

ISSN 2175-8395

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

**ANAIS DO VII WORKSHOP DA REDE DE
NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO**

Maria Alice Martins
Odílio Benedito Garrido de Assis
Caue Ribeiro
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Editores

Embrapa Instrumentação
São Carlos, SP
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
www.cnpdia.embrapa.br
E-mail: cnpdia.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: João de Mendonça Naime
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Sandra Protter Gouvea
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dra. Lucimara Aparecida Forato

Revisor editorial: Valéria de Fátima Cardoso
Capa - Desenvolvimento: NCO; criação: Ângela Beatriz De Grandi
Imagem da capa: Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus
Loures Mourão, Viviane Soares

1ª edição

1ª impressão (2013): tiragem 50

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 VII Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio –
2012 - São Carlos: Embrapa, 2012.

Irregular
ISSN 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
III. Ribeiro, Caue. IV. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. V. Embrapa Instrumentação.

© Embrapa 2013

IMPACTO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE NA VIABILIDADE CELULAR E NA CAPACIDADE FOTOSSINTÉTICA DA MICROALGA *Chlorella vulgaris*

Michele Munk Pereira*, Alice da Rocha, Claude Yéprémian, Alain Couté, Ludovic Mouton, Nádia Rezende Barbosa Raposo, Luiz Henrique Capparelli Mattoso, Humberto de Mello Brandão*, Roberta Brayner*

Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil. Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, Université de Paris Diderot, Paris, France. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, Brasil. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

mimunkbio@gmail.com*; roberta.brayner@univ-paris-diderot.fr*, humberto.brandao@embrapa.br*

Projeto Componente: PC6 Plano de Ação: PA6

Resumo

O potencial ecotóxico de NFC (nanofibras de celulose) foi avaliado utilizando *Chlorella vulgaris*, nas concentrações de 1; 50 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ por 24, 48, 72 e 96h. Foram avaliadas as taxa de crescimento, viabilidade celular e fotossíntese. Houve alteração do número celular em todas as concentrações, porém, a viabilidade das células não foi alterada quando as mesmas foram expostas às NFC (1 e 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) por 48h. Contudo, após 72h houve um declínio da viabilidade. Exposição às NFC (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) exibiu toxicidade a partir de 48h. A atividade fotossintética permaneceu estável até 72h, mas foi alterada com 96h. Nas condições estudadas as NFC podem interferir no crescimento, viabilidade celular e atividade fotossintética.

Palavras-chave: nanomateriais, ecotoxicidade, biondicadores de qualidade ambiental.

Introdução

A nanotecnologia é uma das áreas do conhecimento humano que mais se desenvolve, beneficiando a indústria de eletrônicos, cosméticos, agropecuária, farmacêutica, medicina e despoluição ambiental. Neste contexto, as nanofibras de celulose (NFC) despertam grande interesse por possuírem características químicas e físicas peculiares, caráter biodegradável como em Kolakovic et al (2011), baixo custo e o fato de serem obtidas de fontes renováveis (TEIXEIRA et al., 2010).

Contudo, o acelerado desenvolvimento e disseminação dos nanomateriais podem colocá-los em contato com organismos vivos em situações ainda não compreendidas plenamente. O uso de espécies aquáticas biondicadoras de qualidade ambiental é interessante, uma vez que os nanomateriais tendem a serem lançados nos

cursos d'água, devido aos resíduos industriais e domésticos.

Pelo nosso conhecimento, até o momento ainda não são conhecidos os efeitos de NFC no meio ambiente. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de NFC sobre microalga de água doce *Chlorella vulgaris*, fornecendo assim novos dados para avaliar os riscos da liberação ambiental desses nanomateriais estratégicos.

Materiais e métodos

As amostras de NFC de algodão (diâmetro: 6-18 nm, comprimento: 85-225 μm ; Fig 1A) foram obtidas por hidrólise ácida empregando-se solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4 60% (v/v)). A microalga *Chlorella vulgaris* foi cedida pelo Museu Nacional de Historia Natural da França (Fig. 1B) e expostas às NFC *in vitro* no laboratório Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, Université de Paris

Diderot 7 (Paris, França). A densidade inicial da cultura foi de $5 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$ em meio Bold's Basal (BBM). As microalgas foram crescidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, temperatura controlada ($20 \pm 0,5^\circ\text{C}$), iluminação de densidade de fluxo de fótons $50\text{-}80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (14h luz e 10h escuro), aeração constante e contato com as NFC nas concentrações de 0 (controle); 1; 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 24, 48, 72 e 96h.

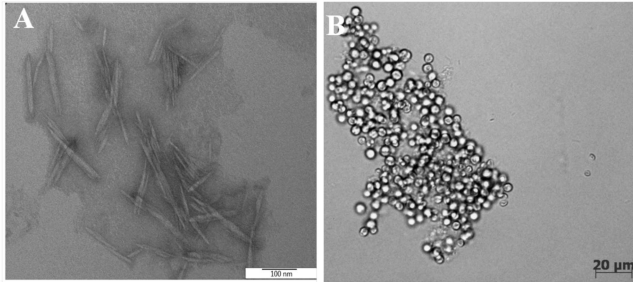


Fig.1 A. Micrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão de NFC de algodão. B. *Chlorella vulgaris* observada ao microscópio óptico (aumento de 400x).

A densidade (número de células mL^{-1}) e a viabilidade celular das microalgas foram avaliadas, com auxílio do contador celular CelloMetter Auto T4 (Nexcelom Bioscience). Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram coradas com Azul de Trypan (0,01%) que avalia a integridade da membrana celular. A eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) foi avaliada utilizando o fluorômetro de amplitude de pulso modulado (PAM, Handy PEA, Hansatech Instruments). Essa técnica permite avaliar a eficiência fotossintética da célula vegetal em estudo. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância e teste Tukey em nível de 5% de significância.

Resultados e discussão

Como demonstrado na Fig. 2, houve alteração no número total de células em todas as concentrações e tempos testados, quando comparado ao controle ($P < 0,05$).

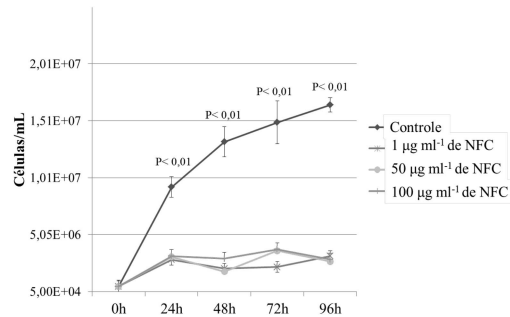


Fig. 2 Avaliação do número de células relacionando diferentes concentrações de NFC e tempos de exposição.

Nanomateriais podem alterar a proliferação celular, uma vez que sua presença no meio de cultura pode levar a efeitos diretos e indiretos neste ambiente. Os efeitos diretos são aqueles causados pela interação física ou química dos nanomateriais e as células. Os efeitos indiretos são aqueles que alteram o pH, a disponibilidade de luz ou nutrientes. (ROGERS et al., 2010). Possivelmente, esses fatores podem ter contribuído para a diminuição da taxa de crescimento celular no ambiente de cultura exposto às NFC.

Os resultados do teste de viabilidade celular estão apresentados na Fig. 3. Após 24 ou 48h, a viabilidade celular não foi alterada nas concentrações de 1 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($P > 0,05$). Porém, após 72 e 96h a viabilidade celular das microalgas foi alterada em todas as concentrações (Fig. 3; $P < 0,05$). Na concentração mais elevada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) a viabilidade celular foi diminuída após 24h (Fig. 3; $P < 0,05$).

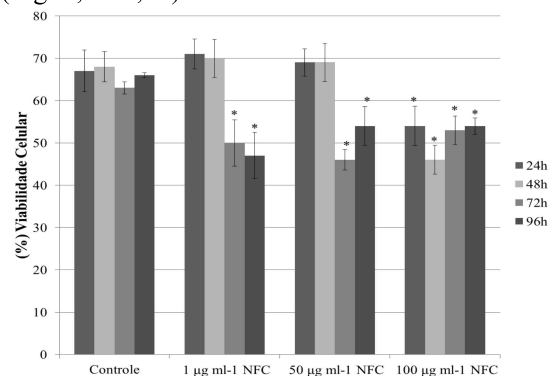


Fig. 3 Viabilidade celular de microalgas expostas a diferentes concentrações de NFC em função do tempo e avaliadas pelo método de exclusão com o Azul de Tripan. * $P < 0,05$

Segundo o teste de Azul de Tripan, as células coradas de azul, indicam morte celular, visto que a parede celular não se manteve impermeável ao corante. A interação entre nanopartículas e algas ocorre após contato e acúmulo na superfície celular segundo Aruoja et al (2009) ou pela

internalização nas células, após dano à parede celular (BRAYNER et al., 2009). Assim, dados do presente estudo sugerem maior citotoxicidade em concentrações altas ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), e em baixas concentrações (1 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$), o fator tempo (72h) está relacionado ao potencial citotóxico das NFC.

A atividade fotossintética não foi alterada ($P > 0,05$) até 72h de exposição celular às NFC (Fig. 4). Similarmente, outro estudo constatou que não houve modificação da fotossíntese em algas expostas a nanopartículas de ouro por 48h (PERREAULT et al., 2012). Contudo, no presente estudo, após 96h houve um declínio na eficiência quântica máxima do fotossistema II. Outro trabalho recente mostrou que no mesmo período de exposição (96h), nanotubos de carbono não influenciaram na atividade fotossintética de microalgas (SCHWAB et al., 2011). Já está bem estabelecido que a exposição celular a nanomateriais leva à formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS), os quais causam vários danos celulares como descrito em PUJALTE et al. (2011) e também estão relacionadas, em células vegetais, com a inibição da fotossíntese (ASADA, 1999). Portanto, possivelmente a exposição das microalgas às NFC por longos períodos (96h) podem ter favorecido à produção e acúmulo de ROS que alteram a fotossíntese nessas células.

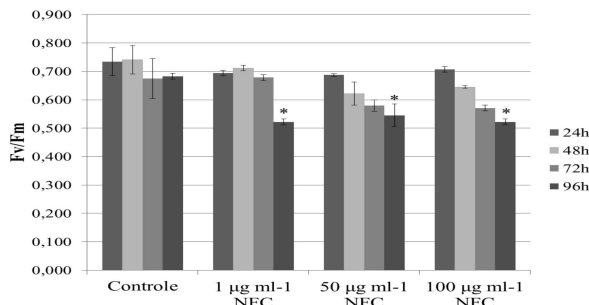


Fig. 4 Eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) da microalga *Chlorella vulgaris* submetida a diferentes concentrações de NFC e tempos de exposição. * $P < 0,05$

Conclusões

O impacto de NFC em microalgas pode estar relacionado à concentração e tempo de exposição que podem interferir na proliferação, viabilidade celular e atividade fotossintética.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa. A CAPES Rede Nanobiotec-Brasil (Edital CAPES 04/CII-2008), Programa Ciências Sem Fronteiras, CNPQ, FINEP, EMBRAPA, ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA), ao Laboratório ITODYS e a Universidade de Paris Diderot 7.

Referências

- ARUOJA, V.; DUBOURGUIER, H.; KASEMETS, K.; KAHRU, A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of The Total Environment*, v. 407, n. 4, p.1461-1468, 2009
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*. v.50, p. 601-639, 1999.
- BRAYNER, R.; DAHOUMANE, S.A.; YEPREMIAN, C.; DJEDIAT, C.; MEYER, M.; COUTE, A.; FIEVET, F. ZnO nanoparticles: synthesis, characterization, and ecotoxicological studies. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, v. 26, n. 9, p. 6522-6528, 2010.
- KOLAKOVIC, R.; PELTONEN, L.; LAAKSONEN, T.; PUTKISTO, K.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J. Spray-Dried Cellulose nanofibers as novel tablet excipient. *AAPS PharmSciTech*, v.12, p. 1366-1373, 2011.
- PERREAULT, F.; BOGDAN, N.; MORIN, M.; CLAVERIE, J.; POPOVIC, R. Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on physiological processes. *Nanotoxicology*, v. 6, n. 2, p. 109-120, 2012.
- PUJALTE, I.; PASSAGNE, I.; BROUILLAUD, B.; TREGUER, M.; DURAND, E.; COURTES, C. O.; LAZOU, B. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Particle Fibre Toxicology*, v.8, n. 10, 2011.
- ROGERS, N.J.; FRANKLIN, N.M.; APTE, S.C.; BATLEY, G.E.; ANGEL, B.M.; LEAD, J.R.; BAALOUSHA, M. Physico-chemical behaviour and algal toxicity of nanoparticulate CeO₂ in freshwater. *Environmental Chemistry*, v.7, n. 1, p. 50-60, 2010.
- SCHWAB, F.; BUCHELI, T.D.; LUKHELE, L.P.; MAGREZ, A.; NOWACK, B.; SIGG, L.; KNAUER, K. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? *Environmental Science Technology*, v.45, n. 14, p. 6136-6144, 2011.
- TEIXEIRA, E.M.; CORRÊA, A.C.; MANZOLI, A.; LEITE, F.L.; OLIVEIRA, C.R.; MATTOSO, L.H.C. Cellulose nanofibers from white and naturally colored cotton fibers. *Cellulose*, v. 17, p. 595-606, 2010.