

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DE NANO-TiO₂ EM PEIXES

Castro, V. L. de

Equipe e Instituições participantes: Zaira Clemente (IB - Unicamp), Claudio Jonsson (Embrapa Meio Ambiente), Leonardo Fracetto (Unesp - Sorocaba), Renata Lima (Uniso), Monica Moura (IB - APTA).

Problema abordado

A elucidação dos efeitos adversos de contaminantes a organismos ecologicamente relevantes faz-se necessária para a avaliação de risco ambiental, para o direcionamento das políticas públicas e para a determinação de limites permissíveis. Um dos materiais mais comumente utilizados em nanoproductos é o dióxido de titânio. Diversas nanopartículas de TiO₂(nano-TiO₂) têm sido produzidas atualmente (XIAOBO, 2009), com variações no tamanho das partículas, área de superfície, pureza, características de superfície, forma cristalina, reatividade química e outras propriedades. Muitos estudos mostram o uso potencial do nano-TiO₂ em processos de fotocatalise heterogênea, para degradação de compostos orgânicos e inorgânicos (CHATTERJEE; DASGUPTA, 2005; FUJISHIMA; ZHANG, 2006). O princípio da fotocatalise heterogênea envolve a ativação de um semicondutor por radiação solar ou artificial, gera espécies reativas de oxigênio (ROS) e encontra aplicabilidade principalmente na remediação de solo e águas contaminadas. As propriedades fotocatalíticas do nano-TiO₂ podem elevar seus efeitos tóxicos a organismos aquáticos em condições ambientais, e poucos estudos têm considerado isso. A realização de ensaios com nano-TiO₂ apresenta, então, diversas particularidades, como as propriedades fotocatalíticas e de absorção da radiação UV, o comportamento de agregação e sedimentação na água. Tem sido observada uma grande variabilidade de resultados na literatura com relação aos testes de ecotoxicidade do nano-TiO₂. Tal variabilidade pode ser decorrente de diferentes características dos nano-TiO₂ e aos desenhos experimentais. Por isso, tem-se discutido largamente a necessidade da caracterização apropriada das NPs estudadas, assim como a padronização dos

métodos de avaliação nanoecotoxicológica (HANDY et al., 2012). Em condições naturais, os organismos aquáticos estão expostos a diversos fatores como a radiação solar que muitas vezes não são incluídos nos bioensaios laboratoriais. De forma geral, as metodologias de avaliação de risco existentes atendem genericamente às necessidades de avaliação de risco das nanopartículas, mas com o enfrentamento de diversos questionamentos. O detalhamento para cada teste ou grupo de testes requer modificações e validações para tratar adequadamente cada nanomaterial com base nas suas características morfológicas / físico-química e do conhecimento de seus procedimentos de síntese. Nos bioensaios com organismos aquáticos, geralmente utilizam-se lâmpadas fluorescentes comuns para estabelecer o ciclo circadiano. Tais lâmpadas emitem basicamente luz visível, enquanto em condições naturais os organismos estão expostos à radiação solar (infravermelho, luz visível e ultravioleta). Devido à formação de ROS quando o TiO₂ é exposto à radiação UV, pode ocorrer manifestação ou aumento de seus efeitos tóxicos em organismos aquáticos em condições ambientais. Portanto, há necessidade de considerar estes fatores na avaliação e de padronizar o seu uso experimental.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição a diferentes concentrações de nano-TiO₂ sob diferentes condições de iluminação em organismos aquáticos, visando estabelecer a toxicidade deste nanocomposto através da avaliação de biomarcadores bioquímicos e genéticos e o desenvolvimento de protocolos experimentais nanoecotoxicológicos. Este estudo visou, portanto, obter informações sobre os potenciais riscos ecotoxicológicos de nano-TiO₂ estabelecendo para isso um modelo experimental de estudo da sua toxicidade em peixes (*Piaractus mesopotamicus* e embriões de *Daniorerio*) e microcrustáceos (*Daphniasimilis* e *Artemia salina*).

Principais contribuições científicas

Foram estudados dois produtos comerciais: Titanium IV oxide (Sigma Aldrich, 100% anatase, tamanho de partícula primária <25 nm, 99.7% pureza) e Aeroxide P25 (DegussaEvonik, 20% rutilo, 80% anatase, tamanho de partícula primária 25 nm, 50 m²/g, 99% pureza). Ambos os produtos apresentaram intensa agregação e precipitação, fazendo-se necessária a renovação diária dos meios de exposição. As medidas de Potencial Zeta ao longo do tempo das suspensões de nano-TiO₂ em água não indicaram boa estabilidade das partículas em suspensão. O pH da solução aquosa afeta o TiO₂, incluindo a carga das partículas, o tamanho dos agregados e a

posição das bandas de condução e de valência. As medidas de tamanho de partículas, por espalhamento dinâmico de luz (DLS) apresentaram boa qualidade apenas nas suspensões preparadas em água sem sal. A instabilidade das suspensões de nano-TiO₂ em água com sal foi confirmada através de espectrofotometria. Foi observada intensa agregação das nanopartículas em água onde os peixes foram testados por DLS. Para ambos os produtos, observou-se redução da absorvância da suspensão ao longo do tempo, sendo que no pico de absorvância, reduziu-se em 24 h a 4,8 % (Titanium IV Oxide) e 6,3 % (AeroxideP25) da inicial, indicando quase total precipitação das partículas. No que se refere à exposição dos organismos, tanto a suspensão das partículas por sonicação – que poderia mudar as características físicoquímicas das nanopartículas mas representaria a máxima chance de exposição bem como a falta de homogeneização do meio que representaria uma condição mais natural mas mais irregular de exposição dos organismos, são situações experimentais criticadas por diferentes grupos de pesquisadores.

Como organismos-teste, foram escolhidos o *Piaractus mesopotamicus* (pacu Caranha) que é uma espécie nativa representativa das regiões tropicais e amplamente cultivada na piscicultura além de microcrustáceos com condições experimentais padronizadas- *Daphnia similis* e *Artemia salina*. Foram também utilizados embriões de *Danio rerio* para a avaliação do desenvolvimento embrionário de peixes.

Para o estabelecimento da radiação ultravioleta (UV) em laboratório, foram utilizadas lâmpadas UVA340 Q-Panel (duas com embriões de peixe, daphnias e artemias e quatro com peixes adultos). Os animais foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12h no teste agudo com peixes e nos demais 16/8h claro/escuro. A exposição à UV, nos grupos correspondentes, ocorreu durante o período claro. Medidas da radiação solar em ambiente externo e em laboratório foram feitas através do espectroradiômetro.

Ao final do período de exposição foram analisados os biomarcadores bioquímicos relacionados a estresse oxidativo e metabolismo - atividade específica de catalase, superóxido dismutase, glutatona S-transferase, fosfatase ácida e Na/K- ATPase e níveis de metalotioneína, lipoperoxidação e carbonilação de proteínas no fígado dos peixes. Em peixe, foram também realizados testes de genotoxicidade (cometa e micronúcleo).

Em peixes, a exposição aguda mostrou um efeito da concentração de nano-TiO₂ Sigma Aldrich sobre a atividade da fosfatase ácida e um efeito da iluminação na carbonilação de proteínas. A exposição prolongada, entretanto, revelou um efeito da iluminação nas atividades da superóxido dismutase e da catalase, e um efeito da formulação de nano-TiO₂ (Titanium IV Oxide ou Aeroxide P25) sobre a atividade da glutatona S-transferase. A ocorrência de interação da formulação de nano-TiO₂ e

condição de iluminação foi também observada na carbonilação de proteínas, concentração de metalotioneína e indução de danos genéticos (ensaio cometa).

Os bioensaios com *D. similis* revelaram uma dependência da iluminação e da formulação de nano-TiO₂ na toxicidade aguda. A CE50_{48h} de Titanium IV Oxide e Aeroxide P25 sob luz visível foi >1000 mg/L, enquanto sob radiação UV a toxicidade de ambos os produtos foi elevada, sendo que o segundo (CE50_{48h} 60,16 mg/L) foi cerca de 10x mais tóxico que o primeiro (CE50_{48h} 750,55 mg/L). Avaliou-se também a toxicidade da combinação de UVA e UVB, e a DE50_{48h} correspondeu a 0,004 mW/cm² de UVB e 0,967 mW/cm² de UVA. No bioensaio de exposição aguda de daphnias ao nano-TiO₂, a dose estabelecida de UV total foi cerca de 20 vezes inferior a DE50_{48h} de exposição UV, e 265 vezes inferior à irradiância solar na primavera, havendo predomínio de UVA (100%).

No meio ambiente, as daphnias movimentam-se na coluna d'água, fazendo com que a dose de exposição à radiação UV varie conforme a profundidade e a qualidade da água. Assim, apesar da dose UV estabelecida ser muito inferior à radiação UV solar na superfície, pode ser comparável às doses reais no meio aquático, visto que a coluna d'água utilizada foi de apenas um cm. Os resultados indicaram que a exposição simultânea a níveis mínimos de radiação ultravioleta altera os parâmetros de toxicidade aguda em daphnia, mostrando inclusive que a toxicidade depende do produto avaliado. A *A. salina* se mostrou mais sensível à ação do nano-TiO₂ com a EC50_{48h} 4 mg/L para ambos os produtos, sob UV.

Por fim, foi avaliada a toxicidade das duas formulações de nano-TiO₂ em diferentes condições de iluminação, através de um modelo experimental atualmente proposta dentro do princípio dos 3Rs (refinamento de metodologias, redução e substituição de animais de experimentação)(DE ESCH et al., 2012). O teste com embriões de peixe (FishEmbryoTest, FET) vem sendo empregado na ecotoxicologia, já que seus resultados apresentam forte correlação com testes de toxicidade aguda com peixes adultos (Knobel et al., 2012). Os embriões de peixe (*Daniorerio*) foram expostos durante 96 h a diferentes concentrações das duas formulações de nano-TiO₂, nas condições de iluminação testadas. Foram avaliados parâmetros de toxicidade aguda e de efeitos subletais, como sobrevivência, malformação, eclosão, equilíbrio, comprimento total das larvas e biomarcadores bioquímicos (atividade específica de catalase, glutatona S-transferase e fosfatase ácida). Ambas as formulações aceleraram a eclosão das larvas. Sob radiação UV, observou-se maior mortalidade de larvas nos grupos expostos a combinação das duas fases cristal do que a fase anatase. A exposição ao Aeroxide P25 sob radiação UV provocou alteração de equilíbrio nas larvas. Alterações nas atividades de CAT e GST indicam ocorrência de

estresse oxidativo, porém não foi observada uma clara relação concentração-resposta. O estudo indica diferentes efeitos nos biomarcadores, de acordo com o produto e a condição de iluminação testada. Em especial, a atividade de fosfatase ácida, glutathione S-transferase, catalase, e os níveis de metalotioneína, proteínas carboniladas e de dano genético apresentaram resposta às condições de estudo. Em embriões de peixe, foram particularmente interessantes a avaliação do tamanho corporal, bem como da taxa de eclosão e da presença de alteração de equilíbrio. As atividades de Na^+/K^+ -ATPase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e os níveis de lipoperoxidação não apresentaram respostas evidentes frente às condições de estudo. Os bioensaios com microcrustáceos e embriões de peixes apresentaram maior sensibilidade, praticidade e economia de recursos com relação aos bioensaios com peixes juvenis.

Assim, é necessária a padronização dos protocolos de estudos nanoecotoxicológicos, para melhor compreensão e avaliação dos riscos da nanotecnologia. Para tal padronização, é necessária a compreensão de todos os fatores envolvidos no comportamento e efeitos de cada formulação de nanopartículas. Por fim, o estudo contribuiu para a compreensão dos fatores envolvidos no caso do nano-TiO₂ mostrando que a toxicidade deste, além do organismo teste, depende também das condições de iluminação, do produto testado e tempo de exposição.

De forma sucinta, as principais contribuições deste projeto foram:

- O estudo contribuiu para a compreensão dos fatores envolvidos com a exposição ao nano-TiO₂ mostrando que além do organismo teste, a sua toxicidade depende das condições de iluminação, do produto testado e tempo de exposição.
- Os resultados ressaltam a necessidade de adaptação dos protocolos de avaliação nanoecotoxicológica e fornecem informações para o desenvolvimento de protocolos que visam estudar substâncias cuja toxicidade seja afetada pelas condições de iluminação e propriedades fotocatalíticas.
- É necessária a padronização dos protocolos de estudos nanoecotoxicológicos, para melhor compreensão e avaliação dos riscos da nanotecnologia.

Impactos sociais, econômicos e ambientais

Este trabalho fornece informações para o desenvolvimento de protocolos que objetivam estudar substâncias cuja toxicidade seja afetada pelas condições de iluminação e propriedades fotocatalíticas. Os resultados exaltam a necessidade de adaptação dos protocolos de avaliação ecotoxicológica para estudos de nanoecotoxicologia para o qual o comportamento das partículas nos meios de exposição e as propriedades fotocatalíticas devem ser levados em consideração. Além

de melhorar a compreensão da toxicidade nano-TiO₂, os resultados demonstraram a importância de se considerar as condições experimentais nos testes nanoecotoxicológicos.

Referências

CHATTERJEE, D.; DASGUPTA, S. Visible light induced photocatalytic degradation of organic pollutants. **Journal of Photochemistry and Photobiology C. Photochemistry Reviews, Amsterdam**, v. 6, p. 186–205, 2005.

DE ESCH, C.; SLIEKER, R.; WOLTERBEEK, A.; WOUTERSEN, R.; DE GROOT, D. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review. **Neurotoxicology and Teratology, Oxford**, v. 34, p. 545–553, 2012.

FUJISHIMA, A.; ZHANG, X. Titanium dioxide photocatalysis: present situation and future approaches. **Comptes Rendus Chimie, Amsterdam**, v. 9, p. 750–60, 2006.

HANDY, R. D.; CORNELIS, G.; FERNANDES, T.; TSYUSKO, O.; DECHO, A.; SABO-ATTWOOD, T.; METCALFE, C. STEEVENS, J. A. KLAINE, S. J.; KOELMANS, A. A.; HORNE, N. Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: practical experiences and recommendations from the bench. **Environmental Toxicology and Chemistry, New York**, v. 31, p. 15–31, 2012.

XIAOBO, C. Titanium dioxide nanomaterials and their energy applications. **Chinese Journal of Catalysis, Amsterdam**, v. 30, p. 839–851, 2009.

Agradecimentos - Apoio Financeiro – Fapesp, Rede AgroNano, Capes