

Resumo

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento da metodologia a aplicar para o estudo da citotoxicidade de nanofluidos de grafeno em diferentes concentrações em culturas de fibroblastos. Os resultados bibliográficos mostram que baixas concentrações não afetam significativamente a mortalidade celular ou a integridade da membrana, mas podem causar rutura do citoesqueleto de Actina-F. Com o presente estudo visa-se identificar concentrações não tóxicas para aplicações biomédicas seguras.

Introdução

O grafeno, composto por uma camada de átomos de carbono dispostos de forma hexagonal, possui propriedades físicas e químicas únicas e extremamente importantes, tais como o facto de ser um excelente condutor elétrico e térmico, altamente resistente, impermeável a gases, mas permeável à água, ter boas propriedades elásticas e uma excelente transparência ótica, o que tem conduzido a avanços na investigação e desenvolvimento nas mais diversas áreas, nomeadamente na medicina [1].

No campo biomédico o grafeno e, os materiais nele baseados, têm sido amplamente utilizados na imagiologia, através da sua utilização sob a forma de nanopartículas que actuam como agentes de contraste, em biossensores para a deteção de doenças em fase inicial, na administração de fármacos devido à sua superfície ajustável, na terapia fototérmica do cancro e na engenharia de tecidos, devido à sua capacidade de criar uma estrutura de suporte para o cultivo de células [2].

No entanto, o maior desafio na utilização deste material é garantir a sua biocompatibilidade e avaliar possíveis efeitos tóxicos ao interagir com tecidos biológicos, tanto a nível celular como molecular, e os estudos resultantes têm mostrado muitas inconsistências [1].

O principal objetivo deste trabalho é realizar a metodologia explicada de seguida para avaliar a toxicidade de soluções contendo nanopartículas de grafeno em diferentes concentrações.

Metodologia

O estudo citotóxico de qualquer material exige rigor nas metodologias utilizadas. Assim, é de extrema importância que todo o equipamento utilizado e o respetivo material em estudo sejam esterilizados antes de iniciar qualquer tipo de intervenção, seja por autoclavagem ou filtração.

Neste estudo, é necessário criar um meio de cultura confluyente de fibroblastos para efetuar a metodologia apresentada na Figura 1.

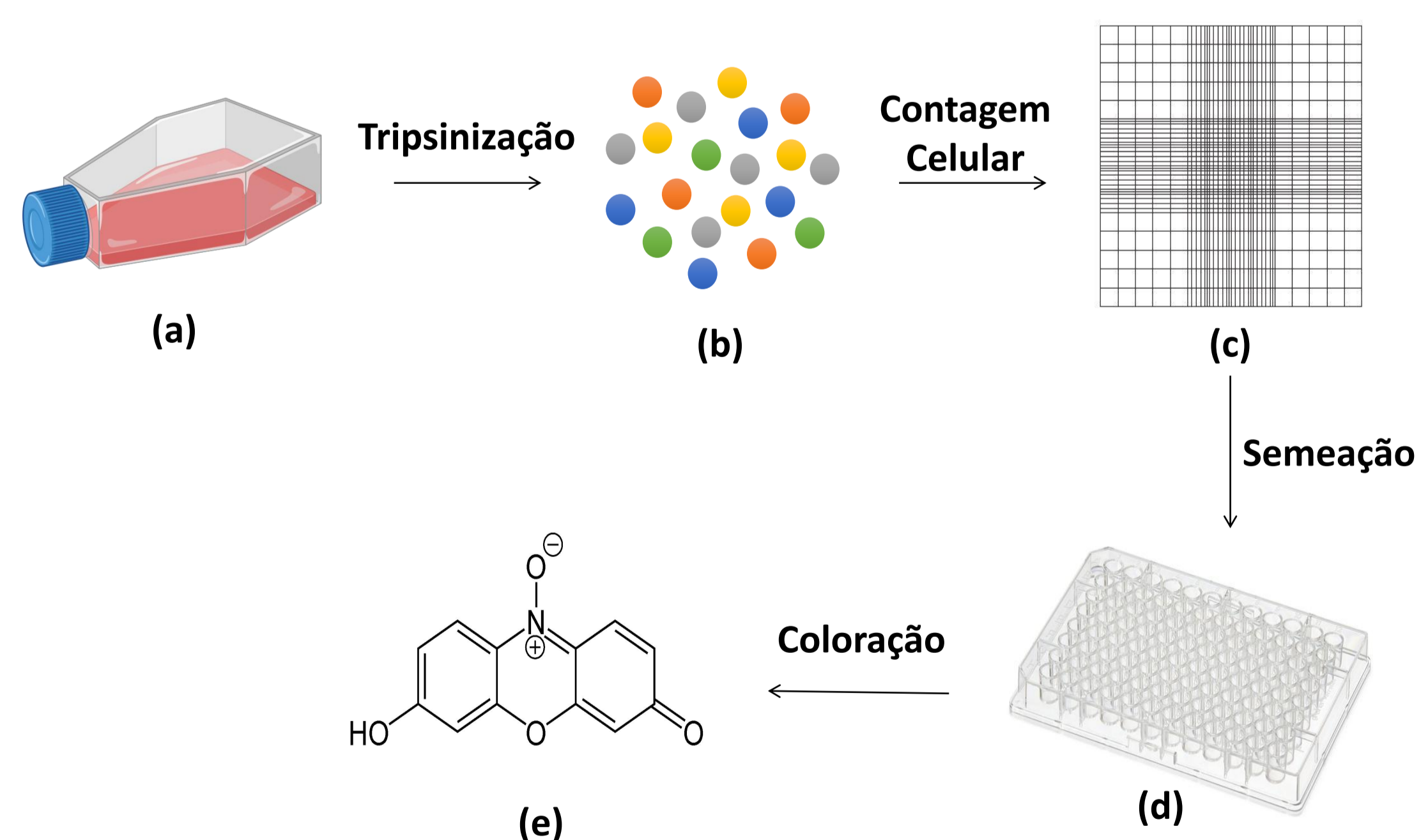


Figura 1. Metodologia para avaliação da citotoxicidade.

A metodologia usada no presente trabalho é a de crescimento de uma cultura de fibroblastos em frascos de cultura (Fig.1 (a)).

De seguida, aplicar a técnica de tripsinização, de modo a soltar as células para posterior visualização ao microscópio. Este processo efectua-se utilizando a enzima tripsina, cuja função é quebrar as ligações proteicas das células aderentes (Fig.1 (b)).

Posteriormente, procede-se a uma contagem de células para verificar se existem células suficientes para efetuar a avaliação pretendida, sendo o número mínimo de células necessário 10^4 células/mL. Esta contagem é feita microscopicamente, através da visualização da malha de uma câmara de contagem (Fig.1 (c)), neste caso uma câmara de Neubauer, e como o volume colocado na câmara é conhecido, podemos obter a concentração celular. Uma vez verificado um número suficiente de células, é possível efetuar o estudo em questão.

Placas como a da Fig.1 (d) são utilizadas para semear estas células para que possam crescer e desenvolver-se, para posterior avaliação. Esta técnica permite a utilização de diferentes soluções para estudos comparativos. O período de incubação deste processo pode ser de três a cinco dias para os estudos de toxicidade e de sete dias para os estudos complementares de biocompatibilidade.

Finalmente, para analisar a toxicidade destas soluções, é utiliza-se um corante, como a resazurina (Fig.1 (e)), que nos permite verificar a atividade metabólica das células para identificar se ocorreu morte celular.

Discussão e Conclusão

Quando usado em baixa concentração em células eucarióticas, o grafeno não tem apresentado efeitos significativos no que diz respeito à mortalidade e integridade da membrana, morfologia e viabilidade celular [3]. No entanto, um estudo realizado a células fibroblásticas mostrou que as mesmas, quando foram expostas a baixas concentrações de grafeno, apresentaram alterações relacionadas com a rutura do citoesqueleto da Actina-F, sendo esta uma consequência importante da toxicidade celular [4]. Isto demonstra que realmente existe uma inconsistência nestes estudos citotóxicos.

Neste momento estão a ser realizados estudos espectrais em tecidos que contêm nanofluidos de grafeno com diferentes concentrações e diferentes fluidos base, de forma a compreender as que melhor se ajustam ao estudo em causa para posterior análise da toxicidade das mesmas.

Esperam-se obter bons resultados óticos os diferentes nanofluidos de grafeno, aplicando-lhes a metodologia referida, determinar qual é a que apresenta melhor avaliação citotóxica, isto porque é espectável que, em sistemas biológicos, a toxicidade do grafeno varie consoante a sua concentração em solução, bem como se espera que, pelo menos uma das concentrações não apresente efeitos tóxicos.

Agradecimentos

I. Martins agradece o apoio financeiro da FCT- bolsa n. UI/BD/151528/2021 e, do projeto UIDB/04730/2020, UIDP/04730/2020.

Referências

- [1] S. Syama, P.V. Mohanan 2016, 'Safety and biocompatibility of graphene: A new generation nanomaterial for biomedical application', *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 86, pp. 546-555.
- [2] Gurunathan, S., & Kim, J. H. 2016, 'Synthesis, toxicity, biocompatibility, and biomedical applications of graphene and graphene-related materials', *International Journal of Nanomedicine*, no. 11, pp. 1927-1945.
- [3] Zhang, Y., Ali, S. F., Dervishi, E., Xu, Y., Li, Z., Casciano, D., & Biris, A. S. 2010, 'Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells.', *ACS nano*, vol. 4, no. 6, pp. 3181-3186.
- [4] Pastrana, H. F., Cartagena-Rivera, A. X., Raman, A., & Ávila, A. 2019, 'Evaluation of the elastic Young's modulus and cytotoxicity variations in fibroblasts exposed to carbon-based nanomaterials.' *Journal of Nanobiotechnology*, no. 17, pp. 1-15.