

induzido pelas próprias partículas ou pelos íons  $Ba^{2+}$  liberados no meio de cultura; (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 diminuição 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

- 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.
- CHENG, W. *et al.* Single-walled carbon nanotube induction of rat aortic endothelial cell apoptosis: reactive oxygen species are involved in the mitochondrial pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 43, n. 4, p. 564-572, 2011.
- 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.
- 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.
- 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.
- SU, C. Y. *et al.* Grain growth and crystallinity of ultrafine barium titanate particles prepared by various routes. *Ceramics International*, v. 39, n. 6, p. 6673-6680, 2013.
- XIN, L. *et al.* Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 14, p. 5494-5500, 2010.

---

## ECOTOXICIDADE AQUÁTICA DE MICRO E NANOPARTÍCULAS DE TITANATO DE BÁRIO EM *EUGLENA GRACILIS*

\*Hudson C. Polonini<sup>1</sup>, Roberta Brayner<sup>2</sup>, Nádia R. B. Raposo<sup>1</sup>, Claude Yéprémian<sup>3</sup>, Alain Couté<sup>3</sup>, Juliana C. Gern<sup>4</sup>, Nívea M. Vicentini<sup>4</sup>, Humberto M. Brandão<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde, NUPICS, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. <sup>2</sup>Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, ITODYS, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, France. <sup>3</sup>Muséum National d'Histoire Naturelle, Département RDDM, USM 505, Paris, France. <sup>4</sup>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 nanométrica (~60 nm),

foram avaliadas quanto ao seu impacto em ambientes aquáticos utilizando a euglenófito *Euglena gracilis* como organismo-modelo. BT apresentou um efeito tóxico estatisticamente significativo ( $p < 0.05$ ) no crescimento e na viabilidade celular de *E. gracilis* desde 1 ppm, efeito relacionado à endocitose das partículas numa quantidade tal que levou a uma ruptura de suas membranas. BT foi capaz de estressar os organismos-teste, o que foi evidenciado pelo aumento na atividade da superóxido dismutase, pela diminuição da eficiência fotossintética e pela diminuição 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; *Euglena gracilis*.

## AQUATICAL TOXICITY OF BARIUM TITANATE MICRO- AND NANOPARTICLES TO *EUGLENA GRACILIS*

### Abstract

Two particles of barium titanate (BT), micro- (~170 nm) and nanosized (~60 nm), were evaluated for their impact on aquatic environments using *Euglena gracilis* as model-organism. BT has a statistically significant toxic effect on cell growth and viability of *E. gracilis*, from 1 ppm, related to the effect of endocytosed particles in such an amount that a rupture of their membranes was caused. 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; *Euglena gracilis*.

### 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

A exposição de nanomateriais em diferentes compartimentos ambientais (água, solo e ar) pode resultar na sua maior biodisponibilidade e acúmulo ao longo das cadeias alimentares. Neste contexto, a ecotoxicologia é uma ciência cujo cerne é estudar os contaminantes e seus efeitos sobre componentes da biosfera, incluindo seres humanos (NEWMAN; ZHAO, 2008).

Para tanto, os testes de toxicidade aquática são bastante utilizados porque tais ecossistemas constituem os principais receptáculos de contaminantes, quer sejam eles advindos de lançamento direto nos corpos d'água, através de descargas de efluentes, ou emitidos no ar ou depositados nos solos (KENDALL *et al.*, 2001). É recomendável que o efeito tóxico de uma amostra seja avaliado para diferentes espécies representativas da biota aquática, e neste estudo euglenófitas (*Euglena gracilis*).

As euglenófitas *E. gracilis* apresentam uma plasticidade metabólica notável, uma vez que podem comportar-se tanto como autotróficas e fotossintéticas (quando cultivadas na presença de luz, apresentando-se macroscopicamente na cor verde) quanto como heterotróficas (quando cultivadas no escuro, sendo neste caso incolor) (EINICKER-LAMAS *et al.*, 2002). No presente estudo, as culturas foram moduladas para terem um comportamento autotrófico. Além disso, elas possuem a capacidade de endocitar partículas e de se mover por meio de um flagelo, uma estrutura longa em forma de chicote (BRAYNER *et al.*, 2011).

O presente estudo focou nos estudos de ecotoxicidade 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 avaliar pela primeira vez o perfil ecotoxicológico de BT para a euglenófito *E. gracilis*, 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

*E. gracilis* (euglena eucariótica) foi proveniente da algoteca do *Muséum National d'Histoire Naturelle*. Suspensões-estoque contendo 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos pós (o chamado "nano" possui 60 nm de

diâmetro e o “micro” 170 nm) foram adicionadas às algas crescidas em Meio Mineral (MM) em concentrações finais de 1, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

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  $\mu\text{g mL}^{-1}$  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  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 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  $\times g$  (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific, EUA). Para a quantificação, foi utilizado 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  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 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  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 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  $\times g$  (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific, EUA), a fim de obter o ATP livre no sobrenadante. A concentração de ATP foi determinada através de uma curva analítica com concentrações conhecidas de ATP na faixa de  $2 \times 10^{-5}$  – 200  $\mu\text{M}$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a taxa de crescimento de *E. gracilis* 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. Um efeito muito pronunciado foi visto em *E. gracilis*, para a qual tanto BT MP quanto BT NP levaram a uma inibição significativa do crescimento ( $p < 0,05$ ) em todas as concentrações testadas e desde a primeira contagem de células, após 24 h de contato.

Quanto ao ensaio realizado para avaliar a viabilidade dos organismos, foi observado que *E. gracilis* exposta a BT apresentou uma diminuição da capacidade de excluir corante, ou seja, a diminuição na contagem foi acompanhada de diminuição na integridade membranal.

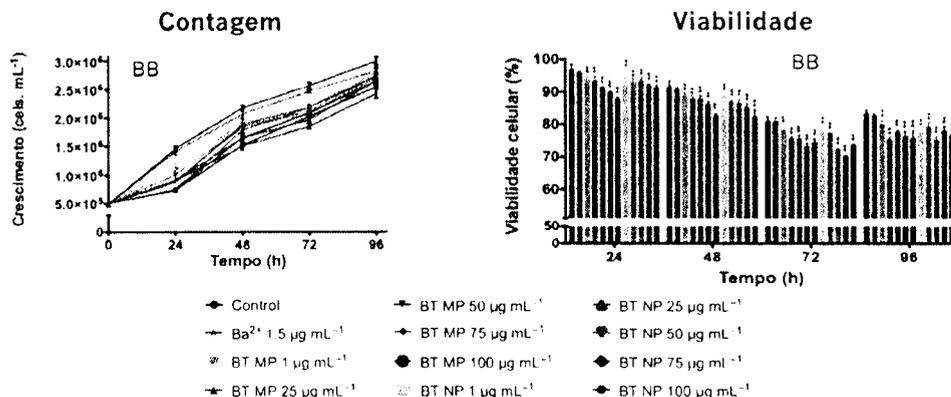


Figura 1. Contagem celular (esquerda) e viabilidade celular (direita) de *Euglena gracilis* em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário.

Microscopicamente, as imagens de MEV do controle de *E. gracilis* mostram células alongadas bem definidas com seus flagelos em forma de chicote. Os tratamentos, no entanto, diferem sobremaneira. Pode ser visto que as células expostas a ambas partículas são menores, com uma forma de peão, e sem flagelo visível. Isso acontece provavelmente por causa da endocitose das partículas de BT e também de outras substâncias contidas nos meios de cultura. As células realizaram endocitose num tal grau que a

membrana não pôde resistir e efetivamente se rompeu. As imagens de MET, por sua vez, mostram duas características principais: as nanopartículas de fato internalizadas por endocitose e um relevante aumento da produção de corpos de paramilo, um carboidrato semelhante ao amido. Estes corpos paramilo podem ser visualizados como bastões rígidos incolores ou brancos, e quando eles atingem uma concentração demasiado elevada para a célula manusear, as paredes celulares acabam por explodir. Neste sentido, MEV e MET foram complementares, ambos confirmando que a alta endocitose das partículas conduziu a uma superprodução de paramilo, o que causou a explosão e, conseqüentemente, a morte das células.

O efeito que as partículas causaram no estresse oxidativo foi também avaliado. Ambas partículas em todas as concentrações, exceto BT MP em  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , exerceram algum efeito sobre a atividade da SOD.

O aumento da produção de EROs também é conhecida por afetar a fotossíntese. Para *E. gracilis*, o efeito (diminuição da atividade) foi observado a partir da primeira hora para ambas as partículas e em ambos os meios.

Juntamente com a atividade da SOD, uma outra medição da atividade mitocondrial das células é o teor de ATP intracelular. Para *E. gracilis*, os efeitos foram vistos desde o primeiro dia. A queda no teor de ATP pode refletir uma diminuição na atividade mitocondrial, e assim as partículas de BT levaram a distúrbios no metabolismo energético dos organismos. Para as células eucarióticas de *Euglena*, a elevada atividade de endocitótica também desempenhou um papel na diminuição de ATP, uma vez que o processo de endocitose utiliza energia a partir do ATP, (DUKHIN *et al.*, 2001).

#### 4 CONCLUSÃO

Diante do exposto, as principais conclusões que se pode depreender deste estudo foram: (i) BT tem um efeito tóxico estatisticamente significativo no crescimento e na viabilidade celular de *E. gracilis* desde a menor concentração testada (1 ppm), efeito relacionado à endocitose das partículas numa quantidade tal que levou a uma ruptura de suas membranas; (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 diminuição 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. Polónini 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

- 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.
- BRAYNER, R. *et al.* Micro-algal biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 401, p. 581-597, 2011.
- 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.
- EINICKER-LAMAS, M. *et al.* *Euglena gracilis* as a model for the study of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environmental Pollution*, v. 120, n. 3, p. 779-786, 2002.
- 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.
- KENDALL, R. J. *et al.* *Ecotoxicology*. USDA National Wildlife Research Center-Staff Publications. p. 516, 2001.

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. Polonini<sup>1</sup>, Roberta Brayner<sup>2</sup>, Nádia R. B. Raposo<sup>1</sup>, Marcos Antônio F. Brandão<sup>1</sup>, Ludovic Mouton<sup>2</sup>, Yann Sivry<sup>3</sup>, Wanessa A. Carvalho<sup>4</sup>, Juliana C. Gern<sup>4</sup>, Humberto M. Brandão<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde, NUPICS, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. <sup>2</sup>Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, ITODYS, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, France. <sup>3</sup>Institute de Physique du Globe de Paris, IGGP, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, France. <sup>4</sup>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

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 Ba<sup>2+</sup> 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 Ba<sup>2+</sup> 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