

ISSN 2175-8395

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

**REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO**

**ANAIS DO VI WORKSHOP – 2012**

Maria Alice Martins  
Morsyleide de Freitas Rosa  
Men de Sá Moreira de Souza Filho  
Nicodemos Moreira dos Santos Junior  
Odílio Benedito Garrido de Assis  
Caue Ribeiro  
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

**Editores**

Fortaleza, CE  
2012

## Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

### **Embrapa Instrumentação**

Rua XV de Novembro, 1452,  
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](mailto:sac@cnpdia.embrapa.br)

### **Embrapa Agroindústria Tropical**

Rua Dra. Sara Mesquita, 2270,  
CEP 60511-110 – Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
<http://www.cnpat.embrapa.br>  
E-mail: [sac@cnpat.embrapa.br](mailto:sac@cnpat.embrapa.br)

### **Comitê de Publicações da Embrapa Instrumentação**

Presidente: João de Mendonça Naime  
Membros: Débora Marcondes Bastos Pereira Milori, Washington Luiz de Barros Melo, Sandra Protter Gouvêa, Valéria de Fátima Cardoso.  
Membro suplente: Paulo Sérgio de Paula Herrmann Júnior

### **Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical**

Presidente: Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior  
Secretário-Executivo: Marcos Antonio Nakayama  
Membros: Diva Correia, Marlon Vagner Valentim Martins, Arthur Cláudio Rodrigues de Souza, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Adriano Lincoln Albuquerque Mattos e Carlos Farley Herbster Moura

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto

Capa: Mônica Ferreira Laurito, Pedro Hernandes Campaner

Imagens da capa:

Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus Loures Mourão, Viviane Soares

Imagem de MEV de Eletrodeposição de cobre – Luiza Maria da Silva Nunes, Viviane Soares

Imagem de MEV de Colmo do sorgo – Fabrício Heitor Martelli, Bianca Lovezutti Gomes, Viviane Soares

Imagem de MEV-FEG de HPMC com nanopartícula de quitosana – Marcos Vinicius Lorevice, Márcia Regina de Moura Aouada, Viviane Soares

Imagem de MEV-FEG de Vanadato de sódio – Waldir Avansi Junior

Imagem de MEV de Fibra de pupunha – Maria Alice Martins, Viviane Soares

1ª edição

1ª impressão (2012): tiragem 300

#### **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**

---

Anais do VI Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio 2012 – São Carlos: Embrapa Instrumentação; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

Irregular

ISSN: 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Rosa. Morsyleide de Freitas. III. Souza Filho, Men de Sá Moreira de. IV. Santos Junior, Nicodemus Moreira dos. V. Assis, Odílio Benedito Garrido de. VI. Ribeiro, Caue. VII. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. VIII. Embrapa Instrumentação. IX. Embrapa Agroindústria Tropical.



---

## ANÁLISES DE GENOTOXICIDADE DE NANOFIBRAS CELULÓSICAS POR TESTE DO *ALLIUM CEPA*

---

Patrícia Cristina Yamawaki<sup>1</sup>, Eliangela M. Teixeira<sup>2</sup>, Ana Carolina Correa<sup>2</sup>, Luiz Henrique Caparelli Mattoso<sup>3</sup>, Leonardo Fernandes Fraceto<sup>3</sup>, Renata de Lima<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnologia, Universidade de Sorocaba, Rodovia Raposo Tavares km 82, CEP 18023-000, Sorocaba, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa, CNPDIA, São Carlos, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Engenharia Ambiental Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Sorocaba, SP, Brasil.

e-mail para contato: [patricia.c.y@hotmail.com](mailto:patricia.c.y@hotmail.com)

Projeto Componente: PC6

Plano de Ação:6

---

### Resumo

Este trabalho tem como objetivo principal realizar avaliações do potencial genotóxico das nanofibras de celulose, utilizando como modelo células em divisões mitóticas de *Allium cepa* a fim de encontrar possíveis efeitos genotóxicos. A utilização do ensaio de aberrações cromossômicas de *Allium cepa* a fim de encontrar possíveis efeitos genotóxicos (alterações no material genético), é feito utilizando-se culturas rápidas de células vegetais, onde são necessárias sementes de *Allium cepa*. Como resultado espera-se que com a realização do teste haja possibilidade de avaliar as nanofibras celulósicas garantindo a segurança na utilização das mesmas.

Palavras-chave: genotoxicidade, nanofibras celulósicas e *Allium cepa*.

---

### Introdução

Há um interesse considerável na exploração comercial de materiais derivados da celulose, uma vez que é tanto renovável e abundante. Nanofibras de celulose, também conhecidas como bigodes, cristalitos, ou cristais de celulose, são os domínios cristalinos de fibras celulósicas que podem ser isoladas utilizando hidrólise ácida. A terminologia utilizada para descrever estas fibras escala nanométrica está relacionada com a sua características físicas, em termos de rigidez, comprimento, espessura [1]. Apesar de atualmente estes materiais têm limitado as aplicações industriais, devido a dificuldades relacionadas com a sua alta higroscopicidade, tendência a se aglomerar e interação com outros materiais pobres, whiskers de celulose tem uma variedade de aplicações potenciais futuros. Eles podem ser usados em aplicações médicas, bem como no agronegócio [2,3,4].

O surgimento de propostas para a utilização destes materiais requer investigações da sua toxicidade, considerando a sua segurança em termos de ambiente e seres vivos, assim como as possíveis modificações das técnicas de produção que podem reduzir qualquer toxicidade, se presente. É possível que a utilização destes materiais no sector da saúde poderia melhorar a biocompatibilidade, o que é requerido pelas agências reguladoras [5]. O objetivo dos estudos nanotoxicológico é garantir a aplicação segura dos nanomateriais, aumentando assim a sua aceitação e minimizar eventuais problemas futuros que possam ser associados à sua utilização em larga escala.

Como resultado, a toxicidade dos materiais também podem variar [6]. Análises nanotecnológicas deve permitir a identificação dos métodos de produção requeridos para produzir nanoestruturas (tais como nanofibras de celulose) que possuem características otimizadas em termos de minimização de toxicidade. No entanto, a

principal dificuldade em relação ao potencial toxicológico de nanomateriais resulta do fato de que é impossível generalizar, uma vez que diferentes nanomateriais exibem distintos perfis toxicológicos [7,8]. No caso de nanofibras, o desafio surge da sua tendência para se aglomerarem, e o seu comportamento higroscópico, o que dificulta a manipulação e análise, e exige o desenvolvimento de novas formas de avaliação.

A viabilidade celular e aparecimento de apoptose não são as principais dificuldades na medida em que o material genético é em causa. A apoptose é uma solução que utiliza a célula quando não é possível para reparar os danos. No entanto, sabe-se que uma alteração na expressão do gene, bem como alterações na sinalização celular, pode levar a danos irreversíveis e multiplicação de células não regulada, com a formação do tumor, a longo prazo. Pequenas perturbações iniciais, portanto, pode levar a sérias conseqüências futuras.

O objetivo deste estudo foi investigar a genotoxicidade de nanofibras de celulose derivados de branco, marrom, rubi, e de algodão verde e curauá. Uma vez que esses materiais apresentam um considerável potencial para uso em aplicações de saúde e ambiental, a informação relevante para a sua segurança foi obtida com o *Allium cepa* ensaio de aberração cromossômica.

## Materiais e métodos

Para análise de genotoxicidade das nanofibras celulósicas foi realizado a citogenética de sementes de *Allium cepa*, que mede e classifica as alterações cromossômicas ocorridas por exposição, indicando maior ou menor toxicidade das diferentes concentrações, baseadas nas alterações de concentrações.

Os testes foram realizados colocando-se as sementes para germinar em água ultrapura. Após período de germinação as raízes foram colocadas em exposição às diferentes tipos de nanofibras por 12, 24 ou 48 horas, posteriormente as raízes foram fixadas com fixador Carnoy (álcool etílico e ácido acético, na proporção de 3:1). Após fixação as raízes devem ser lavadas por três vezes em água destilada e após este procedimento foram submetidas a uma hidrólise ácida (HCl) em banho Maria a 60°C por 9 minutos, seguida de lavagens com água destilada. Após este tratamento as raízes foram coradas com reativo de Schiff no escuro por 2 horas. Na montagem da lâmina foi utilizada a técnica de esmagamento utilizando-se uma gota de Carmim Acético. O material pronto foi conservado a uma temperatura de aproximadamente 4°C onde

serão mantidas até o momento da análise em microscópio.

Para análise das irregularidades celulares, foram confeccionadas de 3 a 5 lâminas de cada concentração, sendo utilizado para a leitura apenas 3 (triplicata). Em cada uma das lâminas foram analisadas, aproximadamente, 500 células, totalizando 1500 células por tratamento de exposição às nanofibras celulósicas.

Para a preparação das lâminas, a região meristemática foi sobreposta por uma lamínula e esmagada cuidadosamente em uma gota de carmim acético a 2%. O material pronto foi conservado a uma temperatura de aproximadamente 4°C onde serão mantidas até o momento da análise em microscópio.

## Resultados e discussão

No presente trabalho, o ensaio de *Allium cepa* foi realizada colocando as raízes germinadas em contato com os diferentes tipos de nanofibras durante 24 horas, em concentrações de nanofibras de 0,01, 0,1, e 1%. Após o tratamento, as lâminas foram preparadas, e contagens foram feitas dos números de células em divisão (prófase, metafase, anáfase e telófase), bem como os números de células danificadas (Fig.2). Os resultados dos testes de *Allium cepa* foram utilizados para calcular o índice mitótico (IM= número de células em divisão/ total de células), o índice mitótico relativa (IMR= índice mitótico/ índice mitótico do negativo), e do arranjo de aberração cromossômica (IALT= número de células com alteração/ total de células).

Os resultados mostraram que não houve alteração significativa índice mitótico. Uma forma de avaliar a citotoxicidade é por análise de alterações no valor do índice mitótico [8], onde uma redução do valor abaixo de 20%, em relação a um controle, poderia indicar um efeito potencialmente letal sobre o organismo [11]. Aqui, foi observado que o efeito tóxico foi, portanto, maior em concentrações mais baixas de fibra, com as alterações nos valores de índice de mitose de 30-40%, em relação ao controle, indicando uma interferência negativo em relação ao desenvolvimento celular.

A utilização das nanofibras de algodão branco e verde provocou alterações significativas, em relação ao controle, em todas as concentrações (0,01, 0,1 e 1%), enquanto que no caso de as nanofibras curauá, alterações só foram observados em concentrações de 0,1 e 1%. Para as nanofibras de algodão marrom, houve apenas uma diferença significativa na maior

concentração testada. Uma descoberta importante foi a de que o algodão branco, algodão verde, e nanofibras curauá produzido os maiores valores de índice de aberrações cromossômicas nas concentrações mais baixas de fibra, suportando a noção de que a formação de agregados em concentrações mais elevadas reduziu a superfície de contato, bem como o grau de interação com *Allium cepa* as células, resultando em menores alterações celulares. (Fig.1)

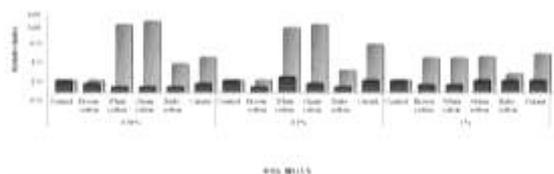


Figura 1 - valores relativos mitóticas índice de acordo com nanofibras concentração (0,01, 0,1 e 1,0%), e os índices de aberrações cromossômicas obtidos após exposição das células de *Allium cepa*. O sobrescrito (\*) indica alterações significativas (ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ).

## Conclusões

Pode-se concluir que o uso futuro de nanofibras de celulose requer primeiramente uma melhor compreensão de seus efeitos, incluindo os possíveis impactos ambientais quando usado em aplicações do agronegócio. As respostas celulares podem diferir de acordo com o organismo em questão, a concentração de nanofibras, eo meio de exposição. Os resultados deste estudo demonstraram que nanofibras de derivados de algodão (branco, verde e marrom) e curauá pode causar alterações nas células da planta. Uma observação importante foi que não há alterações genotóxicas nas células da planta quando expostos a nanofibras de algodão rubi, sob as condições empregues, indicando que o algodão rubi pode ser o material de escolha para a produção de nanofibras.

Por conseguinte, é importante a considerar o ambiente em que as nanofibras será utilizado, uma vez que em alguns agregados aplicações de fibra são usados para reforçar matrizes poliméricas, em que as fibras podem melhorar a estabilidade térmica, resistência mecânica, e permeabilidade aos líquidos e gases, mesmo em baixas concentração de fibras. No seu estado intacto, estas matrizes não são susceptíveis de libertar nanofibras, no entanto processos de decomposição pode resultar em libertação lenta de fibras para o ambiente em geral.

## Agradecimentos

FAPESP, CNPq, CAPES, Fundunesp, Finep e Embrapa.

## Referências

- [1] Souza Lima, M.M., Borsali, R. *Macromol. Rapid Commun.* 25: 771-787 (2004).
- [2] Eichhorn, S.J., Baillie, C.A., Zafeiropoulos, N., Mwaikambo, L.Y., Ansell, M.P., Dufresne, A., Entwistle, K.M., Herrera-Franco, G.C., Escamilla, P.J., Groom, L., Hughes, M., Hill, C., Rials, T.G., Wild, P.M. *J. Mater. Sci.* 36: 2107-2131 (2001).
- [3] Samir, M.A.S.A., Alloin, F., Dufresne, A. *Biomacromolecules* 6: 612-626 (2005).
- [4] Hubbe, M.A., Rojas, O.J., Lucia, L.A., Sain, M. *Bioresources* 3(3): 929-980 (2008).
- [5] Chau C-F, Wu S-H, Yen G-C. The development of regulations for food nanotechnology. *Trends Food Sci Tech* 18(5): 269-80 (2005).
- [6] Nafee N, Schneider M, Schaefer UF, Lehr CM. Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. *Int J Pharm* 381(2): 130-9 (2009).
- [7] Herzog, E., Casey, A., Lyng, F.M., Chambers, G., Byrne, H.H, Davoren, M. *Toxicol. Lett.* 174(1-3): 49-60 (2007).
- [8] Pisanic, T.R., Blackwell, J.D., Shubayev, V.I, Finones, R.R., Jin, S. *Biomaterials* 28(16): 2572-2581 (2007).
- [9] Odeigah, P.G.C., Nurudeen, O., Amund, O.O. *Hereditas* 126: 161-167 (1997).
- [10] Lima, R., Feitosa, L.O., Pereira, A.E., Moura, M.R., Aouada, F.A., Mattoso, L.H.C., Fraceto, L.F. *J. Food Sci.* 75: 89-96 (2010).
- [11] Antonsiewicz, D. *Folia Histochem. Cytobiol.* 28: 79-96 (1990).