



**ESTUDO DA GENOTOXICIDADE DE NANOMATERIAIS  
EM *Drosophila melanogaster***

Queila Susana Gambim Kotzal<sup>1</sup>  
Tatiane RochaCardozo<sup>2</sup>  
Raíne Fogliati de Carli<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 o aumento da utilização da nanotecnologia na indústria e a dispersão das nanopartículas no ambiente, tornou-se essencial que o potencial toxicológico destes materiais fosse avaliado. Nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) são utilizadas em aplicações industriais, em produtos de uso diário, bem como cosméticos e protetores solares. Considerando a falta de estudos *in vivo* sobre a toxicidade genética de NPs de ZnO, este estudo avaliou seu potencial genotóxico no teste SMART de asa em *Drosophila melanogaster*. Os resultados demonstraram um aumento significativo na frequência de clones mutantes das moscas expostas à concentração de 1,2 mg/mL. A genotoxicidade observada está associada a eventos mutacionais e/ou recombinacionais, já que são os parâmetros genéticos detectados no teste SMART.

Palavras-chave: SMART; óxido de zinco; mutação; recombinação

**INTRODUÇÃO**

Tendo em vista novas pesquisas com materiais nanométricos, houve a necessidade de nomear uma nova ciência, a Nanotecnologia. Esta linha de pesquisa aborda conceitos que envolvem a síntese de diferentes materiais resultando na utilização do produto final na escala nanométrica. Este novo enfoque tecnológico tem despertado muitas expectativas em relação aos possíveis impactos dentro do contexto ambiental, de como podem alterar parâmetros biológicos e o quanto estes influenciam na preservação da vida e do ecossistema (DONALDSON et al., 2004; BONACCORSI et al., 2006).

A importância de pesquisar diferentes materiais e suas estruturas, não só na escala macro mas agora na escala nanométrica, é essencial para o desenvolvimento tecnológico. Devido ao fato de os nanomateriais (NMs) terem suas dimensões reduzidas, as quais estão estabelecidas entre 1 e 100 nanômetros (nm), tomam configurações físico-químicas diferentes, adquirindo novas propriedades (NEL et al., 2006).

Nanomateriais (NM) estão sendo usados em diversos produtos comerciais, como plásticos, roupas, cosméticos, eletrodomésticos e até mesmo em alimentos. Suas aplicações se estendem para as áreas biomédicas, da saúde, do diagnóstico, além da utilização de nanocapsulas como carreadores na distribuição de substâncias/medicamentos em diferentes terapias. Além disso, existe uma grande demanda na indústria de cosméticos, de eletrônicos e têxtil (LOURO et al., 2013). Em virtude disso, a indústria tem gerado produtos em larga escala e que estão sendo empregados como matéria-prima, tornando inevitável sua presença no ambiente (RENN et al., 2006; CRANE et al., 2008).

<sup>1</sup> Acadêmica do curso de graduação Biomedicina – Bolsista PIBIC/CNPq – queilak@hotmail.com

<sup>2</sup> Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

<sup>3</sup> Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

<sup>4</sup> Professor da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus Bagé

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

<sup>6</sup> 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.rodrigues@ulbra.br](mailto:rafael.rodrigues@ulbra.br))

As nanopartículas (NPs) estão sendo liberadas sem controle no ambiente, interagindo com diferentes compartimentos ambientais, podendo facilmente atravessar as barreiras celulares devido às suas características nanométricas (DAUGHTON, 2004; MOORE, 2006). A caracterização, incluindo a distribuição de tamanho, forma, área superficial, cristalinidade, porosidade, estado de aglomeração, carga superficial, solubilidade e a correlação entre as suas propriedades físico-químicas e os efeitos biológicos são fundamentais para esclarecer os processos genotóxicos (LI et al., 2003, 2008). Contudo, este desenvolvimento exponencial contrasta com a insuficiente avaliação de risco para a saúde humana e para o ambiente (NOWACK et al., 2007).

As NPs mais conhecidas e utilizadas comercialmente são os óxidos metálicos, como o óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), óxido de alumínio (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), óxido de zinco (ZnO), óxido de cério (CeO<sub>2</sub>), zircônia (ZrO<sub>2</sub>) e óxido de ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), que são empregadas na fabricação para catálises, como sensores ou materiais eletrônicos e nas remediações ambientais devido às suas diversas propriedades ópticas, magnéticas, elétricas, mecânicas, morfológicas e de adsorção. Dentre as principais aplicações podemos destacar a indústria dos cosméticos, como os protetores solares, onde as NPs utilizadas têm aproximadamente 10 nm sendo as NPs de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e óxido de zinco (ZnO) as mais utilizadas (NOHYNEK et al., 2007; 2012).

Diversos modelos biológicos têm sido propostos para avaliar a toxicidade dos NMs. Tanto ensaios *in vitro* como *in vivo* têm sido amplamente utilizados. Inicialmente, modelos *in vitro* fornecem um meio rápido e eficiente para avaliar NPs para uma série de parâmetros toxicológicos (KARLSSON et al., 2010).

Dentro deste contexto, as NPs de óxido de zinco (ZnO) estão sendo usadas em todo o mundo em produtos de consumo e aplicações industriais. Possuem alto índice de refração e brilho, são 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. Por sua estrutura, são amplamente utilizadas em cosméticos, cuidados com a pele e produtos de proteção solar (NOHYNEK et al., 2007; 2012).

Em seu trabalho, Zhu et al. (2008) realizaram testes *in vivo* para analisar o efeito das NPs de óxido de Zinco (ZnO) lançadas no ambiente aquático. Os autores utilizaram embriões do peixe *Danio rerio* para avaliar os efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento destes indivíduos em suspensões aquosas por um período de 96 horas. Foram avaliados parâmetros toxicológicos como sobrevivência dos embriões, a taxa de eclosão e características fisiológicas e morfológicas, tais como diferentes malformações devido à exposição às NPs. Os resultados mostraram que as NPs de ZnO foram capazes de atrasar o desenvolvimento dos embrião de *Danio rerio*, diminuindo a sua sobrevivência e eclosão, causando danos aos tecidos. Em outro estudo, utilizando diferentes organismos aquáticos, foram verificados efeitos tóxicos, quando os organismos *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Tamnocephalus platyuru* foram expostos a NPs de ZnO (HEINLAAN et al., 2008).

Neste sentido, considerando a escassez de informações relacionadas à ação genotóxica *in vivo* de NPs de ZnO, somado a ausência de dados referentes à sua atividade recombinogênica, o presente estudo utilizou o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* para avaliar a ação mutagênica e recombinogênica da NP de óxido de Zinco.

## **METODOLOGIA**

A NPs de óxido de Zinco foram sintetizadas no laboratório de Materiais Nanoestruturados -Departamento de Engenharia Energias Renováveis da Universidade Federal dos Pampas, Campus Bagé- RS (UNIPAMPA).

O Teste SMART de asa fornece uma rápida avaliação do potencial de um agente físico, químico ou biológico induzir a perda da heterozigosidade, relacionada à indução de mutação gênica e/ou cromossômica e recombinação homóloga somática. Esse ensaio faz uso de dois marcadores recessivos, pelos múltiplos (*mwh* 3-0.3) e flare (*flr<sup>3</sup>*, 3-38.8), utilizando o cruzamento padrão que apresenta níveis basais de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450 e o cruzamento aprimorado, que apresenta níveis aumentados de enzimas desse complexo. O teste baseia-se na identificação de pelos com fenótipo mutante que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões em nível de DNA. Os tricomas mutantes organizam-se em manchas e 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 (GRAF et al., 1984).

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 8h. 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 destilada.

As larvas obtidas do cruzamento padrão foram colocadas em frascos contendo 0,75 g de meio sintético, onde foram acrescentados 3 mL das soluções, sendo submetidas ao tratamento crônico expostas às diferentes concentrações de NP de ZnO. A solução contendo as NPs foi preparada utilizando água destilada, que também foi usada como controle negativo. Como controle positivo foi utilizado uretano 20 mM. Todos os adultos nascidos foram conservados em etanol 70%. Posteriormente, as asas dos indivíduos trans-heterozigotos foram submetidas à montagem de lâminas de vidro, contendo cinco pares de asas de machos e cinco pares de asas de fêmeas. Foram analisados 30 indivíduos de cada tratamento, sendo observados os fenótipos mutantes em microscópio óptico com aumento de 400 x.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para a avaliação da genotoxicidade das NPs de ZnO foram testadas quatro diferentes concentrações, 0,15; 0,3; 0,6; 1,2 mg/mL no SMART. Tais concentrações foram determinadas a partir de experimento piloto, onde foram escolhidas doses que garantiram a sobrevivência de no mínimo 50% das moscas. Os dados obtidos em dois experimentos independentes foram agrupados, uma vez que não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

Os resultados obtidos no cruzamento padrão após exposição crônica das larvas aos tratamentos estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados obtidos no teste SMART com a progênie trans-heterozigota (*mwh/flr<sup>3</sup>*) no cruzamentos padrão após exposição crônica de larvas de 3º estadio a diferentes concentrações (mg/mL) de NPs de ZnO

Cruzamento e Tratamentos	No. de moscas (N)	Manchas por mosca (nº. de manchas) diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Total de manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup>
		Manchas simples pequenas <sup>b</sup> (1-2 células) m = 2	Manchas simples grandes <sup>b</sup> (>2 células) m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas <sup>b</sup> m = 2	
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>						
CN	30	1,07 (32)	0,03 (01)	0,03 (01)	1,13 (34)	34
0,15	30	1,33 (40) -	0,30 (09) +	0,00 (00) i	1,63 (49) i	45
0,3	30	0,67 (20) -	0,10 (03) i	0,00 (00) i	0,77 (23) -	23
0,6	30	0,63 (19) -	0,17 (05) i	0,10 (03) i	0,90 (27) -	26
1,2	30	2,40 (72) +	0,33 (10) +	0,07 (02) i	2,80 (84) +	82
CP	10	23,10 (231) +	4,10 (41) +	3,00 (30) +	30,20 (302) +	285

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): -, negativo, +, positivo, i, inconclusivo.  $P \leq 0.05$ . <sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras. <sup>c</sup>Foram considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas. <sup>d</sup>CN, controle negativo: água destilada. <sup>e</sup>CP, controle positivo: Uretano 20mM.

No que se refere aos resultados de genotoxicidade, NPs de ZnO induziram aumentos significativos de clones mutantes para o total de manchas dos indivíduos trans-heterozigotos, quando comparado ao respectivo controle negativo. Os resultados positivos foram observados na concentração de 1,2 mg/mL, evidenciando que ocorreram alterações no material genético das células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Em contrapartida, houve resposta negativa observada nas menores concentrações avaliadas, 0,15; 0,3 e 0,6 mg/mL.

As NPs de ZnO têm sido relatadas em alguns trabalhos por seu potencial citotóxico e genotóxico em células eucarióticas na qual diversos pesquisadores investigaram o potencial genotóxico das NPs de ZnO em células de fígado humano (HepG2) (SHARMA et al., 2009, 2012; OSMAN et al., 2010). Os resultados desse trabalho mostraram que houve genotoxicidade dependente do tempo de exposição no ensaio cometa.

Devido ao seu tamanho extremamente pequeno, NPs de ZnO podem interagir diretamente com macromoléculas, como o DNA. O principal mecanismo indutor de lesões parece estar associado com o estresse oxidativo e peroxidação lipídica. Sharma et al. (2009) demonstraram que NPs de ZnO foram genotóxicas em células epidermais humanas (A431) por meio da indução de espécies reativas de oxigênio.

Considerando que danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio estão relacionados com a indução de quebras de fita de DNA, é possível que o resultado positivo observado neste estudo esteja associado a um aumento na frequência de recombinação homóloga (RH) nas células proliferativas das larvas de terceiro estadio de *Drosophila melanogaster*.

RH é um dos principais processos de alterações genéticas envolvidas na gênese e progressão do câncer e ocorre com mais frequência em células proliferativas (BISHOP; SCHIESTL, 2001). Indivíduos que apresentam doenças associadas à maior predisposição para o desenvolvimento de câncer apresentam alta instabilidade genética e elevada taxa de RH (BISHOP; SCHIESTL, 2003). Portanto, este parâmetro é fundamental para ampliar o entendimento sobre os mecanismos associados à genotoxicidade de NPs de ZnO.

## CONCLUSÃO

Devido ao grande investimento das indústrias tecnológicas e crescimento exponencial da produção nanotecnológica, é fundamental a investigação destes materiais com vistas ao seu potencial tóxico e genotóxico. Os resultados deste estudo demonstraram que as NPs de ZnO, em concentrações maiores, são genotóxicas para as larvas de *Drosophila melanogaster*. Mas para que seja possível quantificar a real contribuição dos eventos recombinacionais para a genotoxicidade das NPs de ZnO, é preciso que esta avaliação deva ser ampliada para a análise dos indivíduos heterozigotos TM3.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio do Edital Universal/ 2014 e pela concessão da bolsa PIBIC.

## REFERÊNCIAS

BISHOP, A. J.; SCHIESTL, R. H. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1471, p. 109-121, 2001.

BISHOP, A. J.; SCHIESTL, R. H. Role of homologous recombination in carcinogenesis. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, p. 94-105, 2003.

BONACCORSI, A.; THOMA, G. Institutional complementarity and inventive performance in nano science and technology. **Research Policy**, v. 36, n. 6, p. 813-831, 2007.

CRANE M, H. D.; GARROD, J.; OWEN, R. Ecotoxicity test methods and Environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 421– 37, 2008.

DONALDSON, K. et al. Nanotoxicology. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 61, p. 727-28, 2004.

GRAF U, Würigler E, Katz J, Frei H, Juon H, Hall B, Kale G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 6, p. 153-88, 1984.

HEINLAAN, M. et al. 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.

KARLSSON, H. L. The comet assay in nanotoxicology research. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 2, p. 651-66, 2010.

LI, N. et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 4, p. 455-60, 2003.

LI, N.; XIA, T.; NEL, A. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 9, p. 1689-99, 2008.

LOURO, H.; BORGES, T.; SILVA, M. Nanomateriais manufacturados – Novos desafios para a saúde pública. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 8, 2013.

MOORE N. Nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**, v. 32, n.8, p. 967-76, 2006.

NEL A, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, p. 622-27, 2006.

NOHYNEK, G.; DUFOUR, E. Nano-sized cosmetic formulations or solid nanoparticles in sunscreens: A risk to human health? **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 1063-75, 2012.

NOWACK, B.; THOMAS, D. Review: occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, p. 5-22, 2007.

OSMAN, F. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in hep-2 cells. **Nanomedicine**, v. 5, p. 1193-203, 2010.

RENN, O.; ROCO, M. Nanotechnology and the need for risk governance. **Journal Nanoparticle research**, v. 8, n. 2, p. 153-91, 2006.

SHARMA, V. et al. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. **Toxicology Letters**, v. 185, p. 211-18, 2009.

ZHU, X. et al. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. **Journal of environmental science and health**, v. 43, n. a, p. 278-84, 2008.