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.

1 INTRODUÇÃO

O titanato de bário ($BaTiO_3$, BT) é um óxido branco do tipo perovskita tradicionalmente conhecido por ser um material semicondutor/ferroelétrico com notável constante dielétrica e, portanto, alta empregabilidade no campo da eletrocerâmica (SU *et al.*, 2013).

Não obstante, a introdução efetiva de BT em nanoescala na indústria e nas rotinas de laboratório trouxe novas aplicações em medicina para tal material. Ciofani e colaboradores descreveram sua utilização como nanocarreador intracelular para proteínas e fármacos de baixo peso molecular, tais como doxorrubicina (CIOFANI *et al.*, 2010). Ainda em 2010, a segunda aplicação do nanosistemas de BT focou na bioconjugação de nanocristais de BT com anticorpos imunoglobulina G (IgG) para sondas de imagem (HSIEH *et al.*, 2010). Mais recentemente, Ball e colaboradores (2014) investigaram o potencial de BT em medicina regenerativa. Espumas com porosidade entre 50 e 70%, com tamanho médio de partícula igual a 30 nm de diâmetro foram sintetizadas e avaliadas para aplicações ortopédicas.

Porém, além de não haver na literatura dados de biocompatibilidade em longo prazo, 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 alga verde *Chlorella vulgaris*, 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

C. vulgaris (alga verde planctônica eucariota, uni-celular) 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, 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 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 através de uma curva analítica com concentrações conhecidas de ATP na faixa de $2 \times 10^{-5} - 200\ \mu M$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a taxa de crescimento de *C. vulgaris* 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. Como a resposta do sistema é a redução do crescimento das células expostas, pode ser inferido que tanto BT MP e BT NP foram tóxicos para *C. vulgaris* em BB, em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$), embora pareça

que este efeito aumenta com a concentração. No entanto, este efeito foi observado desde o primeiro determinação de contagem de células (24 h).

Quanto ao ensaio realizado para avaliar a viabilidade dos organismos, foi observado que *C. vulgaris* exposta a BT apresentou uma diminuição da capacidade de excluir corante, embora as menores concentrações de BT MP (1-50 μg mL^{-1}) parecem não afetar a integridade da membrana, independentemente do tempo de exposição, enquanto BT NP afetou este parâmetro em todas as concentrações.

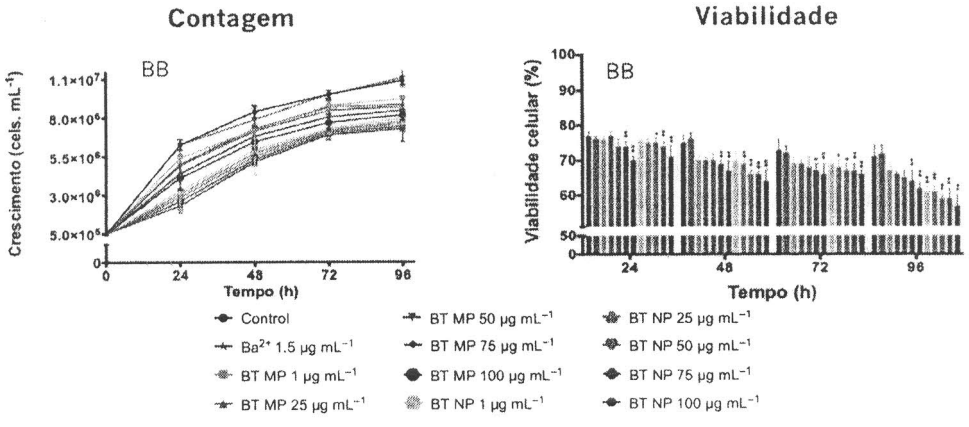

Figura 1. Contagem celular (esquerda) e viabilidade celular (direita) de *C. vulgaris* em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário.

Pôde ser observado por Microscopia Eletrônica de Varredura que não há nenhuma partícula de BT MP ou BT NP adsorvido pelas membranas de algas, e pelas análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão que não há nenhuma partícula detectável no interior de vesículas celulares. Ao contrário, o que pode ser observado é a formação de agregados de partículas grandes e compactos dentro das culturas, circundando as células, mas sem contato direto. As imagens mostraram que as células expostas produziram um material de tipo goma, que não foi observado nos controles. Estudos anteriores já detectaram este fenômeno, relacionado com a capacidade das células de *C. vulgaris* de produzir um polímero de alto peso molecular composto de moléculas de açúcar conhecido como exopolissacarídeo (EPS) como uma forma de proteção adaptativa. Este EPS não só impediu o contato direto das partículas com as células, mas também propiciou a formação de agregados de partículas inertes cercando as algas, o que impediu a internalização de partículas.

O efeito que as partículas causaram no estresse oxidativo foi também avaliado. Quando se olha para a taxa de inibição da atividade da SOD em *C. vulgaris*, pode ser visto que não diferiram dos controles em meio BB. Após 48 h, houve um ligeiro aumento na atividade, mas nenhuma das concentrações testadas foram estatisticamente superiores ao respectivo controle. A atividade aumentada de SOD pode ser um reflexo de uma maior exposição/produção de EROs que, por sua vez, está associada com a ativação da apoptose das células através da mitocôndria (CHENG *et al.*, 2011). Neste sentido, a mortalidade mais elevada observada em ARS pode estar ligada ao aumento da atividade da SOD – ou seja, a toxicidade pode ter ocorrido por meio de exposição a EROs gerado pelo BT. À medida em que as partículas conduziram à formação de grandes agregados de partículas em torno das algas, pode ser esperado que este causou uma diminuição na disponibilidade de nutrientes necessários para o crescimento de algas, porque o seu transporte pela membrana celular foi perturbado – e mesmo a disponibilidade de luz poderia ser ameaçada por estes grandes agregados metálicos – o que, em certa medida, poderia ter submetido as células ao estresse, levando ao aumento na produção de EROs (XIN *et al.*, 2010).

O aumento da produção de EROs também é conhecida por afetar a fotossíntese. De fato, a atividade fotossintética de *C. vulgaris* foi reduzida, porém somente após 96 h, para BT NP. Ainda, o teor de ATP foi encontrado diminuído após 48 h de exposição à concentração mais elevada de BT MP (> 100 μg mL^{-1}, e após 72 h em todas as concentrações) e todas as concentrações de BT NP.

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 *C. vulgaris* desde a menor concentração testada (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; (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

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[1], Roberta Brayner[2], Nádia R. B. Raposo[1], Claude Yéprémian[3], Alain Couté[3], Juliana C. Gern[4], Nívea M. Vicentini[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),