



AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA TOXICIDADE DE NANOFIBRAS DE CELULOSE EM MODELOS MURINOS DE ALERGIA PULMONAR EXPERIMENTAL

Virginia Oliveira¹, Michele Munk Pereira^{1,2}, Ana Cláudia Carvalho Gouveia¹, Pedro Paulo Soldati¹, Humberto de Mello Brandão², Eliangela de Moraes Teixeira³, Luiz Henrique Capparelli Mattoso³, Nádia Rezende Barbosa Raposo¹

¹Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), MG.

²Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

³Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP. (nadiafox@gmail.com)

Projeto Componente: PC6 Plano de Ação: PA5

Resumo

As nanofibras de celulose (NFC) são consideradas nanomateriais estratégicos devido à sua estrutura e propriedades singulares, o que permite que sejam exploradas em diferentes áreas de pesquisa e aplicação. No entanto, dados relativos à sua toxicidade são escassos. Este trabalho objetivou avaliar a toxicidade pulmonar *in vivo* de NFC em modelos murinos de alergia pulmonar experimental, por meio de exposição inalatória, verificando a indução de resposta alérgica/inflamatória semelhante à asma. Não foram encontradas alterações histopatológicas no pulmão, aumento do número de células no lavado broncoalveolar e distúrbios hematológicos, resultados que apontam para baixa toxicidade das NFC.

Palavras-chave: Nanofibras de celulose, Asma pulmonar experimental, Toxicidade respiratória.

Introdução

As nanofibras de celulose (NFC), consideradas nanomateriais estratégicos devido à sua estrutura singular, possuem 2 a 20 nm de diâmetro e poucos micra de comprimento [1,2]. Podem ser obtidas de várias fontes, tais como tunicina, bacterianas, madeira, legumes, frutas e algodão [3,4,5,6]. Devido à sua organização estrutural, as NFC apresentam propriedades mecânicas excepcionais, a saber: flexibilidade, resistência, grande área de superfície, baixa densidade ($1,6 \text{ g/cm}^3$), além de possuírem grupos carboxila que facilitam a funcionalização desses materiais [7, 8]. Além disso, a utilização da celulose na escala nanométrica é atrativa, uma vez que as nanofibras são obtidas a partir de fontes renováveis, biodegradáveis, de baixo custo [9, 10] e abundantes em países em desenvolvimento, como o Brasil.

A versatilidade desses materiais permite que sejam explorados em diferentes áreas de pesquisa e

aplicação. Na indústria, as NFC também possuem aplicações múltiplas, com fim de reforço, em compósitos de matrizes poliméricas biodegradáveis [11]. Na nanomedicina, as NFC vêm sendo apontadas por diversos estudos por sua potencial aplicação em enxertos de peles artificiais, produção de vasos sanguíneos, suporte para crescimento de tecidos e na liberação controlada de fármacos [12, 13].

Embora a aplicabilidade desses materiais seja bastante explorada, dados relativos à sua toxicidade são escassos. Pouco se conhece acerca dos efeitos das NFC sobre a saúde humana e o meio ambiente.

A toxicidade pulmonar das NFC deve ser particularmente explorada, devido à sua facilidade de acesso a este sistema, bem como para o aperfeiçoamento e consolidação de suas potenciais aplicações industriais, sem que haja riscos ocupacionais.

Neste contexto, faz-se imperiosa a realização de estudos que elucidem os mecanismos de interação das NFC com sistemas biológicos, investigando o

seu potencial tóxico, carcinogênico e inflamatório. Isto posto, este trabalho avaliou a toxicidade pulmonar *in vivo* de NFC em modelos murinos de alergia pulmonar experimental, verificando se eles induzem resposta alérgica/inflamatória semelhante à asma. Para tal, foi analisado o lavado broncoalveolar e realizada a análise histopatológica do pulmão, além do esfregaço sanguíneo.

Material e métodos

As amostras de NFC, obtidas por hidrólise ácida empregando-se solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 60% (v/v), foram produzidas e caracterizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA) na sede da Embrapa Instrumentação Agropecuária em São Carlos (SP).

Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o registro 063/2010.

Os camundongos (fêmeas - BALB/c) com idade aproximada de 5 semanas, foram divididos em 6 grupos experimentais, cada um com 10 animais: controle negativo absoluto (não-tratado), controle negativo relativo (tratado apenas com o veículo das nanopartículas), controle positivo (induzido à asma com ovoalbumina) e 3 grupos testes expostos a nanofibras de celulose (nas concentrações de 1, 2 e 4g/kg de peso do animal).

O grupo controle positivo teve a asma alérgica experimental induzida pela sensibilização intraperitoneal com 10µg de ovoalbumina (OVA) (Grade V, Sigma-Aldrich Corp, EUA) adsorvida em 100mg de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich Corp, EUA) em volume total de 160µL por animal nos dias 0 e 14 do protocolo, seguido pelo desafio com ovoalbumina nos dias 21, 22, 23, 24 e 25 do protocolo, onde os animais eram submetidos à nebulização com OVA 1% por 20 minutos/dia, mimetizando a via natural de exposição aos alérgenos ambientais. Os grupos testes foram primeiramente sensibilizados com solução de NFC em tampão PBS, por meio de nebulização durante 1 hora. Quinze dias após esse procedimento, eles foram desafiados com a mesma solução, sob as mesmas condições, através de nebulizações (nebulizador Ultra-Sônico Pulmosonic Star, Soniclear, Brasil) de 1 hora de duração por 5 dias consecutivos.

Após término do protocolo (24 horas após a última nebulização), os animais foram eutanaziados e coletadas as amostras biológicas para análise.

O lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado por meio da inserção de uma sonda (CPL Medical's, São Paulo, SP, Brasil) na traquéia exposta e lavagem dos pulmões com 1 mL de PBS e foi analisado em câmara de Neubauer para determinação do número total de células. As lâminas de esfregaços sanguíneos foram coradas com May-Grünwald-Giemsa e analisadas com o auxílio de microscópio ótico (Olympus Bx51).

Após a obtenção do LBA, a caixa torácica do animal foi recortada longitudinalmente e o tecido pulmonar lavado, através de uma perfusão com 10 mL de PBS gelado. Os lobos pulmonares foram fixados em formaldeído tamponado a 10% por 24 horas, submetidos ao processamento histológico de rotina e corados pela hematoxilina-eosina (HE). As amostras foram analisadas em toda a sua extensão quanto ao grau de inflamação pulmonar, presença de hiperplasia de células calciformes, fibrose e hipertrofia/hiperplasia do músculo liso das vias aéreas, em microscópio óptico. Após observação, foram selecionados para captura fotográfica digital, 5 campos de cada lobo pulmonar para análise do infiltrado inflamatório. Para a análise estatística, foram utilizadas as médias aritméticas simples destes 5 campos pulmonares por lâmina.

Na análise histopatológica, as áreas peribronquiolares e perivascularares foram avaliadas de acordo com o grau de infiltrado celular inflamatório, tendo sido atribuído escores de 0 a 5 para cada campo [14], sendo 0 para ausência de processo inflamatório e 5 para infiltrado inflamatório intenso.

Os dados foram analisados estatisticamente empregando o programa GraphPad Prism 5 usando o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, seguido pelo teste t não pareado para os dados paramétricos e Mann-Whitney para os dados não paramétricos. O nível de significância aceito foi de $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Os grupos controle negativo absoluto e relativo, bem como os 3 grupos teste expostos às NFC apresentaram média 0 (zero), segundo o grau de inflamação. Já o grupo controle positivo (APE), que teve a asma induzida com OVA, apresentou 4 como escore médio nos campos avaliados. Não foram encontradas nas fotomicrografias do tecido epitelial de revestimento bronquiolar e no epitélio alveolar alterações celulares metaplásicas. A produção de muco foi observada somente no grupo controle positivo, no qual foi induzida a asma.

Nos esfregaços sanguíneos não foram observadas alterações hematológicas nas séries branca e vermelha.

O número total de células do LBA (Fig. 1) não foi afetado pela exposição às NFC, permanecendo próximo aos valores observados nos grupos controle.

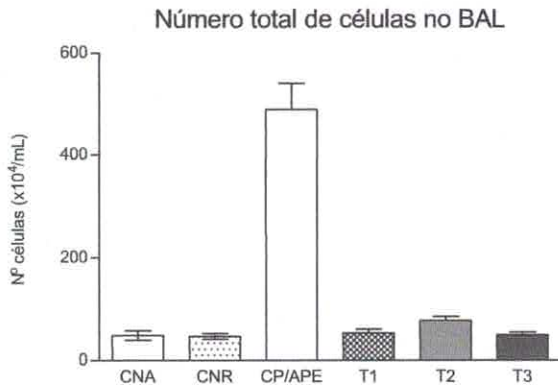


Fig. 1: Contagem total das células no lavado broncoalveolar. CNA – Controle Negativo Absoluto, CNR – Controle Negativo Relativo, CP/APE – Controle Positivo/Asma Pulmonar Experimental, T1, T2 e T3 – Grupos Teste expostos a nanofibras de celulose nas concentrações de 1, 2 e 4g/kg de peso do animal. Barras representam a Média \pm DP. *P < 0,05 vs Grupo Controle Negativo Absoluto.

Conclusões

Os resultados encontrados, embora preliminares, apontam para a ausência de toxicidade respiratória das NFC nestas condições experimentais. Novos estudos deverão ser conduzidos para ratificar este achado.

Agradecimentos

À CAPES Rede Nanobiotec-Brasil (Edital CAPES 04/CII-2008), CNPQ, FINEP, EMBRAPA, Rede AgroNano e ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA).

Referências

1. S.M.A. Azizi; F. Alloin; A. Dufresne. *Biomacromolecules*. 2005, 6, 612.
2. I. Siró; D. Plackett. *Cellulose*. 2010, 17, 459.
3. L. Goetz; A.P. Mathew; K. Oksman; A.J. Ragauskas. *Tappi. J.* 2011, 10, 29.

4. S. Moreira; N.B. Silva; J. Almeida-Lima; H.A. Rocha; S.R. Medeiros; C.Jr. Alves; F.M. Gama. BC nanofibras: *Toxicol. Letters*. 2009, 189, 235.
5. R. Zuluaga; J.L. Putaux; J. Cruz; J. Vélez; I. Mondragon; P. Gañán. *Carbohydr. Polym.* 2009, 6, 51.
6. E.M. Teixeira; A.C. Corrêa; A. Manzoli, F.L. Leite; C.R. Oliveira; L.H.C. Mattoso. *Cellulose*. 2010, 17, 595.
7. A. Dufresne. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2006, 2, 322.
8. R.J. Moon; A. Martini; J. Nairn; J. Simonsen; J. Youngblood. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 3941.
9. T. Nishino; I. Matsuda; K. Hirao. *Macromolecules*. 2004, 37, 7683.
10. W.J. Orts; J. Shey; S.H. Imam; G.M. Glenn; M.E. Guttman; J.F. Revol. *J. Polym. Environ.* 2005, 13, 301.
11. K. Yoon; B.S. Hsiao; B. Chu. Functional nanofibers for environmental applications. *J. Mater Chem.* 2008, 18, 5326.
12. J.K. Jackson; K. Letchford; B.Z. Wasserman; L. Ye; W.Y. Hamad; H.M. Burt. *Int. J. Nanomedicine*. 2011, 6, 321.
13. J.C.O. Villanova; E. Ayres; S.M. Carvalho; P.S. Patrício; F.V. Pereira; R.L. Oréfice. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2011, 42, 406.
14. M. LEE; S. KIM; O.K. KWON; S.R. OH; H.K. LEE; K. AHN. *Int Immunopharmacol.* 2009, 9, 418.