

EFEITOS DE NANOFIBRAS DE CELULOSE E NANOTUBOS DE CARBONO NO METABOLISMO ENERGÉTICO DA MICROALGA *KLEBSORMIDIUM FLACCIDUM*

*Michele Munk Pereira¹, Juliana Carine Gern², Claude Yéprémian³, Alain Couté³, Ludovic Mouton⁴, José Manoel Marconcini⁵, Luiz Orlando Ladeira⁶, Nádia Rezende Barbosa Raposo¹, Roberta Brayner⁴

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ³ Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France. ⁴ Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, Université de Paris Diderot, Paris, France. ⁵ Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP. ⁶ Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG.
*mimunkbio@gmail.com

Classificação: Estudo dos aspectos de segurança em nanotecnologia.

Resumo

O estudo avaliou o impacto de nanofibras de celulose (NFC) de algodão e nanotubos de carbono multicamadas (MWCNT) na microalga *Klebsormidium flaccidum* em função da concentração (1, 50 e 100 µg ml⁻¹) e tempo de exposição (24, 48, 72 e 96h). A atividade fotossintética e os níveis de ATP de *K. flaccidum* após a adição das nanopartículas (NPs) foram mensurados utilizando o fluorímetro PAM. A morfologia celular foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após 48h de contato com as NPs (100 µg ml⁻¹). Os dados foram avaliados por ANOVA. A adição das NFCs na cultura celular alterou a fotossíntese após 24h de exposição (P < 0,05). Entretanto, a atividade fotossintética permaneceu constante na presença de NFC após 48, 72 e 96h (P > 0,05). No caso dos MWCNT, não foram observadas alterações na atividade fotossintética (P > 0,05). Ambas NPs diminuíram o conteúdo de ATP dependendo da concentração e tempo de exposição (P < 0,05) e alteraram a morfologia das microalgas. Em conclusão, os dados demonstraram que a exposição de NFCs e MWCNTs afetam o metabolismo celular e a morfologia de *K. flaccidum*.

Palavras-chave: Fotossíntese; Níveis de ATP; Morfologia Celular; Ecotoxicologia

EFFECTS OF CELLULOSE NANOFIBER AND CARBON NANOTUBE ON ENERGY METABOLISM OF MICROALGAE

Abstract

The impacts of cotton cellulose nanofibers (CNF) and Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) on microalgae *Klebsormidium flaccidum* were measured as function of concentration (1, 50 and 100 µg ml⁻¹) and time (24, 48, 72 and 96hr). The photosynthetic activity and ATP levels of *K. flaccidum* after addition of NPs were measured using a PAM fluorimeter. In order to evaluate morphological, cellular ultrastructure changes and interaction between NPs and *K. flaccidum*, we analyzed microalgae cells by Scanning electron microscopy (SEM) after 48hr of contact with NPs (100 µg ml⁻¹). Data were analyzed by ANOVA. The addition of cotton CNF to cell suspension, leads to a fall in the photosynthetic rate after 24hr (P < 0.05). However, the photosynthetic activity remains constant in the presence of cotton CNFs after 48, 72 or 96hr of culture (P > 0.05). In the case of MWCNT no photosynthetic activity variation was observed (P > 0.05). NPs significantly decreased content ATP, depending on concentration and time (P < 0.05). The cell shrinkage was noted on the cells treated with both cotton CNFs and MWCNTs. In conclusion, we have demonstrated that exposure to cotton CNFs and MWCNTs to affects cell metabolism and algal cell morphology.

Keywords: Photosynthesis; ATP levels; Cell morphology; Ecotoxicology

Publicações relacionadas:

PEREIRA, M.M.; MOUTON, L.; YEPREMIAN, C.; COUTE, A.; LO, J.; MARCONCINI, J.M.; LADEIRA, L.O.; BARBOSA, N.R.; BRANDÃO, H.M.; BRAYNER, R. Ecotoxicological effects of carbon nanotubes and cellulose nanofibers in *Chlorella vulgaris*. Journal of Nanobiotechnology, v. 12, p. 15, 2014.

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia tem um grande potencial de melhorar a qualidade de vida, especialmente por

beneficiar as áreas da agricultura e indústria alimentícia. Algumas das nanopartículas (NPs) existentes incluem as nanofibras de celulose (NFCs) aplicadas em filmes nanocompósitos comestíveis (AZEREDO et al., 2010) e os nanotubos de carbono (NTC) usados na análise de pesticidas e incremento no crescimento de vegetais (FANG et al., 2009). Contudo a liberação de NPs em diferentes compartimentos ambientais (água, solo e ar) pode resultar na sua maior biodisponibilidade e acúmulo ao longo das cadeias alimentares causando impactos no ecossistema. Neste contexto, as microalgas *Klebsormidium flaccidum* são representantes típicos dos produtores primários (BRAYNER et al., 2010) e possuem ampla distribuição no planeta habitando ambientes aquáticos e terrestres.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos de NFC e NTC multicamadas (MWCNT) no metabolismo energético da microalga *K. flaccidum*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As microalgas *K. flaccidum* foram obtidas na algoteca do Museu Nacional de História Natural da França. As microalgas (5×10^5 células ml^{-1}) foram crescidas em meio Bold's basal (BB), em 20°C , iluminação de $50\text{-}80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (14h luz e 10h escuro) e aeração constante. As microalgas foram mantidas em contato as NFC (diâmetro: 6-18 nm; comprimento: 85-225 μm) ou MWCNT (diâmetro: 20nm; comprimento: 40-100 μm), nas concentrações de 0 (controle); 1; 50 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ por 24, 48, 72 e 96h.

A eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) foi avaliada utilizando-se o fluorômetro de amplitude de pulso modulado (PAM, Hansatech Instruments). Para a microscopia de varredura (MEV), as microalgas (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ em 48h de exposição), foram fixadas em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 1,0% de ácido pícrico em PBS por 2 h. Em seguida as células foram tratadas com tetróxido de Ósmio 1% por 2h a 4°C e desidratadas à temperatura ambiente em etanol (50%, 70%, 90% e 100%), uma vez por 10 min em cada concentração. Os níveis intracelulares de ATP foram quantificados com o kit *ATP bioluminescent assay* (FL-AA) de acordo com as instruções do fabricante. A luminescência foi lida em equipamento *Envision Multilabel Plate Reader* (Perkin-Elmer, USA).

Os resultados foram avaliados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de SNK. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias \pm EP da média.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito das nanopartículas na eficiência fotossintética das microalgas

A adição de MWCNT não causou efeitos adversos ($P > 0,05$) na fotossíntese de *K. flaccidum* (Figura 1A). Porém, a exposição às NFCs promoveu uma redução na taxa fotossintética em todas as concentrações ($P < 0,05$), nas primeiras 24h de exposição, normalizando as taxas após este período. Semelhantemente ao presente estudo, Schwab e colaboradores (2011) demonstraram que a atividade fotossintética da microalga *C. vulgaris* permaneceu inalterada após exposição a 40 μg de NTCs.

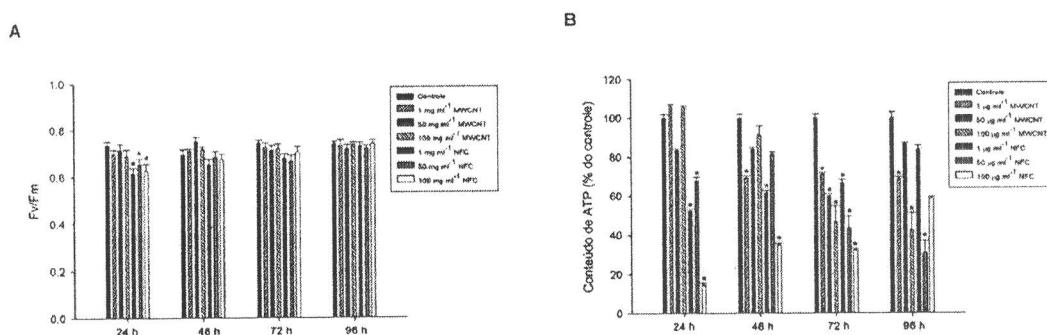


Figura 1. Efeitos de NFCs e MWCNTs (1, 50 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) no metabolismo energético de *K. flaccidum* após por 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. A: Eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm). B: Conteúdo de ATP intracelular. Diferenças significativas entre os grupos testes (NFC ou MWCNT) e o controle são indicados por * $P < 0,05$.

Por outro lado, outras NPs podem alterar a taxa Fv/Fm de algas, como as NPs de ZnO (BRAYNER et al., 2010). Gao e colaboradores (2013) demonstraram que um dos efeitos tóxicos das NPs sobre organismos fotossintéticos é a redução da eficiência fotoquímica do fotossistema II. Em *K. flaccidum*, este efeito nocivo parece estar relacionado ao tipo de NP (maior efeito das NFC quando comparado aos MWCNTs). Possivelmente, o acúmulo de NFCs na superfície das microalgas inibiu a atividade fotossintética, devido a diminuição de trocas gasosas e entrada de nutrientes nas células. Apesar de ter ocorrido a adsorção de ambas as NPs (MWCNT ou NFC) à parede celular das células (Figura 2B,C), provavelmente, aquelas expostas às NFCs foram envolvidas por uma estrutura semelhante a um gel intensificando os efeitos adversos da adsorção de NPs às células.



Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura de células de *K. flaccidum* expostas a $100\mu\text{g ml}^{-1}$ de MWCNT ou NFC por 48 horas. Controle de *K. flaccidum* (A), *K. flaccidum* expostas a MWCNTs (B) ou às NFCs (C).

Esse fenômeno pode ser explicado pela fisiologia das microalgas e/ou pelas características das NPs utilizadas neste trabalho. A interação entre as NPs e o fitoplâncton produz substâncias poliméricas extracelulares conhecidas como exopolissacarídeos (EPS) (BRAYNER et al., 2010) como resposta adaptativa ao estresse ambiental. Em células expostas às NFCs, uma maior formação de substância gelatinosa pode ter ocorrido devido a constituição dessa NP. A celulose é composta de longas cadeias poliméricas de glicose, e é possível sugerir que as cadeias poliméricas das NFCs tenham sido reticuladas pelos EPS produzidos pelas microalgas, formando assim uma substância gelatinosa. Adicionalmente, as imagens de MEV demonstraram danos causados na parede celular das microalgas expostas às NPs (Figura 3B,C) pode ter implicações citotóxicas. De fato análises posteriores da produção de ATP celular evidenciaram que ambas as NPs estudadas prejudicaram a produção de energia pelas microalgas e serão discutidas abaixo.

3.2 Efeitos das nanopartículas nos níveis intracelulares de ATP

A produção de ATP pode ser um alvo de toxicidade relacionado a exposição celular às NPs. Para verificar esse efeito, foram avaliados os níveis intracelulares de ATP após exposição às NFCs e aos MWCNTs (Figura 1B). De maneira geral, as NPs causaram diminuição nos níveis de ATP ($P < 0,05$) de acordo com concentrações e tempos específicos (Figura 1B).

Pouco se conhece sobre os efeitos potenciais de NPs nas mitocôndrias. Phenrat e colaboradores (2009) demonstraram que as NP de ferro valência zero induziram a diminuição nos níveis de ATP celular. O ATP é a molécula de energia mais utilizada pelas células vivas, e seu declínio é indicativo de perda de função mitocondrial. Assim, os níveis de ATP representam o estado metabólico de células ativas. No presente estudo, a mudança nos níveis de ATP nas microalgas tratadas com NPs comparada com as do grupo controle sugere que tanto as NFCs quanto os MWCNTs prejudicam o metabolismo energético de *K. flaccidum*.

4 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais avaliadas, as NFCs influenciaram as taxas fotossintética e tanto as NFCs quanto os MWCNTs prejudicaram o metabolismo energético das microalgas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes e Projeto MPI Rede Agronano – Embrapa. À CAPES Rede Nanobiotec-Brasil (Edital CAPES04/CII-2008), CNPQ, FINEP, EMBRAPA, Rede Agro-Nano, ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA) e ao Laboratório de Nanomateriais da UFMG.

REFERÊNCIAS

- AZEREDO, H. M. C.; MATTOSO L.H.C.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; FILHO, G.C.; MUNFORD, M.L.; WOOD, D.; MCHUGH, T.H. Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. *Journal of Food Science*, Wiley Online Library, v. 75, p. 1-7, 2010.
- BRAYNER, R.; DAHOUMANE, S.A.; YÉPRÉMIAN, C.; DJEDIAT, C.; MEYER, M.; COUTÉ, A.; FI-ÉVET, F. ZnO nanoparticles: synthesis, characterization, and ecotoxicological studies. *Langmuir*, ACS Publications, v. 26, n. 9, p. 6522-6528, 2010.
- FANG, G.; MIN, G.; HE, J.; ZHANG, C.; QIAN, K.; WANG, S. Multiwalled carbon nanotubes as matrix solid-phase dispersion extraction absorbents to determine 31 pesticides in agriculture samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ACS Publications, v. 57, n.8, p. 3040-3045, 2009.
- GAO, H.; PANG, Z.; JIANG, X. Targeted delivery of nano-therapeutics for major disorders of the central nervous system. *Pharmaceutical Research*, Springer, v.30, n.10, p. 2485-2498, 2013.
- PHENRAT, T.; LONG, T.C.; LOWRY, G.V.; VERONESI, B. Partial oxidation ("aging") and surface modification decrease the toxicity of nanosized zerovalent iron. *Environmental Science Technology*, ACS Publications, v. 43, n. 1, p. 195-200, 2009.
- 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 and Technology*, ACS Publications, v.45, n. 14, p. 6136-6144, 2011.

AGREGAÇÃO E CARGA DE SUPERFÍCIE DE NANOFIBRAS DE CELULOSE: IMPLICAÇÕES CITOTÓXICAS

*Michele Munk Pereira¹, Juliana Carine Gern², Saulo Ribeiro da Silva³, Claude Yéprémian⁴, Alain Couté⁴, Ludovic Mouton⁵, José Manoel Marconcini⁶, Nádia Rezende Barbosa Raposo¹, Roberta Brayner⁵

¹Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ²Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ³Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG. ⁴Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France. ⁵Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, Université de Paris Diderot, Paris, France. ⁶Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP.

*mimunkbio@gmail.com

Classificação: Estudo dos aspectos de segurança em nanotecnologia.

Resumo

As nanofibras de celulose (NFC) são promissoras nanomateriais (NMs) que se destacam devido a importantes características mecânicas e devido ao seu caráter renovável e abundante. Entretanto, materiais na escala nanométrica podem ser mais ecotóxicos que os mesmos materiais na escala natural, devido ao aumento da área de superfície e consequente maior exposição de grupos reativos na interface. O impacto das NFC na microalga *K. flaccidum* foi avaliado em função de diferentes concentrações (1, 50 e 100µg mL⁻¹) e tempos de exposição (24, 48, 72 e 96h). Foram estudadas a carga de superfície, a agregação, a interação das NFC com as células e a viabilidade das microalgas expostas a esta nanofibras. Os resultados demonstraram que as células expostas às NFCs produziram exopolissacarídeos. Não foram encontradas NFC dentro das células após avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (MET), porém, de forma geral as NFCs diminuíram a viabilidade celular das microalgas em todas as concentrações (1; 50 e 100µg mL⁻¹) e tempos avaliados (24, 48, 72 e 96h).

Palavras-chave: Nanomateriais; Ecotoxicologia; Bioindicadores