

NEWMAN, M. C., ZHAO, Y. Ecotoxicology nomenclature: LC, LD, LOC, LOEC, MAC. In: Jorgensen, S.E., Fath, B. (Eds.), Encyclopedia of Ecology. Elsevier, pp. 1187–1193. 2008.

CARACTERIZAÇÃO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS DE TITANATO DE BÁRIO PARA ENSAIOS DE TOXICIDADE

*Hudson C. Polonini¹, Roberta Brayner², Nádia R. B. Raposo¹, Marcos Antônio F. Brandão¹, Ludovic Mouton², Yann Sivry³, Wanessa A. Carvalho⁴, Juliana C. Gern⁴, Humberto M. Brandão⁴

¹Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde, NUPICS, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. ²Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, ITODYS, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, France. ³Institute de Physique du Globe de Paris, IPGP, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, France. ⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora.
*h.c.polonini@gmail.com

Classificação: Estudo dos aspectos de segurança em nanotecnologia.

Resumo

Dois partículas de titanato de bário (BT) foram caracterizadas físico-quimicamente quanto a parâmetros de interesse para ensaios de toxicologia aquática. Foram realizados: difração de raios-X, observações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), determinação da área de superfície, do estado de dispersão e da carga e química de superfície e avaliação do grau de dissolução em suspensões aquosas. Tanto BT MP (micropartícula) quanto BT NP (nanopartícula) se mostraram carregadas negativamente, facilmente agregáveis, com uma taxa de liberação de íons Ba²⁺ para os meios de cultura que não ultrapassa 1,5%.

Palavras-chave: Titanato de bário; Caracterização físico-química; Nanoecotoxicologia.

CHARACTERIZATION OF BARIUM TITANATE MICRO- AND NANOPARTICLES FOR TOXICITY ASSAYS

Abstract

Two particles of barium titanate (BT) were physico-chemically characterized regarding parameters of interest to aquatic toxicology assays. We performed: X-ray diffraction, morphological observations by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), determination of surface area, the state of dispersion and charge and chemistry of surface and assessment of the dissolution in aqueous suspensions. Both BT MP (microparticle) as BT NP (nanoparticle) were negatively charged, easily aggregatable, with a release rate of Ba²⁺ ions to the culture media that does not exceed 1.5%.

Keywords: Barium titanate; Physicochemical characterization; Nanoecotoxicology.

Publicações relacionadas

POLONINI, H. C. *et al.* Size-dependent ecotoxicity of barium titanate particles: the case of *Chlorella vulgaris* green algae. Chemosphere. No prelo.

POLONINI, H. C. *et al.* Ecotoxicological studies of micro-and nanosized barium titanate on aquatic photosynthetic microorganisms. Aquatic Toxicology, v. 154, p. 58-70, 2014.

1 INTRODUÇÃO

Os três elementos base para as estratégias de *screening* do perfil de toxicidade de nanomateriais, segundo Oberdörster *et al.* (2005) são: (i) caracterização físico-química (tamanho, área de superfície, formato, solubilidade, agregação); (ii) elucidação dos efeitos biológicos a partir de estudos *in vitro*; e (iii) confirmação dos efeitos em estudos *in vivo*. Nesse sentido, a caracterização assume papel primordial para o completo entendimento do mecanismo de interação dos materiais com os seres vivos.

O conhecimento científico recente sobre os mecanismos de interação de células e nanopartículas

vem indicando que as muitas células prontamente internalizam as nanopartículas, quer através de mecanismos ativos ou passivos. Mesmo partículas de um mesmo material podem apresentar comportamentos completamente diferentes, devido a, por exemplo, pequenas diferenças na superfície de revestimento, na carga ou no tamanho (ELSAESSER; HOWARD, 2012).

Além disso, há muito mais variáveis a considerar quando se trabalha com nanomateriais, e estas incluem: tamanho, forma, carga de superfície, estado de dispersão (aglomeração, agregação), concentração e meio. Caso contrário, os possíveis efeitos tóxicos não poderão ser facilmente atribuídos a uma determinada qualidade do nanomaterial ou até mesmo ao próprio nanomaterial porque, por exemplo, impurezas e outros componentes podem ser responsabilizados (SAYES; WARHEIT, 2009).

O presente estudo focou na caracterização físico-química de titanato de bário (BT), um material que em nanoescala tem sido utilizado como nanocarreador intracelular para proteínas e fármacos de baixo peso molecular, tais como doxorubicina (CIOFANI *et al.*, 2010), como material para sondas de imagem (HSIEH *et al.*, 2010) e como material de enxerto ósseo (BALL *et al.*, 2014). Assim sendo, o objetivo geral foi caracterizar físico-quimicamente dois lotes de BT com tamanhos de partículas distintos, sendo um micrométrico (BT MP) e o outro nanométrico (BT NP), em relação à composição química, à forma e ao tamanho, a seu estado de dispersão e a sua carga, área e química de superfície.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A difração de raios-X (DRX) das amostras nano ou microparticuladas (doravante intituladas pós) foram registradas com difratômetro X'pert Pro (PANalytical, Holanda) equipado com um detector multicanal X'Celerator, e utilizando a radiação de Co K α ($\approx 1,790307 \text{ \AA}$), no intervalo de ângulos 2θ variando de 5° a 120° , com um passo de varredura de $0,05^\circ/5s$. O suporte de amostras utilizado foi de sílica monocristalina.

Observações morfológicas dos materiais por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas por meio de um microscópio Supra 40 (Zeiss, Alemanha) equipado com um detector na lente. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas utilizando um microscópio 100CX -II (JEOL, Japão) operando com uma tensão de aceleração de 100 kV.

A área superficial específica (S_g) e o tamanho dos poros foram medidos pela coleta das isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio (N_2) em um sistema Gemini V 2380 (Mic America, EUA) a 77 K, após os materiais terem sido secos a 160°C durante 1 h.

O estado de dispersão (determinado como tamanho hidrodinâmico) e as forças de carga da superfície/interpartículas (potencial zeta, ζ) das dispersões de pós nos meios de cultura ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou $4,28 \times 10^{-7} \text{ M}$) foram caracterizados usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), através de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espalhamento eletroforético de luz (ELS), respectivamente.

O grau de dissolução dos materiais nos meios de cultura (Bold's Basal, BB, e Meio Mineral, MM) como uma função de tempo (1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 e 96h) foi avaliado seguindo um protocolo proposto por Sivry *et al.* (2014). A partir de uma solução-estoque ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$, volume final = 100 mL), preparada no momento 0 h, alíquotas (3,5 mL) foram retiradas nos intervalos de tempo especificados e ultra-filtradas usando filtros de 3 kDa (Microsep Advance Centrifugal Device, Pall Corporation, EUA) que foram centrifugados em velocidade máxima (EBA 8, Hettich, Alemanha) por 1h. Após, adicionou-se $50 \mu\text{L}$ de HNO_3 saturado (sem nenhum traço de Ba^{2+}). A análise elementar foi realizada por plasma indutivamente acoplado a espectrometria de emissão óptica (ICP- OES) (iCAP 6200, Thermo Scientific, EUA). O restante das dispersões aquosas (72 mL) foi centrifugado a $20.000 \times g$ (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific, EUA) e o meio foi completamente evaporado em estufa a 50°C . Os resíduos secos foram, então, analisados por DRX e espectroscopia de foto-elétrons excitados por raios-X (XPS) (VG Escalab 250, Thermo Scientific, EUA), usando Al K α de 1486,6 eV, a 15 kV e 150 W, para avaliação de eventuais mudanças químicas na superfície das partículas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os difratogramas de BT indicam que os materiais sintetizados têm duas estruturas diferentes: BT MP mostra boa concordância com a estrutura tetragonal convencional do BaTiO_3 , com o grupo de espaço P4mm (ICDD 00-005-0626). O difratograma de BT NP, por sua vez, indica que o material sintetizado é BaTiO_3 de estrutura cúbica, com o grupo de espaço Pm3m (ICDD 00-031-0174). Usando o modelo de Williamson-Hall calculado pelo *software* do difratômetro, tem-se que os tamanhos médios de cristalitos foram $172,0 \pm 102,4 \text{ \AA}$ (com $0,19 \pm 0,06\%$ de deformação) e $60,0 \pm 16,7 \text{ \AA}$ ($0,10 \pm 0,05\%$), respectivamente para BT MP e BT NP.

Sabendo-se que os dois materiais são diferentes em termos de estrutura cristalina e tamanho de seus cristallitos, realizou-se a observação microscópica dos mesmos. Na Figura 1, vê-se a diferença morfológica entre as partículas e confirma-se que o tamanho não é completamente uniforme, particularmente para o pó com partículas maiores (BT MP). Foi realizada a estimativa de tamanho das partículas como sendo da ordem de 170 nm para BT MP e em torno de 60 nm para BT NP.

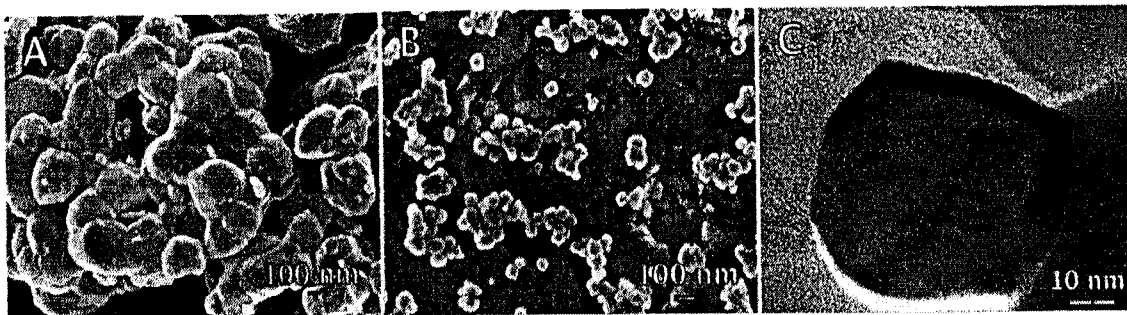


Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica de titanato de bário. (A) MEV de BT MP; (B) MEV de BT NP; (C) MET de BT NP.

A área de superfície foi calculada como sendo $3,24 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para BT MP e $16,60 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para BT NP. Os volumes totais dos poros foram, respectivamente, $0,006$ e $0,07 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ e os diâmetros médios dos poros foram, respectivamente, $7,34$ e $17,46 \text{ nm}$. A isoterma de BT NP mostra uma ligeira histerese em alta pressão relativa, o que geralmente acontece quando o material possui meso- ($2\text{-}50 \text{ nm}$) ou macroporos ($> 50 \text{ nm}$). A histerese é, portanto, explicada pelo fato de o nanomaterial apresentar poros maiores do que o micro.

Como o BT apresenta uma estrutura de perovskita, é esperada a observação de instabilidade termodinâmica e reatividade em meio aquoso, e isso foi evidenciado pelas medidas de DLS realizadas. Os resultados de ζ mostram que, de uma maneira geral, ambas as partículas são carregadas negativamente, e esta carga tende a diminuir em módulo com valores de pH baixos e maior tempo em suspensão. Excetuando-se este caso, nenhum dos materiais apresentaram valores suficientemente elevados para garantir a estabilidade coloidal, que deve ser no mínimo 25 mV . Esta instabilidade pode ser observada a olho nu como sedimentação na suspensão após algumas horas de preparo. Como a carga de superfície afeta a absorção e a translocação das partículas por organismos vivos, pode-se esperar que as partículas irão mostrar efeitos distintos sobre os micro-organismos, quer devido à sua própria natureza, ou devido a seu diferente comportamento em cada meio.

Os dados de ζ levam à afirmação de que o tamanho dos agregados não afeta o ζ , pois ele se mantém negativo desde o momento de preparo das suspensões até 96 h após o mesmo. Quanto ao pH, vê-se também uma tendência quase de forma linear: quanto maior o pH, mais negativa a carga é, com apenas algumas exceções. O pH pode ser associado com as variações nos valores ζ uma vez que os meios ácidos lixiviam o Ba^{2+} da superfície do BT, tornando o ζ perto de 0 (suspensão instável). A dissolução (ver adiante) pode ter tornado a superfície de BT rica em Ti, isto é, uma superfície mais ácida. O aumento do pH, por sua vez, diminui a dissolução de Ba^{2+} ou causa reabsorção do cátion.

O tamanho hidrodinâmico das partículas foi avaliado como uma função do pH e do tempo, da mesma maneira como foi realizada a medição do ζ . Em meio BB, o pH não influenciou o tamanho de agregados, ao contrário do tempo, que desempenhou um papel importante sobre este parâmetro, como os agregados parecem aumentar em grande medida ao longo dos dias em ambas as partículas. O mesmo fenômeno ocorreu em MM, mas, neste caso, a diminuição do pH também levou a um aumento nos tamanhos de agregados. Para MM, os agregados de BT NP foram maiores do que os de BT MP. Nenhuma tendência pôde ser vista, uma vez que não seguem uma relação linear com o tempo ou o pH.

Finalmente, o grau de dissolução das partículas também foi avaliado, uma vez que a liberação de íons para os meios de cultura pode ser responsáveis por um diferente grau e mecanismo de toxicidade para os micro-organismos. BT NP liberou mais Ba^{2+} nos meios do que BT MP – $1,132 \text{ ppb}$ após 96 h em meio BB, $6,5$ vezes mais do que BT MP no mesmo meio; $1,258 \text{ ppb}$ após 96 h em MM contra 345 ppb de BT MP, $3,6$ vezes mais. No entanto, as taxas de dissolução dos pós em BB ou ARS não foram superiores a $1,5\%$.

Após as 96 h de experimento, os difratogramas de DRX dos pós restantes foram avaliados e não foi observada nenhuma diferença significativa em nenhum meio. Análises por XPS dos resíduos também foram realizadas (química da superfície). A relação Ba/Ti/O de acordo com a baixa solubilidade verificada por ICP-OES. O carbono (C) é uma impureza comum em ultra-alto vácuo (UAV), e os sinais ao redor de

285 eV (hidrocarboneto) são normalmente utilizados como padrão interno de referência a outros elementos quando ocorrem fenômenos de carregamento elétrico. No entanto, a sua presença em mais de um estado é um indicativo da formação de carbonato de bário, BaCO_3 (também observado pela energia de ligação de Ba em ~ 780 eV). A deconvolução do pico C 1s revelou um pico de carbonato na superfície do BT, em 288-289 eV. O BaCO_3 pode ser um subproduto da síntese de BaTiO_3 , qualquer que seja a via de síntese, ou pode também ser derivado da tendência para a adsorção de CO_2 que existe em superfícies de perovskitas, devido a uma interação dipolo-dipolo entre o cristal BaTiO_3 ferroelétrico e a molécula de CO_2 polar. Como este componente está presente somente em traços, é mais provável que o carbonato seja formado como uma segunda fase discreta ($\sim 2\%$) em vez de uma película de superfície.

4 CONCLUSÃO

Tanto BT MP ($\sim 170\text{nm}$, tetragonal) quanto BT NP (~ 60 nm, cúbico de face centrada) se mostraram negativos, facilmente agregáveis e precipitáveis (instáveis) em todos os meios de cultura aquoso estudados, com uma taxa de liberação de íons Ba^{2+} para os mesmos que não ultrapassa 1,5%. Estes dados podem ser usados para direcionar futuros trabalhos com ensaios de ecotoxicidade aquática.

AGRADECIMENTOS

H. Polonini agradece CAPES (04/CII-2008-Projeto 7, Rede Brasil Nanobiotec) e Programa Ciência sem Fronteiras/CNPq (245781/2012-9) pelas bolsas de estudo concedidas. Todos os autores agradecem a Jacques Monod; prof. Dr. Marcone A. L. de Oliveira; Sophie Nowak; Jean-Yves Piquemal; e Philippe Decorse.

REFERÊNCIAS

- BALL, J. P. *et al.* Biocompatible evaluation of barium titanate foamed ceramic structures for orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 102, n. 7, p. 2089-1095, 2014.
- CIOFANI, G. *et al.* Barium titanate nanoparticles: highly cytocompatible dispersions in glycol-chitosan and doxorubicin complexes for cancer therapy. *Nanoscale Research Letters*, v. 5, n. 7, p. 1093-1101, 2010.
- ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V.. Toxicology of nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, v. 64, n. 2, p. 129-137, 2012.
- HSIEH, C. *et al.* Bioconjugation of barium titanate nanocrystals with immunoglobulin G antibody for second harmonic radiation imaging probes. *Biomaterials*, v. 31, n. 8, p. 2272-2277, 2010.
- OBBERDÖRSTER, G. *et al.* Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, v. 2, n. 1, p. 8, 2005a.
- SAYES, C. M.; WARHEIT, D. B. Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 1, n. 6, p. 660-670, 2009.

EXPOSIÇÃO SUBLETAL DE DAPHNIA A ANATASE PROVOCA ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DEPENDENTES DA CONDIÇÃO DE ILUMINAÇÃO

*Clemente, Z.^{1,2}, Castro, V.L.S.S.¹, Jonsson, C.M.¹, Fraceto, L.F.^{2,3}

¹ Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança, Embrapa CNPMA, Jaguariúna, SP. ² Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, UNICAMP, Campinas, SP. ³ Departamento de Engenharia Ambiental, UNESP, Sorocaba, SP.

*zairaclemente@hotmail.com