



## ANÁLISE DA TOXICIDADE GENÉTICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE NÍQUEL

Gabrielle Nunes da Silva<sup>1</sup>  
Débora dos Santos Chaves<sup>2</sup>  
Tatiane RochaCardozo<sup>3</sup>  
Allan Seeber<sup>4</sup>  
Wladimir Hernandez Flores<sup>4</sup>  
Mauricio Lehmann<sup>5</sup>  
Rafael Rodrigues Dihl<sup>6</sup>

### Resumo

Com a incorporação de nanopartículas (NPs) em produtos comerciais, é fundamental compreender como elas interagem com os organismos vivos. A inalação de compostos de níquel é um perigo que está associado com o desenvolvimento de inflamação pulmonar, fibrose e câncer. No entanto, os mecanismos de toxicidade pulmonar destes materiais permanecem indefinidos. Diante deste panorama, o presente estudo buscou verificar a atividade tóxico-genética de NPs de NiO em células V79 de hamster Chinês. A caracterização das NPs de NiO por microscopia de transmissão mostrou que houve predominância de partículas da ordem de 110 a 140 nm. Os resultados obtidos com a avaliação de danos no DNA no ensaio cometa mostraram que as concentrações de 62 – 500 µg/mL foram genotóxicas para as células V79 com uma relação dose - efeito. Os resultados do presente estudo somados aos dados obtidos na literatura científica indicam que NPs de NiO são genotóxicas *in vitro*. Assim, a avaliação de diferentes parâmetros genéticos é fundamental para a ampliação do conhecimento e da caracterização do perfil de nanotoxicidade destes materiais.

Palavras-chave: Cometa; genotoxicidade; V79; nanomateriais

### INTRODUÇÃO

Desde a década passada a comunidade científica tem demonstrado interesse no que diz respeito ao ramo da nanociência e suas aplicações. A grande dificuldade das pessoas lidarem com os novos conceitos decorrentes do desenvolvimento e avanço das nanociências e

---

1 Aluna do curso de graduação em Ciências Biológicas – Bolsista PIBIC/CNPq – gabriellens@gmail.com

2 Mestre em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

3 Doutora em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

4 Professor da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus Bagé

5 Professor do curso de Engenharia Ambiental/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

6 Professor Orientador dos cursos de Ciências Biológicas e Biomedicina/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA ([rafael.rodriques@ulbra.br](mailto:rafael.rodriques@ulbra.br))

das nanotecnologias se deve a pouca familiaridade com este mundo tão pequeno, de escala atômica, ou seja, das dimensões nanométricas (MELO; PIMENTA, 2004; MELO et al., 2012). A tecnologia e a ciência em nanoescala atraíram considerável destaque nos últimos anos, pela expectativa do impacto que os nanomateriais estruturados podem causar na melhoria da qualidade de vida e na preservação do meio ambiente (FERREIRA; RANGEL, 2009).

O níquel é um metal de transição e é o quinto elemento mais abundante no mundo, logo, as nanopartículas de óxido de níquel possuem uma vasta aplicabilidade, como por exemplo, no uso de catalisadores químicos, sensores, filmes eletrocromáticos, dispositivos de armazenamento de energia, eletrodos de baterias, tintas de impressão, aditivo de combustível e sensores de materiais magnéticos (DUAN et al., 2015; MAGAYE et al., 2012; SALVADORI et al., 2014). A inalação, ingestão e absorção pela pele são as principais vias de exposição ao óxido de níquel. Os principais alvos são os pulmões e os rins (MAGAYE et al., 2012). Dessa forma, este trabalho avaliou o efeito genotóxico de NPs de óxido de níquel (NiO) em células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) no teste cometa.

## **METODOLOGIA**

As NPs de NiO foram sintetizadas no laboratório de Materiais Nanoestruturados – Departamento de Engenharia e Energias Renováveis da Universidade Federal dos Pampas, Campus Bagé – RS (UNIPAMPA) pelos professores colaboradores Dr. Allan Seeber e Dr. Wladimir Flores. A nanoestrutura de NiO teve sua rota de síntese definida pelos professores. As NPs de NiO foram obtidas após 6 h de calcinação na temperatura de 550 °C. A caracterização morfológica e estrutural das NPs de NiO foi realizada por microscopia de transmissão (MET JEM 1200 EXII ) no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS e a análise das imagens foi realizada através do software ImageJ 1.46r. As medidas de difração de raios-X foram realizadas utilizando a geometria de Bragg-Brentano (Rigaku – ULTIMA IV), com passo de 0,02° e tempo de integração de 5 s. A radiação usada no difratômetro teve potência no tubo de 40 kV/20mA.

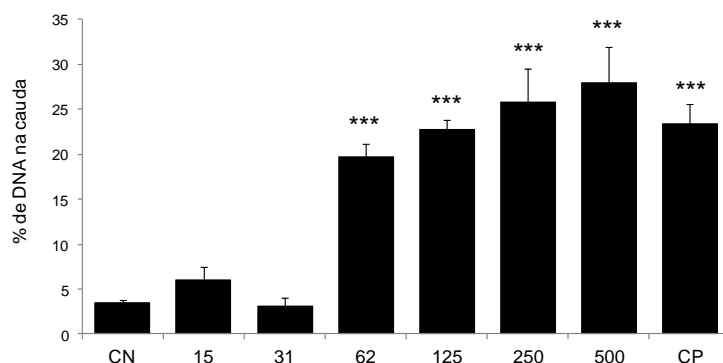
Para a realização dos experimentos foram utilizadas as células V79, que foram transferidas para placas de cultivo celular com 24 poços. As diferentes concentrações das NPs de NiO foram preparadas na hora do tratamento, por dissolução em água destilada. As NPs foram testadas em 6 concentrações: 15, 31, 62, 125, 250, 500 µg/ml. Após 24 h, as concentrações de NiO NPs foram adicionadas, da mesma forma que o controle positivo EMS (Etilmetanosulfonato – 0,5 mM) e o controle negativo (H<sub>2</sub>O destilada) durante o período de

4h. Após este período, as células foram homogeneizadas com gel de agarose de baixo ponto de fusão, distribuídas sobre lâminas de vidro cobertas com gel de agarose de ponto de fusão normal. Estas lâminas foram mergulhadas em solução de lise por 24 horas e submetidas a eletroforese em condições alcalinas (pH>13). A seguir, as lâminas foram coradas com brometo de etídio e os núcleos portadores de quebras no DNA puderam ser visualizados sob a forma de um cometa (Tice et al., 2000). Estes foram avaliados em aumento de 200X em microscópio de fluorescência (Olympus - BX41). Foram avaliados a extensão dos danos no DNA classificando-se os cometas por meio de um *software* (*Comet Assay IV*) (*Perceptive Instruments*). O parâmetro utilizado para a avaliação de danos foi a porcentagem de DNA na cauda (*tail intensity*). A comparação dos dados foi realizada utilizando-se a análise da variância (ANOVA) com teste *post hoc* de Dunnett para uma significância estatística  $p < 0,05$  (TICE et al., 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à avaliação da genotoxicidade das NPs de NiO em células V79 no Teste Cometa estão representados na figura 1. Foi possível observar um aumento significativo na frequência de danos no DNA das células expostas às concentrações de 62, 125, 250, e 500  $\mu\text{g/ml}$  de NPs de NiO quando comparado ao controle negativo.

Figura 1 - Danos no DNA após exposição (4 h) das células V79 às diferentes concentrações (15 – 500  $\mu\text{g/mL}$ ) de NP de NiO. CN- Controle Negativo. CP – Controle Positivo (EMS 0,5 mM). \*\*\*  $P < 0,001$



As imagens de NPs de NiO obtidas por microscopia eletrônica mostram aglomerados de partículas, as quais apresentam formatos poligonais (Figura 2) compreendendo o intervalo de 50 a 500 nm. A análise de distribuição de tamanho (Figura 3), mostra que há predominância de partículas da ordem de 110 a 140 nm.

Figura 2: Imagem das NPs de NiO.

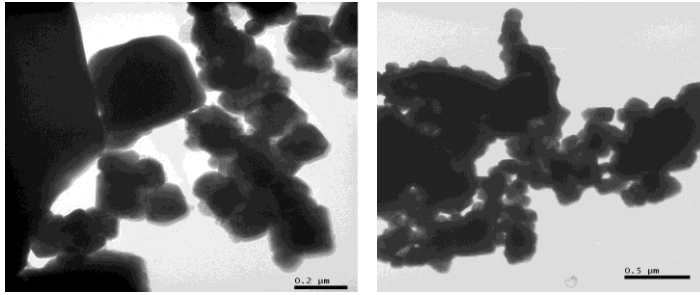
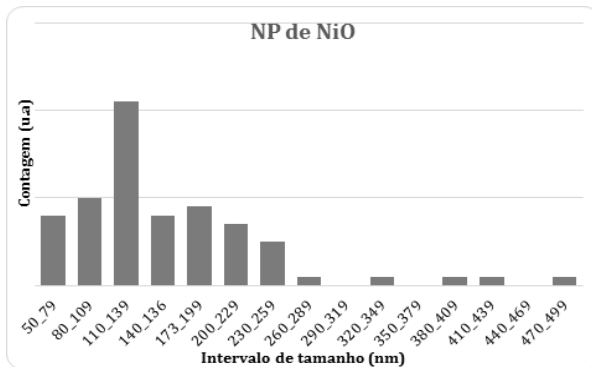
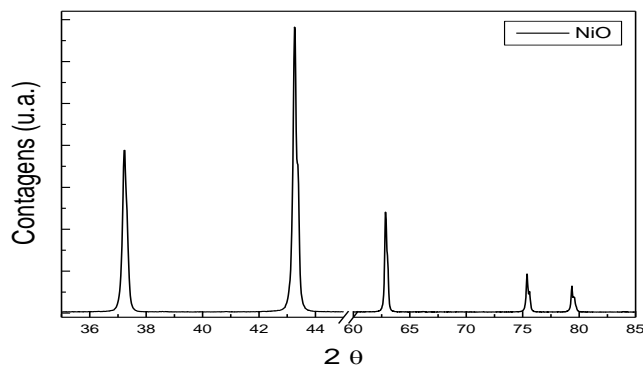


Figura 3: Análise de distribuição de tamanho das NPs de NiO.



A Figura 4 apresenta o difratograma do NiO, no qual pode-se observar apenas os picos referentes a fase cúbica, indicando que as NPs são policristalinas e os planos cristalinos não apresentam orientações preferenciais.

Figura 4: Difratograma das nanopartículas de NiO obtidas após a calcinação em 550°C por 6 horas.



Os nossos resultados estão de acordo com trabalhos publicados previamente na literatura com células V79. Maser et al. (2015) avaliaram o potencial genotóxico de NPs de SiO<sub>2</sub> no ensaio cometa em células V79. Concentrações acima de 600 μg/mL foram genotóxicas após tratamento de 24 h. Adicionalmente, concentrações acima de 250 μg/mL de NPs de NiO foram genotóxicas no ensaio cometa em células epiteliais de rim, NRK-52E e em

células neuronais (SH-SY5Y) em concentrações de 15 – 120 µg/mL (ABUDAYYAK et al., 2017a; ABUDAYYAK et al., 2017b).

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que as NPs de NiO induziram aumentos significativos de danos no DNA das células V79 expostas a concentrações superiores a 62 µg/mL no ensaio cometa.

## REFERÊNCIAS

ABUDAYYAK, M.; GUZEL, E.; ÖZHAN, G. Nickel oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in kidney cell lines (NRK-52E). **Biological Trace Element Research**, v. 178, p. 98-104, 2017a.

ABUDAYYAK, M.; GUZEL, E.; ÖZHAN, G. Nickel oxide nanoparticles are highly toxic to SH-SY5Y neuronal cells. **Neurochemistry International**, v. 108, p. 7-14, 2017b.

DUAN WX, He MD, MAO L, QIAN FH, Li YM, PI HF, et al. NiO nanoparticles induce apoptosis through repressing SIRT1 in human bronchial epithelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 286, p. 80-91, 2015.

FERREIRA, H.S.; e RANGEL M.C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v.32, n.7, p. 1860-70, 2009.

MAGAYE, R.; ZHAO, J.; BOWMAN, L.; DING, M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt, nickel and copper based nanoparticles (review). **Experimental and therapeutic medicine**, v. 4, p. 551-61, 2012.

MASER, E.; SCHULZ, M.; SAUR, U.G.; WIEMANN, M.; HOCK, LM, WOHLLEBEN, W.; HARTWIG, A.; LANDSIEDEL, R.; In vitro and in vivo genotoxicity investigations of differently sized amorphous SiO<sub>2</sub> nanomaterials. **Mutation Research**, v. 794, p. 57–74, 2015.

MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v.9, n.18, 2004.

MELO, M.A.; SANTOS, L.S.S.; GONÇALVES M.C.; NOGUEIRA, A.F.; Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, p. 1872-78, 2012.

SALVADORI, M.R.; NASCIMENTO, C.A.O.; CORRÊA, B.; Nickel oxide nanoparticles film produced by dead biomass of filamentous fungus. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-6, 2014.

TICE, R.; AGURELLE. E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN. A.; KOBAYASHI, H.; et al. Single cell gel/comet assay : guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 206-21, 2000.