

## CITOTOXICIDADE CAUSADA POR NANOMATERIAIS: AVALIAÇÃO DO MICRONÚCLEO

Anny Manrich<sup>1\*</sup>, Silviane Zanni Hubinger<sup>1</sup>, Elaine Cristina Paris<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro 1452, 13560-970, São Carlos, SP  
\*anny.manrich@gmail.com

**Classificação:** Cenários e avaliação dos riscos ambientais e sociais dos nanocompostos

### Resumo

Nanomateriais vem sendo utilizados cada vez mais em diversas áreas, como energia, materiais, alimentos e medicina e despertado enorme interesse devido a enorme avanços que têm proporcionado. Por motivos ainda não muito conhecidos, os nanomateriais interagem de forma única e diferenciada com o meio ambiente e com células vegetais e animais podem causar danos toxicológicos, levando a alterações cromossômicas e ao câncer. O teste do micronúcleo é bastante utilizado para avaliar o potencial carcinogênico de materiais e foi aplicado em células de *Allium cepa* (cebola) para investigar se os nanomateriais de uso comercial, nanopartícula e nanobastão de prata e sílica nanoparticulada possuem efeito citotóxico. Várias alterações cromossômicas foram observadas depois da interação destes materiais com as células, em especial no caso da sílica nanométrica.

**Palavras-chave:** Nanomateriais, Citotoxicidade, Micronúcleo, *Allium cepa*.

### TOXICITY CAUSED BY NANOMATERIALS: THE MICRONUCLEI ASSAY

#### Abstract

Nanomaterials have been increasingly used in various areas such as energy, materials, food and medicine and aroused interest due to the tremendous advances they have provided. For reasons not yet well known, Nanomaterials interact in a unique and differentiated way with the environment and with plant and animal cells and can cause toxicological damage, leading to chromosomal changes and cancer. The micronucleus test is widely used to evaluate the carcinogenic potential of materials and was used to *Allium cepa* (onion) cells to investigate whether nanomaterials of commercial use, silver nanoparticles and nanorods and nanoparticulated silica have a cytotoxic effect. Several chromosomal changes were observed after the interaction of these materials with the cells, especially in the case of the nanosilica.

**Keywords:** .Nanomaterials, Cytotoxicity, Micronucleus, *Allium cepa*.

#### Publicações relacionadas:

### 1 INTRODUÇÃO

Muitos avanços vem sendo conquistados no campo da nanotecnologia com a aplicação de Nanomateriais em diversas áreas, como de energia, medicina e segurança alimentar (RAJESHWARI, et al., 2016). Sabe-se que os materiais de dimensão nanométrica interagem com o meio ambiente de uma forma única, ainda não muito bem compreendida pelos cientistas (AUPLAT e SLIMANE, 2015). Além disso, eles demonstram ser especialmente tóxicos, comparados a materiais de dimensões micrométricas de mesma composição (KUMARI, et al., 2009). Com isso, a investigação acerca da toxicidade dos nanomateriais torna-se fundamental, já que agentes físicos e químicos podem causar graves alterações ao material genético de células eucarióticas, levando ao câncer e ao envelhecimento precoce. O estudo de danificação do DNA em seu nível cromossômico é a etapa essencial da investigação sobre a toxicidade genética, já que a mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese. O ensaio do micronúcleo tem sido o teste de preferência para essa análise porque possibilita a avaliação confiável tanto da perda e da ruptura cromossômica (FENECH, 2008; FISKESJÖ, 1985; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).O micronúcleo (MN) é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado por cromossomos ou fragmento destes que não

são incluídos no núcleo principal durante a mitose, que surge decorrente de alterações estruturais cromossômicas (CARRARD, et al., 2007). Trazido à área da nanotecnologia, já foi utilizado para investigar a toxicidade de muitos materiais com nanotubos de carbono (GHOSH, et al., 2015), nanopartículas de ouro (RAJESHWARI, et al., 2016) e prata (CVJETKO, et al., 2017; KUMARI, et al., 2009). Neste trabalho, nanomateriais comerciais foram investigados quanto a sua toxicidade, utilizando-se o teste de micronúcleos em células de *Allium cepa* (cebola) e comparados a um padrão de efeito tóxico e carcinogênico, a Trifluralina, um herbicida comumente utilizado em culturas de grãos. Anormalidades cromossômicas como o embolhamento nuclear, a perturbação durante a anáfase e surgimento de micronúcleos foram observadas após 24 h de exposição das raízes de cebola a 75 ppm de nanopartículas de SiO<sub>2</sub>, e nanopartículas e nanobastões de Ag, indicando que tais materiais possuem efeito carcinogênico, podendo levar a danos no DNA.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL

As nanopartículas estudadas foram adquiridas junto ao Projeto NANoREG (Den Haag, Holanda): nanopartículas e nanotubos de prata, nanopartículas de sílica. Reagentes utilizados foram: etanol 95%, ácido acético glacial e reagente de Schiff (Hexis Científica, Jundiaí, SP); carmim acético (Dinâmica, Diadema, SP), Trifluralina (Nortox, Rondonópolis, MT). As sementes de cebola (*Allium cepa*) da variedade foram adquiridas em mercado local.

### 2.2. MÉTODOS

#### 2.2.1. Suspensão das Nanopartículas

Os nanomateriais foram suspensos em água deionizada em concentração de 75 ppm e dispersos com uso de ponteira de ultrassom de ½ polegada (Branson modelo 101-147-037), a 30% de amplitude por 3 minutos em banho de gelo.

#### 2.2.2. Aplicação do teste de micronúcleos

O ensaio de toxicidade seguiu como descrito por Kumari et al., 2009, com adaptações. Resumidamente, as sementes de cebola foram dispostas em placas de petri sobre papel de filtro e regadas com 4 mL de água diariamente até que as raízes atingissem entre 1 e 2 cm de comprimento. As raízes foram permaneceram em contato com suspensões de nanopartículas, ou em solução padrão positivo (trifluralina) ou negativo (água) por 24 h ao abrigo de luz. Decorrido esse tempo, as raízes foram submetidas à hidrólise ácida e foram coradas com reagente de Schiff ao abrigo da luz por 2 h. Em seguida, as extremidades das raízes foram cortadas e prensadas entre lâminas de vidro com corante carmim acético para que fossem submetidas à análise em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes.

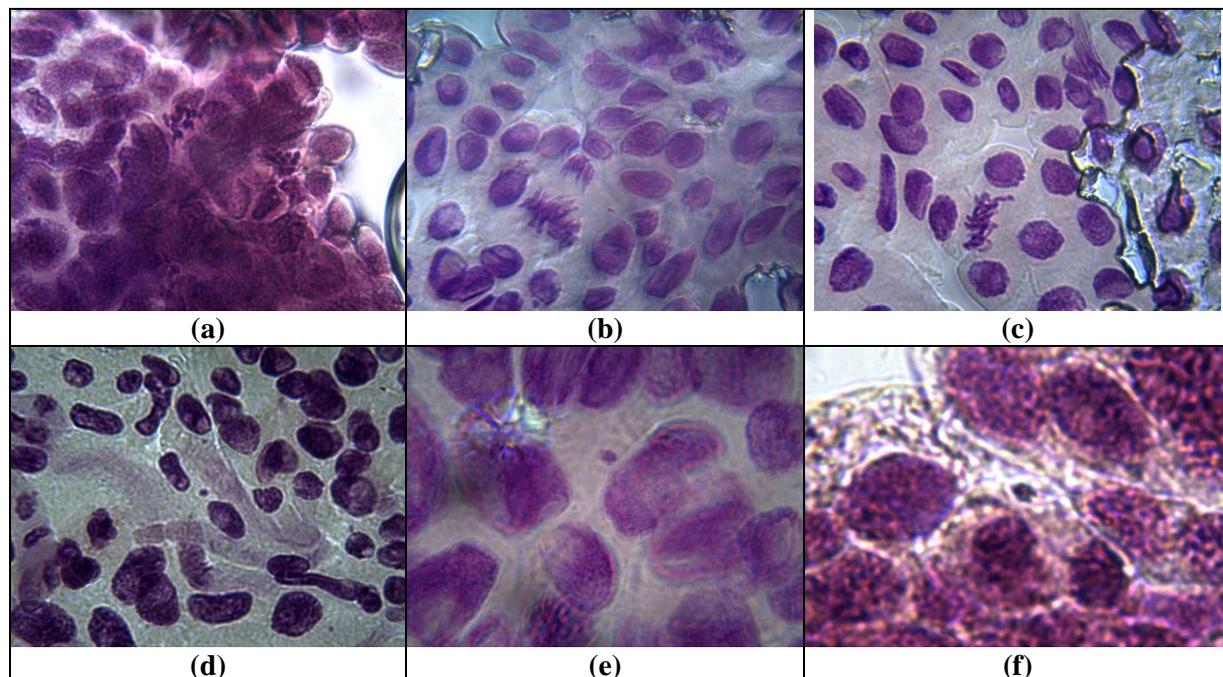
#### 2.2.3. Análise em Microscópio

As lâminas contendo as células de cebola foram analisadas em microscópio ótico Bel modelo Solaris T acoplado com câmera USB Eureka 5.0. Buscou-se verificar a existência de células em diferentes fases de divisão celular e a formação de alterações cromossômicas graves e micronúcleos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior parte das células encontravam-se em intérfase e sem alteração para ambos os nanomateriais avaliados (SiO<sub>2</sub> e Ag). Adicionalmente, foram observadas células em todas as fases de divisão celular, que são: prófase, metáfase, anáfase e telófase, o que demonstra que as mesmas encontravam-se de fato em fase de divisão e multiplicação celular, onde necessariamente ocorrem as alterações dos cromossomos e o surgimento de micronúcleos (FENECH, 2008). Foi contabilizado o número de micronúcleos a cada 1000 células observadas, até um total de células contabilizadas entre 7.000 e 10.000. Na Figura 1 encontram-se exemplos de anormalidades cromossômicas observadas em células após 24 h de contato com os materiais, como embolhamento nuclear, perturbação em anáfase, quebra cromossômica e micronúcleos; e micronúcleo com fenda. O surgimento de tais anomalias não

são ainda conhecidas, porém são frequentemente utilizadas como indicativos de danos ao DNA derivados de alterações após exposição à radiação, diferentes estágios de necrose, morte celular, genotoxicidade e outros (TORRES-BULGARÍN et al., 2014). Na Tabela 1 são apresentados os números de células observadas nas diferentes fases de divisão celular e o número de micronúcleos por 1.000 células. Observa-se que a exposição das células à água destilada (padrão negativo do teste) não causou o aparecimento de micronúcleos.



**Figura 1.** Exemplos de anormalidades nucleares e cromossômicas. (a) embolamento nuclear (b) perturbação em anáfase (c) quebra cromossômica (d) e (e) micronúcleos (f) micronúcleo com fenda

O aparecimento de micronúcleos entre as células de Nanomateriais estudados é um indicativo de que tais materiais provocaram alterações cromossômicas e podem levar ao aparecimento de câncer (CARRARD et al., 2007). Os materiais que mostraram maior potencial carcinogênico em ordem crescente foram nanosílica, nanopartículas de Ag, nanobastões de Ag e Trifluralina. A água destilada não provocou o surgimento de micronúcleo. Foram encontrados 8,74 micronúcleos a cada 1.000 células observadas, no caso da sílica nanoparticulada, o que evidencia que o material é grande poder carcinogênico.

**Tabela 1.:** Número de células observadas nos diferentes estágios de divisão celular e número de micronúcleos observados (a cada 1.000 células).

Material	Fase de divisão celular				Micronúcleo
	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
Trifluralina	3,43	0,93	0,53	0,93	1,46
Nanobastões Ag	4,15	1,18	2,36	0,19	1,88
Nanopartículas Ag	3,67	0,13	0,26	0	2,75
Nanosílica	5,00	2,53	1,88	0,55	8,74
Água	3,22	1,84	0,92	1,38	0

Os motivos que levam um determinado Nanomaterial ser tóxico podem não ser explicados considerando-se unicamente sua composição e tamanho. Outros fatores importantes influenciam como as suas propriedades físico-químicas, formato, e química de superfície, ou seja, carga, potencial zeta e rugosidade (SHARIFI et al., 2016). Qual desses fatores é determinante para que a sílica nanoparticulada apresente efeito especialmente citotóxico é ainda desconhecido e não foi aqui

investigado. Entretanto, pretende-se realizar estudos mais aprofundados com este e os demais Nanomateriais para que isso seja mais bem esclarecido.

#### 4 CONCLUSÃO

Todos nanomateriais investigados demonstraram potencial de alteração cromossômica, gerando um maior número de micronúcleos no estudo de células de *Allium cepa* por 1.000 células do que a Trifluralina, herbicida reconhecidamente cancerígeno. Em especial a sílica nanoparticulada provocou o aparecimento de 8,74 micronúcleos por 1.000 células analisadas, contra 1,46 no caso da Trifluralina. Pretende-se investigar outras propriedades desses Nanomaterial para que seu efeito cancerígeno seja mais bem esclarecido.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao suporte dado pelo CNPq (402287/2013-4) SISNANO/MCTI, FINEP e à Rede AgroNano.NanoReg - CNPq process n. 405030/2015-0.

#### REFERÊNCIAS

- AUPLAT, C. e SLIMANE, S .B. Regulation and innovation dynamics for nanoresponsible development: The case of the French code de l'environnement L 523-1 to L 523-5. *Journal of Physics: Conference Series*, n. 617, 2015.
- CARRARD, V. C.; COSTA, C. H.; FERREIRA, L. A.; LAUXEN, I. S.; RADOS, P. V. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. *R. Fac. Odontol. Porto Alegre, Porto Alegre*, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, 2007.
- CVJETKO, P.; MILOŠIĆ, A.; DOMIJAN, A. M.; VRČEK, I. V.; TOLIĆ, S.; ŠTEFANIĆ, P. P.; LETOFSKY-PAPSTE, I.; TKALEC, M.; BALEN, B. Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 137 pp. 18–28, 2017.
- FENECH, Micheal. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 410: Environmental Genomics, ed. C. Cristofre Martin. Humana Press, Totowa, NJ. 2008.
- FENECH, M. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*, vol. 26 no. 1 pp. 177–184, 2011.
- FISKESJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, *Hereditas*, vol. 102, pp.99-112, 1985.
- GHOSHA, M., BHADRA, S., ADEGOKE, A. BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. MWCNT uptake in *Allium cepa* root cells induces cytotoxic and genotoxic responses and results in DNA hyper-methylation. *Mutation Research*, vol. 774, pp. 49–58, 2015.
- SHARIFI, S., BEHZADI, S., LAURENT, S., FORREST, M. L., STROEVE, P., MAHMODI, M. Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, vol., 41, no. 6, pp. 2323-2343. 2012.
- TORRES-BUGARÍN, O., ZAVALA-CERNA, M. G., NAVA, A., FLORES-GARCÍA, A., & RAMOS-IBARRA, M. L. Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Disease markers*, vol. 2014, pp.1-13, 2014.
- VOLDERS, M. K.; DECORDER, I.; ELHAJOUJI, A.; PLAS, G.; AARDEMA, M. J. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. Mamta Kumari, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran. *Science of the Total Environment*, vol. 407, pp. 5243–5246, 2009.