



ESTUDO DA INTERAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO COM EMBRIÕES DE MAMÍFEROS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN

Michele Munk Pereira¹; Humberto de Mello Brandão^{2*}; Nádia Rezende Barbosa Raposo¹; Bruno Campos de Carvalho²; Ado Jório de Vasconcelos³; Jaqueline dos Santos Soares³; Luiz Sérgio de Almeida Camargo²; Luiz Orlando Ladeira³

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil

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

³ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

*e-mail de contato; humberto@cnp.gl.embrapa.br

Projeto Componente: PC6 Plano de Ação: PA4

Resumo

Os nanotubos de carbono (NTC) podem ser utilizados como vetores de fármacos e DNA para a terapia gênica, bem como na produção de animais domésticos transgênicos de interesse econômico. Porém, pouco se sabe sobre a interação desse nanomaterial com embriões de mamíferos. O objetivo do trabalho foi utilizar a espectroscopia Raman para determinar se nanotubos multicamadas (MWNTs) conseguem permear embriões bovinos produzidos *in vitro*. Os resultados revelaram a presença da banda G no interior dos embriões, indicando que os MWNTs atingiram as células embrionárias. Em conclusão, a técnica de espectroscopia Raman é um eficiente método para compreender a interação entre MWNT e embriões de mamíferos.

Palavras-chave: nanotecnologia, embriões, transgênicos, toxicidade.

Publicações relacionadas

PEREIRA, M.M.; BRANDÃO, H.M.; CARVALHO, B.C.; SERAPIÃO, R.V.; SOARES, J.S.; VASCONCELOS, A.J.; LADEIRA, L.O. Identification of the presence of carbon nanotubes in bovine embryo by Raman spectroscopy. In: NANOAGRI, 2010, São Pedro. International Conference on Food and Agriculture Applications of Nanotechnologies, 2010. v. 1. p. 248-248.

Introdução

Nas últimas duas décadas, a nanotecnologia tornou-se um campo amplo de pesquisas em todo o mundo, sobretudo os nanomateriais como os nanotubos de carbono (NTC). Tais nanomateriais têm potencial emprego em eletrônicos, agropecuária, medicina e indústria farmacêutica [1]. Várias pesquisas têm sido realizadas utilizando NTC como vetores de fármacos e de DNA visando aplicação na terapia gênica, bem como a produção

de animais domésticos transgênicos de interesse econômico. Porém, pouco se sabe sobre sua capacidade de interação com membranas biológicas e, especialmente, a zona pelúcida (ZP) de embriões de mamíferos que é constituída por glicoproteínas que formam poros nanométricos e funcionam como barreira protetora contra os menores vírus existentes na natureza.

O objetivo do trabalho foi utilizar a espectroscopia Raman para determinar se MWNTs

conseguem transpor a ZP intacta de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Material e métodos

A espectroscopia Raman foi realizada no Departamento de Física da UFMG para avaliação da capacidade de passagem dos NTC pela zona pelúcida de embriões.

Oócitos imaturos foram obtidos de ovários coletados de animais abatidos e maturados *in vitro* em meio de cultivo de células (TCM199), adicionado de hormônio folículo estimulante (FSH) e soro de vaca em cio dentro de incubadora com 5% de CO₂, ar atmosférico e 39 °C, por 24 h. Ao término da maturação, os oócitos foram fecundados *in vitro* com doses de sêmen congelado de touros na concentração de 2×10^6 /mL. Após a fecundação, os possíveis zigotos foram transferidos para meio de cultivo embrionário CR2aa suplementado com 10% de soro fetal bovino, em incubadora com 5% CO₂, ar atmosférico e umidade saturada, por sete dias.

Posteriormente, os embriões foram divididos em grupo controle e expostos a 0,2 µg/mL MWNT por 24 h. Antes da espectroscopia Raman, 3 embriões do grupo controle e 3 do cultivado com MWNT foram lavados em solução salina fosfatada para remover MWNTs adsorvidos à superfície da ZP e, mantidos em lâmina em temperatura ambiente.

Os espectros Raman foram coletados em vários pontos das amostras após incidência de um laser de He-Ne (632,8 nm), utilizando-se um espectrômetro (Andor™ Technology – shamrock sr-303i) acoplado a um microscópio óptico confocal invertido (Eclipse TE2000-U, Nikon).

Resultados e discussão

Para estudar a capacidade dos MWNTs permearem para o interior embriões de mamíferos, embriões bovinos produzidos *in vitro* foram expostos a 0,2 µg/mL de MWNTs por 24 h e avaliados por espectroscopia Raman.

Na fig. 1A estão demonstrados os MWNTs por microscopia eletrônica de transmissão. Na fig. 1B observam-se a imagem espectroscópica Raman do embrião gerada com auxílio de um filtro espectral para banda G do MWNT e na fig. 1C os espectros Raman.

Quando se avaliou o espectro Raman (com ajuste da linha de base) desses pontos no embrião exposto ao NTC (Figura 1B), observou-se no ponto 1 a inexistência da banda G ($1565\text{--}1595\text{ cm}^{-1}$),

associada a modos de vibração tangencial no plano da grafite. Contudo, mesmo após a lavagem do embrião, na interface ar/zona pelúcida (ponto 2) pode-se detectar um discreto estiramento da banda G indicando a presença de NTC. À medida que se deslocam os eixos X e Y para o interior do embrião, passando pela zona pelúcida (ponto 3), ocorre um aumento da intensidade de ambas as bandas, que atingem a intensidade máxima no interior do embrião (ponto 4).

Esses dados indicaram que os MWNTs conseguiram transpor a ZP e entrar em contato com os blastômeros.

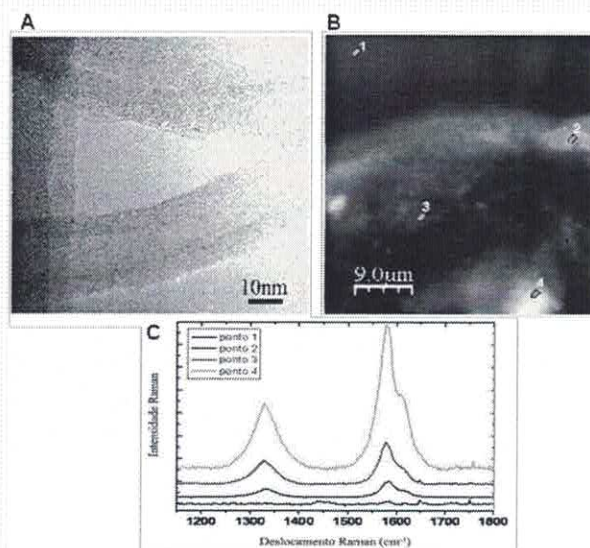


Fig 1. Morfologia (TEM) do MWNT utilizado (1A). Imagem confocal (filtro para banda G) de embriões bovinos cultivados com MWNT (0,2 µg/ml) (1B), evidenciando a faixa espectral da banda G (1C).

A crescente utilização de nanomateriais, principalmente nas áreas biomédicas e no agronegócio, gera a necessidade de melhor entendimento dos mecanismos de interação dessas nanoestruturas, em especial de NTC com os sistemas biológicos. Para a identificação de NTC nas amostras, geralmente é utilizada a espectroscopia Raman [2, 3]. Essa técnica permite a verificação da presença da banda G (grafite), que aparece por volta de 1320 cm^{-1} e está relacionada ao modo de vibração tangencial do grafite [2].

Neste contexto, técnicas que auxiliem no estudo da interação de nanomateriais com embriões de mamíferos podem auxiliar outros estudos que avaliem o potencial embriotóxico de sistemas nanoestruturados.

Conclusões

Em conclusão, observou-se que a técnica de espectroscopia Raman é um eficiente método para compreender a interação entre MWNT e embriões de mamíferos.

Agradecimentos

À CAPES Rede Nanobiotec-Brasil (Edital CAPES 04/CII-2008), CNPQ, FINEP, EMBRAPA, Rede AgroNano, FAPEMIG (edital 17/2010 Pronex CBB-APQ-04334-10) e ao departamento de Física da UFMG.

Referências

1. G. Fang; G. Min; J. He; C. Zhang; K. Qian; S. Wang. *J. Agric. Food Chem.* 2009, *57*, 3040.
 2. S. Arepalli; P. Nikolaev; O. Gorelik; V.G. Hadjiev; W. Holmes; B. Files; L. Yowell. *Carbon.* 2004, *42*, 1783.
 3. A.L. Elias; P. Ayala; A. Zamudio; M. Grobosch; E. Cruz-Silva; J.M. Romo-Herrera; J. Campos-Delgado; H. Terrones; T. Pichler; M. Terrones. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2010, *10*, 3959.
-