartículas QS-PMAA. O tamanho médio das partículas foi analisado em um Fiber Optic Quasi Elastic Light Scattering (FOQELS) (Brookhaven, USA). As medidas foram realizadas em triplicata a 25 °C. As suspensões de partículas foram caracterizadas quanto à forma das partículas e homogeneidade da suspensão, através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). O microscópio utilizado foi um Philips Cm200.

Estudo citogenético

As amostras de sangue periférico foram coletadas de três indivíduos diferentes, não fumantes e com hábitos regulares de alimentação. Os voluntários realizaram a participação após assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Protocolo Comitê de ética em pesquisa/Universidade de Sorocaba, Protocolo número: 008/08).

Para cada estudo, cada um dos voluntários contribuiu com 2,5 mL de sangue periférico, que foram utilizados em quatro culturas diferentes, sendo utilizado para cada uma delas 500 μ L de sangue. Uma das amostras serviu de controle negativo e três outras foram utilizadas para os tratamentos com diferentes concentrações suspensões de QS/PMAA que resultaram em concentração final de 0,018 %, 0,0018 % e 0,00018 %, aplicadas logo no início da cultura. Todas as culturas foram incubadas em 5 mL de solução final que consta de 78 % de meio de cultura RPMI (Cultilab®) suplementado com 20 % de soro fetal bovino e 2 % de fitohemaglutinina, estas foram mantidas a 37 °C em incubadora com umidade controlada e com 5 % de CO_2 durante 72 h.

Aproximadamente 30 minutos do período final da incubação foram adicionados 15 μ L de colchicina em cada cultura, no fim do período de 72 h de incubação foi realizada a hipotonia celular com solução de KCl 0,075M a 37 °C, por 40 min. A fixação das metáfases foi realizada utilizando mistura de metanol/ácido acético (3:1, v/v). As lamínas foram montadas e a coloração realizada utilizando o corante Giemsa, seguidamente as lamínas foram analisadas por microscopia. O índice mitótico foi determinado contando o número de metáfases pelo número total de células, o índice mitótico relativo determinado pelo índice mitótico da concentração dividido pelo índice mitótico do controle negativo.

Resultados e discussão

Caracterização das nanopartículas de QS/PMAA

Na Tabela 1 é apresentada a dependência entre a quantidade de quitosana na síntese e o tamanho médio das nanopartículas. Pode ser observado que aumentando a quantidade de quitosana na síntese das nanopartículas, o tamanho médio das NPs apresentou um decréscimo.

Tabela 1. Valores de tamanho médio para as diferentes NPs de quitosana em pH = 4,0.

Nanopartícula	Tamanho de partícula (nm)
0,2 % m/v de QS	110 \pm 4
0,5 % m/v de QS	82 \pm 2
0,8 % m/v de QS	60 \pm 4

Todas as nanopartículas analisadas apresentam morfologia homogênea, com uniforme distribuição de tamanho de partículas e esféricos formatos, como apresentado na Figura 1.

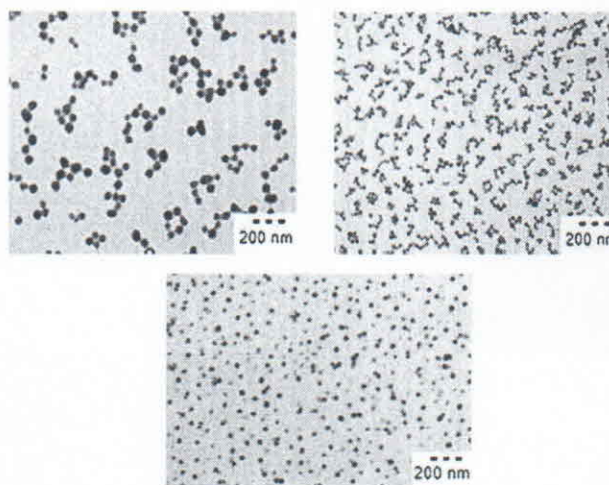


Fig. 1. Micrografias de MET das nanopartículas de quitosana preparadas com (a) 0,2; (b) 0,5 e (c) 0,8 (m/v) de quitosana a pH \approx 4.

Análise citogenética

As análises citogenéticas (qualitativas e quantitativas) foram realizadas com auxílio de microscópio e constaram de observação e contagem de células em divisão celular, foi estabelecido o índice mitótico para cada concentração e condição testada. A Figura 2 apresenta os resultados de valores de índice mitótico determinados. Os testes mostraram que as nanopartículas de QS/PMAA de

59 nm apresentaram um aumento no valor do índice mitótico relativo, indicando que as células de linfócitos na presença destas nanopartículas sofrem um aumento na divisão celular. O mesmo comportamento não foi observado para as nanopartículas de QS/PMAA com tamanho de 82 nm. Cabe ressaltar ainda que as alterações nos valores de índices mitóticos não foram concentração dependente, o que indica que estas modificações observadas devem-se principalmente a diferença de tamanho das nanopartículas.

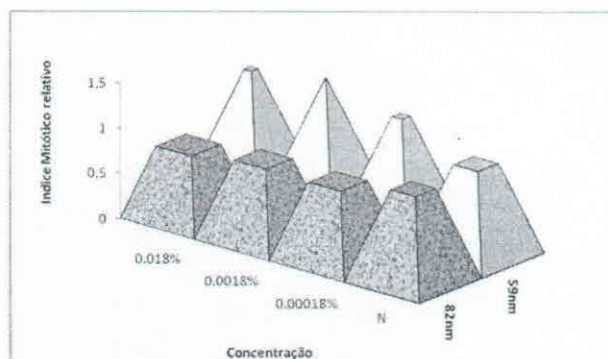


Fig. 2. Valores de índices mitóticos relativos obtidos pelas análises das células expostas as nanopartículas de QS/PMAA de diferentes tamanhos (59 nm e 82 nm) e do negativo (N), (n=3).

Conclusões

As nanopartículas QS-PMAA foram sintetizadas com sucesso, através da polimerização de ácido metacrílico na presença de solução de quitosana. O tamanho das partículas foi dependente da concentração de quitosana utilizada na preparação das nanopartículas. Microscopias eletrônicas de transmissão (MET) mostraram que nanopartículas de QS-PMAA apresentaram morfologia homogênea em forma e distribuição de tamanho, com predominância da forma esférica. Os resultados obtidos neste trabalho são promissores e fornecem informações sobre a genotoxicidade de nanopartículas de QS/PMAA e os diferentes efeitos observados em função das diferenças de tamanho destas. No entanto, este estudo é restrito a um tipo celular e desta maneira, outros ensaios devem ser realizados para se obter informações adicionais sobre a segurança desta nanopartículas poliméricas, bem como seus impactos aos seres humanos e ambiente.

Agradecimentos

FAPESP, CNPq, FINEP/MCT, EMBRAPA.

Referências

- MOURA, M. R. de.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. **J. Colloid Interf. Sci.**, [S. l.], v. 321, n. 2, p. 477-483, 2008.
- ROCO, M. C. **Curr. Opin. Biotechnol.**, London, v. 14, n. 3, p. 337-346, 2003.
- SUH, W. H.; SUSLICK, K. S.; STUCKY, G. D.; SUH, Y. H. **Prog. Neurobiol.**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 133-170, 2009.
- WANG, J. J.; SANDERSON, B. J. S.; WANG, H. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 628, n. 2, p. 99-106, 2007.