



## AVALIAÇÃO, *IN VIVO*, DA TOXICIDADE GENÉTICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

Christine Melgarejo Lences<sup>1</sup>  
Tatiane Rocha Cardozo<sup>2</sup>  
Rafael Rodrigues Dihl<sup>3</sup>

### Resumo

Com o aumento da utilização da nanotecnologia na indústria e a dispersão das nanopartículas no ecossistema, é essencial que haja uma avaliação da segurança dos mesmos, avaliando seu potencial toxicológico. Nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) estão sendo usadas em todo o mundo em produtos de consumo e aplicações industriais. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade e genotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) no teste SMART em *Drosophila melanogaster*. Os resultados preliminares apontaram para a redução na porcentagem de sobrevivência das larvas expostas às maiores concentrações das nanopartículas de ZnO. Os resultados referentes a avaliação genotóxica demonstraram um aumento significativo na frequência de clones mutantes nas asas das moscas expostas a concentração de 1,2 mg/mL. A genotoxicidade observada pode estar relacionada com a formação de espécies reativas de oxigênio induzidas pelas nanopartículas de ZnO.

Palavras chave: Nanomateriais, SMART, *Drosophila melanogaster*, genotoxicidade.

### INTRODUÇÃO

A investigação sobre segurança em nanotecnologia necessita de pesquisas com uma visão multidisciplinar. Cada vez mais, diferentes ramos na indústria têm utilizado produtos com adesão de nanomateriais manufaturados que entram no ambiente por vários meios, podendo interagir facilmente ao nível celular, por causa das suas características nanométricas (DAUGHTON, 2004; MOORE, 2006).

Para o entendimento dos mecanismos biológicos, que originam o potencial de toxicidade, é importante avaliar as características físico-químicas dos nanomateriais. A caracterização, incluindo a distribuição de tamanho, forma, área superficial, cristalinidade, porosidade, estado de aglomeração, carga superficial, solubilidade e a correlação entre as propriedades físico-químicas e os efeitos biológicos são fundamentais para o entendimento da toxicidade associada às nanopartículas (NPs) (LI et al., 2008). Diversos modelos biológicos têm sido propostos para avaliar a toxicidade dos nanomateriais. Tanto ensaios *in vitro* como *in vivo* têm sido amplamente utilizados.

Magdolenova et al. (2013) revisaram diferentes ensaios genotóxicos que avaliaram o potencial das NPs ao interagir com diferentes linhagens celulares. Entre os ensaios mais relatados na literatura destacam-se o ensaio cometa, micronúcleos, aberrações cromossômicas e o teste de Ames. Em todos estes ensaios, a avaliação do tempo de exposição e a relação dose-resposta com as NPs são essenciais para a avaliação toxicológica.

---

1 Aluno do curso de Ciências Biológicas da ULBRA – Bolsista PIBITI/CNPq – christinelences@live.com

2 Aluno do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde — tatiane.cardozo@gmail.com

3 Professor dos cursos de Ciências Biológicas e Biomedicina e do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – rafael.rodrigues@ulbra.br

Nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) estão sendo usadas em todo o mundo em produtos de consumo e aplicações industriais. As NPs de ZnO têm alto índice de refração e brilho, sendo regularmente utilizadas como pigmentos de clareamento e apresentam propriedades específicas que permitem a aplicação em produtos comerciais, tais como tintas e agentes de branqueamento nos produtos alimentares. Suspensões de NPs de ZnO, por sua estrutura, são amplamente utilizadas em cosméticos, cuidados com a pele e produtos de proteção solar.

As NPs de ZnO têm sido relatadas em alguns trabalhos por seu potencial citotóxico e genotóxico em células eucarióticas (SHARMA et al., 2009, Osman et al., 2010). Sharma et al. (2012) investigaram o potencial genotóxico das NPs de ZnO em células de fígado humano, HepG2. Os resultados desse trabalho mostraram que houve genotoxicidade dependente do tempo de exposição no ensaio cometa. NPs de ZnO foram capazes de atrasar o desenvolvimento dos embriões de *Danio rerio*, diminuindo a sua sobrevivência e eclosão, causando danos nos tecidos. Outro estudo, utilizando diferentes organismos aquáticos, verificaram efeitos tóxicos quando expostos a NPs de ZnO para *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Tamnocephalus platyuru* (HEINLAAN et al., 2008).

Considerando a escassez de estudos in vivo sobre a toxicidade genética de NPs de ZnO, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico destas NPs através do teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*.

## METODOLOGIA

### Materiais Nanoestruturados - NMS

As NPs foram sintetizadas no laboratório de Materiais Nanoestruturados - Departamento de Engenharia e Energias Renováveis da Universidade Federal dos Pampas (UNIPAMPA), Campus Bagé- RS, pelos professores colaboradores Dr. Allan Seeber e Dr. Wladimir Flores. As nanoestruturas de Óxido de Zinco tiveram suas rotas de síntese pré-definidas pelos professores.

### Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*

O Teste SMART de asa baseia-se na identificação de pelos com fenótipos mutantes que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões em nível de DNA. Tais alterações são primordialmente induzidas nas células dos discos imaginais que, por inúmeras divisões mitóticas, darão origem às asas dos adultos com seus pelos ou tricomas. Os tricomas mutantes organizam-se em manchas, com fenótipos característicos, que indicam a ocorrência de eventos genéticos relacionados com mutações pontuais, aberrações cromossômicas e rearranjos estruturais devidos à recombinação mitótica (ANDRADE et al., 2004).

### Cruzamentos de *Drosophila melanogaster*

Nesta abordagem experimental foi empregado tanto o cruzamento padrão, no qual fêmeas virgens *flr*<sup>3</sup> serão cruzadas com machos *mwh*, originando larvas portadoras de nível basal de atividade metabólica dependente de citocromo P-450, como o cruzamento aprimorado, que se baseia no cruzamento de fêmeas virgens *ORR;flr*<sup>3</sup> com machos *mwh*. As fêmeas *ORR;flr*<sup>3</sup> são portadoras de cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem *Oregon* (R) resistente ao DDT. Estes cruzamentos originam larvas com duas constituições genotípicas, no que se refere aos genes marcadores localizados no cromossomo 3: larvas *mwh* +/ + *flr*<sup>3</sup> - que são trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr*<sup>3</sup> e larvas *mwh* +/*TM3*, *Bd*<sup>S</sup> - heterozigotas para o cromossomo *TM3*, necessário para balancear o marcador *flr*<sup>3</sup>, já que este

é letal em homozigose. Os adultos heterozigotos para o cromossomo *TM3* apresentam recortes nas asas - determinados pelo gene marcador *Bd<sup>S</sup>* - o que permite diferenciá-los dos imagos trans-heterozigotos, que apresentam asas com formato normal.

#### Tratamento e Análise Microscópica

Os cruzamentos foram realizados em massa (80 fêmeas: 40 machos), durante 3 dias, em vidros contendo meio de cultura padrão. Após este período, os casais foram transferidos para tubos de ¼ L contendo meio de ovoposição, onde permaneceram por 8 h. Passado este tempo, os adultos foram descartados. Depois de 72h do início do período de ovoposição, foram coletadas larvas de terceiro estágio por flotação em água corrente. Estas larvas foram, então, submetidas a tratamento crônico com diferentes concentrações das NPs. Todos os adultos que nascerem 10-12 dias após a postura dos ovos foram conservados em etanol 70%. Posteriormente, as asas dos indivíduos trans-heterozigotos e heterozigotos *TM3* foram submetidas à montagem em lâminas de vidro. As lâminas contendo 10 asas de fêmeas e 10 asas de machos foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 400 x.

Foram analisadas as asas de pelo menos 10 indivíduos de cada sexo, por ponto de tratamento, observando-se os fenótipos dos tricomas existentes nas superfícies dorsal e ventral das asas dos indivíduos trans-heterozigotos. Estes pelos originam-se dos discos imaginais de larvas de terceiro estágio que foram expostas aos diferentes tratamentos. A ocorrência — ao longo do desenvolvimento larval — de alterações no material genético destas células leva ao aparecimento, nas asas dos adultos, de manchas com os fenótipos pelos múltiplos e/ou pelos com a base alargada - refletindo a expressão dos marcadores genéticos, representados pelos genes recessivos *mwh* e/ou *flr<sup>3</sup>*, respectivamente. Os diferentes tipos de manchas são designados como simples *mwh* ou *flr<sup>3</sup>*, quando apenas um dos marcadores se expressa, ou como manchas gêmeas, quando tanto pelos múltiplos (*mwh*), como pelos com a base alargada (*flr<sup>3</sup>*) estão presentes dentro de uma mesma mancha. São considerados clones independentes aqueles separados por 3 ou mais fileiras de tricomas normais (GRAF et al., 1984).

#### Análise Estatística

Para fazer a avaliação genotóxica das NPs, as frequências de manchas obtidas nos tratamentos com as diferentes concentrações foram comparadas com o controle negativo. Para tanto, foi utilizado o teste binomial condicional de Kastembaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a avaliação da toxicidade em *D. melanogaster*, foram testadas sete concentrações das NPs, 2,4; 1,8; 1,2; 0,6; 0,3; 0,15 e 0,075 mg/L, tanto no cruzamento padrão (CP) como no cruzamento aprimorado (CA). Enquanto as moscas do CP apresentam níveis basais de enzimas de metabolização, as moscas do CA possuem níveis aumentados de enzimas do complexo CYP450.

Os resultados apresentados na figura 1 demonstraram que as concentrações de 2,4 e 1,8 mg/L apresentaram toxicidade superior a 50%, em ambos os cruzamentos, não sendo avaliadas em relação a genotoxicidade. Considerando as avaliações de genotoxicidade (figura 2), os resultados referentes à análise de 30 indivíduos no CP, apontam para o aumento significativo na indução de clones mutantes nas asas das moscas expostas a concentração de 1,2 mg/L, em comparação ao controle negativo (água destilada). Por outro lado, uma resposta negativa foi observada nas menores concentrações avaliadas, 0,6; 0,3 e 0,15 mg/L. Cabe salientar que os resultados apresentados são preliminares, já que é necessário ampliar o

número amostral no CP, além da avaliação dos indivíduos heterozigotos TM3. Além disso, a análise dos indivíduos trans-heterozigotos referentes ao CA é fundamental para a caracterização adequada do perfil genotóxico das NPs de ZnO no teste SMART.

Figura 1: Porcentagem de sobrevivência após exposição crônica das larvas às diferentes concentrações (mg/mL) de NPs de ZnO.

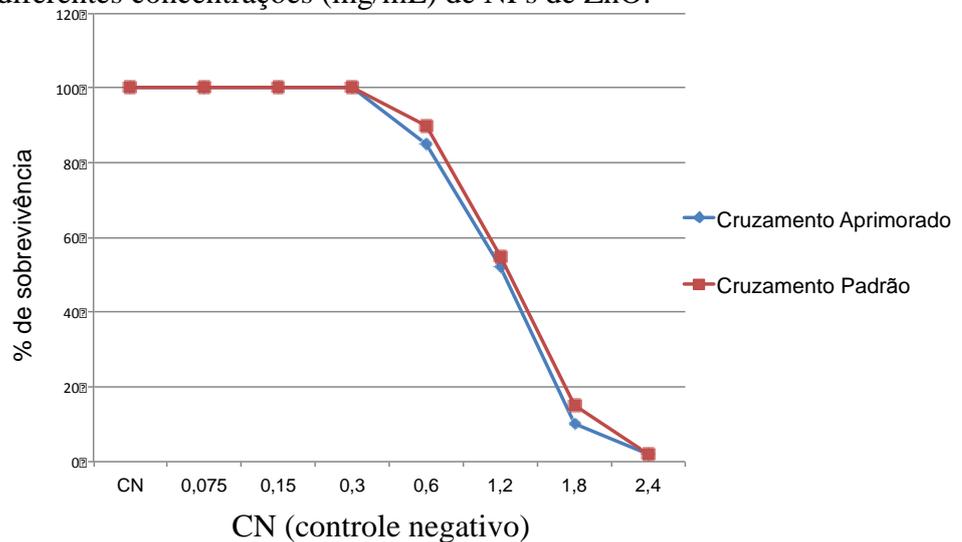
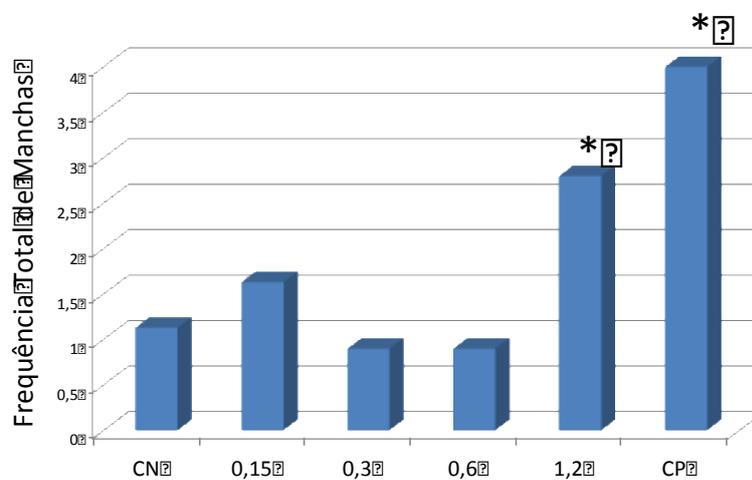


Figura 2: Frequência de clones mutantes após exposição crônica das larvas trans-heterozigotas do cruzamento padrão às diferentes concentrações (mg/mL) de NPs de ZnO.



\*Significativo em relação ao CN ( $p < 0,05$ ). CP (Controle positivo - EMS).

Devido ao alto investimento das indústrias tecnológicas em relação ao desenvolvimento e produção de produtos comerciais com uso de nanotecnologia, é fundamental a investigação desses nanomateriais em relação ao potencial tóxico e genotóxico. A interação dessas nanopartículas com o ecossistema parece ser inevitável, visto que o controle e regulamentação ainda não estão em vigor por agências governamentais.

Vários são os fatores que influenciam a toxicidade das NPs, como seu tamanho, forma e porosidade que irão interagir fisicamente e quimicamente nos sistemas biológicos.

Estudos de genotoxicidade sugerem a existência de interação direta entre NPs e o DNA ou ainda proteínas, e que pode causar danos no material genético. De fato, as NPs podem atuar como sítios para a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando efeitos genotóxicos (SHARMA et al., 2012).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As NPs de ZnO, em altas concentrações, são tóxicas às larvas de *Drosophila melanogaster*. As NPs de ZnO são genotóxicas em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, no cruzamento padrão.

## AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. Allan Seeber e Wladimir Flores por terem gentilmente cedido as nanopartículas utilizadas neste estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa PIBITI.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE R., REGULY L, LEHMANN M., Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: Henderson, DS (Ed.), *Drosophila Cytogenetics Protocols*, **Humana Press Inc. Totowa**, p. 389-12, 2004;
- FREI H., WÜRGLER E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988;
- HEINLAAN M., IVASK A, BLINOVA I., DUBOURGUIER C., KAHRU A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. **Chemosphere**, v. 71, p. 1308–16, 2008;
- KASTEMBAUM A., BOWMAN O. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v. 7, p. 527-49, 1970;
- MAGDOLENOVA Z., COLLINS A., KUMAR A., DHAWAN A., STONE V., DUSINSKA M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. **Nanotoxicology**, p. 1–46, 2013;
- SHARMA V., ANDERSON D., DHAWAN A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative dna damage and ros-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (hepg2). **Apoptosi**, v. 17, p. 852–70, 2012;
- SHARMA V., SHUKLA K., SAXENA N., PARMAR D., DAS M., DHAWAN A. Dna damaging potential of zinc oxide nanoparticles in humanepidermal cells. **Toxicol. Lett**, v. 185, p. 211–18, 2009.