CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE

Ana Beatriz Klosowski (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Patrícia Mathias Doll Boscardin (Orientador), e-mail: pattydoll@globo.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Farmacêuticas

Área e Subárea do CNPq: Farmácia (4.03.00.00-5) Farmacotécnica (4.03.01.00-1)

Palavras-chave: Viabilidade celular, Avaliação Citotóxica, Nanotecnologia

Resumo

As nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam diversas propriedades terapêuticas, como atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral. Apesar de apresentar muitos benefícios, há estudos que comprovam a toxicidade da prata em diferentes linhagens celulares. O objetivo do trabalho foi avaliar a citotoxicidade em fibroblastos 3T3 e a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata, obtidas por síntese verde. Foi feita a caracterização das AgNPs por meio do diâmetro médio, potencial zeta, índice de polidispersão, UV-Vis e FEG, e posteriormente, a amostra foi testada em fibroblastos 3T3 pelo método MTT para avaliação da citotoxicidade. Além disso, a atividade antibacteriana foi analisada por meio do método de microdiluição em caldo. As nanopartículas obtidas apresentaram diâmetro médio de 23,56 nm, potencial zeta de -18 mV, com valor de índice de polidispersão de 0,153. No ensaio de viabilidade celular, na concentração de 0,25 µg/mL, não houve morte celular significativa, além de apresentar atividade antimicrobiana. Por meio dos resultados obtidos, é possível concluir que as AgNPs podem ter utilidade terapêutica, em baixas concentrações.

Introdução

Nanopartículas são partículas que devem apresentar tamanho entre 1 a 100 nm e são utilizadas como agentes de administração de fármacos, possuindo vantagens quando comparadas às formas farmacêuticas convencionais, como maior controle na liberação do princípio ativo, redução de doses tóxicas e subterapêuticas, possibilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas, diminuição da instabilidade e degradação de fármacos sensíveis às variações ambientais, monitoramento dos níveis de fármaco no sítio de aplicação, direcionamento e concentração do fármaco no local a ser tratado. Além disso, permite a redução tanto do intervalo da dosagem, quanto da ocorrência de efeitos colaterais, uma vez que necessita de menor quantidade do princípio ativo devido ao maior tempo de ação no organismo (BIZERRA; SILVA, 2016).

As nanopartículas de prata (AgNPs) são amplamente utilizadas em formulações devido as suas diversas propriedades terapêuticas, como antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral, além de auxiliar na regeneração da pele. As AgNPs possuem propriedades físico-químicas muito características, incluindo a sua flexibilidade, maleabilidade e condutividade térmica e elétrica elevada em relação a

qualquer outro metal, além de apresentarem estabilidade química e atividade catalítica (SOARES, 2014).
Devido à crescente utilização de sistemas de liberação controlada de ativos, como as nanopartículas de prata, as quais possuem diversas propriedades terapêuticas de extrema importância, especialmente a atividade antimicrobiana, podendo dessa forma, serem incorporadas em produtos farmacêuticos e cosméticos, há necessidade da realização de estudos de citotoxicidade para avaliar a viabilidade celular e se é possível a utilização, com segurança, dessa nanotecnologia em produtos, sem ocasionar danos ao consumidor.

Materiais e Métodos

Obtenção do extrato aquoso do gel de Aloe vera
O extrato aquoso do gel de *Aloe vera* foi preparado a partir de folhas frescas coletadas do horto da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Síntese e caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs)
Para a síntese das AgNPs, foi preparada uma solução aquosa de nitrato de prata ($AgNO_3$) 1 mM. Em seguida, 1 mL de extrato de gel de *Aloe vera* foi adicionado a 9 mL de solução aquosa de $AgNO_3$ 1 mM e a mistura foi exposta à luz solar ao meio dia, horário de radiação solar de maior intensidade, durante 30 segundos, até a mudança de coloração de incolor para amarelo. A síntese das AgNPs foi confirmada pela análise de espectroscopia em UV-Vis em espectrofotômetro UV-VIS NIR VARIAN CARY 50 com comprimento de onda de 200 a 800 nm, e a avaliação da morfologia e superfície foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (SEM-FEG) em microscópio MYRA 3 LMH (Tescan). Além desses parâmetros, o diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta foram determinados pelo aparelho Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments), com diluição prévia (1:10) da amostra.

Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de prata a linhagem celular de fibroblastos de camundongos 3T3
Para avaliação da citotoxicidade, foi utilizada a linhagem celular de fibroblastos de camundongos 3T3, e cultivada com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 34 $mmol.L^{-1}$ de bicarbonato de sódio e antibiótico (penicilina 10000 UI e estreptomicina 10 $mg.mL^{-1}$). As células foram mantidas a 37° C em estufa umidificada com 5% de CO_2. A avaliação da toxicidade dos fibroblastos foi feita por meio do método MTT, sendo que este método determina a capacidade das células reduzirem o sal solúvel brometo 3-(4,5)dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico, formando cristais insolúveis de formação com coloração violeta.. A amostra foi adicionada em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25 µg/mL) nas placas contendo os fibroblastos (3T3), sendo o período de exposição avaliado de 24 horas. O sobrenadante foi descartado após incubação, adicionando posteriormente uma solução de MTT 0,5 $mg.mL^{-1}$. As culturas de células foram incubadas ao abrigo da luz a temperatura de 37 °C durante 30 minutos até a observação de cristais de formazan. Dimetilssulfóxido (DMSO) foi adicionado para solubilizar os cristais formados e em seguida foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 570 nm em leitor de placas (BIOTEK). A viabilidade celular foi determinada pela comparação dos valores de absorbância obtidos para células tratadas e não tratadas com as amostras (controle).

Avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata
A avaliação da atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de microdiluição em caldo em placa de 96 poços. Foram feitas diluições (0,5 mM; 0,25 mM; 0,125 mM; 0,062 mM) da solução de nanopartículas de prata, obtidas a partir de nitrato de prata 1 mM. A viabilidade dos micro-organismos foi confirmada por adição do corante 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio (TCC) e a concentração bactericida mínima foi obtida semeando o conteúdo dos poços que não coraram em ágar Mueller-Hilton.

Resultados e Discussão

Na análise de espectroscopia em UV-Vis, a amostra apresentou a banda de plasmon com comprimento de onda máximo de 440 nm, o que confirma a síntese de nanopartículas de prata, uma vez que a ressonância plasmônica de superfície para a prata ocorre em comprimento de onda entre 400 e 500 nm.
Na microscopia eletrônica de varredura (SEM-FEG), foram observadas nanopartículas amorfas, quase esféricas, de superfície lisa.
O potencial zeta representa a carga na superfície das nanopartículas e consequentemente está relacionado com repulsão eletrostática e estabilidade da solução. A estabilidade de partículas ocorre quando o valor de potencial zeta é menor ou igual a -30 mV ou maior ou igual a +30 mV. Já o índice de polidispersão (PDI) é a medida da amplitude da distribuição de tamanho, cujos valores devem estar no intervalo de 0 a 1. Um PDI igual a 1 indica grandes variações no tamanho da partícula, enquanto que um valor próximo de 0 indica uma população de partículas monodispersas (LACATUSU et al., 2012). O melhor resultado obtido para os três parâmetros avaliados foi o diâmetro médio de 23,56 nm, potencial zeta de -18 mV e índice de polidispersão de 0,153, o que indica homogeneidade na distribuição de tamanho das partículas.

No teste microbiológico, as nanopartículas de prata, na concentração de 0,5 mM de nitrato de prata, apresentaram inibição do crescimento de todos os micro-organismos testados, e para a bactéria *Enterococcus faecalis*, as diluições realizadas até a concentração de 0,062 mM de prata também apresentaram atividade inibitória para esta bactéria. Quando avaliada a atividade bactericida das nanopartículas de prata desenvolvidas, somente a bactéria *Salmonella enteritidis* não apresentou crescimento em ágar Mueller-Hinton.

Para a avaliação da citotoxicidade em linhagem celular 3T3, as nanopartículas de prata (AgNPs) foram testadas nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 5; 2,5; 1; 0,5 e 0,25 µg/mL, assim como o extrato aquoso de *Aloe vera* foi testado na concentração de 100 mg/mL. O período de exposição das células testadas em relação às amostras foi de 24 horas, e a viabilidade celular, em percentual, para as diferentes concentrações de AgNPs, bem como para o extrato, pode ser avaliada na Figura 1.

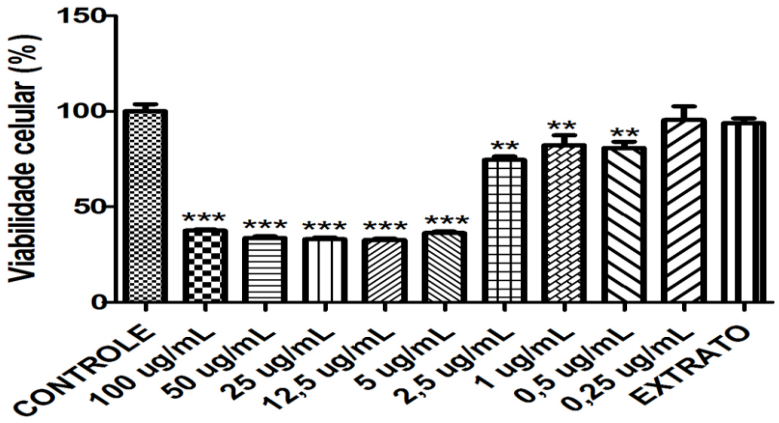


Figura 1 – Efeito das nanopartículas de prata e do extrato de *Aloe vera* sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, após 24 horas, pelo método de redução do MTT. Os resultados estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média) (n=8). Os testes estatísticos utilizados foram Anova, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ***P< 0,001 quando comparado com o grupo controle.

Com as informações extraídas da Figura 1, pode-se observar que as nanopartículas de prata podem ser utilizadas com segurança em baixas concentrações, igual ou abaixo de 0,25 µg/mL, em produtos farmacêuticos ou cosméticos, uma vez que não houve redução na viabilidade celular, quando comparado às concentrações maiores, em que a porcentagem de células viáveis foi menor ou próximo a 50%.

Conclusões

O método de síntese verde permitiu a obtenção de nanopartículas de prata com tamanho adequado e por meio do ensaio de citotoxicidade em 24 horas, pode-se concluir que as AgNPs sintetizadas não diminuíram a viabilidade de fibroblastos 3T3 em concentração igual a 0,25 µg/mL. Além de não ser tóxica em baixas concentrações, as AgNPs desenvolvidas apresentaram ação inibitória do crescimento dos micro-organismos.

Agradecimentos

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela realização das análises de caracterização das AgNPs.
À Fundação Araucária, pela bolsa concedida para a realização da pesquisa.

Referências

BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA**, Três Lagoas, v.3, n.2, p.1-12, 2016.

LACATUSU, I. et al. Novel bio-active lipid nanocarriers for the stabilization and sustained release of sitosterol. **Nanotechnology**, v. 23, n. 45, p. 455702, 2012.

SOARES, T.S.C. **Efeito de nanopartículas de prata em neutrófilos.** Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal, 2014.