

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 (~ 170 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.
- OBERDÖRSTER, 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.S¹, 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

Classificação: Estudo dos aspectos de segurança em nanotecnologia.

Resumo

As nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) apresentam propriedades fotocatalíticas que devem ser consideradas na sua avaliação ecotoxicológica. Este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade do nano-TiO₂ em *Daphnia similis*, sob diferentes condições de iluminação. *D. similis* foram expostas a 0, 7, 75 e 750 mg/L de nano-TiO₂ (anatase, 25 nm) sob luz visível ou luz visível e radiação ultravioleta (UV), durante 24h. Analisou-se a atividade de catalase (CAT), glutatona S-transferase (GST) e fosfatase ácida (FA) nos organismos expostos. CAT apresentou redução na sua atividade nos grupos expostos a 750 mg/L. Em geral, a exposição a radiação UV elevou a atividade de GST. FA sofreu interação dos fatores, sendo a atividade de FA inibida sob radiação UV, em todas as concentrações testadas. Estes resultados contribuem para compreensão dos efeitos ecotoxicológicos do nano-TiO₂ e indicam que a condição de iluminação influencia tais efeitos.

Palavras-chave: Nanotoxicologia; Ecotoxicologia; Água; Microcrustáceo.

SUBLETHAL EXPOSURE OF DAPHNIA TO ANATASE CAUSES BIOCHEMICAL CHANGES THAT ARE DEPENDENT OF ILLUMINATION CONDITION.

Abstract

Nanoparticles of titanium dioxide (nano-TiO₂) exhibit photocatalytic properties that must be considered in its ecotoxicological assessment. This study aimed to evaluate the toxicity of nano-TiO₂ in *Daphnia similis* under different illumination conditions. *D. similis* were exposed to 0, 7, 75 and 750 mg/L of nano-TiO₂ (anatase 25 nm) under visible light or visible and ultraviolet light (UV) for 24 hours. We analyzed the activity of catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and acid phosphatase (AP) in exposed organisms. CAT showed a decrease in activity in the groups exposed to 750 mg/L. In general, exposure to UV radiation increased the GST activity. FA showed that there was an interaction of factors, and the activity of FA was inhibited under UV radiation, at all tested concentrations. These findings contribute to understanding the ecotoxicological effects of nano-TiO₂ and indicate that the illumination condition influences such effects.

Keywords: Nanotoxicology; Ecotoxicology; Water; Microcrustacean.

Publicações relacionadas

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V.L.S.S.; JONSSON, C.M.; FRACETO, L.F.. Minimal levels of ultraviolet light enhance the toxicity of TiO₂ nanoparticles to two representative organisms of aquatic systems. *Journal of Nanoparticle Research*, 2014.

1 INTRODUÇÃO

Nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) estão entre as mais utilizadas pela nanotecnologia. Sua crescente produção e utilização levaram a diversos estudos para avaliação da sua toxicidade. O nano-TiO₂ possui propriedades fotocatalíticas, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) capazes de danificar moléculas biológicas; este tem sido o mecanismo de toxicidade mais discutido para o nano-TiO₂ (NOGUEIRA; JARDIM, 1998).

Trabalho anterior do nosso grupo mostrou que níveis mínimos de radiação UV alteram a toxicidade aguda do nano-TiO₂ em *Daphnia similis*, sendo o valor de CE50_{48h} = 750 mg/L para anatase 25 nm. Apesar do valor de CE50 ser elevado e classificar o nano-TiO₂ como praticamente não tóxico (USEPA, 1985), é importante avaliar a ocorrência de efeitos subletais em organismos expostos ao nano-TiO₂ para avaliar possíveis riscos ao ambiente.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos subletais do nano-TiO₂ em *Daphnia similis*, sob diferentes condições de iluminação, através da análise de biomarcadores bioquímicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

D. similis foram expostas durante 24h a 0, 7, 75, e 750 mg/L de nano-TiO₂ (Sigma Aldrich, 25 nm, 100% anatase) sob duas condições de iluminação: luz visível com ou sem radiação ultravioleta (UV). As concentrações testadas corresponderam à CE50_{48h} sob UV, 10 % e 1 % da CE50_{48h} sob UV de nano-TiO₂. A radiação UV nos bioensaios foi estabelecida através de lâmpadas UVA340 da Q Panel, e a sua intensidade foi de 0.17 J/h/cm², uma dose cerca de 250 vezes inferior à radiação solar no outono

(CLEMENTE et al, 2013).

Cerca de 100 organismos adultos foram expostos às condições testes, em placas de petri (diâmetro 10 cm, altura coluna de água 1 cm) contendo 50 mL de solução. Ao final do período de exposição, os organismos foram coletados utilizando uma peneira (malha de 21.2 mm), lavados com água destilada, pesados e armazenados a -80°C para posterior realização de análises bioquímicas.

As daphnias coletadas foram homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM pH 7 (1:10 peso/volume) e centrifugadas a 10.000 xg durante 10 min, 4°C . O sobrenadante foi utilizado para realização das análises das atividades específicas de glutationa S-transferase (GST; KEEN et al., 1976), catalase (CAT; AEBI, 1983), fosfatase ácida (FA; PRAZERES et al., 2004) e concentração proteica (BRADFORD, 1976). Ao menos 3 pools de daphnia foram analisados por grupo e todas as leituras foram feitas em triplicata.

As análises foram realizadas em leitora de absorvância de microplaca (Tecan Sunrise, Austria), exceto a análise de CAT, que foi realizada em espectrofotômetro de cubeta UV-Vis (Model 1650PC, Shimadzu, Japão).

Os dados bioquímicos foram comparados através de Anova de duas vias; consideraram-se os fatores condição de iluminação (com e sem UV), concentração e a interação entre eles. Empregou-se o pós-teste de Holm-Sidak, para comparação dos grupos. Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5%. A normalidade dos dados foi testada através do teste de Shapiro-Wilk. Para estas análises utilizou-se o programa Sigma Plot versão 11.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exposição durante 24h de daphnias a concentrações equivalentes e abaixo da $CE50_{48h}$ sob UV, indicou diferentes respostas dos biomarcadores bioquímicos estudados. A atividade específica de CAT (Figura II) apresentou efeito da condição de iluminação ($p=0,006$) e da concentração ($p<0,001$), mas não houve interação entre os dois fatores ($p=0,13$). A inibição na atividade de CAT ocorreu nos grupos expostos a 750 mg/L sem e com UV e também a 7 mg/L com UV. O efeito da concentração de nano-TiO₂ sobre a atividade específica de FA (Figura III) dependeu da condição de iluminação, caracterizando a ocorrência de interação dos dois fatores ($p=0,017$). A inibição da atividade de FA ocorreu em todas as concentrações testadas de anatase com UV. A atividade específica de GST (Figura IIII) apresentou efeito da condição de iluminação ($p=0,018$).

A literatura é ainda inconclusiva sobre o efeito do nano-TiO₂ sobre biomarcadores bioquímicos. Trabalhos com outros organismos aquáticos expostos ao nano-TiO₂ também observaram reduções na atividade e expressão de CAT (HAO et al., 2009, CUI et al., 2010). Altas concentrações de H₂O₂ podem inibir reversivelmente e inativar irreversivelmente a atividade de catalase (LARDINOIS et al, 1996). Da mesma forma, espécies reativas de oxigênio como *O₂ e H₂O₂ são capazes de oxidar resíduos de cisteína presentes no sítio ativo e, portanto, inibir a atividade de fosfatases (AOYAMA et al., 2003). A ocorrência de estresse oxidativo pode estar relacionada à produção direta de ROS pelo nano-TiO₂, ou por hipóxia causada devido à aderência do nano-TiO₂ aos organismos e conseqüente dificuldade respiratória. Anatase é a fase cristal de TiO₂ com maiores propriedades fotocatalíticas com relação a rutilo. A fotoativação de anatase pela radiação UV leva a produção de ROS e no nosso estudo, essa condição promoveu uma elevação na toxicidade desse material para daphnia.

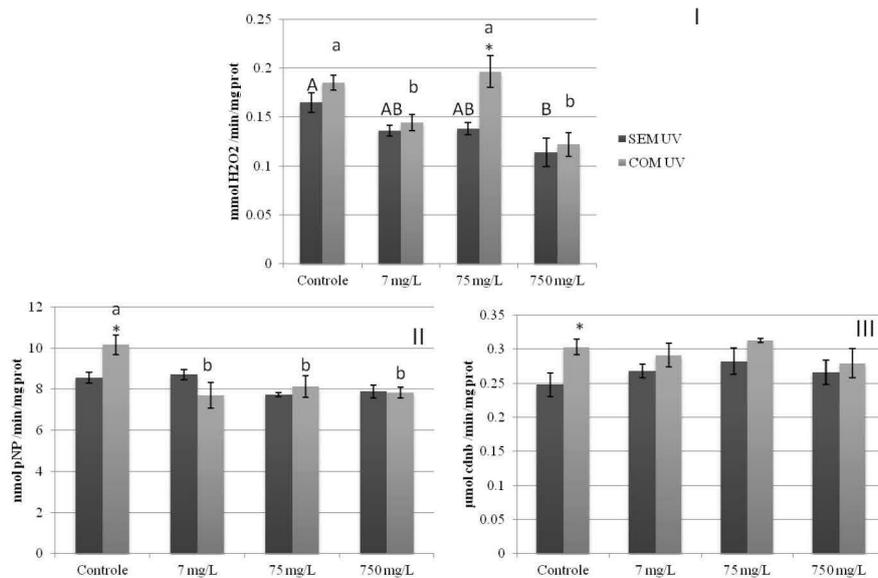


Figura 1. Análises bioquímicas em *D. similis* expostas durante 24h a nano-TiO₂ sem e com radiação UV. Atividades específicas de (I) catalase, (II) fosfatase ácida, (III) glutatona S-transferase. Média ± erro padrão. * indica p<0,05 entre grupos sem e com UV dentro da mesma concentração. Letras maiúsculas diferentes indicam p<0,05 entre grupos sem UV. Letras minúsculas diferentes indicam p<0,05 entre grupos com UV.

4 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que o nano-TiO₂ anatase pode gerar efeitos subletais em organismos aquáticos que dependem da condição de iluminação. A exposição aguda de daphnias a concentrações equivalentes e abaixo da CE50_{48h} de nano-TiO₂ sob radiação UV inibiu as atividades específicas de catalase e fosfatase ácida, indicando a ocorrência de estresse oxidativo. Nossos resultados indicam que o nano-TiO₂ pode apresentar impacto negativo em ecossistemas de água doce, e contribuem para a discussão e estabelecimentos dos protocolos nanoecotoxicológicos.

AGRADECIMENTOS

FAPESP, CNPq, CAPES e EMBRAPA.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. Academic Press, v.105, p.121-126, 1984.
- Aoyama, H.; Silva, T.M.A.; Miranda, M.A.; Ferreira, C.V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. Química Nova, v.6, p. 896-900, 2003.
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.
- Clemente, Z.; Castro, V.L.; Feitosa, L.O.; Lima, R.; Jonsson, C.M.; Maia, A.H.; Fraceto, L.F. Fish exposure to nano-TiO₂ under different experimental conditions: Methodological aspects for nanoecotoxicology investigations. Science of Total Environment, v. 463-464, p.647-656, 2013.
- Cui, Y.; Gong, X.; Duan, Y; et al. Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. Journal of Hazard Materials, v.183, n. 1-3, p. 874-880, 2010.
- Hao, L.; Wang, Z.; Xing, B. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Environmental Science, v. 21, n. 10, p. 1459-1566, 2009.

Keen, J. H.; Habig, W. H.; Jakoby, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

Lardinois, O.M.; Mestdagh, M.M.; Rouxhet, P.G. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *BBA - Protein Structure M*, v. 1295, n. 2, p. 222-238, 1996.

Nogueira, R.F.P.; Jardim, W.F. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. *Quimica Nova*, v. 21, n. 1, p. 69-72, 1998.

Prazeres, J.N.; Ferreira, C.V.; Aoyama, H. Acid phosphatase activities during the germination of Glycine max seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42, p.15-20, 2004.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). EPA-540 / 9 -85-009. Hazard Evaluation Division. Standard Evaluation Procedure. Acute toxicity test for estuarine and marine organisms. Washington, 1985.

INDICADORES DE RISCO DO DESENVOLVIMENTO DAS NANOTECNOLOGIAS – UMA FERRAMENTA DE APOIO À DECISÃO

*Karen C. Massini¹, Katia R.E. Jesus², Odílio B. G. Assis³

¹Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. ²Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. ³Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP.
*kamassini@hotmail.com.

Classificação: Estudo dos aspectos de segurança em nanotecnologia.

Resumo

A nanotecnologia representa atualmente um negócio mundial que movimenta mais de 100 bilhões de dólares e atrai cada vez mais recursos humanos e financeiros, devido ao seu enorme potencial de aplicação. Assim, metodologias que permitam avaliar a segurança dos nanoproductos, especialmente aqueles que já encontram-se no mercado, são de fundamental importância. No entanto, a área do conhecimento que envolve as avaliações de riscos das nanotecnologias encontra-se ainda bastante incipiente no Brasil. A criação de uma metodologia para a Avaliação dos Riscos das nanotecnologias representa uma medida mitigatória eficaz para enfrentar os desafios cada vez maiores identificados pelos cientistas e legisladores, podendo atuar em três momentos: prevenindo, monitorando e restaurando. Desta forma, são apresentados nesse trabalho 14 indicadores para a avaliar o potencial de risco. Esses foram validados pelos especialistas da área de nanotecnologia por meio da Técnica Delphi de consulta aos especialistas. Segundo eles, esses indicadores representam de modo mais completo os aspectos mais críticos relacionados ao desenvolvimento da Nanotecnologia. Estes indicadores, de modo geral, têm a finalidade de auxiliar os desenvolvedores desta tecnologia para que reavaliem as metodologias empregadas para o desenvolvimento das nanotecnologias com a finalidade de mitigar um provável risco.

Palavras-chave: Nanotecnologia, Nanopartícula, Avaliação da Segurança, Indicadores de riscos.

RISK INDICATORS OF THE NANOTECHNOLOGY DEVELOPMENT - A TOOL FOR DECISION MAKING SUPPORT

Abstract

Nanotechnology is currently a global business that operates more than 100 billion dollars and is increasingly attracting human and financial resources, due to their enormous potential application. Thus, methodologies for assessing the safety of nano-products, especially those that are already in market. However, the area of knowledge that involves risk assessments of nanotechnology is still incipient in Brazil. The development of a methodology for risk assessment of nanotechnologies is an effective measure to face increasing challenges identified by scientists and legislators, which can act in three stages: preventing, monitoring and restoring. Thus, in this work are presented 14 indicators to assess the potential risk, these have been validated by experts in the field of nanotechnology through the Delphi technique of consulting experts. According to them, these indicators represent more completely the most critical