



## TOXICIDADE DE NANOFIBRAS DE CELULOSE EM CULTURA DE FIBROBLASTOS BOVINOS

Michele Munk Pereira<sup>1</sup>; Humberto de Mello Brandão<sup>2\*</sup>; Nádia Rezende Barbosa Raposo<sup>1</sup>; Carolina Capobianco Romano Quintão<sup>2</sup>; Eliangela de Moraes Teixeira<sup>3</sup>; Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>2</sup>; Luiz Henrique Capparelli Mattoso<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil

<sup>2</sup> Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

<sup>3</sup> Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, Brasil

\*e-mail de contato; humberto@cnpqgl.embrapa.br

Projeto Componente: PC6 Plano de Ação: PA3

### Resumo

As nanofibras de celulose (NFC) possuem características mecânicas excepcionais e são provenientes de fontes renováveis, o que as torna muito atrativa para aplicações na construção de matrizes poliméricas, bioengenharia e em sistemas de liberação controlada de fármacos. Entretanto, antes da sua aplicação, são necessários estudos toxicológicos que garantam a segurança do seu uso. O objetivo deste estudo foi determinar a dose capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população em teste (DL<sub>50</sub>) de NFC em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*. Nas condições testadas, as NFC não apresentaram toxicidade até a concentração de 1,50µg/mL. A DL<sub>50</sub> foi de 5000µg/mL.

Palavras-chave: nanotecnologia, nanofibras de celulose, citotoxicidade.

### Publicações relacionadas

PEREIRA, M. M.; BRANDÃO, H.M.; BARBOSA, N. R.; QUINTÃO, C.C.R.; TEIXEIRA, E.M.; DA SILVA, S.R.; MOREIRA, A.P.; CAMARGO, L.S.A.; MATTOSO, L.H.C. Cell viability in bovine dermal fibroblast cells exposed by nanocellulose fibers. In: 7º Seminário Internacional de Nanotecnologia, Sociedade e Meio Ambiente. Anais... Rio de Janeiro: 2010, Seminário Internacional de Nanotecnologia.

### Introdução

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que tem o potencial de melhorar a vida humana por aprimorar produtos existentes e por gerar novos produtos, utilizando dispositivos que possuem pelo menos uma de suas dimensões menores que 100 nm [1]. Dentre os nanomateriais existentes, destacam-se as nanofibras de celulose (NFC) também conhecidas com "whisker", as quais possuem características mecânicas excepcionais e são provenientes de fontes renováveis.

As NFC podem ser aplicadas na construção de matrizes poliméricas biodegradáveis, bioengenharia e em sistemas de liberação controlada de fármacos [2].

Entretanto, antes da sua ampla aplicação, são necessários estudos toxicológicos, considerando a toxicidade associada à morfologia de fibra observadas em outros nanomateriais [3].

O objetivo deste estudo foi determinar a DL<sub>50</sub> de NFC em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*.

## Materiais e métodos

As amostras de NFC, obtidas por hidrólise ácida empregando-se solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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).

Fibroblastos bovinos adultos foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Após atingir a confluência de 60%, as células foram expostas as NFC (diâmetro: 6-18 nm; comprimento: 85-225 µm) por 24h em diferentes concentrações: 0 (controle); 0,02; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 100; 200; 400; 800; 1000; 2000; 3000 e 5000µg/mL. Posteriormente, as células foram coradas com iodeto de propídio (50 µg/mL) e avaliadas por citometria de fluxo, empregando o equipamento FACScalibur (Becton Dickinson, São Jose, CA) equipado com um laser de 585±42nm. Foram realizadas três repetições em triplicata. A análise foi realizada após contagem de 10.000 eventos por replicata e os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software WinMDI versão 2.9.

A análise estatística foi realizada por ANOVA e as medias comparadas pelo teste de *Student Newman Keus*.

## Resultados e discussão

NFC são nanomaterias que apresentam grandes resistência, área de superfície, flexibilidade e são leves. Porém, relatos científicos que avaliam a toxicidade de NFC são numericamente escassos. Suwantong, Ruktanonchai e Supaphol [4], observaram que não houve toxicidade de fibroblastos expostos à fibras de acetato de celulose (301-545 nm). Clift e colaboradores [5] demonstraram baixa citotoxicidade de NFC em células pulmonares humanas. Todavia, um único ensaio isolado é insuficiente para assegurar a inocuidade de uma nova substância.

No presente estudo, as NFC também não alteraram (P>0,05) a viabilidade de fibroblastos bovinos nas concentrações de 0,02 (92,37 ± 1,31); 0,2 (94,00 ± 1,29); 0,5 (92,33 ± 1,35); 1,0 (92,25 ± 1,37) e 1,5 µg/mL (89,93 ± 1,17) quando comparado ao grupo controle (94,27 ± 1,52) (Figs. 1 e 2).

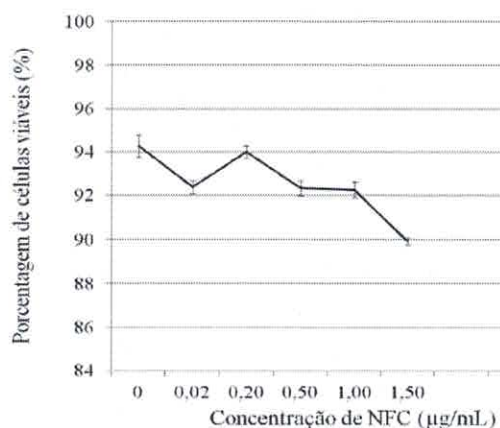


Fig. 1. Médias das porcentagens de células viáveis após exposição às concentrações de 0 (controle); 0,02; 0,20; 0,50; 1,00 e 1,50µg/mL de NFC por 24h.

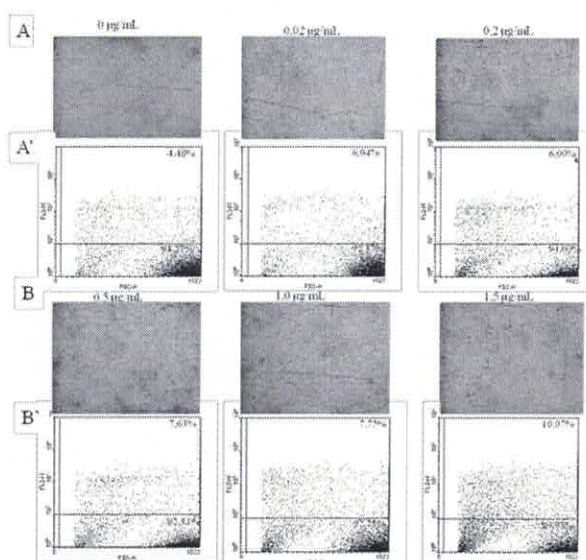


Fig. 2. (A, B) Fibroblastos bovinos derivados de animais adultos após exposição às concentrações de 0,00 (controle); 0,02; 0,2; 0,5; 1,0 e 1,5 µg/mL de NFC por 24h. (A', B') Gráficos citométricos da viabilidade celular. Tamanho (FSC) *versus* fluorescência com marcação do iodeto de propídio (FL2).

Adicionalmente, a fim de determinar a DL<sub>50</sub> para NFC foram testadas maiores concentrações que alteraram a viabilidade celular (P<0,001) nas concentrações de 100 (90,78% ± 3,20), 200 (86,41% ± 5,37), 400 (86,32% ± 1,31), 800 (76,79% ± 2,74), 1000 (71,94% ± 2,76), 2000 (67,99% ± 4,63), 3000 µg/mL (55,97% ± 2,37), comparado com o grupo controle (95,75% ± 0,96) sendo que a DL<sub>50</sub> foi estimada na concentração de 5000 µg/mL (36,51% ± 2,58 - Figs. 3 e 4).

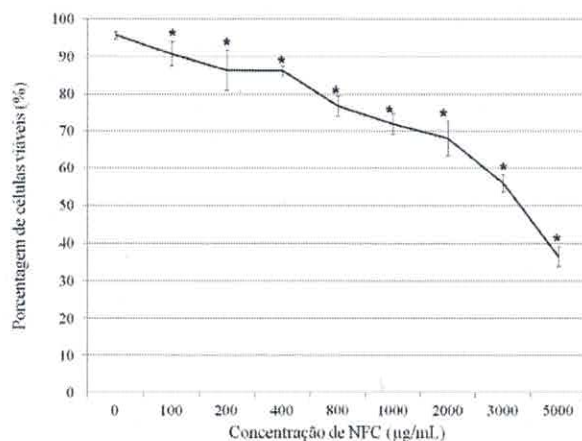


Fig. 3. Médias das porcentagens de células viáveis após exposição às concentrações de 0 (controle); 100; 200; 400; 800; 1000; 2000; 3000 e 5000µg/mL de NFC por 24h.

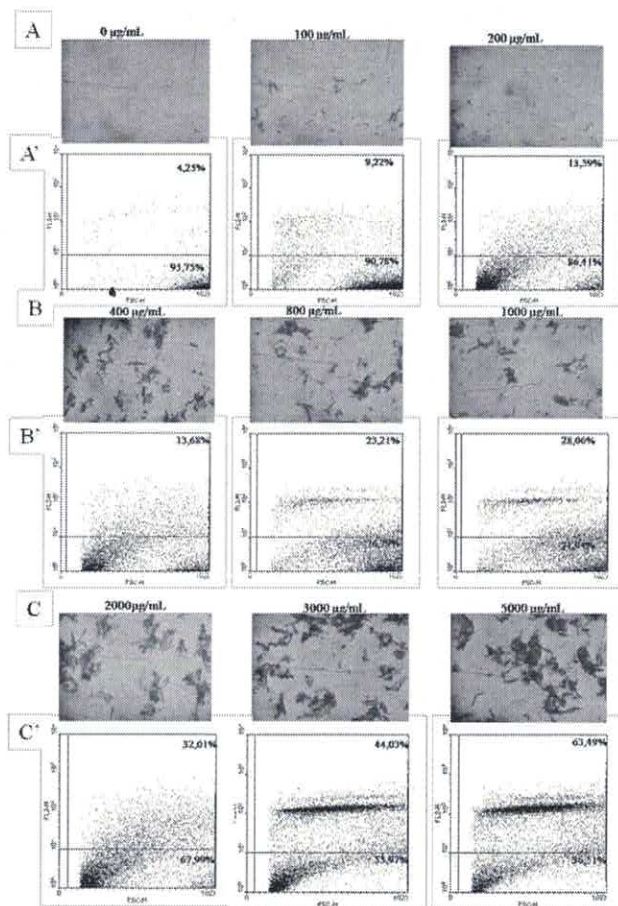


Fig. 4. (A, B e C) Fibroblastos bovinos derivados de animais adultos após exposição às concentrações de 0,00; 100; 200; 400; 800; 1000; 2000; 3000 e 5000 µg/mL de NFC por 24h. (A', B', C'). Gráficos citométricos da viabilidade celular. Tamanho (FSC) *versus* fluorescência com marcação do iodeto de propídio (FL2).

## Conclusões

Nas condições testadas, as NFC não apresentaram toxicidade até a concentração de 1,50µg/mL. A DL<sub>50</sub> estimada foi de 5000µg/mL.

## 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. K. Donaldson; R. Aitken; L. Tran; V. Stone; R. Duffin; G. Forrest; A. Alexander. *Toxicol. Sci.* 2006, 92, 5.
2. 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.
3. N. Doshi; S. Mitragotri. *J. R. Soc. Interface.* 2010, 7, 403.
4. O. Suwantong; U. Ruktanonchai; P. Supaphol. *Polymer.* 2008, 49, 4239.
5. M.J.D. Clift; E.J. Foster; D. Vanhecke; D. Studer; P. Wick; P. Gehr; B. Rothen-Rutishauser, Christoph Weder. *Biomacromolecules.* 2011, 12, 3666.