ECOTOXICIDADE AQUÁTICA DE MICRO E NANOPARTÍCULAS DE TITANATO DE BÁRIO EM *ANABAENA FLOS-AQUAE*

***Hudson C. Polonini[1], Roberta Brayner[2], Nádia R. B. Raposo[1], Claude Yéprémian[3], Alain Couté[3], João B. Ribeiro[4], Juliana C. Gern[4], Alessandro S. Guimarães[4], Humberto M. Brandão[4]**

[1]Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. [2]Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, ITODYS, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, France. [3]Muséum National d'Histoire Naturelle, Département RDDM, USM 505, Paris, France. [4]Empresa 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
Duas partículas de titanato de bário (BT), da ordem micrométrica (~170 nm) e manométrica (~60 nm), foram avaliadas quanto ao seu impacto em ambientes aquáticos utilizando a cianobactéria *Anabaena flos-aquae* como organismo-modelo. BT tem um efeito tóxico muito baixo no crescimento de *A. flos-aquae*, porém ambas partículas afetam a viabilidade celular desde a menor concentração testada, o que ocorre por efeito indireto das mesmas no estresse oxidativo das células. BT foi capaz de estressar todos os organismos-teste, o que foi evidenciado pelo aumento na atividade da superóxido dismutase, pela diminuição da eficiência fotossintética e pela dimuição dos níveis intracelulares de ATP. O tamanho de BT parece não influenciar os efeitos produzidos sobre o crescimento dos microrganismos – embora a inibição do crescimento tenha sido pronunciada com o nanomaterial.
Palavras-chave: Nanoecotoxicologia aquática; Titanato de bário; *Anabaena flos-aquae*.

AQUATICAL TOXICITY OF BARIUM TITANATE MICRO- AND NANOPARTICLES TO *ANABAENA FLOS-AQUAE*

Abstract
Two particles of barium titanate (BT), micro- (~170 nm) and nanosized (~60 nm), were evaluated for their impact on aquatic environments using *Anabaena flos-aquae* as model-organism. BT has a very low toxic effect on the growth of *A. flos-aquae*, but both particles affect cell viability since the lowest concentration tested, which occurs by indirect effect on the cells. BT was able to stress all test-organisms, which was evidenced by the increase in superoxide dismutase activity, decreased photosynthetic efficiency and the decreased intracellular ATP levels. The size of BT did not influence the effects on the growth of microorganisms - although growth inhibition has been more pronounced with the nanomaterial.
Keywords: Aquatic nanoecotoxicology; Barium titanate; *Anabaena flos-aquae*.

Publicações relacionadas
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

O acelerado desenvolvimento e disseminação dos nanomateriais podem colocá-los em contato com organismos vivos em situações ainda não compreendidas plenamente. Pesquisas recentes indicam que nanomateriais possuem diferentes perfis de toxicidade quando comparados a grandes partículas, devido ao seu pequeno tamanho e alta reatividade (BRAYNER *et al.*, 2010).

O titanato de bário ($BaTiO_3$, BT) é um material semicondutor/ferroelétrico que ainda é a base para a preparação de condensadores cerâmicos multi-camada e de termoresistores com coeficiente de temperatura positivo de resistividade (HENNINGS *et al.*, 2001), detectores de infravermelho (LI *et al.*, 2013), dispositivos piezoelétricos (PARK *et al.*, 1999), sensores de umidade (WANG *et al.*, 2011) etc.

Porém, além de não haver na literatura dados de biocompatibilidade em longo prazo deste material, nenhum estudo do impacto ambiental de nanopartículas de BT foi encontrado. Neste contexto,

a hipótese do presente trabalho é a de que partículas de diferentes tamanhos de BT possuem diferentes perfis toxicológicos para organismos aquáticos, o que também é influenciado pelo meio onde os mesmos são cultivados. Assim sendo, o objetivo geral foi avaliar pela primeira vez o perfil ecotoxicológico de BT para a cianobactéria *Anabaena flos-aquae*, avaliando a resposta em função do tamanho de partícula, determinando se o tamanho de partícula é um parâmetro que influencia a toxicidade de BT.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A. flos aquae (cianobactéria planctônica procariótica, multi-celular, cepa ALCP B24) foi proveniente da algoteca do *Muséum National d'Histoire Naturelle*. Suspensões-estoque contendo 1000 μg mL^{-1} dos pós (o chamado "nano" possui 60 nm de diâmetro e o "micro" 170 nm) foram adicionadas às algas crescidas em meio Bold's Basal (BB) em concentrações finais de 1, 25, 50, 75 e 100 μg mL^{-1}.

A resposta tóxica foi avaliada por meio da contagem de células às 24, 48, 72 e 96 h após a adição dos materiais. A contagem das células foi feita através de microscopia de campo luminoso, utilizando o Auto Cellometer X4 (Nexcelom, EUA). Foi avaliada simultaneamente a porcentagem de viabilidade celular utilizando o método de exclusão do azul de tripano.

As interações entre os organismos e os materiais na concentração de 100 μg mL^{-1} e após 72 h de exposição foram observadas usando MEV e MET.

A enzima superóxido dismutase (SOD) foi quantificada nos controles e tratamentos (1, 50 e 100 μg mL^{-1}, em 24, 48, 72 e 96 h de exposição). Para liberação da SOD intra-celular, as células foram lisadas com o auxílio de esferas de sílica através de agitação mecânica vigorosa em vórtice e posterior centrifugação por 15 min a 2000 × *g* (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific, EUA). Para a quantificação, utilizou-se um kit de ensaio de SOD-WST 19160 (Sigma-Aldrich, Alemanha). Os controles e os tratamentos, depois de serem incubados a 37 °C durante 20 min, foram lidos a 450 nm utilizando um leitor de placas Envision Multilabel (Perkin-Elmer, EUA).

A atividade fotossintética dos controles e tratamentos (1, 50 e 100 μg mL^{-1}, a 24, 48, 72 e 96 h de exposição) foram determinados através de fluorometria de amplitude de pulso modulado (PAM) utilizando fluorímetro PEA Handy (Hansatech, Reino Unido).

Níveis intracelulares de adenosina-5-trifosfato nos controles e tratamentos (1, 50 e 100 μg mL^{-1}, em 24, 48, 72 e 96 h de exposição) foram quantificados através de kit ATP Bioluminescent Assay (Sigma-Aldrich, Alemanha). A lise das células foi conseguida mecanicamente num vórtice usando esferas de vidro seguido de centrifugação por 15 min a 2000 × *g* (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific, EUA), a fim de obter o ATP livre no sobrenadante. A concentração de ATP foi determinada utilizando-se uma curva analítica com concentrações conhecidas de ATP na faixa de 2×10^{-5} – 200 μ*M*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a taxa de crescimento de *A. flos-aquae* como uma função do tempo de exposição às partículas de BT. Apesar da relativamente breve duração do teste, os efeitos ao longo de várias gerações podem ser avaliados por causa da taxa de divisão que as algas possuem. Os efeitos tóxicos foram significativos apenas após 72 h de exposição, e somente para as maiores concentrações dos materiais (após 96h ≥ 75 μg mL^{-1} para BT NP e = 100 μg mL^{-1} para BT MP, em BB; e ≥ 75 μg mL^{-1} para ambos os materiais em ARS).

Quanto ao ensaio realizado para avaliar a viabilidade dos organismos, *A. flos-aquae* mostrou resultados discrepantes. Enquanto nenhuma inibição significativa do crescimento foi observada, a viabilidade da sua membrana mostrou-se diminuída em todas as concentrações, em ambas substâncias, desde o primeiro dia.

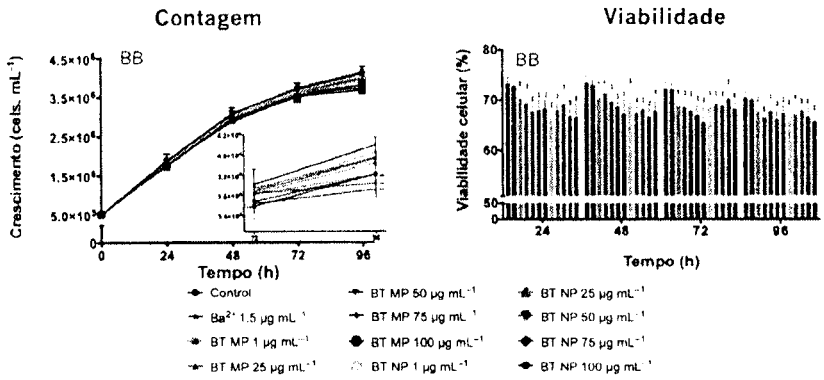

Figura 1. Contagem celular (esquerda) e viabilidade celular (direita) de *A. flos-aquae* em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário.

As imagens de MEV mostraram que, para *A. flos-aquae* exposta a partículas de BT por 72 h em uma concentração de 100 µg mL^{-1}, não houveram alterações morfológicas das células com os tratamentos. Agregados de células e de partículas foram observados. O principal aspecto a ser destacado é: as partículas foram encontradas em torno da parede celular composta por polissacarídeos, e as imagens de MET confirmam que as mesmas não penetram as células.

O efeito que as partículas causaram no estresse oxidativo foi também avaliado. A atividade da SOD foi encontrada aumentada em *A. flos-aquae* crescida em BB quando exposta a BT MP a 100 µg mL^{-1} e BT NP em todas as concentrações testadas, após 72 h.

O aumento da produção de EROs também é conhecida por afetar a fotossíntese. Em *A. flos-aquae*, tratamentos diferiram de seus controles em relação à capacidade fotossintética em meio BB desde a primeira hora de avaliação, para ambas as partículas.

Juntamente com a atividade da SOD, uma outra medição da atividade mitocondrial das células é o teor de ATP intracelular. As mitocôndrias estão diretamente relacionadas com a viabilidade celular, uma vez que são responsáveis não só pela produção de ATP, mas também pela geração de EROs e pela liberação de proteínas que controlam a apoptose (PEREIRA *et al.*, 2014). Em *A. flos-aquae*, o teor de ATP começou a diminuir após 48 h de exposição – isto ocorreu inicialmente nas concentrações mais elevadas, mas após 72 h todas as concentrações exerceram algum efeito

4 CONCLUSÃO

Diante do exposto, as principais conclusões que se pode depreender deste estudo foram: (i) BT tem um efeito tóxico muito baixo no crescimento de *A. flos-aquae*, porém ambas partículas afetam a viabilidade celular desde a menor concentração testada, o que ocorre por efeito indireto das mesmas no estresse oxidativo das células; (ii) BT foi capaz de estressar os organismos-teste, o que foi evidenciado pelo aumento na atividade da SOD, pela diminuição da eficiência fotossintética e pela dimuição dos níveis intracelulares de ATP; e (iii) o tamanho de BT parece não influenciar os efeitos produzidos sobre o crescimento dos micro-organismos – embora a inibição do crescimento tenha sido pronunciada com o nanomaterial.

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 ao Institut Jacques Monod; prof. Dr. Marcone A. L. de Oliveira; Sophie Nowak; Jean-Yves Piquemal; e Philippe Decorse.

REFERÊNCIAS

BRAYNER, R. *et al.* ZnO nanoparticles: synthesis, characterization, and ecotoxicological studies. Langmuir, v. 26, n. 9, p. 6522-6528, 2010.

HENNINGS, D. F. K; METZMACHER, C.; SCHREINEMACHER, B. Seriyati. Defect chemistry and microstructure of hydrothermal barium titanate. Journal of the American Ceramic Society, v. 84, n. 1, p. 179-182, 2001.

PARK, S. *et al.* Crystallographically engineered BaTiO 3 single crystals for high-performance piezoelectrics. Journal of applied physics, v. 86, n. 5, p. 2746-2750, 1999.

PEREIRA, M. M. Ecotoxicological effects of carbon nanotubes and cotton cellulose nanofibers in the green microalga *Chlorella vulgaris*. Journal of Nanobiotechnology, v. 12, n. 1, p. 15.

WANG, L. *et al.* DC humidity sensing properties of $BaTiO_3$ nanofiber sensors with different electrode materials. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 153, n. 2, p. 460-464, 2011.

ECOTOXICIDADE AQUÁTICA EM *CHLORELLA VULGARIS* DE MICRO E NANOPARTÍCULAS DE TITANATO DE BÁRIO

***Hudson C. Polonini[1], Roberta Brayner[2], Nádia R. B. Raposo[1], Ludovic Mouton[2], Claude Yéprémian[3], Alain Couté[3], Guilherme Nunes de Souza[4], Juliana Carine Gern[4], Humberto M. Brandão[4]**

[1]Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde, NUPICS, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. [2]Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, ITODYS, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, France. [3]Muséum National d'Histoire Naturelle, Département RDDM, USM 505, Paris, France. [4]Empresa 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
Duas partículas de titanato de bário (BT), da ordem micrométrica (~170 nm) e manométrica (~60 nm), foram avaliadas quanto ao seu impacto em ambientes aquáticos utilizando a alga verde *Chlorella vulgaris* como organismo-modelo. BT tem um efeito tóxico estatisticamente significativo no crescimento e na viabilidade celular de *C. vulgaris* desde 1 ppm, o que parece ser mediado por um estresse oxidativo induzido pelas próprias partículas ou pelos íons Ba^{2+} liberados no meio de cultura. BT foi capaz de estressar todos os organismos-teste, o que foi evidenciado pelo aumento na atividade da superóxido dismutase, pela diminuição da eficiência fotossintética e pela dimuição dos níveis intracelulares de ATP. O tamanho de BT parece não influenciar os efeitos produzidos sobre o crescimento dos microrganismos – embora a inibição do crescimento tenha sido pronunciada com o nanomaterial.
Palavras-chave: Nanoecotoxicologia aquática; Titanato de bário; *Chlorella vulgaris*.

AQUATICAL TOXICITY OF BARIUM TITANATE MICRO- AND NANOPARTICLES TO *CHLORELLA VULGARIS*

Abstract
Two particles of barium titanate (BT), micro- (~170 nm) and nanosized (~60 nm), were evaluated for their impact on aquatic environments using *Chlorella vulgaris* as model-organism. BT has a statistically significant toxic effect on cell growth and viability of *C. vulgaris*, from 1 ppm, which appears to be mediated by oxidative stress induced by the particles themselves or by Ba^{2+} ions released into the culture medium. BT was able to stress all test-organisms, which was evidenced by the increase in superoxide dismutase activity, decreased photosynthetic efficiency and the decreased intracellular ATP levels. The size of BT did not influence the effects on the growth of microorganisms - although growth inhibition has been more pronounced with the nanomaterial.
Keywords: Aquatic nanoecotoxicology; Barium titanate; *Chlorella vulgaris*.

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