

Caracterizarea nanoparticulelor de ZnO in vederea evaluării riscurilor asupra mediului și calității vietii

**A.Bragaru, M. Kusko, E. Vasile*, M. Simion, M. Danila, T. Ignat, I. Mihalache, R. Pascu, F. Craciunoiu
Diana Savu****

Laboratorul de Nanobiotehnologii, IMT Bucuresti, Romania

e-mail: adina.bragaru@imt.ro

* UPB Bucuresti

** IFIN-HH Magurele



FP7 Engineered Nanoparticles Risk Assesment (ENPRA) (2009-2012) (www.enpra.eu) :

Evaluarea riscului NPs presupune expunerea si identificarea pericolelor, hazardului !

Principalele componente ale evaluarii riscului:

- identificarea pericolului (hazardului) (hazard identification)
- evaluarea raspunsului in functie de doza (dose-response assesment)
- expunerea riscului (risk exposure)
- evaluarea si managementul riscului (risk and management assesment)

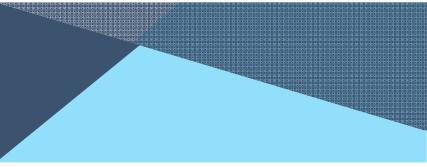
Primul pas: o analiza mai in detaliu pentru fiecare tip de NPs, in functie de aplicatia dorita (Fubini et al. Nanotoxicology 4, (2010) 347-363) :

- dimensiunea/forma (distributia de dimensiune);
- aria suprafetei;
- cristalinitatea;
- proprietatile electrice;
- compozitia chimica – reactivitatea suprafetei, grupele functionale de la suprafata, gradul de stabilitate;
- solubilitatea si gradul de aglomerare;

Urmatorul pas: evaluarea riscurilor expunerii NPs prin efectuarea testelor de toxicologie *in vitro* (S. Arora et al., Toxicology and Applied Pharmacology 258 (2012) 151-165)

- studiu pulmonar, renal, hepatic, cardio-vascular, urmarindu-se:
 - stresul oxidativ;
 - genotoxicitatea;
 - apoptoza;
 - hemoliza;
 - etc;





Studii privind evaluarea gradului de toxicitate al ZnO-NPs s-au efectuat pe diferite dimensiuni, *DAR există încă probleme nerezolvate referitoare la influența dimensiunilor mici de NP (5-10 nm) asupra toxicității* ([Lin et al., J Nanopart Res 11 \(2009\)25–39](#))

Scopul acestui studiu – **de a caracteriza proprietatile fizico-chimice ale ZnO-NPs cu dimensiuni < 10 nm, și de a studia gradul de stabilitate al dispersiilor formate din aceste NPs**, primele etape pentru viitoarele studii de toxicologie ([Jiang et al., J Nanopart Res 11 \(2009\)77–89](#))

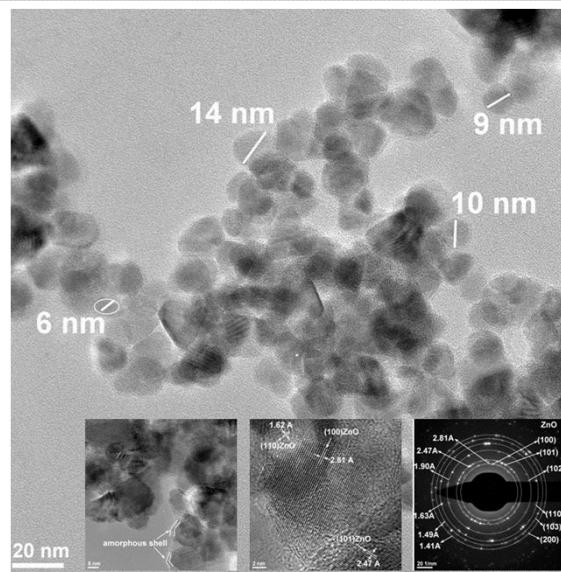
ZnO-NPs – denumirea comercială Zincox™, de la Nanogate AG, companie parteneră în proiectul **FP7 Project NanoSustain (2010-2013)**



Caracterizarea nanoparticulelor

Caracterizare morfologica

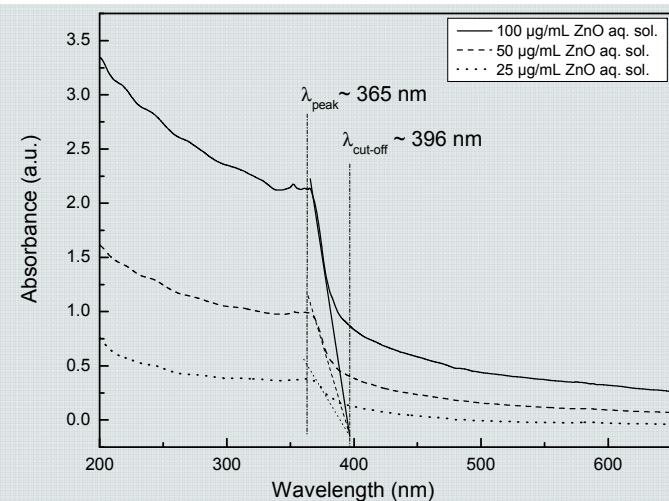
Dimensiunea medie: 8.5-10 nm



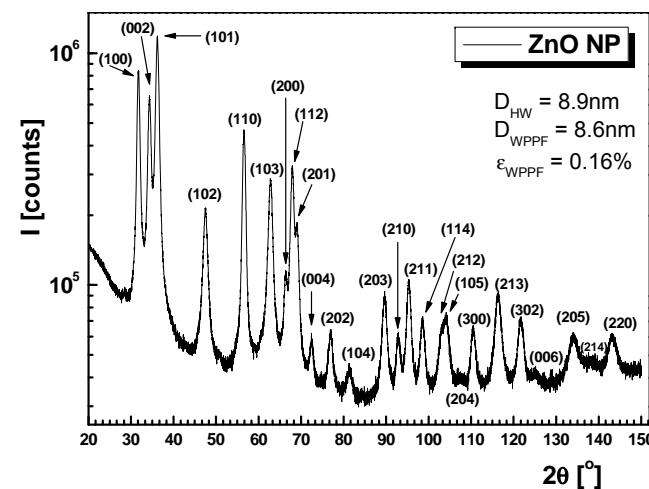
Corelare buna a rezultatelor masuratorilor :

- spectroscopie UV-Vis - 7.8 nm
- SEM - 8.5-10.0 nm
- TEM - 6-14 nm
- XRD - 8.6-9.5 nm

Determinarea proprietatilor optice - spectroscopia UV-Vis



Determinarea structurii cristaline - XRD

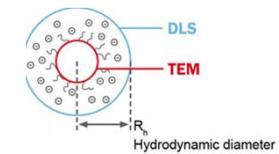


D Scherer eq=9.5 nm

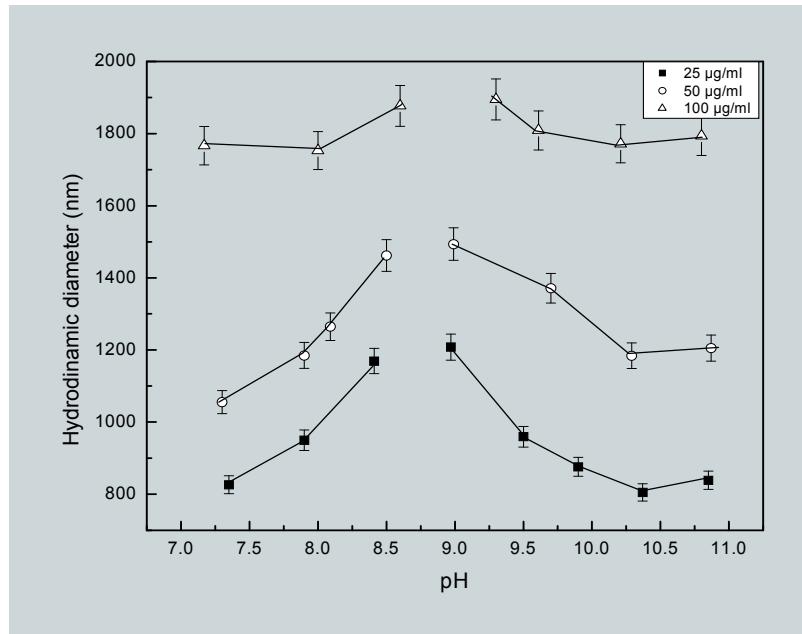


Evaluarea gradului de stabilitate a dispersiilor de ZnO-NPs

Diametrul hidrodinamic (d_h) și potentialul zeta (ζ) – prima etapa în evaluarea efectelor asupra mediului și sănătății umane – înaintea studiilor *in vitro* și *in vivo* (Murdock et al. 2008)



Dispersii apoase de ZnO-NPs

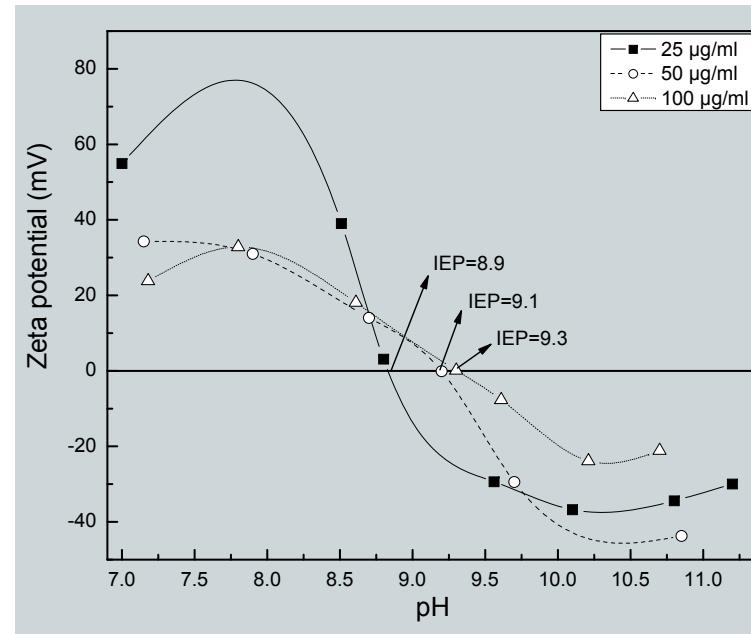


Cresterea concentratiei → Cresterea d_h

Concentratie (µg/ml)	PDI
25	0.465
50	0.483
100	0.580



Valorile max ale d_h – în apropierea IEP, unde apar aglomerări



pH 7-9, ζ valori pozitive → $Zn(OH)^+$

pH 9.5-11.5, ζ valori negative → $Zn(OH)_4^-$ și $Zn(OH)_4^{2-}$

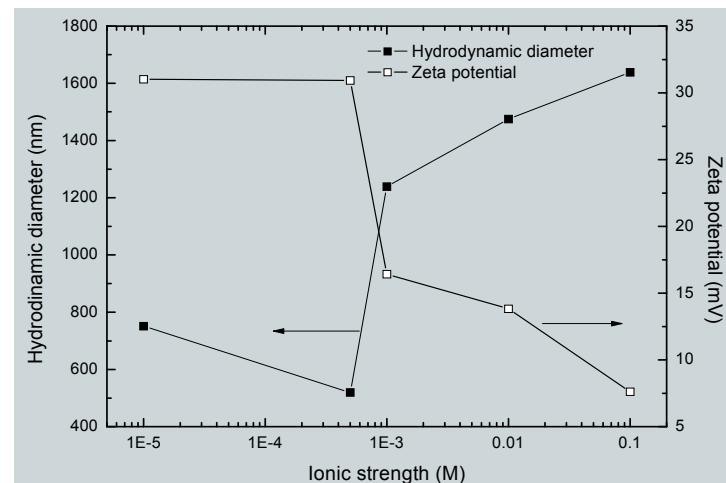
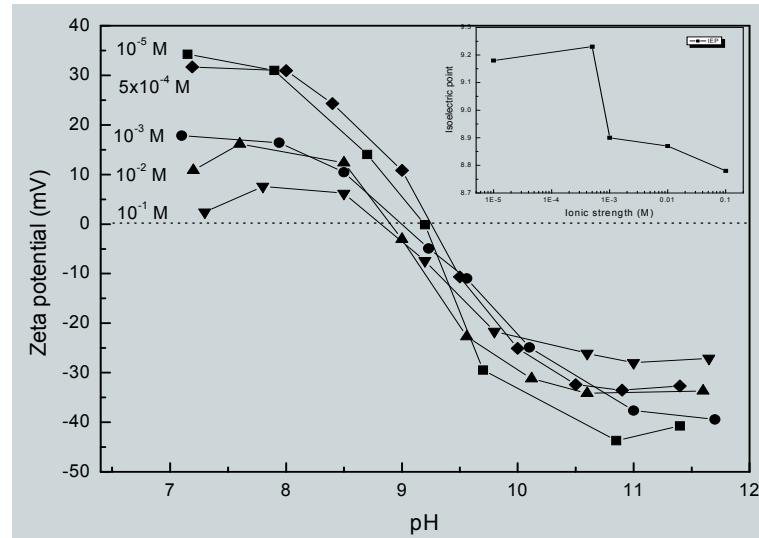
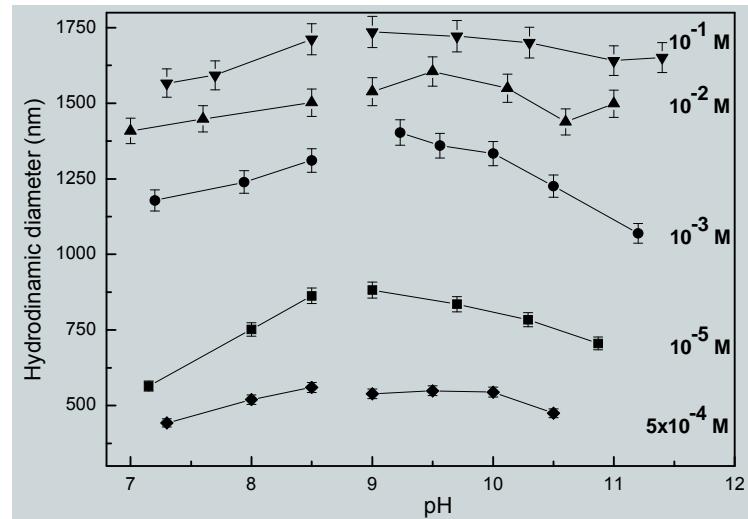
$pH \neq IEP \rightarrow d_h$ - scade
 ζ - creste

cresterea [ZnO] → ζ scade



Evaluarea efectului cresterii tariei ionice asupra stabilitatii dispersiilor

Influenta concentratiei si pH-ului asupra d_h si ζ in momentul cresterii tariei ionice (IS) (5×10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} si 10^{-1} M NaCl)



Variata d_h si ζ cu IS la pH 8 si 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ZnO-NPs

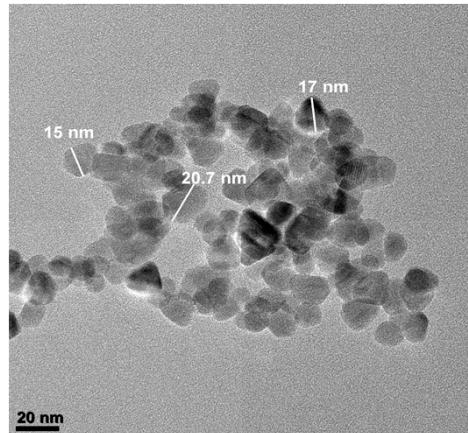
Ionic strength (M)	Hydrodynamic diameter			Zeta potential (mV)
	d_h (nm)	PDI	Average error %	
10^{-5}	751.6	0.165	0.3	31.01
5×10^{-4}	519.6	0.254	5.5	30.93
10^{-3}	1239.3	0.320	1.8	16.42
10^{-2}	1475.3	0.335	4.1	13.83
10^{-1}	1638.4	0.450	2.5	7.62



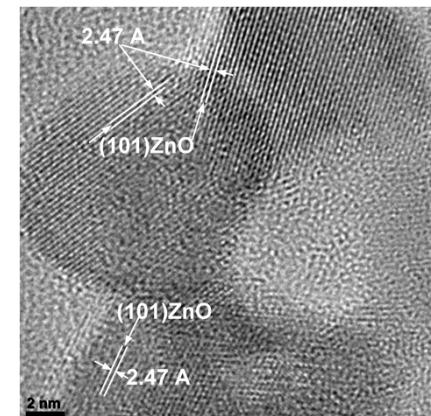
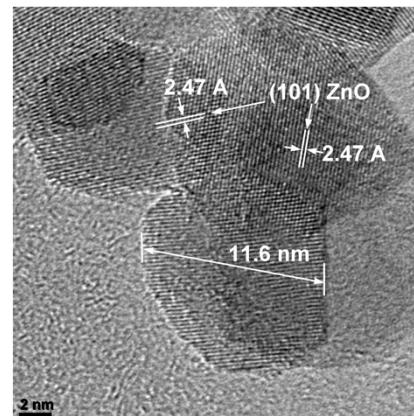
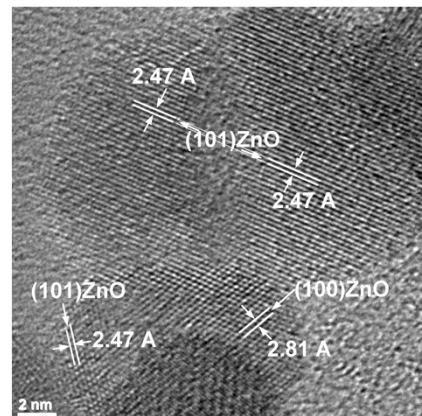
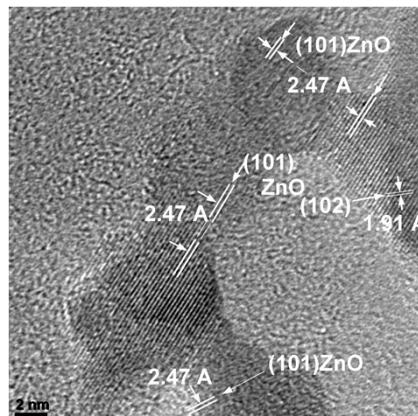
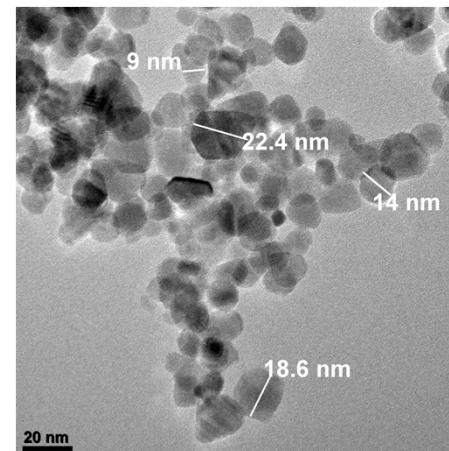
Investigarea morfologica privind efectul cresterii tariei ionice asupra stabilitatii dispersiilor

Procesul de agregare – intre ZnO-NPs disperse in sol NaCl

10^{-3} M NaCl



10^{-1} M NaCl



Forma se schimba, ZnO-NPs – forma poliedrica



Concluzii

! Analiza rezultatelor privind ZnO-NPs sub forma de pulbere si dispersie – diametrele hidrodinamice masurate pentru fiecare concentratie preparata - sunt de 10 ori mai mari decat cele ale pulberilor

Explicatia: formarea de specii instabile $Zn(OH)_2$ si $Zn(OH)_3^-$ $Zn(OH)_4^{2-}$

! Rezultatele indica influenta puternica pe care o exercita mediul de dispersie/taria ionica asupra gradului de stabilitate al ZnO-NPs, analiza cat mai completa a acestora putand asigura un control privind dozajul in timpul testelor de bio-toxicitate



Studii de toxicitate asupra efectelor biologice induse de ZnO-NPs

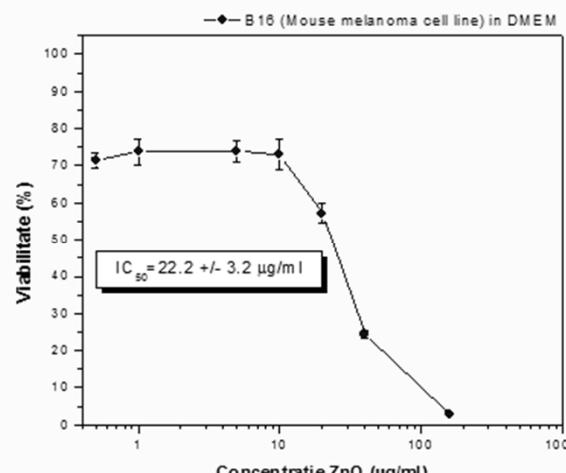
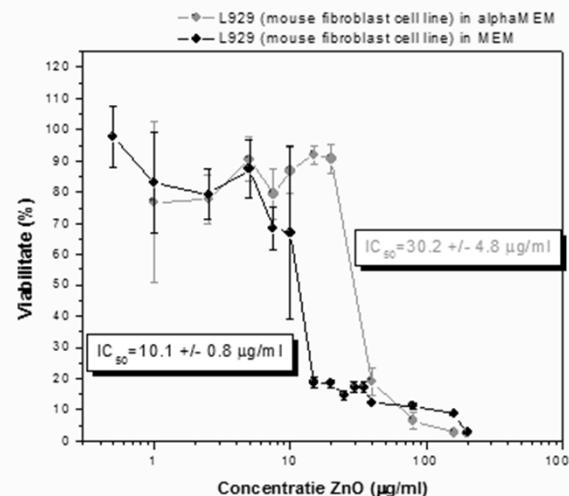
Prepararea probelor pentru experimentele in vitro: pulberea ZnO – suspendata in ser fiziologic (2 mg/ml); sol stoc – 30 min dispersare in baie de apa cu ultrasunete si 15 min autoclavate la 121°C; [ZnO] = 200-0.5 µg/ml in MEM, αMEM, DMEM cu 10 si 20% FCS

2 linii celulare: fibroblaste de soarece (L929) si celule melanoma de soarece (B16)

Medii de cultura: (i) L929 - αMEM cu 2 mM Glutamina+20%FCS si MEM cu 2 mM Glutamina+10%FCS (ii) B16 - DMEM + 10%FCS.

In toate mediile de cultura folosite s-a adaugat streptomicina 100µg/ml si penicilina 100 unitati/ml.

Testul MTS (determinarea viabilitatii celulare) si testul de supravietuire clonoqenica



-pentru melanoma B16, curba doza-efect se situeaza in acelasi domeniu de valori ca si L929, cu IC₅₀ de 22.2 µg/ml.
- in conditiile experimentale folosite in acest studiu, nu putem trage o concluzie relativa la sensibilitatea semnificativ diferita a celulelor cancerioase in comparatie cu celulele normale atunci cand sunt expuse la ZnO-NPs.

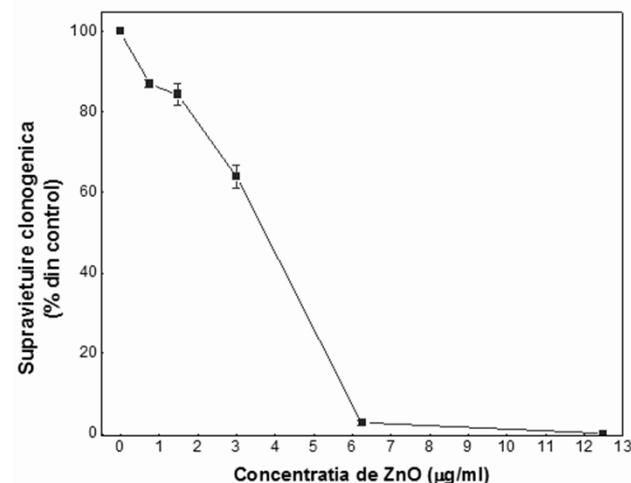
- modificari morfologice si inhibarea viabilitatii, relatia doza-efect de tip logaritmnic;
- Concentratia medie letala (IC₅₀) calculata pentru ZnO-NPs - 10.1 µg/ml pentru L929 crescute in MEM cu 10%FCS si 30.2 µg/ml pentru celulele crescute in αMEM cu 20%FCS

Suplimentarea mediului de cultura cu un procent mai mare de ser fetal are un efect de protectie impotriva efectului citotoxic indus de nanoparticule.



Testul de supravietuire si proliferare colonogenica

- abilitatea unei singure celule de a se divide si a produce o colonie



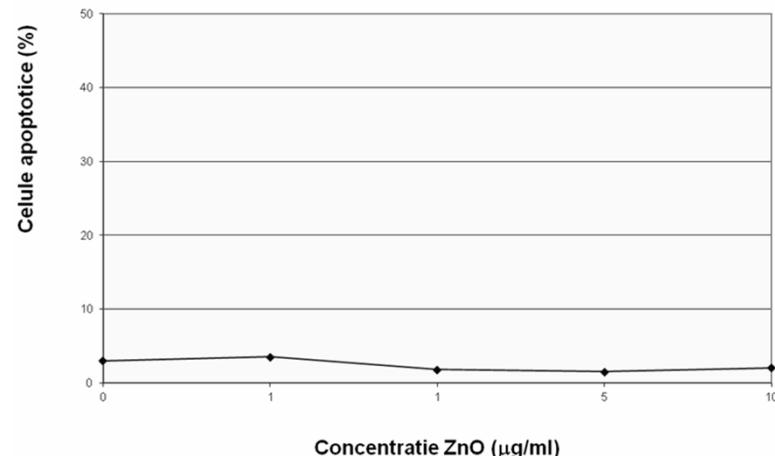
Efectul expunerii la ZnO-NPs asupra integritatii reproductive (formare de colonii) a celulelor L929; Punctele reprezinta numarul de colonii gasite dupa 8 zile de expunere la ZnO

Pentru celulele L929 - deteriorare semnificativa a integratii reproductive a celulelor odata cu cresterea dozei de ZnO-NPs dupa 8 zile

Doza de 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - pierderea totala a capacitatii reproductive a celulelor dupa 8 zile de incubare cu ZnO-NPs

Masurarea gradului de apoptoza indus de incubarea celulelor cu nanoparticule

celulele L929 marcate si analizate prin microscopie de fluorescenta s-au dovedit a fi viabile



Celule apoptotice L929 in MEM induse dupa 20 de ore de incubare in prezenta de ZnO-NPs

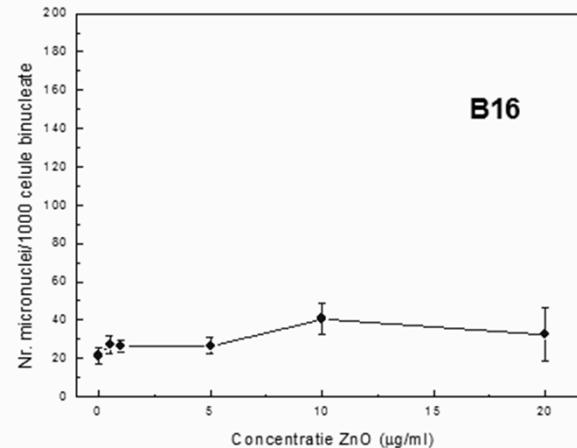
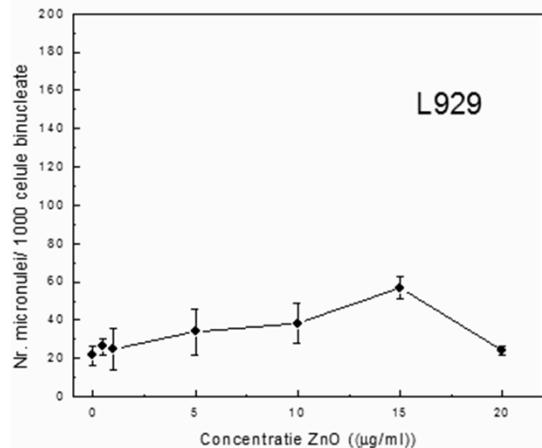
- in domeniul de doze $< 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ nivelul de celule apoptotice indus este neglijabil, apoptoza astfel pare sa nu fie unul dintre mecanismele de inducere a toxicitatii
- Pentru concentratii mai mari de ZnO nu s-a mai putut pune in evidenta apoptoza cu metoda folosita in experiment



16 mai 2013

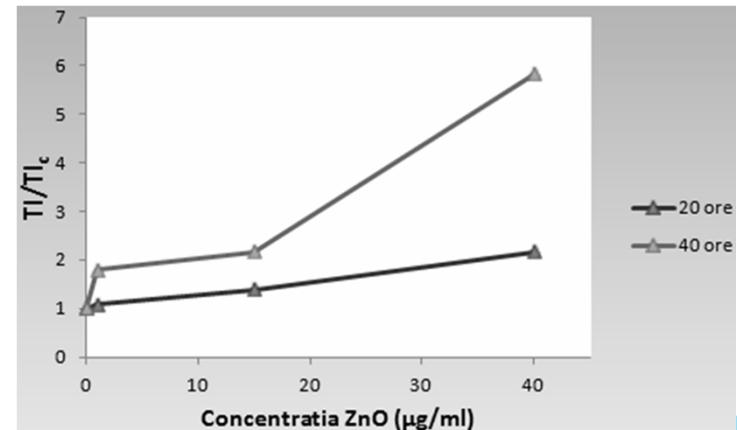
Evaluarea genotoxicitatii induse de nanoparticulele de ZnO

- Genotoxicitatea indusa de ZnO-NPs asupra celulelor L929 a fost testata prin metodele cometei alcaline si formarea de micronuclei;
- ZnO-NPs nu induc o alterare semnificativa a ADN-ului prin cresterea nivelului de micronuclei formati, neexistand o dependenta a numarului acestora de timp, in domeniul 0.5 – 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$;



Determinarea genotoxicitatii prin masurarea nivelului de micronuclei la celule L929 si B16
incubate 20h cu ZnO-NPs

In cazul testului cometei - rezultatele - un efect de inducere a deteriorarii ADN-ului intr-o maniera dependenta atat de concentratia ZnO-NPs cat si de timpul de incubare in prezena acestora. Diferente semnificative apar la 40 de ore de expunere



Concluzii

- !**
 - toxicitatea nanoparticulelor studiate pare sa nu fie indusa prin apoptoza
 - parametrul supravietuire clonogenica evidentaiza un efect puternic de scadere a capacitatii proliferative cu doza de expunere

- !**
 - Monitorizarea viabilitatii a doua tipuri de celule (L929 si B16) prin testul MTS indica un efect citotoxic dependent atat de doza cat si de timpul de expunere la ZnO-NPs

- !**
 - Sunt necesare experimente suplimentare pentru o adaptare mai buna a metodologiilor folosite in acest studiu la caracteristicile dispersiilor de nanoparticule pentru care se urmareste raspunsul toxic



Va multumesc!

adina.bragaru@imt.ro

Acknowledgement

Aceste studii au fost realizate cu sprijinul proiectului finantat de Uniunea Europeana FP7/2001-2013
NanoSustain - Development of sustainable solutions for nanotechnology based products based on hazard characterization and LCA

Multumiri Dr. Adrian Dinescu pentru caracterizarea SEM

A. Bragaru, M. Kusko, E. Vasile, M. Simion, M. Danila, T. Ignat ,I. Mihalache, R. Pascu, F. Craciunoiu, *Analytical characterization of engineered ZnO nanoparticles relevant for hazard assessment*, J Nanopart Res (2013) 15:1352, DOI 10.1007/s11051-012-1352-0

