



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Marcela Correia da Rocha Honorato

**Avaliação toxicogenética de óxido de zinco: análise comparativa
de nanopartículas e forma massiva em modelos alternativos**

Rio de Janeiro
2024

Marcela Correia da Rocha Honorato

**Avaliação toxicogenética de óxido de zinco:
análise comparativa de nanopartículas e forma massiva em modelos alternativos**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando Araujo-Lima

Coorientador: Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

H774 Honorato, Marcela Correia da Rocha.

Avaliação toxicogenética de óxido de zinco: análise comparativa de nanopartículas e forma massiva em modelos alternativos / Marcela Correia da Rocha Honorato. - 2024.

59 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Nanotecnologia – Instrumentação – Teses. 2. Sobrevivência celular – Efeitos dos fármacos. 3. Óxido de Zinco – Toxicidade. 4. Testes de mutagenicidade – Métodos. I. Oliveira, Carlos Fernando Araújo Lima de. II. Felzenszwalb, Israel. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 620.3:615.9

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Marcela Correia da Rocha Honorato

**Avaliação toxicogenética de óxido de zinco:
análise comparativa de nanopartículas e forma massiva em modelos alternativos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 02 de abril de 2024.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando Araujo-Lima
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Coorientador: Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Andréia da Silva Fernandes
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Como forma de agradecimento ao apoio, carinho e investimento, dedico este trabalho aos meus maiores incentivadores, meus pais, Marcello e Cláudia;
Ao Drº Daniel Rosa Alvarez Simon (*em memória*);
A minha mãe do céu, Nossa Senhora de Fátima.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Marcello e Cláudia, por sempre me lembrarem que mar calmo nunca faz bom marinheiro. Sem vocês, nada disso seria possível. Agradeço o apoio emocional e moral da minha irmã Carolina. Ao Leandro, meu melhor amigo e companheiro de vida. Obrigada por não me deixarem desistir.

Agradeço o carinho da minha vó, Rosangela, e da minha madrinha, Angela; exemplos de profissionais da saúde. Ao apoio dos meus amigos de vida, Brenda, Vanessa, Pedro e Rafaela. Cada um de vocês tem extrema importância na minha vida.

Agradeço, com exaltamento, ao meu orientador Carlos Fernando Araújo Lima, pelo apoio e por ter me concedido a oportunidade de conhecer e desbravar um horizonte nunca visto por mim antes. Agradeço ao meu coorientador, Israel Felzenszwalb, pelo valiosíssimo apoio e pela oportunidade de fazer parte da família LabMut. Inquestionavelmente, vocês dois foram os responsáveis por todo o meu progresso tanto pessoal quanto profissional. Isto é impagável. A minha eterna e mais sincera gratidão.

Agradeço ao Laboratório de Mutagênese Ambiental por ter me acolhido. Sem dúvidas, eu nunca me esquecerei de todas as horas em que aquelas paredes foram a minha casa durante esses 2 anos de mestrado. E aos meus amigos de laboratório Alex, Natália, Lizandra, Bárbara, Letícia, Adrielli, Pedro, Eduardo, Lays e Prof^a. Dr^a. Andréia.

Agradeço aos professores e professoras da banca por cederem seus tão brilhantes conhecimentos para a avaliação deste estudo. Excepcionalmente, ao professor Adenilson, por ter aceitado de prontidão a revisão deste texto.

Agradeço ao Prof^o Dr^o Otniel Freitas Silva por ter cedido as amostras que foram utilizadas neste estudo.

Agradeço à Prof^a. Dra. Renata Jurema Medeiros e ao Magno Maciel Magalhães, do Laboratório de Fisiologia – Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), que aceitaram colaborar e participar da execução de parte deste trabalho e me permitiram conhecer o brilhante mundo do Zebrafish.

Em conclusão, agradeço à Universidade do Estado do Rio de Janeiro e ao Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, que abrigam carinhosamente o Laboratório de Mutagênese Ambiental, e às agências de fomento (CNPq, CAPES e FAPERJ) pelo apoio financeiro ao laboratório que, terminantemente, ajudou para a elaboração deste trabalho.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime,
pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

Josué 1:9

“Eu sou um universo de átomos, e ainda assim, um átomo no universo.”

Richard P. Feynman

RESUMO

HONORATO, Marcela Correia da Rocha. **Avaliação toxicogenética de óxido de zinco: análise comparativa de nanopartículas e forma massiva em modelos alternativos.** 2024. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A nanotecnologia consiste na manipulação e produção de materiais em escala nanométrica. É uma área da ciência que ganhou destaque e desenvolvimento nas últimas décadas. Devido ao tamanho reduzido, as nanopartículas possuem propriedades físicas e químicas mais intensas quando comparadas às moléculas em escala macroscópica. Em particular, as nanopartículas de Óxido de Zinco são usadas para o uso comercial devido às suas características antibacterianas, nanopesticidas e nanofertilizantes. Sua forma massiva (*bulk*) também é utilizada. Os efeitos nocivos do uso das nanopartículas do óxido de zinco e sua forma massiva levam à preocupação com o potencial tóxico das moléculas tanto para com os sistemas biológicos quanto para com o meio ambiente. A nanotoxicologia propõe-se a explorar os efeitos adversos dos nanomateriais. O objetivo do trabalho foi a avaliação toxicogenética das nanopartículas do óxido de zinco e sua forma massiva em modelos *in vitro* e *in vivo*, fazendo uma comparação da nocividade de ambas as formas do mesmo material. As concentrações testadas foram de 0,005 a 50µg/ml. Para o teste *in vitro*, com célula procariótica, foi realizado o teste de reversão bacteriana. O teste é conhecido como Teste de Ames ou *Salmonella*/microsoma. Possui como objetivo a identificação do potencial mutagênico de compostos químicos com o uso de cepas de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* que possuem mutações interferentes nos processos bioquímicos da síntese de histidina (His⁻). Os ensaios foram realizados com e sem ativação metabólica. Foram utilizadas as cepas TA97a, TA98, TA100, TA102, TA104 e TA1535. Como modelo eucariótico, foram utilizadas células da linhagem celular HepG2 (hepatocarcinoma humano), realizado o teste de sal de tetrazólio solúvel em água (WST-1) e observada a viabilidade celular através do dano mitocondrial. *In vivo*, foi realizado o Teste de Toxicidade Aguda em Embriões de Peixe Zebra (*Danio rerio*). O teste tem a finalidade de observar a letalidade aos embriões, bem como alterações morfológicas e cardíacas neste modelo após a exposição aguda às substâncias químicas. Nos ensaios *in vitro*, foi observado indução de mutagenicidade induzidas pelas duas formas do Óxido de Zinco com e sem metabolização exógena por S9 mix nas cepas TA98 e TA102. Na cepa TA100, foi observado efeito mutagênico sem S9 mix, induzida pela forma *bulk* na maior concentração testada. Na análise de WST-1, foi observada significativa citotoxicidade de forma dose-dependente induzida pelas nanopartículas na linhagem HepG2 quando comparado à forma massiva, promovendo maior dano mitocondrial e reduzindo a viabilidade celular. No modelo *in vivo*, foi observado que as nanopartículas interferiram no desenvolvimento anatômico dos embriões alterando o diâmetro dos olhos e tamanho corporal. Os batimentos cardíacos não foram alterados. Em síntese, considerando os resultados positivos para toxicidade *in vitro* e *in vivo*, o óxido de zinco na forma massiva e a forma nanoparticulada, precisam ter suas aplicabilidades revistas quanto à segurança toxicológica e a ecotoxicidade.

Palavras-chave: nanotoxicologia; nanopartículas de óxido de zinco; toxicidade.

ABSTRACT

HONORATO, Marcela Correia da Rocha. **Toxicogenetic evaluation of zinc oxide: comparative analysis of nanoparticles and bulk form in alternative models.** 2024. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Nanotechnology consists of the manipulation and production of materials on a nanometric scale. It is an area of science that has gained prominence and development in recent decades. Due to their small size, nanoparticles have more intense physical and chemical properties when compared to molecules on a macroscopic scale. In particular, Zinc Oxide nanoparticles are used for commercial use due to their antibacterial, nanopesticidal and nanofertilizer characteristics. Its bulk form is also used. The harmful effects of using zinc oxide nanoparticles and their massive form lead to concern about the toxic potential of the molecules for both biological systems and the environment. Nanotoxicology aims to explore the adverse effects of nanomaterials. The objective of the work was the toxicogenetic evaluation of zinc oxide nanoparticles and their massive form in *in vitro* and *in vivo* models, making a comparison of the harmfulness of both forms of the same material. The concentrations tested ranged from 0.005 to 50 µg/ml. For the *in vitro* test, with prokaryotic cells, the bacterial reversion test was performed. The test is known as the Ames or Salmonella/microsome test. Its objective is to identify the mutagenic potential of chemical compounds using strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium that have mutations that interfere with the biochemical processes of histidine (His-) synthesis. The assays were performed with and without metabolic activation. Strains TA97a, TA98, TA100, TA102, TA104 and TA1535 were used. As a eukaryotic model, cells from the HepG2 cell line (human hepatocarcinoma) were used, the water-soluble tetrazolium salt test (WST-1) was performed and cell viability was observed through mitochondrial damage. *In vivo*, the Acute Toxicity Test was carried out on Zebrafish Embryos (*Danio rerio*). The test aims to observe lethality to embryos, as well as morphological and cardiac changes in this model after acute exposure to chemical substances. In *in vitro* tests, induction of mutagenicity was observed in the Ames Test caused by the two forms of Zinc Oxide tested with and without exogenous metabolism in strains TA98 and TA102. In strain TA100, mutagenicity was observed without exogenous metabolism induced by the bulk form at the highest concentration tested. In the WST-1 analysis, greater cytotoxicity was observed in a dose-dependent manner caused by nanoparticles in the HepG2 lineage when compared to the bulk form, promoting greater mitochondrial damage and reducing cell viability. In the *in vivo* model, it was observed that the nanoparticles interfered with the anatomical development of the embryos, altering the diameter of the eyes and body size. The heartbeat was not changed. In summary, given the positive results for toxicity, both zinc oxide in bulk and nanoparticle form need to have their applicability reviewed in terms of toxicological safety and ecotoxicity.

Keywords: nanotoxicology; zinc oxide nanoparticles; toxicity.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Genótipo das linhagens de teste de <i>Salmonella</i> Typhimurium usadas no Teste de Ames	23
Quadro 2 –	Resultado do Teste de Ames com os valores de colônias revertentes de histidina com valores médios e desvio padrão da linhagem <i>Salmonella enterica</i> sorovar <i>Typhimurium</i> TA97a, TA98 e TA100	36
Quadro 3 –	Resultado do Teste de Ames com os valores de colônias revertentes de histidina com valores médios e desvio padrão da linhagem <i>Salmonella enterica</i> sorovar <i>Typhimurium</i> TA102, TA104 e TA1535	37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Desfecho sobre a viabilidade de células HepG2 frente ao contato agudo (24 h, 48 h e 72 h) com nanopartículas de Óxido de Zinco e a forma massiva (<i>bulk</i>)	38
Gráfico 2 –	Demonstração gráfica da medição do diâmetro dos olhos das larvas de <i>Danio rerio</i> após a exposição aguda às nanopartículas de Óxido de Zinco .	40
Gráfico 3 –	Demonstração gráfica da medição do tamanho corporal das larvas de <i>Danio rerio</i> após a exposição aguda às nanopartículas de Óxido de Zinco .	41
Gráfico 4 –	Demonstração gráfica da medição da frequência cardíaca (BPM) das larvas de <i>Danio rerio</i> após a exposição aguda às nanopartículas de Óxido de Zinco	41
Gráfico 5 –	Demonstração gráfica da porcentagem das pontuações das larvas de <i>Danio rerio</i> quanto à letalidade	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema representativo do ciclo de vida do <i>Danio rerio</i> (<i>Zebrafish</i>)	26
Figura 2 –	Variações morfológicas e eclosão embrionária provocadas pela toxicidade das nanopartículas de óxido de zinco após a exposição aguda aos embriões de <i>Danio rerio</i> (<i>Zebrafish</i>)	43
Figura 3 –	Variações morfológicas provocadas pela toxicidade das nanopartículas de óxido de zinco após a exposição aguda às larvas de <i>Danio rerio</i> (<i>Zebrafish</i>)	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-S9	Sem metabolização exógena
+S9	Com metabolização exógena
2-AA	2-Amino-antraceno
4NQO	4-nitroquinolina-N-1-óxido
ASMT	Sociedade Americana de Testes e Materiais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Azida sódica
B[a]P	Benzo(a)pireno
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DMSO	Dimetil sulfóxido
EC ₅₀	Concentração efetiva de 50%
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FET	Teste de toxicidade aguda em embriões de peixe
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HepG2	Linhagem celular de Adenocarcinoma Hepático Humano
<i>His</i> ⁺	Colônias Revertentes de Histidina
HPF	Horas pós fecundação
IM	Índice de Mutagenicidade
MMC	Mitomicina C
MMS	Metil-metanosulfonato
NPs	Nanopartículas
NP	Nanopartícula
NPMs	Nanopartículas Metálicas
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>)
pH	Potencial de Hidrogênio
SFB	Soro Fetal Bovino
S9 mix	Homogenato de Fígado de Rato induzido por Aroclor 1254

UV	Radiação Ultravioleta
ZnO NPs	Nanopartículas de Óxido de Zinco
ZnB	Óxido de Zinco na forma massiva (do inglês “ <i>Bulk</i> ”)
ZnN	Nanopartículas de Óxido de Zinco
ZnO	Óxido de Zinco
WST-1	<i>Water soluble tetrazolium-1</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
rpm	Rotações por minuto
µg	Micrograma
mL	Mililitro
±	Mais ou menos
O ₂	Oxigênio
mm	Milímetro
µL	Microlitro
nm	Nanômetro
<	Menor que
≤	Menor ou igual que
>	Maior que
≥	Maior ou igual que
=	Igual a

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1	Nanomateriais	18
1.1.1	<u>Nanopartículas Metálicas – NPMs</u>	19
1.1.2	<u>Nanopartículas de Óxido de Zinco</u>	19
2	MODELOS AVALIADORES DE ECOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E CITOTOXICIDADE	21
2.1	Modelo Procarioto	21
2.2	Modelo Eucarioto	23
2.3	<i>Zebrafish (Danio rerio)</i>	24
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo Geral	27
3.2	Objetivos Específicos	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Amostra	28
4.2	Aspectos éticos e Colaboração	28
4.3	Teste de Ames – Teste de Reversão Bacteriana	29
4.4	Cultura Celular	31
4.4.1	<u>Ensaio de Viabilidade Celular – Teste de WST-1</u>	32
4.5	FET	33
5	RESULTADOS	35
5.1	Mutagenicidade	35
5.2	Viabilidade Celular	38
5.3	FET	39
6	DISCUSSÃO	45
	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia surgiu e assomou aos processos industriais com a crescente utilização de materiais compostos por partículas em escala nanométrica. Segundo a Sociedade Americana de Testes e Materiais, nanomateriais são partículas ultrafinas, com comprimentos de duas ou três dimensões e que possuem tamanho em média de 1 a 100 nanômetros, podendo ou não apresentar intesividade de propriedade relacionadas ao seu tamanho. Dependendo da área de aplicação e do material utilizado, com o tempo, os nanomateriais se sobrepuseram ao uso de substâncias com a forma massiva (Wang, Wang, 2020). Dada escolha refere-se ao fato de que, como as nanopartículas se encontram em tamanho menor, essa diminuição faz com que haja uma modificação da superfície e amplificação da reatividade química aprimorando sua aplicação (Elsaesser; Howard, 2012).

Substâncias nanométricas são empregadas em diversos setores, tais como cosméticos, biotecnologia, eletrônicos, têxteis, engenharia ambiental e itens do cotidiano, além de desempenharem papel na área da saúde, sendo utilizadas em diagnósticos por imagem e no desenvolvimento de sistemas para administração de medicamentos (Bonnard *et al.*, 2019; L. Zhang *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2019).

Nas últimas décadas, a nanomedicina tem se demonstrado uma das áreas promissoras da nanotecnologia com o uso de nanofármacos. Devido ao seu tamanho ultrapequeno, as partículas podem ser empregadas como mecanismos de entrega de remédios em tratamentos focados em tecidos e receptores celulares específicos (Bogdanović *et al.*, 2014) sendo utilizadas para o tratamento de diversas doenças, em especial, o câncer, com o método de *drug delivery* (Bahrami *et al.*, 2017; Gholipourmalekabadi *et al.*, 2017). As nanopartículas também estão presentes em novos métodos de tratamento baseados na antibioticoterapia devido ao surgimento de cepas resistentes aos antibióticos (Katas *et al.*, 2019) além de também estarem presentes em preparações cosméticas como os protetores solares, sendo usados na sua composição nanopartículas de zinco e titânio desde a década de 1980 (Weir *et al.*, 2012).

Uma das classes de nanopartículas é a de óxidos metálicos. As nanopartículas de óxido de zinco compreende partículas empregadas quimicamente pelas suas capacidades físicas e químicas, como a alta capacidade semicondutora, fotocatalisadora e alta estabilidade química. Bem como a forma nanoestrutural, a forma massiva também é utilizada comercialmente (Mendoza-Milla *et al.*, 2022). Alguns benefícios semelhantes são encontrados em outros nano-óxidos metálicos, como o óxido de cobre (CuO); dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de zinco (ZnO) (Stankic *et al.*, 2016).

Mediante as aplicabilidades do material nanoparticulado, desde a fabricação até seu destino final, também é necessária a atenção quanto ao seu descarte para que não impacte negativamente o ambiente aquático, por exemplo. Conseqüentemente, os organismos ali presentes também seriam afetados. Compostos químicos entrando ou não de maneira intencional em contato com o ambiente e com os organismos gera desequilíbrio ambiental e, conseqüentemente, impacto ecotoxicológico (Dai *et al.*, 2014).

As propriedades vantajosas dos nanomateriais podem resultar em um efeito prejudicial ao organismo humano e ao ambiente. Com a redução do tamanho, fica mais evidente a facilidade de penetração no corpo através dos sistemas digestivo, dérmico e respiratório, além de conseguirem alastrar com mais facilidade no sangue através dos capilares (Tee *et al.*, 2019). Os efeitos nocivos ao ambiente, como o solo e a água, levam em consideração a bioacumulação e a capacidade de intervir no desenvolvimento de organismos aquáticos (Kühr *et al.*, 2018).

Com a implementação do uso dos nanomateriais, são necessários esclarecimentos quanto aos seus efeitos nocivos à saúde humana e ambiental (Lewinski *et al.*, 2008). Para o auxílio dessas informações, a nanotoxicologia propõe-se a avaliar os efeitos nocivos dos materiais nanométricos com o auxílio de metodologias direcionadas ao entendimento da interação nanopartícula-célula (Radaic *et al.*, 2016).

O campo denominado toxicogenética gera debates acerca das mudanças resultantes da exposição a agentes físicos e químicos no material genético de todos os seres vivos. A mutagenicidade é uma área estudada nesse ramo e lida com as alterações na sequência nucleotídica que ocorrem em nível gênico - substituições, inserções ou deleções de um ou mais nucleotídeos - ou cromossômico, originadas por rearranjos ou quebras, modificando sua estrutura (danos clastogênicos) ou afetando sua integridade numérica, por ganho ou perda de cromossomos inteiros (danos aneugênicos) (Kummrow e Umbuzeiro, 2021).

Dentre as aplicabilidades de metodologias experimentais incluídas na toxicogenética para as avaliações de nocividade, são encontrados testes *in vitro*, com modelo procarioto e eucarioto e *in vivo*, a fim de aprimorar e esclarecer os resultados. O teste de mutação reversa bacteriana, também conhecido como Ensaio *Salmonella*/microsossoma ou Teste de Ames, é utilizado como uma das primeiras abordagens *in vitro* na avaliação de substâncias que causam mutações genéticas pontuais. Se configura como uma alternativa à utilização de procedimentos que envolvam animais de experimentação (Carrão-Dantas *et al.*, 2022). Também *in vitro*, metodologias são aplicadas com células mamíferas a fim de observar o efeito citotóxico às células frente à exposição das substâncias químicas, como o teste de WST-1 (Ngamwongsatit *et al.*, 2008).

Para as avaliações ecotoxicológicas, o modelo peixe-zebra, do inglês *Zebrafish*, é utilizado como modelo toxicológico. Esse modelo tem ganho força para estudo em nanotecnologia por ser intermediário entre modelos celulares e mamíferos além de conseguirem ser mais complexos para ver o impacto da distribuição das nanopartículas. (Torres-Ruiz *et al.*, 2021). É escolhido pela alta homologia com a genética humana e sua fácil manutenção laboratorial, apresentando vantagens como alta taxa de fecundação e embriões transparentes (Lee *et al.*, 2021).

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Nanomateriais

A nanotecnologia é um dos ramos mais promissores da tecnologia sobre o qual se depositam grandes expectativas. O prefixo grego “nano” significa “anão” ou refere-se a algo muito pequeno (Bayda et al., 2019). A Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (do inglês, *The National Nanotechnology Initiative* – NNI) assegura a nanotecnologia como “uma ciência, engenharia e tecnologia conduzida em nanoescala, onde fenômenos únicos permitem novas aplicações, desde a química, física e biologia, até medicina, engenharia e eletrônica”. Quanto ao uso de nanopartículas, é necessária a preocupação na utilização de estruturas controladas devido a sua forma e tamanho e, por conseguinte, o zelo quanto à utilização das vantagens das propriedades das partículas em nanoescala (Barhoum *et al.*, 2022).

Posteriormente, o termo foi aplicado à nanociência, que compreende o entendimento dos eventos que abrangem a manipulação, seja na conceção, controle e alteração dos materiais em várias escalas - atômica, molecular e macromolecular - estando ligada a várias áreas do conhecimento como engenharia, física, química, biologia, eletrônica, informática e medicina (Khatoon *et al.*, 2023). No entanto, a literatura já descreve o uso das nanopartículas sendo usadas pelos humanos desde o século IV dC, na Roma antiga, com a aplicação das nanomoléculas aos vidros. O mais arcaico e pioneiro deste exemplo foi denominado Cálice de Licurgo (Barhoum *et al.*, 2022). Existem os prós e contras para todos os protocolos de síntese de nanopartículas, que podem envolver processos químicos e biológicos (Zhang *et al.*, 2016). As metodologias de síntese geram resíduos tóxicos (Rai & Yadav, 2013) e, mesmo a deposição dos produtos tóxicos na superfície das nanopartículas, os métodos químicos ainda são os mais utilizados (Narayanan & Sakthivel, 2010).

Dada escolha refere-se ao fato de ter um maior controle do tamanho e da forma do material nanoparticulado. Para esta síntese são utilizados íons de prata – mais comumente nitrato de prata – provocando *clusters* de prata metálica. Também são usados agentes estabilizadores a fim de promover uma melhor estabilidade coloidal com o propósito de amplificar o controle da forma geométrica da nanopartícula (Meng *et al.*, 2010).

Em escala nanométrica, há o confinamento de elétrons no interior da partícula, acentuando suas propriedades magnéticas, ópticas e elétricas (Liu *et al.*, 2016) fazendo com que sejam acentuados os aspectos toxicológicos dos nanomateriais sendo analisado em conjunto com o período de exposição, quantidade, agregação, densidade, dimensão, formato, superfície e carga (Altunbek *et al.*, 2014).

1.1.1 Nanopartículas Metálicas – NPMs

Partículas metálicas em escala nanométrica são pequenos fragmentos de partículas de que podem ser feitas de diversos tipos de metais, incluindo ouro, prata, ferro, entre outros compostos (Król *et al.*, 2017). Devido às propriedades físico-químicas, as nanopartículas metálicas, bem como outras classes de materiais nanométricos, possuem a capacidade de diferenciação dos seus análogos em escalas maiores como a alta funcionalidade, biocompatibilidade, ampla disponibilidade e maior reatividade de superfície (Patil & Burungale, 2020).

Nanopartículas à base de metal e de óxido metálicos, com a presença de oxigênio na sua composição química, apresentam características eletroluminescentes e termoelétricas mais intensas (Seabra & Durán, 2015). O tamanho das partículas impacta nas propriedades de reatividade e capacidade de interação com o meio externo. A reatividade está relacionada ao volume da área de superfície, concentração, nível de agregação e o recobrimento da nanopartícula (Grassian, 2008).

1.1.2 Nanopartículas de Óxido de Zinco

No grupo de óxidos metálicos, encontra-se o óxido de zinco (ZnO) e sua forma nanoestruturada. Sua forma massiva é encontrada na crosta terrestre como um mineral zincita e é classificado como um composto inorgânico. Em alimentos, é um oligoelemento essencial (Moatamed *et al.*, 2019), pois participa do metabolismo, desempenhando papéis importantes em proteínas, síntese de ácido nucleico, hematopoiese e neurogênese (Jiang *et al.*, 2018) e é usado como aditivo em diversos produtos como pomadas, tintas e plástico (Jiang *et al.*, 2018).

A forma nanoestruturada do óxido de zinco possui alta aplicabilidade na composição de materiais de uso tópico devido sua atividade antimicrobiana devido à capacidade de interagirem com as membranas celulares após o rompimento da parede celular (Ahmad *et al.*, 2013). Dependendo da dosagem e do tamanho da partícula, a toxicidade também é levada em consideração para o êxito da sua ação e a capacidade de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (Derbalah *et al.*, 2012).

Sua aplicação comercial mais comum é na fórmula de protetores solares com a finalidade de agir como uma barreira física protetora sobre a pele fazendo com que os raios ultravioleta sejam refletidos e dispersos (Ginzburg *et al.*, 2021).

Além disso, as nanopartículas apresentam melhor dispersão em produtos de uso tópico, as tornando transparente na solução utilizada e mais esteticamente aceitável (Sharma *et al.*, 2012).

A pesquisa em nanotoxicologia avança em conjunto com os estudos de nanotecnologia, visando identificar os potenciais perigos e riscos relacionados aos nanomateriais (Maynard, 2012). Para alcançar esse propósito, a nanotoxicologia busca estabelecer e identificar os danos causados pelos nanomateriais desenvolvidos e aplicados em materiais que entram em contato com as células (Akçan *et al.*, 2020).

2 MODELOS AVALIADORES DE ECOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E CITOTOXICIDADE

Apesar da utilização comercial das nanopartículas, é encontrado na literatura que ainda existem o riscos iminentes de nocividade proveniente do seu uso (Inoue & Takano, 2011). Substâncias cancerígenas, como o amianto e o tabaco, foram expostas aos humanos antes mesmo da identificação da sua malignidade à saúde humana. Com a forma estrutural semelhante a essas substâncias, algumas nanopartículas também apresentam efeitos fibrogênicos e tóxicos (Berk & Akkurt, 2012). A utilização de métodos experimentais para avaliar a toxicidade e mutagenicidade são fundamentais para a avaliação de outras nanopartículas e é importante para a aprovação regulatória de novas substâncias e produtos que serão usado por seres humanos (KUMMROW e UMBUZEIRO, 2021).

Dessa maneira, existem diversos experimentos combinados em baterias de testes aplicados na avaliação toxicológica, com o objetivo de investigar a segurança e eficácia de uma substância. Essas diretrizes envolvem a realização de ensaios em laboratório com organismos simples e complexos, assim como testes em células somáticas e/ou germinativas. (KUMMROW e UMBUZEIRO, 2021). Os testes *in vitro* e *in vivo* são métodos que permitem selecionar materiais de alto rendimento para avaliar sua biocompatibilidade para aplicações médicas e comerciais.

2.1 Modelo Procarioto

O ensaio de mutação reversa bacteriana, conhecido como teste de *Salmonella*/microsossoma ou também Teste de Ames, é utilizado como um dos primeiros testes para avaliar substâncias que podem ou não causar mutações genéticas pontuais (ROUBICEK *et al.*, 2021). O método representa a ser uma alternativa ao uso de testes que façam a utilização de animais em em laboratório (CARRÃO-DANTAS *et al.*, 2022). O método segue a conformidade da Norma No 471 (OECD, 2020).

Regularmente, a OECD (2020) recomenda primariamente o uso das cepas TA1535, TA97a, TA98, TA100 e TA102. O teste tem como objetivo empregar cepas geneticamente modificadas da bactéria *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium originárias da linhagem LT2 para depender da adição do aminoácido histidina no meio de cultura, tornando-as incapazes de crescer na ausência dessa substância essencial (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

O procedimento envolve uma etapa inicial de pré-exposição das cepas a diferentes compostos, a fim de identificar aqueles que têm potencial para induzir mutações. Isso pode ser feito na presença ou ausência de um sistema externo de metabolização chamado S9 mix, composto por um homogenato hepático de rato e cofatores capazes de ativar a mimetização hepática necessária do componente em estudo, algo que as bactérias naturalmente não possuem (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Quando as células bacterianas entram em contato com a substância teste e isso resulta em eventos mutagênicos, é possível determinar a magnitude ou força da mutagenicidade causada por essa amostra contando o número de colônias que crescem como resultado do retorno ao fenótipo original dessas células. Elas são cultivadas em um meio seletivo com traços de histidina e biotina (ROUBICEK *et al.*, 2021).

Diferentes mutações são atribuídas às linhagens utilizadas e as modificações genéticas feitas nas cepas de *Salmonella* Typhimurium permitem que as bactérias se tornem sensíveis a agentes mutagênicos que provocam danos no DNA por diferentes mecanismos específicos, como a oxidação dos nucleotídeos (MORTELMANS e ZEIGER, 2000) e aumente a sensibilidade a xenobióticos de alto peso molecular (MARON e AMES *et al.*, 1983). A mutação $\Delta uvrB$, que compreende a deleção do gene que irá codificar o reparo por excisão de nucleotídeos - a remoção em *uvrB* vai até o gene do aminoácido biotina, o que resultou em cepas que necessitam dessa substância - o plasmídeo *pKM101* (fator R) que aumenta a quantidade de reversões espontâneas ao induzir um sistema de reparo propenso a erros e proporciona resistência ao antibiótico ampicilina; o plasmídeo *pAQ1* que confere a mutação da cepa TA102, ocasionando a detecção de mutações nos pares AT e proporciona resistência ao antibiótico tetraciclina, e a mutação *rfa* que causa uma modificação na composição da camada de polissacarídeos da superfície celular bacteriana, permitindo assim um aumento na permeabilidade a grandes moléculas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000) (Quadro 1).

Quadro 1 – Genótipo das linhagens de teste de *Salmonella Typhimurium* usadas no Teste de Ames.

Linhagem	Mutação <i>His^r</i>	Mutação Específica	pAQ1	pKM101	$\Delta uvrB$	<i>rfa</i>
TA97a	<i>hisD6610</i>	CCCCCC	-	+	+	+
TA98	<i>hisD3052</i>	CGCGCGCG	-	+	+	+
TA100	<i>hisG46</i>	GGG	-	+	+	+
TA102	<i>hisΔG46</i>	TAA	+	+	-	+
TA1535	<i>hisG46</i>	GGG	-	-	+	+

Fonte: A autora (2024). Adaptado de MARON E AMES (1983); MORTELMANS E ZEIGER (2000). pKM101 (plasmídeo, aumento de mutagênese espontânea); *His^r* (produção de histidina nula); pAQ1 (plasmídeo, resistência a tetraciclina); $\Delta uvrB$ (reparo à luz UV); *rfa* (gene que induz aumento de permeabilidade de membrana).

2.2 Modelo Eucarioto

Os testes de citotoxicidade e crescimento celular são empregados na triagem de drogas para identificar se as substâncias testadas impactam na multiplicação celular ou possuem efeitos citotóxicos diretos (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016). As células de hepatoma são amplamente empregadas como substitutos aos hepatócitos humanos primários para estudos *in vitro* (Choi *et al.*, 2015).

Elas se destacam por terem uma vida longa, apresentarem um perfil constante, serem de fácil manipulação e amplamente disponíveis. Dentre os hepatomas humanos, a linhagem HepG2 é a mais utilizada em pesquisas sobre metabolismo de drogas e hepatotoxicidade, por este motivo, foram utilizadas para o teste de viabilidade celular. Essas células se reproduzem rapidamente e possuem uma morfologia similar a células epiteliais, desempenhando várias funções específicas do fígado (Donato *et al.*, 2015). O ensaio WST-1 é o método mais comum para a avaliação de citotoxicidade *in vitro* de produtos químicos.

No teste, os sais de tetrazólio são clivados em formazan por enzimas celulares. Uma expansão no número de células viáveis resulta em um aumento na atividade global das desidrogenases mitocondriais na amostra, o que por sua vez aumenta a quantidade de formazan formado mudando a coloração do meio e, após, é realizada a quantificação do corante produzido por células metabolicamente viáveis.

A quantidade de células vivas em uma amostra, conhecida como viabilidade celular, e a multiplicação das células são essenciais para compreender como certos genes, proteínas e vias afetam a sobrevivência ou morte celular diante de substâncias tóxicas (Peskin & Winterbourn, 2017). O reagente WST-1 apresenta variadas vantagens em comparação com os outros reagentes à base de sal de tetrazólio como a melhor solubilidade em água, rapidez, maior sensibilidade e estabilidade (Scarcello *et al.*, 2020).

2.3 Zebrafish (*Danio rerio*)

Há três décadas, o cientista George Streisinger fez a escolha do peixe-zebra (*Danio rerio*), um teleósteo pertencente à família Cyprinidae, como modelo para suas pesquisas genéticas em seu laboratório. Atualmente, essa espécie - conhecida como paulistinha no Brasil (Streisinger *et al.*, 1981). O *D. rerio* já tinha sido descrito em 1882 por Francis Hamilton em seu livro chamado “*An account of the fishes found in the river Ganges and its branches*” (Hamilton, 1882). Originalmente, a espécie é mais comumente encontrada no sul da Ásia e distribuída nas regiões da Índia, Bangladesh e Nepal (Lawrence, 2007).

Com a quantidade significativa de dados provenientes de pesquisas genéticas e de desenvolvimento, aliada à iminente finalização do projeto do genoma do peixe-zebra (Hill *et al.*, 2005), tornou-se cada vez mais interessante utilizar esse peixe como modelo para estudos toxicológicos (MacRae & Peterson, 2023).

Embora normalmente os dados confiáveis para prever efeitos tóxicos em humanos sejam obtidos por meio de estudos laboratoriais com roedores, esses são mais dispendiosos e demorados. Uma vez que o genoma do peixe-zebra apresenta alto grau de similaridade com os genomas de humanos e de camundongos (Howe *et al.*, 2014), suas características o tornam um modelo seguro na pesquisa em nossos tempos (MacRae & Peterson, 2023).

Os benefícios de utilizar o peixe-zebra como modelo para estudos toxicológicos em comparação com outras espécies de vertebrados estão relacionados ao seu tamanho pequeno, fácil manejo e morfologia inicial. Medindo aproximadamente entre 3 e 4 centímetros, este teleósteo pode ser facilmente mantido e distribuído nos aquários, necessitando de pouco espaço (Howe *et al.*, 2014).

Ao contrário de espécies maiores, o tamanho reduzido do peixe-zebra em sua fase larval e adulta resulta em custos menores devido à necessidade de quantidades menores de substâncias - tais como produtos químicos experimentais, medicamentos e poluentes - e, conseqüentemente, gera menos resíduos a serem eliminados (Bambino & Chu, 2017). Além disso, há uma redução na quantidade de materiais de laboratório e produtos químicos necessários tanto para tratar e manter os peixes vivos quanto para conduzir diversos testes toxicológicos (Rubinstein, 2006).

O modelo possui baixo custo de manutenção e apresenta alta taxa de fecundidade. A cada acasalamento, a fêmea pode colocar em média de 200 a 300 ovos em uma manhã, e se mantidos em estado favorável, repetir este ciclo a cada 5 a 7 dias (Choi *et al.*, 2021). A rapidez, a quantidade da desova e a facilidade de acesso aos ovos reflete na facilidade de manejo e de tempo na utilização do modelo.

Uma característica benéfica e atrativa no peixe-zebra são os seus embriões transparentes e isso auxilia na observação do embrião para que sejam analisadas qualquer disfunção morfológica fora da normalidade no processo do seu desenvolvimento e possuem uma rápida maturação sexual, entre três e seis meses (Figura 1) (D'Costa & Shepherd, 2009).

O peixe possui alta sensibilidade ao entrar em contato com produtos químicos, pois consegue absorver rapidamente os compostos acrescentados diretamente à água e armazená-los em vários tecidos, principalmente no sistema nervoso central (Lieschke & Currie, 2007).

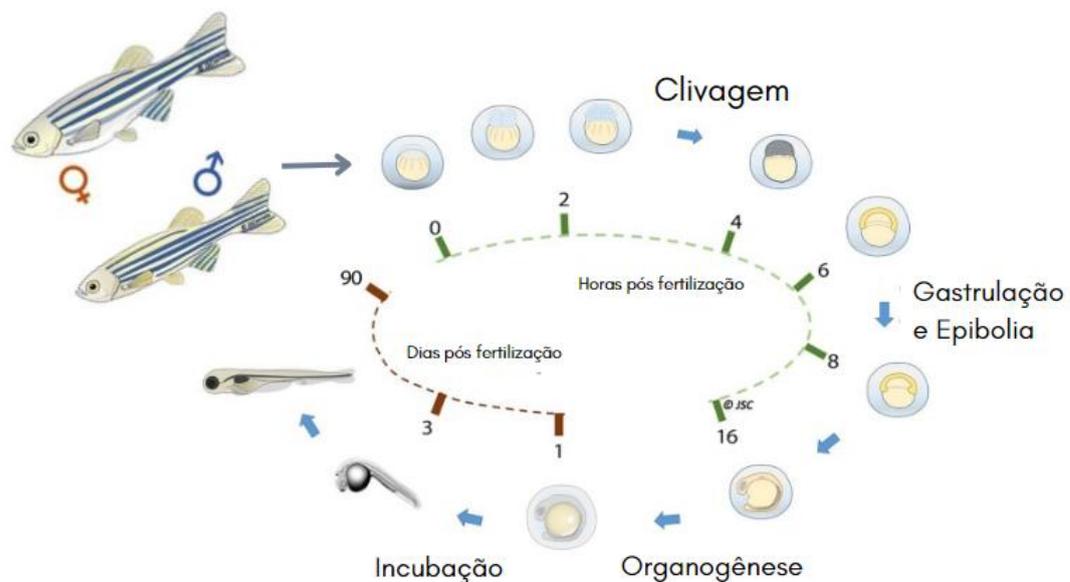
O modelo é utilizado para diferentes análises afim de detectarem resultados comportamentais e de toxicidade aguda. Os testes comportamentais são feitos na maioria das vezes no estágio de vida larvar e adulto. Embriões de peixes-zebra ótimas opções para avaliar os riscos ambientais de produtos químicos, pois permitem análises em pequena escala e com alta eficiência. Além de serem usados na detecção da toxicidade aguda, esses embriões são excelentes para estudos dos mecanismos tóxicos e possíveis efeitos adversos a longo prazo (Scholz *et al.*, 2008).

Os testes de toxicidade aguda são comumente realizados no estágio embrionário. A literatura já descreve alguns produtos químicos da classe de metais avaliados quanto à toxicidade em peixes-zebra como o cádmio, cobre e o ferro (Rougier *et al.*, 1996). Os resultados de exposição aguda, em sua maioria, demonstram toxicidade de dose-resposta, efeitos deletérios induzindo problemas na taxa de eclosão embrionária e sobrevivência das larvas, anormalidades morfológicas.

O embrião de peixe-zebra tem uma variedade impressionante de aplicações nas ciências ambientais, e a incorporação de métodos moleculares e sistêmicos da pesquisa biomédica provavelmente ampliará sua utilização na ecotoxicologia (Hill *et al.*, 2005).

Comumente, o teste de toxicidade aguda realizado com o modelo *Danio rerio* é o FET. O ensaio baseia-se no seguimento da diretriz 236 da OECD, que orienta o ensaio no que tange a determinação de toxicidade à exposição aguda de produtos químicos em embriões de peixes. O teste é indicado a diversas amostras que exibem variadas solubilidades, volatilidades, hidrofobicidades e modos de ação (OECD, 2013).

Figura 1 – Esquema representativo do ciclo de vida do *Danio rerio* (Zebrafish).



Legenda: Esquema demonstrativo do ciclo de vida do *Zebrafish* horas e dias após a sua fertilização. O desenvolvimento embrionário acontece *ex vivo* sendo possível expor o ovo com facilidade a xenobióticos de interesse a fim da visualização do impacto no desenvolvimento do animal. As fêmeas adultas diferem do macho por exibirem uma pretuberância abdominal. Fonte: A autora. (2024). Adaptado de Ribeiro, O. *et al.* 2022.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos toxicogênicos da nanopartícula do óxido de zinco e sua forma massiva em modelos *in vitro* com células procarióticas e eucarióticas e em modelo *in vivo* em embriões de Zebrafish.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) avaliar o potencial mutagênico *in vitro* da nanopartícula de Óxido de Zinco e sua forma massiva;
- b) investigar a ação da nanopartícula de Óxido de Zinco e sua forma massiva *in vitro* sobre a viabilidade celular;
- c) avaliar o efeito de toxicidade *in vivo* da exposição de ZnO NPs considerando *end points* desenvolvimento corporal, ocular e cardiovascular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

A Nanopartícula de Óxido de Zinco (ZnO) e a forma massiva (ZnB) foram obtidas comercialmente das empresas Sigma-Aldrich[®] (Brasil, 677450 – 5G) e Dinâmica Química Contemporânea[®] (Brasil, Lote: 111138), respectivamente. Ambas as amostras foram gentilmente cedidas pelo pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Prof. Dr. Otniel Freitas Silva.

Para os ensaios *in vitro*, ambas as amostras foram preparadas em soluções de estoque. A forma nanoparticulada (ZnN) a 10 mg/ml e a forma massiva (ZnB) a 20 mg/ml em dimetilsulfóxido (DMSO) como veículo de diluição. Foram mantidas sob congelamento em tubos identificados e protegidos da luz. As diluições seriadas foram para obter as concentrações de 0,005; 0,05, 0,5; 5 e 50 µg/ml para o ensaio de mutagenicidade e as mesmas concentrações para o ensaio de viabilidade celular.

Para os ensaios *in vivo*, a nanopartícula de óxido de zinco foi preparada em solução estoque de 58,9 µl/ml. A amostra foi diluída em água Milli-Q[®] e, posteriormente, foram realizadas diluições seriadas no meio embriônico específico para o FET nas concentrações de 1,875; 3,75; 7,5 e 15,0 µg/ml.

4.2 Aspectos Éticos e Colaboração

Os testes contemplaram a avaliação da segurança, eficácia e tolerabilidade em modelo animal *Zebrafish* (*Danio rerio*). Essa etapa foi desenvolvida em colaboração com a prof. Dra. Renata Jurema Medeiros, no Laboratório de Fisiologia – Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), estando aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número de parecer: LW-38/19 e LW-39/19. O laboratório parceiro também realizou a caracterização das nanopartículas anteriormente aos testes realizados.

4.3 Teste de Ames – Método de Reversão Bacteriana

As linhagens utilizadas foram cultivadas a partir de estoques pertencentes ao Laboratório de Mutagênese Ambiental localizado na Universidade do Estado do Rio de Janeiro, no Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Antes de todos os ensaios, foram realizados protocolos de checagem de genótipo para todas as linhagens utilizadas tanto para controle laboratorial quanto para confirmação de autenticidade para a realização dos ensaios (ROUBICEK et al., 2021).

Posteriormente as cepas na solução criopreservadora foram descongeladas em proporção de 1:1. Uma alíquota 10 ml de meio de cultivo bacteriano Lysogenic Broth (ou Meio LB) foram adicionados em um erlenmeyer, em seguida foi adicionado 200 µl da solução bacteriana. De acordo com a necessidade, foi adicionado aos 200 µl de LB 2,5 µL/mL de tetraciclina, 32 µl/ml de ampicilina ou ambos juntos.

A incubação ocorreu por 12 a 16 horas a 37° C, sob agitação de 150 a 170 rpm. Após esse período, repetiu-se o processo com 100 µl da suspensão bacteriana anterior. Após as culturas de *Salmonella enterica sorovar* Typhimurium serem retiradas da incubação, foram posteriormente acondicionadas em baixa temperatura para garantir a fase estacionária de crescimento até serem manuseadas na cabine de segurança biológica. Obrigatoriamente, no dia anterior aos ensaios, foram preparadas novas culturas bacterianas contendo aproximadamente $1-2 \times 10^9$ células/ml.

Aos tubos de ensaio, em triplicata para cada concentração, sem metabolização exógena, foi adicionado 500 µl de tampão fosfato de sódio 0,2 M com pH 7,4. Posteriormente, foram adicionados 100 µl da cultura bacteriana e 100 µl de cada concentração da nanopartícula de óxido de Zinco e da sua forma massiva separadamente. As concentrações utilizadas foram 0,005; 0,05, 0,5; 5 e 50 µg/ml. No controle negativo, foi utilizado o volume de 100 µl de DMSO e para o positivo, 100 µl referente a cada cepa. Os controles positivos utilizados nos ensaios sem metabolização exógena, -S9, foram: para TA97a e TA98, respectivamente, 9-aminoacridina (9-AA, 50 µg/placa) e 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO, 0,5 µg/placa); para TA100 e TA1535 azida sódica (AS, 5 µg/placa); TA102 mitomicina-C (MMC, 0,5 µg/placa) e TA104 metassulfonato de metila (MMS, 250 µg/placa). Para os ensaios com ativação metabólica, +S9 foi usado 2-aminoantraceno (2-AA, 5 µg/placa).

De acordo com as recomendações de Maron e Ames (1983), o metabolizador exógeno - descrito como S9 mix - foi reconstituído em água estéril ultrapura e foi adquirido da empresa Moltox TM (Boone, Carolina do Norte, Estados Unidos). Para os testes com metabolização exógena, foram adicionados aos tubos 500 µl de S9 mix 4% que foi preparado no mesmo dia do experimento e mantido em refrigeração até a hora da sua utilização.

Para preparar 50 ml da mistura S9 mix 4% foi adicionado 2,0 ml do liofilizado da fração microsomal de fígado de rato a 1,0 ml de solução de MgCl₂-KCl 0,15M; 250µl de solução de glicose-6-fosfato 1M; 2,0 ml de solução de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADP) 1M; 25 ml de solução tampão fosfato de sódio 0,2M e 19,75 ml de água ultrapura estéril.

Seguido o modelo de pré-incubação todo o conteúdo foi pré incubado e mantido sob agitação a 37°C e 150 a 170 rpm durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 ml de solução líquida recentemente preparada de ágar de superfície a 45°C (0,6% ágar, 0,6% NaCl), suplementada com 10% de solução histidina e biotina 0,05 mM. Após a homogeneização do conteúdo dos tubos, esse foi adicionado à placas de Petri que continham meio Vogel-Bonner. Após a estabilização de toda solução dentro das placas, foi realizada a incubação por 60 a 72 horas (Ref). O ensaio descrito foi repetido em três vezes para as duas amostras.

Após o período de incubação, as placas foram examinadas visualmente e foram contados os números de colônias bacterianas presentes na superfície do ágar com a finalidade de determinar o índice de mutagenicidade (IM). Esse índice é calculado pela razão entre o número médio de revertentes His⁺, resultantes tanto de mutações espontâneas quanto induzidas, em cada concentração teste e o número médio de revertentes espontâneas (controle negativo).

Foi considerado resultado positivo quando se encontrava maior e/ou igual a 2 ($IM \geq 2,0$). A resposta citotóxica também foi analisada haja vista a resposta a exposição às amostras levando em consideração uma porcentagem de menor e/ou igual a 50% ($\leq 50\%$) de sobrevivência celular (Ref). Foi utilizada a análise de variância *one-way* ANOVA ($p < 0,05$) para determinações de diferenças estatísticas entre os grupos e executadas pelo *software* Graph Pad Prism (versão 8). Por fim, os resultados foram agrupados e tabulados utilizando o Microsoft Excel (versão 2020).

4.4 Cultura Celular

A linhagem utilizada para os ensaios de viabilidade celular foi a HepG2. As células foram adquiridas conforme suas necessidades de cultivo no Laboratório de Mutagênese Ambiental na Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os criotubos contendo a solução de criopreservação - que consiste em 95% de meio próprio e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) – foram mantidos em nitrogênio líquido.

Após o descongelamento da linhagem, toda a manipulação com a solução foi realizada dentro da cabine de segurança biológica. Com o auxílio de uma micropipeta, todo o conteúdo foi adicionado a um tubo cônico de centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos. A centrifugação ocorreu após o tubo ser completado com 9 ml do meio de cultivo celular específico para HepG2 - *Dulbecco's modified Eagle Medium* - DMEM (Cultilab®, Campinas, Brasil) com pH 7,4, suplementado com 1% de solução 10 mg/ml penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich®, Brasil) e 10% de soro fetal bovino - SFB (Cultilab®, Brasil).

Após a centrifugação e a observação do sedimento ao fundo do tubo cônico, o sobrenadante foi descartado e todo o conteúdo restante da centrifugação foi misturado com 2 mL do meio de cultivo celular. Após o conteúdo do tubo contendo as células ser bem homogeneizado, foi passado 1 ml do conteúdo para uma garrafa de cultivo celular aderente média com 75 cm² e preenchida com o meio de cultivo celular específico da linhagem HepG2. As garrafas foram mantidas sob incubação em estufa de CO₂ a 5% e 37°C. Após 48 h, as células proliferaram e alcançaram a densidade celular, de 85 a 95% de confluência na superfície da garrafa de cultivo.

Após a checagem das células viáveis, as mesmas foram passadas para uma nova garrafa da mesma proporção com o descarte do meio por inversão. Antes do descarte, a mudança de coloração do meio foi levada em consideração devido ao consumo dos nutrientes propriamente dito indicando mudança de pH de 7,4 para 6 e cor alterada de vermelho para amarelada. Após o processo, para lavagem, foi adicionado 10 ml de salina tamponada com fosfato PBS (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄), descartado, e em seguida começou o processo de remoção das células aderidas ao fundo da garrafa de cultivo com a adição de 5 ml de tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich®, Brasil).

A tripsina/EDTA foi mantida dentro da garrafa sob incubação durante 5 minutos para o êxito do seu efeito. Após, foi adicionado 10 ml de meio próprio do cultivo celular de HepG2

e retirado o volume final de 10 ml para a centrifugação do conteúdo em tubo cônico.

Após, foi adicionado meio próprio do cultivo celular e levadas para a contagem das células viáveis por meio do método de exclusão por azul de tripano 0,4% (Thermo Fischer®, EUA). Após a homogeneização da suspensão celular, para a contagem, foi adicionado 20 µl de suspensão, 30 µl de PBS, 30 µl de azul de tripano em um microtubo de 1,5 ml. Logo depois, retirou-se 10 µl da suspensão para adicioná-la a câmara de Neubauer para a realização da visualização e contagem das células.

A contagem foi feita tendo em vista as células viáveis e não viáveis, sendo as viáveis de coloração transparentes e a não viáveis de coloração azul em cada quadrante da câmara. As células viáveis foram levadas em consideração na contagem da densidade multiplicando-as pela capacidade máxima da câmara 10^4 mais o fator de diluição da solução (meio de cultivo celular) utilizado nas células. Seguidamente, para a semeadura das células em placas de 96 poços, foi necessária a densidade celular de $1,0-2,0 \times 10^6$ células/ml.

Para tal, as células foram cultivadas em garrafas de cultivo até obterem a densidade dita anteriormente. Para isto, foi adicionado 1,0 ml da suspensão para uma nova garrafa de cultivo grande com 150 cm^2 . O procedimento foi repetido ao mínimo três vezes para o ocorrer a semeadura das células com êxito.

4.4.1 Ensaio de Viabilidade Celular – Teste de WST-1

Para dar continuidade ao teste usando as células HepG2 cultivadas, iniciou-se o processo com o plaqueamento das células em microplacas de 96 poços sob a densidade de $2,0 \times 10^4$ células/poço. Cada poço obteve um volume final de 100 µl/poço e mantidas 24 h em incubação de estufa de CO_2 a 5% e 37°C . Por conseguinte, prosseguiu-se a etapa de tratamento. Para o tratamento, foram adicionadas as amostras ZnN e ZnB, a 0,005; 0,05, 0,5; 5 e 50 µg/ml como volume final cada uma. A fim de avaliar a viabilidade de 100% e 0% das células para os controles, foi utilizado DMSO como controle negativo, e como controle positivo, o Triton X-100 (Thermo Fischer, ref. #HFH10). O processo de exposição das substâncias testadas nas células ocorreu durante 24, 48 e 72 horas. Todo o ensaio foi realizado em triplicata. Após o fim de cada tempo mencionado anteriormente, seguindo a ordem dos dias e as observações do fabricante, as células foram submetidas à reação com o *Cell Proliferation Reagent Kit WST-1* (Roche®, Brasil).

Em cada poço, o conteúdo contendo as amostras de ZnB, ZnN e os controles negativo e positivo foram removidos. Os poços foram lavados com cuidado com 50 µl de PBS. Após a remoção do PBS, a solução de WST-1 foi preparada no meio de cultivo celular próprio da HepG2. O preparo continha 10 µl de WST-1 + 90 µl de meio de cultivo celular. Foi adicionado a cada poço 100 µl da solução. Por conseguinte, a placa foi levada à incubação durante 3 horas para a reação com o reagente. Chegado o fim do período de incubação, o meio ficou de cor amarelada – desfecho da transformação de WST-1 em sal de formazan solúvel – e, em seguida, foi realizada a leitura da absorbância.

A leitura foi executada em um leitor de microplacas (Celer, MG/BR) com a configuração para espectros de 440nm de comprimento. Nas análises estatísticas do ensaio de Viabilidade Celular foram levados em consideração os resultados da leitura de absorbância dos controles negativos (100% de sobrevivência) e controle positivos (0% de sobrevivência). Os ensaios foram realizados ao menos 3 vezes (n=3) para as análises com a linhagem celular HepG2 e cada concentração em triplicata em ambas as amostras além dos controles.

Os resultados foram usados para o cálculo de regressão não-linear da resposta dose-dependente (agonista). Ademais, foram feitas as leituras de três poços, sem células plaqueadas, que continham apenas a solução de WST-1 preparado em meio próprio. Os poços foram considerados como leitura de fundo “branco background reading”. Uma vez mais, as discrepâncias estatísticas entre os grupos foram determinadas por análise de variância one-way ANOVA (p.<0,05) posteriormente à de Tukey, realizada pelo software Graph Pad Prism.

4.5 FET

Os ovos recém fertilizados foram expostos às quatro concentrações de nanopartículas de óxido de zinco 1,875; 3,75; 7,5 e 15,0 µg/ml que foram calculadas a partir da menor letalidade média observada no teste de viabilidade celular (24h: 15,03). Durante o período de 96 horas, em uma placa de 24 poços, sendo 1 placa por tratamento (20 embriões expostos às NPs e 4 em meio embriônico para controle interno de placa) e mais 1 placa inteira de controle negativo. Portanto, para o ensaio, foram utilizadas 5 placas e 120 ovos, a cada rodada, sendo o ensaio realizado em triplicata. Com as diluições já realizadas em meio embriônico E3 (750 mM KH₂PO₄; 250 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM NaCl; 50 mM KCl; 500 mM CaCl₂+2H₂O; 350 mM NaHCO₃), em cada poço foi inserido um ovo fertilizado em 2 ml de meio com a amostra ou meio embriônico puro.

A cada 24 horas, as condições dos embriões eram verificadas e classificadas de acordo com os parâmetros esperados de morfologia (Menke et al., 2011), além de serem avaliadas os quatro parâmetros de letalidade citados na diretriz da OCED, que são: coagulação de ovos fertilizados, falta ou malformação de somito, ausência de deslocamento da cauda do saco vitelínico e ausência de batimento cardíaco. Esses parâmetros de má-formação seguem uma ordem de classificação segundo a OECD e são avaliados no último dia do teste. (Ref)

Durante o período de exposição, o meio não foi trocado e os resultados de tempo foram levados em consideração considerando as horas pós-fecundação dos embriões (hpf). Após o preenchimento das placas, as mesmas foram levadas à estufa incubadora com o fotoperíodo e a climatização controlados ($26^{\circ}\text{C}\pm 1$; 14 h com luminosidade).

Foram mantidas dentro da estufa até o final dos 4 dias, tirando somente a cada 24 horas para as análises necessárias no estereomicroscópio. As análises feitas foram a cada poço individualmente e anotadas. No último dia, em 96 hpf, cada embrião foi colocado sob lâminas para microscopia de vidro, medindo 26x76mm com espessão de 1,0-1,2 mm.

Para a estabilização do animal na lâmina, foi colocada uma gota de carboximetilcelulose (CMC) de baixa viscosidade a 15% m/m\ v e, com o auxílio de uma agulha, foram ajustados para o corpo ficar o mais reto e com a melhor posição anatômica possível. Por fim, cada larva foi fotografada e filmada no estereomicroscópio para as análises futuras de diâmetro dos olhos, medidas do tamanho corporal e batimentos cardíacos por minuto (bpm).

Nas análises estatísticas do FET, foram levadas em consideração as análises observadas de cada embrião até o estado larval, individualmente, durante o passar dos cinco dias de teste, diferindo-os com o controle negativo. Cada teste foi realizado ao menos 3 vezes (n=3) com 10 larvas por grupo além dos controles. As análises foram para o desenvolvimento do tamanho corporal, comprimento corporal, dos olhos, batimentos cardíacos por minuto e a média das pontuações relativas de sobrevivência de cada grupo para as 4 concentrações testadas.

Foi utilizada a análise de normalidade D'Agostino & Pearson e análise de *two-way* ANOVA com teste de múltiplas comparações de Dunnet ($p = 0,05$) para as estatísticas de diâmetro de corporal, ocular, cardíaco e variância da média das pontuações. Posteriormente, os dados foram executados pelo software Graph Pad Prism (versão 8).

5 RESULTADOS

5.1 Mutagenicidade

No Teste de Ames, ambas as amostras testadas induziram mutagenicidade na linhagem de *Salmonella enterica sorovar* Typhimurium tanto na presença quanto na ausência de metabolização exógena (-S9/+S9). (Quadro 2)

Na ausência de metabolização exógena (-S9), foi observada a indução de mutagenicidade pela nanopartícula na cepa TA98, na concentração de 50 µg/placa, e na TA102 com 5 µg/placa e também 50 µg/placa. Já na presença de metabolização exógena (+S9), após ser metabolizada, também houve indução de mutagenicidade nas linhagens TA98, nas concentrações de 0,005; 0,05 e 0,5 µg/placa e TA102 em todas as concentrações testadas.

A forma massiva (*bulk*) apresentou indução de mutagenicidade sem metabolização exógena (-S9) na cepa TA98 na concentração de 50µg/placa e na TA102 com 5 e 50µg/placa. Na presença de metabolização exógena (+S9), induziu mutação nas cepas TA98, nas concentrações de 0,005; 0,05 e 0,5µg/placa e TA102 que, como a nanopartícula, também induziu mutação com todas as concentrações testadas.

Quadro 2 – Resultado do Teste de Ames com os valores de colônias revertentes de histidina com valores médios e desvio padrão da linhagem *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium TA97a, TA98 e TA100.

Cepa	µg/placa	Nanopartícula de Óxido de Zinco ZNN				Óxido de Zinco (Bulk) ZNB			
		-S9 ¹		+S9 ²		-S9		+S9	
		I.M. ³	His ⁺ ±DP ⁴	I.M.	His ⁺ ± DP	I.M.	His ⁺ ± DP	I.M.	His ⁺ ± DP
TA97a	0	1,0	165 ± 5	1,0	168 ± 4	1,0	165 ± 5	1,0	168 ± 4
	0,005	0,5	47 ± 3	0,3	52 ± 4	0,2	37 ± 4	0,3	46 ± 4
	0,05	0,4	58 ± 3	0,4	60 ± 6	0,4	60 ± 8	0,4	58 ± 5
	0,5	0,4	68 ± 1	0,4	68 ± 2	0,4	67 ± 3	0,4	67 ± 2
	5	0,5	71 ± 4	0,5	72 ± 2	0,5	78 ± 10	0,4	71 ± 3
	50	0,5	83 ± 9	0,6	91 ± 2	0,5	87 ± 8	0,5	80 ± 4
TA98	0	1,0	30 ± 2	1,0	35 ± 4	1,0	30 ± 2	1,0	35 ± 4
	0,005	1,9	55 ± 6	2,5	75 ± 4	1,2	36 ± 6	2,5	75 ± 3
	0,05	1,9	56 ± 4	2,3	67 ± 1	1,4	43 ± 9	2,2	69 ± 1
	0,5	1,8	52 ± 5	2,0	59 ± 2	2,5	75 ± 9	2,2	67 ± 2
	5	1,8	54 ± 6	1,8	55 ± 5	3,0	90 ± 8	1,6	46 ± 5
	50	2,4	72 ± 9	1,8	54 ± 4	2,0	59 ± 8	1,2	36 ± 1
TA100	0	1,0	144 ± 8	1,0	146 ± 11	1,0	144 ± 7,5	1,0	146 ± 11
	0,005	0,2	31 ± 4	0,1	20 ± 5	0,7	26 ± 3,6	0,2	22 ± 4
	0,05	0,3	39 ± 8	0,2	26 ± 7	0,9	30 ± 6,1	0,2	27 ± 4
	0,5	0,2	32 ± 4	0,2	25 ± 4	1,7	35 ± 5,9	0,2	27 ± 2
	5	0,2	30 ± 3	0,3	37 ± 3	1,7	38 ± 6,1	0,3	39 ± 2
	50	0,2	30 ± 5	0,3	37 ± 3	2,0	33 ± 5,8	0,3	41 ± 2

Legenda: 1⁽¹⁾ -S9, ausência de metabolização exógena ; 2⁽²⁾ +S9, presença de metabolização exógena; 3⁽³⁾ Índice de mutagenicidade; 4⁽⁴⁾ DP - Desvio padrão. Em negrito, os resultados positivos para mutagenicidade. Controles positivos sem S9: 4NQO (0,5 µg/placa) para TA98 600 ± 80 revertentes; AS (5 µg/placa) para TA1535 975 ± 48 revertentes e TA100 1.200 ± 50 revertentes; MMC (0,5 µg/placa) para TA102 2.130 ± 8 revertentes; MMS (250 µg/placa) para TA104 1.120 ± 74 revertentes; 9AA (50 µg/placa) para TA97 a 585 ± 13 revertentes. Com S9:2AA (5 µg/placa) para TA98 1.137 ± 9 revertentes; para TA102 1.618 ± 15 revertentes; para TA100 1.400 ± 27 revertentes; para TA104 1.486 ± 18 revertentes; para TA1535 560 ± 23 revertentes; para TA97a 1.000 ± 58 revertentes.

Quadro 3 – Resultado do Teste de Ames com os valores de colônias revertentes de histidina com valores médios e desvio padrão da linhagem *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium TA102, TA104 e TA1535.

Cepa	Nanopartícula de Óxido de Zinco ZNN					Óxido de Zinco (Bulk) ZNB				
	µg/placa	-S9 ¹		+S9 ²		I.M.	-S9		+S9	
		I.M. ³	His ⁺ ± DP ⁴	I.M.	His ⁺ ± DP		His ⁺ ± DP	I.M.	His ⁺ ± DP	
TA102	0	1,0	324 ± 13	1,0	461 ± 7	1,0	324 ± 13	1,0	461 ± 7	
	0,005	1,0	321 ± 4	2,2	1033 ± 6	0,7	222 ± 3	2,2	1028 ± 6	
	0,05	1,0	323 ± 10	2,4	1127 ± 8	0,9	287 ± 9	2,3	1078 ± 3	
	0,5	1,0	318 ± 10	2,4	1119 ± 7	1,7	554 ± 23	2,4	1120 ± 7	
	5	2,2	708 ± 38	2,4	1122 ± 6	1,7	549 ± 45	2,5	1169 ± 4	
	50	2,7	879 ± 3	2,7	1123 ± 4	2,0	636 ± 14	2,4	1119 ± 13	
TA104	0	1,0	392 ± 10	1,0	396 ± 5	1,0	392 ± 10	1,0	396 ± 5	
	0,005	0,4	155 ± 12	0,4	166 ± 5	0,6	224 ± 8	0,4	157 ± 3	
	0,05	0,5	179 ± 7	0,5	188 ± 2	0,6	232 ± 20	0,5	186 ± 3	
	0,5	0,5	318 ± 8	0,5	193 ± 6	0,5	213 ± 11	0,5	194 ± 6	
	5	0,6	708 ± 5	0,6	220 ± 5	0,6	248 ± 19	0,6	225 ± 5	
	50	0,5	879 ± 4	0,6	225 ± 5	0,6	236 ± 11	0,6	222 ± 8	
TA1535	0	1,0	26 ± 4	1,0	27 ± 2	1,0	26 ± 4	1,0	27 ± 2	
	0,005	0,3	8 ± 1	0,5	13 ± 5	0,5	12 ± 2	0,4	11 ± 2	
	0,05	0,3	8 ± 2	0,7	18 ± 2	0,6	16 ± 3	0,6	15 ± 3	
	0,5	0,5	12 ± 2	0,7	18 ± 3	0,6	16 ± 2	0,6	17 ± 3	
	5	0,6	15 ± 2	0,8	22 ± 3	0,7	17 ± 2	0,8	21 ± 2	
	50	0,6	15 ± 3	1,1	29 ± 2	0,8	20 ± 2	0,9	25 ± 5	

Legenda: 1⁽¹⁾ -S9, ausência de metabolização exógena ; 2⁽²⁾ +S9, presença de metabolização exógena; 3⁽³⁾ Índice de mutagenicidade; 4⁽⁴⁾ DP - Desvio padrão. Em negrito, os resultados positivos para mutagenicidade. Controles positivos sem S9: 4NQO (0,5 µg/placa) para TA98 600 ± 80 revertentes; AS (5 µg/placa) para TA1535 975 ± 48 revertentes e TA100 1.200 ± 50 revertentes; MMC (0,5 µg/placa) para TA102 2.130 ± 8 revertentes; MMS (250 µg/placa) para TA104 1.120 ± 74 revertentes; 9AA (50 µg/placa) para TA97 a 585 ± 13 revertentes. Com S9:2AA (5 µg/placa) para TA98 1.137 ± 9 revertentes; para TA102 1.618 ± 15 revertentes; para TA100 1.400 ± 27 revertentes; para TA104 1.486 ± 18 revertentes; para TA1535 560 ± 23 revertentes; para TA97a 1.000 ± 58 revertentes.

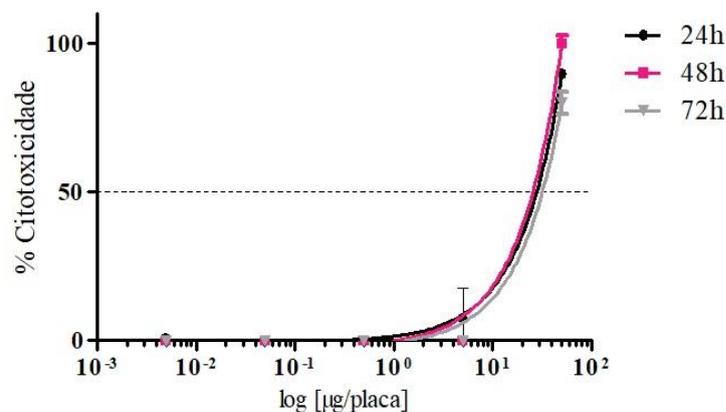
5.2 Viabilidade Celular

Após a exposição das células da linhagem HepG2 às amostras testadas no ensaio de WST-1, foram observados aumento da indução à citotoxicidade (Figura 2). Para a forma massiva, observou-se aumento da citotoxicidade na maior concentração testada nos três tempos de tratamentos.

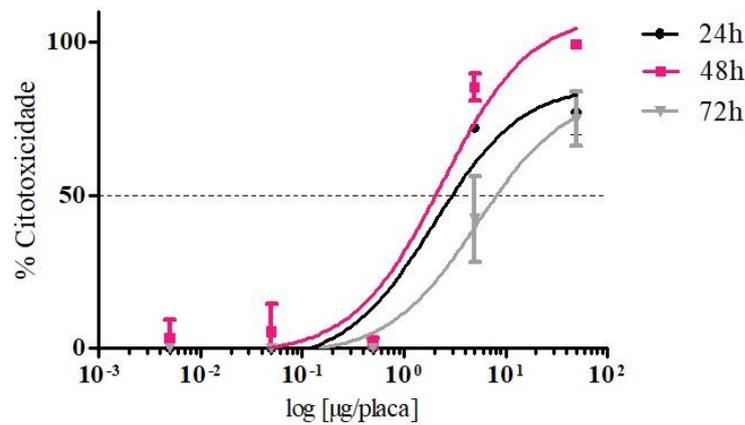
As células expostas à forma nanoestruturada do Óxido de Zinco apresentaram efeito citotóxico de forma dose-dependente em 24, 48 e 72 h de exposição e partir das menores concentrações (0,005; 0,05, 0,5 $\mu\text{g/ml}$).

Gráfico 1 – Desfecho sobre a viabilidade de células HepG2 frente ao contato agudo (24 h, 48 h e 72 h) com nanopartículas de Óxido de Zinco e a forma massiva (*bulk*).

A) Óxido de Zinco – Nulk (ZnB)
HepG2



B) Nanopartícula de Óxido de Zinco – Nulk (ZnB)
HepG2



Legenda: Representação gráfica da citotoxicidade (%) induzida pelo Óxido de Zinco (A) e sua forma nanoparticulada (B) em células da linhagem de Hepatocarcinoma Humano (*HepG2*) por análise de regressão não linear (*Log do efeito agonista vs. resposta*).

5.3 FET

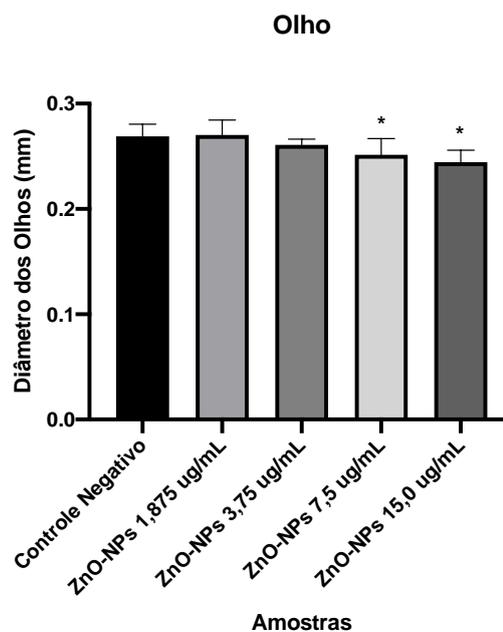
Após a exposição aguda dos embriões às nanopartículas de óxido de zinco as respostas obtidas foram levadas em consideração seguindo a análise de desenvolvimento corporal, dos olhos, e aferição dos batimentos cardíacos das larvas a fim de detectar a intervenção da toxicidade no crescimento em comparação com o controle negativo e analisar o crescimento do embrião.

Em relação aos olhos (Gráfico 2), as duas maiores concentrações (7,5 e 15 µg/ml) induziram diferença de desenvolvimento quando comparado ao controle negativo. Para a observação da evolução do tamanho corporal, observou-se que apenas a maior concentração (15µg/ml) diferiu do controle negativo (Gráfico 3) indicando uma redução do crescimento significativa, ou seja, as larvas deste grupo cresceram menos e com isso, há o indicativo de que a velocidade de crescimento pode ter sido afetada.

Nas observações da frequências cardíacas não foram encontradas diferenças (Gráfico 4). Já nas ponderações das porcentagens (Gráfico 5) das pontuações, duas concentrações diferiram do controle negativo na maior pontuação (4) – pontuação que classifica morte, coagulação ou alterações morfológicas incompatíveis com a vida – a menor e a maior concentração, de 1,875 e 15 µg/ml (Gráfico 2 e 3).

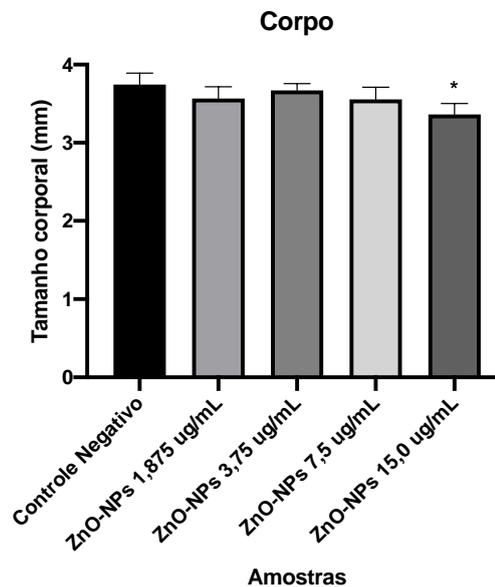
Visto a facilidade de solubilização das nanopartículas em meio embriônico - meio indispensável para a realização do teste - o ensaio foi realizado. No entanto, encontrou-se dificuldade de diluição com a forma massiva no meio embriônico. A forma em pó utilizada apresentou sedimentação no meio e, mesmo testando colocá-las com o embrião, observou-se a sedimentação no poço da placa, invalidando assim qualquer resultado que compreendesse a absorção das partículas pelo córion do embrião. Por este motivo, a realização do teste com a forma massiva foi interrompida e direcionada a análises futuras com o objetivo de serem utilizadas dosagens coerentes para a realização do método e a obtenção de resultados favoráveis.

Gráfico 2 – Demonstração gráfica da medição do diâmetro dos olhos das larvas de *Danio rerio* após a exposição aguda às nanopartículas de Óxido de Zinco.



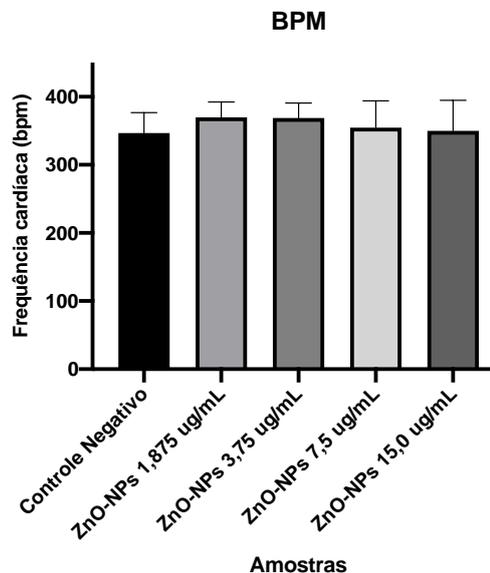
Legenda: Representação gráfica da análise do diâmetro dos olhos (mm) das larvas sendo observada uma diferença significativa com o controle negativo nas concentrações de 1,875; 7,5 e 15 ug/ml sugerindo intervenção no desenvolvimento (* significância a diferentes níveis p: 7,5 ug/ml: 0,0223 / 15 ug/ml: 0,001).

Gráfico 3 – Demonstração gráfica da medição do tamanho corporal das larvas de *Danio rerio* após a exposição aguda às nanopartículas de Óxido de Zinco.



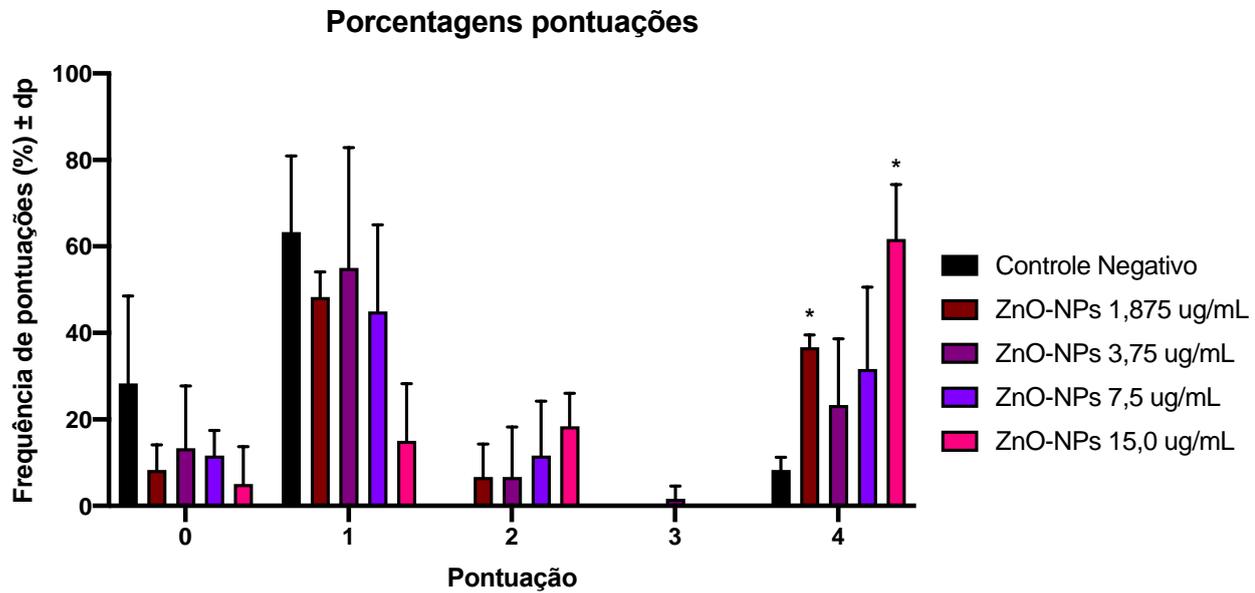
Legenda: Representação gráfica da análise do tamanho corporal (mm) das larvas sendo observada uma diferença significativa com o controle negativo na concentração testada sugerindo intervenção no crescimento (* significância a diferentes níveis p: 15 ug/ml: < 0,0001).

Gráfico 4 – Demonstração gráfica da medição da frequência cardíaca (BPM) das larvas de *Danio rerio* após a exposição aguda às nanopartículas de Óxido de Zinco.



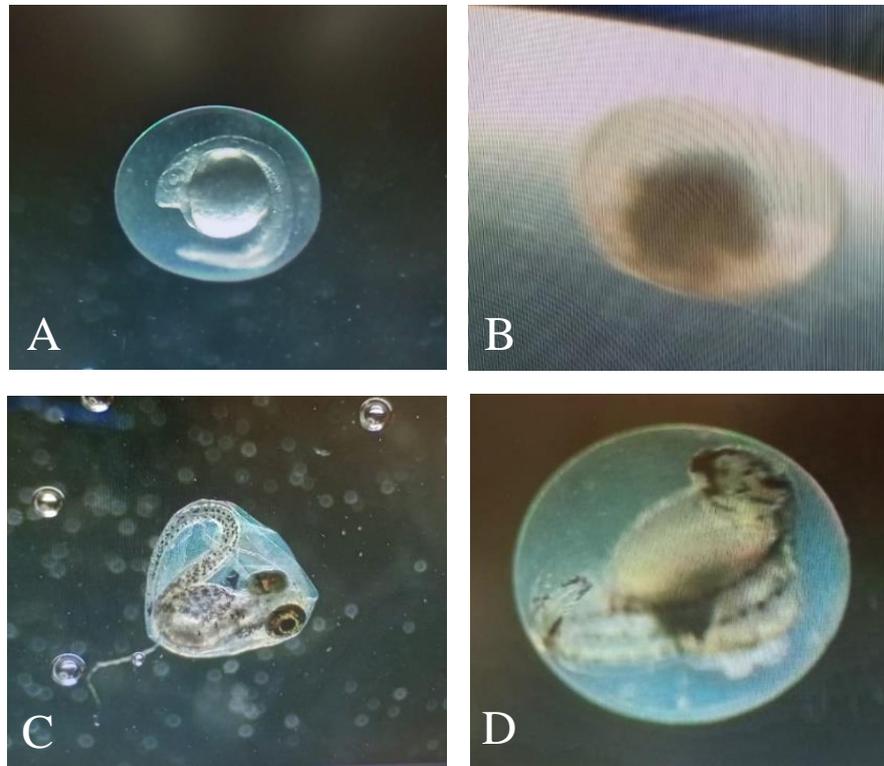
Legenda: Representação gráfica da análise da medição da frequência cardíaca (bpm) das larvas não sendo observada alteração significativa.

Gráfico 5 – Demonstração gráfica da porcentagem das pontuações das larvas de *Danio rerio* quanto à letalidade.



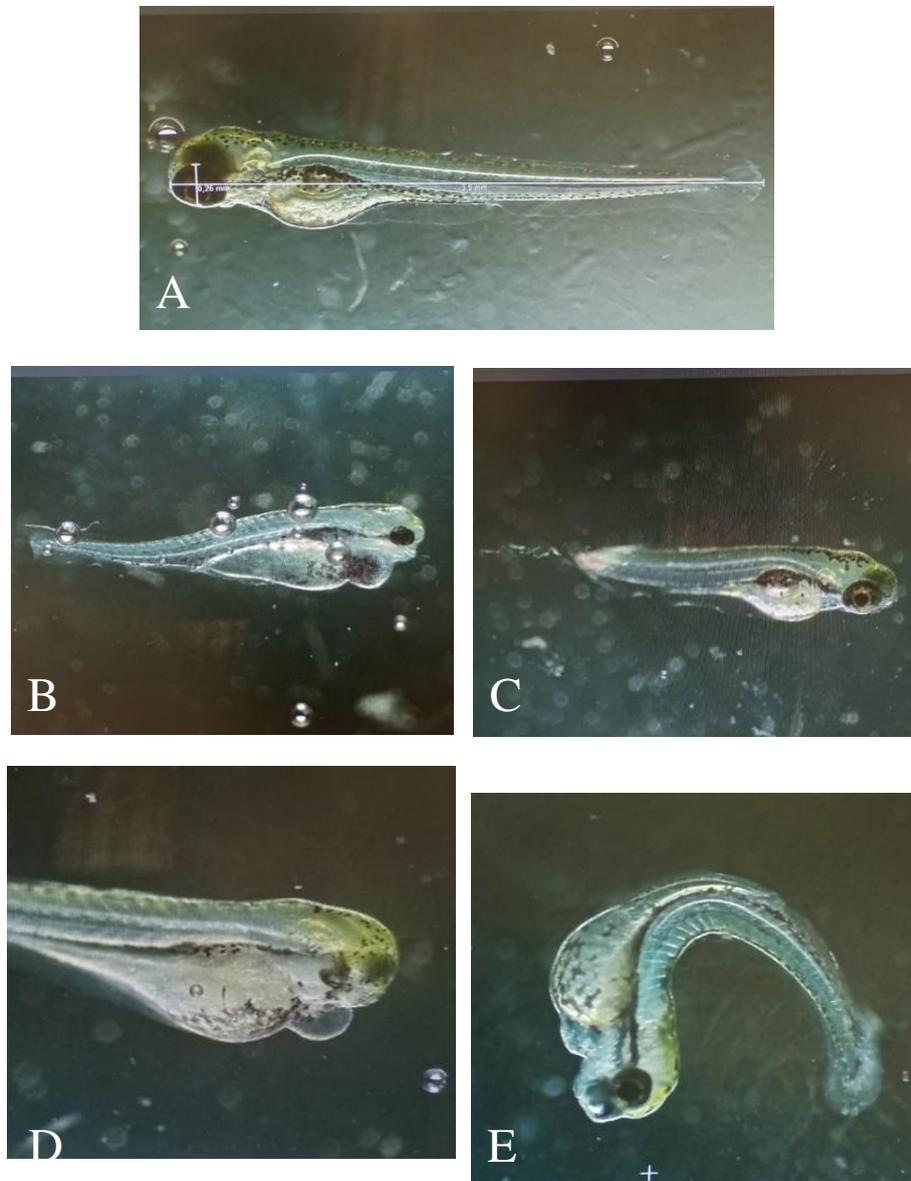
Legenda: Representação gráfica da frequência relativa de cada pontuação em cada grupo testado. Na pontuação 4, nas concentrações de 1,875 e 15 ug/ml, foi demonstrada uma maior incidência de morte (* significância a diferentes níveis p: 1,875 ug/ml: 0,0397 / 15 ug/ml: 0,0299).

Figura 2 – Variações morfológicas e eclosão embrionária provocadas pela toxicidade das nanopartículas de óxido de zinco após a exposição aguda aos embriões de *Danio rerio* (Zebrafish).



Legenda: Variações anatômicas incompatíveis com a vida no período embrionário de *Danio rerio* após a exposição aguda à nanopartícula de óxido de zinco a 15 $\mu\text{g/ml}$. A) Embrião morfolologicamente normal; B) Morte embrionária, embrião coagulado; C) Embrião desenvolvido porém sem batimento cardíaco ainda ao interior do córion visualmente não funcional; D) Má formação do corpo, cabeça e cauda. Fonte: A autora (2024).

Figura 3 – Variações morfológicas provocadas pela toxicidade das nanopartículas de óxido de zinco após a exposição aguda às larvas de *Danio rerio* (Zebrafish).



Legenda: Variações anatômicas incompatíveis com a vida no período larvar de *Danio rerio* após a exposição aguda à nanopartícula de óxido de zinco a 15 $\mu\text{g/ml}$. A) Larva morfológicamente normal; B) Estágio larval com pretuberância de pericárdio; C) Edema caudal sem a formação da porção final da cauda; D) Má formação ocular; E) Curvatura da coluna vertebral danificada. Fonte: A autora (2024).

6 DISCUSSÃO

Nanopartículas têm se tornado cada vez mais populares desde que foram identificadas como um tipo especial de material. Esse crescimento se deve às propriedades físico-químicas únicas das partículas em escala nanométrica, o que levou a um aumento no desenvolvimento, produção e uso deliberado delas em diversos setores. Estão presentes em mais de 1.800 produtos comerciais diferentes, abrangendo várias áreas de aplicação (Buchman et al., 2019) e, por isto, tem havido um esforço para compreender os mecanismos de toxicidade das nanopartículas para organismos ambientais relevantes (Buchman et al., 2019).

Através de metodologias laboratoriais *in vivo* e *in vitro*, a nanotoxicologia busca entender os mecanismos de toxicidade das nanopartículas e como é a interação das partículas com as células (Najahi-Missaoui et al., 2020). Características de superfície já foram descritas e associadas à capacidade tóxica das partículas, como área superficial, forma, condição e tempo de exposição - aguda ou crônico – classe de pertencimento, capacidade de agregação, carga e solubilidade (Ali, 2023).

A análise toxicológica é fundamental para detectar os perigos associados à exposição a uma substância. Ela desempenha um papel crucial na tomada de decisões, por exemplo, ao estabelecer os limites máximos permitidos de aditivos alimentares e ao aprovar um medicamento, levando em consideração tanto a eficácia em alcançar o resultado terapêutico desejado quanto os eventuais efeitos adversos. Um dos efeitos adversos avaliados é o potencial de causar danos no DNA (Nicolette, 2017).

As maneiras como as partículas causam a toxicidade nas células podem ser pelos mecanismos de ligação das nanopartículas ao exterior celular. Essa interação pode levar à absorção das nanopartículas com base na interação eletrostática (Huang et al., 2017). As partículas entram na célula por via endocitose ou livre interagindo de modo agudo com o microambiente celular (Ganguly et al., 2018). Quando englobadas pelo lisossomo, o ambiente ácido causa a rápida liberação dos íons que irão interagir com as proteínas citosólicas. As mitocôndrias possuem o papel de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) gerando o estresse oxidativo, o citocromo C é liberado desencadeando uma cascata de caspases (Egbuna et al., 2021) e resultando o processo em apoptose (De Matteis & Rinaldi, 2018).

A produção de ROS e o estresse oxidativo que acompanha as nanopartículas já é um mecanismo revisado pela nanotoxicidade (von Moos & Slaveykova, 2014) como induzido por nanopartículas de ferro (Ševců et al., 2011).

A dissolução dos íons tóxicos também é uma maneira das NPs induzirem dano celular. Os íons²⁺ podem se ligar a proteínas e enzimas comprometendo criticamente seu papel e, assim, inibir funções celulares (Barras & Fontecave, 2011).

Com a metodologia *in vitro* à toxicidade dos compostos, o teste de Ames, também chamado de *Salmonella*/microsossoma, foi usado como exemplo de método para avaliação de mutagenicidade com *S. Typhimurium* (Mortelmans & Zeiger, 2000). O método de Ames é extensamente empregado na identificação da toxicidade genética de diversos compostos químicos e tem sido cada vez mais utilizado na avaliação do risco de novos poluentes ambientais, como os nanomateriais (Pan, 2021).

O teste, sendo a forma mais acessível da fase pré-clínica de triagem de compostos e produtos químicos, é comumente uma das primeiras abordagens toxicogenéticas adotadas em baterias de testes requeridos para o registro de candidatos a aditivos em alimentos, medicamentos, moléculas em desenvolvimento, misturas de substâncias químicas, entre outras coisas (ROUBICEK *et al.*, 2021).

A relação entre um composto com efeito mutagênico positivo observado no teste de Ames e sua capacidade de ser cancerígeno atinge uma taxa de 83% (Zeiger, 2019). A mistura S9 é composta pela fração microsossomal derivada da homogeneização do fígado de ratos, que foram induzidos quimicamente para produzir enzimas citocromo (CYP), principalmente CYP1A1 e CYP1A2. Com a adição desse sistema externo de metabolização, se torna possível a potencialização da atuação de agentes mutagênicos com a mimetização da metabolização hepática (Zeiger, 2019).

Os resultados demonstram resposta mutagênica nas cepa TA102, TA98 e TA100 tanto pelas nanopartículas quanto pela forma massiva com e sem a indução de metabolização exógena. A cepa de *Salmonella Typhimurium*, TA102, refere-se a uma linhagem com maior capacidade de detectar mutágenos oxidantes por possuírem um par de bases A-T no sítio de reversão primário (OECD 471, 2009). É competente para o sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), para detecção de agentes indutores de *cross-linking*. A presença do plasmídeo pKM101 estimula o reparo do DNA por translesão, um sistema acionado quando há grave dano ao DNA (Vaisman *et al.*, 2012). Já a linhagem TA98 possui pares de bases G-C no sítio primário de reversão (Mortelmans & Zeiger, 2000). Ademais, já são descritas na literatura mutações em TA100 induzidas pela nanopartícula de óxido de cobre (CuO), sugerindo mutações do tipo substituição de pares de bases (Pan & Zhang, 2021).

Com a metodologia *in vitro* de viabilidade celular, utilizando a célula metabolicamente competente HepG2, foram demonstrados resultados que indicaram maior citotoxicidade induzida pelas nanopartículas de óxido de zinco de forma dose-dependente. O fígado é um órgão complexo, com uma anatomia e função diversificadas. É o maior órgão interno, possuindo mecanismos de defesa variados contra substâncias estranhas. As células endoteliais apresentam poros grandes, facilitando ainda mais a entrada de nanopartículas (Park *et al.*, 2009).

Mesmo que os íons metálicos liberados devido à dissociação quando a partícula é exposta à célula sendo descrito como o principal mecanismo de toxicidade oriunda das nanopartícula de óxidos metálicos (Li *et al.*, 2014), é descrito na literatura que os íons Zn^{2+} liberados das nanopartículas podem, sozinhos, não ter um efeito significativo na viabilidade celular (Shen *et al.*, 2013) e o contato da célula com as partículas seria um indicativo de citotoxicidade.

As análises realizadas tanto com as nanopartículas quanto com a forma massiva sugerem baixa citotoxicidade do ensaio de WST induzida pela forma massiva, quando comparado com a forma nano. Os resultados poderiam possivelmente ser explicados pelo contato das células com a partícula e não seu englobamento, o que resultaria em menos toxicidade.

Em qualquer fase da vida útil dos produtos com material nanoparticulado na sua composição, as nanopartículas que o compõe podem ser libertadas no ambiente. Nas últimas décadas, foram feitos progressos com estudos significativos para melhor compreensão das formas como as nanopartículas podem impactar o meio ambiente (von Moos & Slaveykova, 2014). Mesmo ainda não sendo reguladas técnicas padrões para avaliar a toxicidade de nanopartículas no ambiente aquático (Rather *et al.*, 2018), o modelo *Zebrafish* tem se demonstrado um modelo promissor para o entendimento da ecotoxicologia.

O modelo é visto como um bom fator para a fácil exposição aos xenobióticos graças à manipulação *ex vivo* dos ovos fecundados e a capacidade dos agentes químicos penetrarem com mais facilidade ao córion – que assemelha-se à zona pelúcida na embriogênese -, sendo mais fácil de observar os impactos toxicológicos no período embrionário (Dumitrescu *et al.*, 2019).

Um das particularidades apresentadas quanto à toxicidade parte da premissa que é importante avaliar os níveis seguros quanto à exposição de químicos nocivos ao microambiente celular, levando ao dano ao DNA (Scholz *et al.*, 2008) A falha no desenvolvimento e crescimento dos animais corroboram com a regulação positiva e negativa de genes na expressão gênica provocada pela substância a que foram expostos.

O resultado sugere impacto no genoma dos embriões causando dano no DNA e, conseqüentemente, deformidade no desenvolvimento. A embriogênese do peixe-zebra é o estágio com maior probabilidade de recapitular as interações e respostas biológicas humanas, e as respostas biológicas são funcionalmente conservadas entre o modelo e os humanos.

As ZnO NPs são consideradas "altamente tóxicas" no ambiente e têm o potencial de causar sérios problemas ecológicos, sendo bioacumuladas por organismos aquáticos (Jia *et al.*, 2019).

No modelo *in vivo* testado nesse trabalho, embriões de *Danio rerio* foram expostos às ZnO NPs e foi observado o aumento de más formações anatômicas e eclosão embrionária quando expostos à maior concentração sugerindo a toxicidade provocada pelas nanopartículas associada aos estágios iniciais do desenvolvimento do peixe-zebra.

A precariedade do desenvolvimento dos embriões, como o retardo da eclosão, mostra que as ZnO NPs causaram um distúrbio na produção da enzima responsável pela eclosão que tem sua produção realizada em uma glândula incorporada ao saco coriônico. Portanto, sugere que as ZnO NPs ultrapassaram os canais dos poros do córion ou formam agregados que bloqueiam os poros, suprimindo a passagem de O₂ (Xia *et al.*, 2011). Anteriores estudos já demonstraram resultados análogos após a exposição dos embriões de peixe-zebra quando expostos a nanotubos de carbono (Cheng *et al.*, 2007). Em modelo de microalgas verdes de água doce *Pseudokirchneriella subcapitata* (*P. Subicapitata*), pertencente à classe Cloroficeas, também demonstrou toxicidade das nanopartículas de óxido de zinco (Franklin *et al.*, 2007).

Estudos com nanopartículas de prata e ouro expostas à embriões de *Danio rerio* já sugeriram que o nanomaterial induziu regulação negativa nos genes pró-apoptóticos, inflamação, regulação do ciclo celular e no sistema de defesa contra espécies reativas, bem como na expressão dos genes relativos ao desenvolvimento (Kulasza & Skuza, 2021). O estresse oxidativo é um fator indutivo de quebra de cadeia de DNA (Valavanidis *et al.*, 2006). O nanomaterial é um grande indutor de ROS no interior celular e, com isto, a regulação do sistema de defesa antioxidante seria desregulada (Czyżowska & Barbasz, 2022b).

A superexpressão de CYP1a2, correlacionada com o metabolismo de xenobióticos, também já foi descrita na espécie aquática *Oncorhynchus mykiss* (Scown *et al.*, 2010). A expressão do gene *Bcl-2*, desta espécie, localizado onde são produzidos radicais livres e funciona como um evidente antioxidante contra o estresse oxidativo a fim de prevenir a apoptose (Gross *et al.*, 1999) viria a acontecer de forma significativa e, assim, ocasionando resistência ao estresse oxidativo sem a ativação satisfatória de agentes antioxidantes, como descrito em Y. Liu *et al.*, 2008.

Ademais, é descrito na literatura a toxicidade crônica ou aguda de forma não intencional provocada pelo sistema fagocítico que pode ocorrer através da fagocitação de nanomateriais por células mononucleares antes de chegarem ao seu alvo (Bauer *et al.*, 2021).

Por fim, o desenvolvimento de ferramentas para o entendimento das interações nanopartícula-célula é vital para um futuro seguro das aplicações dos nanomateriais. Uma das formas é redesenhar estratégias para mitigar os mecanismos de toxicidade das nanopartículas frente a organismos biológicos. Uma das estratégias seria reduzindo a afinidade das NPs às superfícies biológicas para serem ecologicamente aceitas sem perderem sua eficácia e efetividade nas aplicações.

CONCLUSÃO

A utilização de nanopartículas já é uma realidade crescente a cada dia nas mais diversas áreas e tende a ser a única tecnologia válida na próxima era, no entanto, ainda não há um consenso sobre o impacto a curto e a longo prazo desta tecnologia na humanidade, no ambiente e no equilíbrio ecológico.

A toxicidade em nanoescala e os impactos negativos dos nanomateriais em indivíduos expostos, profissionais da indústria e pacientes tornam os nanomateriais uma questão delicada para a medicina do futuro. A pesquisa sobre os efeitos adversos dos nanomateriais na saúde humana tem avançado junto com o progresso tecnológico. Para lidar com esses riscos, é essencial estabelecer regulamentações e leis que garantam a segurança do uso desses materiais. A nanotoxicologia é uma área de estudo que, por meio da pesquisa científica, com metodologias *in vivo* e *in vitro*, ajuda a minimizar os riscos e fornece informações fundamentais para apoiar essas regulamentações.

No trabalho foram realizadas as duas formas de metodologias a fim de aprimorar a eficácia dos resultados. Estas análises levaram a preocupações significativas quanto à segurança do uso do óxido de zinco na sua forma nano e macroestrutural. *In vitro*, foram detectados resultados positivos para o Teste de Ames e indica que a substância tem o potencial de causar mutações genéticas. O teste de WST-1 sugeriu citotoxicidade às células provocadas pelas propriedades nocivas da substância química, em especial da nanopartícula, o que culminou em uma mudança metabólica causando morte celular. *In vivo*, foram detectadas alterações anormais nos embriões de *Zebrafish* demonstrando que, as nanopartículas exerceram efeitos deletérios no desenvolvimento morfológico corporal e neuronal.

Por fim, é importante ressaltar que os testes positivos por si só não determinam se uma substância é carcinogênica em seres humanos, mas serve como indicadores preocupantes quanto às suas aplicabilidades. Compreendendo melhor os mecanismos de toxicidade das tanto das partículas quanto das nanopartículas e suas propriedades físico-químicas, é possível redirecionar melhores estratégias para reduzir o dano ao material genético e o impacto ambiental.

REFERÊNCIAS

- Abid, N., Khan, A. M., Shujait, S., Chaudhary, K., Ikram, M., Imran, M., Haider, J., Khan, M., Khan, Q., & Maqbool, M. (2022). Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 300(102597), 102597. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102597>
- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213–1221. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
- Ahmad, T., Wani, I. A., Manzoor, N., Ahmed, J., & Asiri, A. M. (2013). Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 107, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.02.004>
- Akçan, R., Aydoğan, H. C., Yildirim, M. Ş., Taştekin, B., & Sağlam, N. (2020). Nanotoxicity: a challenge for future medicine. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(4), 1180–1196. <https://doi.org/10.3906/sag-1912-209>
- Ali, M. (2023). What function of nanoparticles is the primary factor for their hyper-toxicity? *Advances in Colloid and Interface Science*, 314(102881), 102881. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102881>
- Altunbek, M., Baysal, A., & Çulha, M. (2014). Influence of surface properties of zinc oxide nanoparticles on their cytotoxicity. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 121, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.034>
- Barber, D. J., & Freestone, I. C. (1990). An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus cup by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry*, 32(1), 33–45. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x>
- Barhoum, A., García-Betancourt, M. L., Jeevanandam, J., Hussien, E. A., Mekkawy, S. A., Mostafa, M., Omran, M. M., S. Abdalla, M., & Bechelany, M. (2022). Review on natural, incidental, bioinspired, and engineered nanomaterials: History, definitions, classifications, synthesis, properties, market, toxicities, risks, and regulations. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 12(2), 177. <https://doi.org/10.3390/nano12020177>
- Barras, F., & Fontecave, M. (2011). Cobalt stress in Escherichia coli and Salmonella enterica: molecular bases for toxicity and resistance. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 3(11), 1130. <https://doi.org/10.1039/c1mt00099c>
- Bauer, B., Mally, A., & Liedtke, D. (2021). Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13417. <https://doi.org/10.3390/ijms222413417>

- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(1), 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Berk, S., & Akkurt, I. (2012). Nanoparticle: a nightmare for the future. *Tuberkuloz ve toraks*, 60(2), 180–184. <https://doi.org/10.5578/tt.3557>
- Biswas, A., Bayer, I. S., Biris, A. S., Wang, T., Dervishi, E., & Faupel, F. (2012). Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: techniques, applications & future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science*, 170(1–2), 2–27. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.11.001>
- Bogdanović, U., Lazić, V., Vodnik, V., Budimir, M., Marković, Z., & Dimitrijević, S. (2014). Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. *Materials Letters*, 128, 75–78. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.04.106>
- Bonnard, T., Gauberti, M., Martinez de Lizarrondo, S., Campos, F., & Vivien, D. (2019). Recent advances in nanomedicine for ischemic and hemorrhagic stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 50(5), 1318–1324. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.118.022744>
- Brannen, K. C., Charlap, J. H., & Lewis, E. M. (2013). Zebrafish Teratogenicity Testing. *Em Methods in Molecular Biology* (p. 383–401). Humana Press.
- Carrão Dantas, E. K., Araújo-Lima, C. F., Ferreira, C. L. S., Goldstein, A. da C., Aiub, C. A. F., Coelho, M. G. P., & Felzenszwalb, I. (2022). Toxicogenetic assessment of a pre-workout supplement: In vitro mutagenicity, cytotoxicity, genotoxicity and glutathione determination in liver cell lines and in silico ADMET approaches. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 879–880(503517), 503517. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2022.503517>
- Cheng, J., Flahaut, E., & Cheng, S. H. (2007). Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio Rerio*) embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(4), 708–716. <https://doi.org/10.1897/06-272r.1>
- Choi, T.-Y., Choi, T.-I., Lee, Y.-R., Choe, S.-K., & Kim, C.-H. (2021). Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(3), 310–317. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00571-5>
- Cui, J., Wang, F., Gao, J., Zhai, W., Zhou, Z., Liu, D., & Wang, P. (2019). Bioaccumulation and metabolism of carbosulfan in zebrafish (*Danio rerio*) and the toxic effects of its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(45), 12348–12356. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03674>
- Czyżowska, A., & Barbasz, A. (2022a). A review: zinc oxide nanoparticles – friends or enemies? *International Journal of Environmental Health Research*, 32(4), 885–901. <https://doi.org/10.1080/09603123.2020.1805415>
- Czyżowska, A., & Barbasz, A. (2022b). A review: zinc oxide nanoparticles - friends or enemies? *International Journal of Environmental Health Research*, 32(4), 885–901. <https://doi.org/10.1080/09603123.2020.1805415>

- Dai, Y.-J., Jia, Y.-F., Chen, N., Bian, W.-P., Li, Q.-K., Ma, Y.-B., Chen, Y.-L., & Pei, D.-S. (2014). Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1), 11–17. <https://doi.org/10.1002/etc.2406>
- D'Costa, A., & Shepherd, I. T. (2009). Zebrafish development and genetics: Introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. *Zebrafish*, 6(2), 169–177. <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0562>
- De Matteis, V., & Rinaldi, R. (2018). Toxicity assessment in the nanoparticle era. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (p. 1–19). Springer International Publishing.
- Derbalah, A. S., Elkot, G. A. E., & Hamza, A. M. (2012). Laboratory evaluation of botanical extracts, microbial culture filtrates and silver nanoparticles against *Botrytis cinerea*. *Annals of Microbiology*, 62(3), 1331–1337. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0388-1>
- Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015b). Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1250, 77–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5
- Du, X., Zhang, T., Ma, G., Gu, X., Wang, G., & Li, J. (2019). Glucose-responsive mesoporous silica nanoparticles to generation of hydrogen peroxide for synergistic cancer starvation and chemotherapy. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 2233–2251. <https://doi.org/10.2147/ijn.s195900>
- Dumitrescu, E., Wallace, K., & Andreescu, S. (2019). Nanotoxicity assessment using embryonic zebrafish. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1894, 331–343. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8916-4_20
- Egbuna, C., Parmar, V. K., Jeevanandam, J., Ezzat, S. M., Patrick-Iwuanyanwu, K. C., Adetunji, C. O., Khan, J., Onyeike, E. N., Uche, C. Z., Akram, M., Ibrahim, M. S., El Mahdy, N. M., Awuchi, C. G., Saravanan, K., Tijjani, H., Odoh, U. E., Messaoudi, M., Ifemeje, J. C., Olisah, M. C., ... Ibeabuchi, C. G. (2021). Toxicity of nanoparticles in biomedical application: Nanotoxicology. *Journal of Toxicology*, 2021, 9954443. <https://doi.org/10.1155/2021/9954443>
- Elsaesser, A., & Howard, C. V. (2012). Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(2), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.001>
- Escorihuela, L., Fernández, A., Rallo, R., & Martorell, B. (2018). Molecular dynamics simulations of zinc oxide solubility: From bulk down to nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 112, 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.038>
- Franklin, N. M., Rogers, N. J., Apte, S. C., Batley, G. E., Gadd, G. E., & Casey, P. S. (2007). Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 41(24), 8484–8490. <https://doi.org/10.1021/es071445r>

Ganguly, P., Breen, A., & Pillai, S. C. (2018). Toxicity of nanomaterials: Exposure, pathways, assessment, and recent advances. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(7), 2237–2275. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00068>

Gholipourmalekabadi, M., Mobaraki, M., Ghaffari, M., Zarebkohan, A., Omrani, V. F., Urbanska, A. M., & Seifalian, A. (2017). Targeted drug delivery based on gold nanoparticle derivatives. *Current Pharmaceutical Design*, 23(20). <https://doi.org/10.2174/1381612823666170419105413>

Ginzburg, A. L., Blackburn, R. S., Santillan, C., Truong, L., Tanguay, R. L., & Hutchison, J. E. (2021). Zinc oxide-induced changes to sunscreen ingredient efficacy and toxicity under UV irradiation. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 20(10), 1273–1285. <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00101-2>

Grassian, V. H. (2008). When size *really* matters: Size-dependent properties and surface chemistry of metal and metal oxide nanoparticles in gas and liquid phase environments. *The Journal of Physical Chemistry. C, Nanomaterials and Interfaces*, 112(47), 18303–18313. <https://doi.org/10.1021/jp806073t>

Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 13(15), 1899–1911. <https://doi.org/10.1101/gad.13.15.1899>

Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 86(1), 6–19. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>

Horzmann, K. A., & Freeman, J. L. (2018). Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 163(1), 5–12. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy044>

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Turrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., ... Stemple, D. L. (2014). Erratum: Corrigendum: The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 505(7482), 248–248. <https://doi.org/10.1038/nature12813>

Hsiao, I.-L., & Huang, Y.-J. (2011). Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. *The Science of the Total Environment*, 409(7), 1219–1228. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.12.033>

Huang, Y.-W., Cambre, M., & Lee, H.-J. (2017). The toxicity of nanoparticles depends on multiple molecular and physicochemical mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2702. <https://doi.org/10.3390/ijms18122702>

Inoue, K.-I., & Takano, H. (2011). Aggravating impact of nanoparticles on immune-mediated pulmonary inflammation. *TheScientificWorldJournal*, 11, 382–390.

<https://doi.org/10.1100/tsw.2011.44>

Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53(101174), 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>

Jia, H.-R., Zhu, Y.-X., Duan, Q.-Y., Chen, Z., & Wu, F.-G. (2019). Nanomaterials meet zebrafish: Toxicity evaluation and drug delivery applications. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 311–312, 301–318. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.022>

Jiang, J., Pi, J., & Cai, J. (2018). The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2018/1062562>

Król, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V., & Buszewski, B. (2017). Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.033>

Kulasza, M., & Skuza, L. (2021). Changes of gene expression patterns from aquatic organisms exposed to metal nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(16), 8361. <https://doi.org/10.3390/ijerph18168361>

Kulasza, M., & Skuza, L. (2021). Changes of gene expression patterns from aquatic organisms exposed to metal nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(16), 8361. <https://doi.org/10.3390/ijerph18168361>

Kummrow, F., Umbuzeiro, G. A., Salvadori, D. M. E., Takahashi, C. S., Grisolia, C. K., Santos, R. A., Da Toxicogenética À Toxicogenômica, & Li, Z. (2018). Discovery of novel bioactive natural products driven by genome mining. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 6, 318–328. <https://doi.org/10.5582/ddt.2018.01066>

Król, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V., & Buszewski, B. (2017). Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.033>

Katas, H., Lim, C. S., Nor Azlan, A. Y. H., Buang, F., & Mh Busra, M. F. (2019). Antibacterial activity of biosynthesized gold nanoparticles using biomolecules from *Lignosus rhinocerotis* and chitosan. *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ: The Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 27(2), 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.11.010>

Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 269(1–4), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>

Lee, H.-C., Lin, C.-Y., & Tsai, H.-J. (2021). Zebrafish, an in vivo platform to screen drugs and proteins for biomedical use. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(6), 500. <https://doi.org/10.3390/ph14060500>

Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4(1), 26–

49. <https://doi.org/10.1002/sml.200700595>

Li, J., Chang, X., Chen, X., Gu, Z., Zhao, F., Chai, Z., & Zhao, Y. (2014). Toxicity of inorganic nanomaterials in biomedical imaging. *Biotechnology Advances*, 32(4), 727–743. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.009>

Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews. Genetics*, 8(5), 353–367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>

Liu, J., Feng, X., Wei, L., Chen, L., Song, B., & Shao, L. (2016). The toxicology of ion-shedding zinc oxide nanoparticles. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(4), 348–384. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1137864>

Liu, Y., Wang, J., Wei, Y., Zhang, H., Xu, M., & Dai, J. (2008). Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 89(4), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.009>

MacRae, C. A., & Peterson, R. T. (2023). Zebrafish as a mainstream model for in vivo systems pharmacology and toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 63(1), 43–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-051421-105617>

Maynard, R. L. (2012). Nano-technology and nano-toxicology. *Emerging Health Threats Journal*, 5(1), 17508. <https://doi.org/10.3402/ehth.v5i0.17508>

Mendoza-Milla, C., Macías Macías, F. I., Velázquez Delgado, K. A., Herrera Rodríguez, M. A., Colín-Val, Z., Ramos-Godinez, M. del P., Cano-Martínez, A., Vega-Miranda, A., Robledo-Cadena, D. X., Delgado-Buenrostro, N. L., Chirino, Y. I., Flores-Flores, J. O., & López-Marure, R. (2022). Zinc oxide nanoparticles induce toxicity in H9c2 rat cardiomyoblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12940. <https://doi.org/10.3390/ijms232112940>

Meng, X. K., Tang, S. C., & Vongehr, S. (2010). A review on diverse silver nanostructures. *Journal of Materials Science & Technology*, 26(6), 487–522. [https://doi.org/10.1016/s1005-0302\(10\)60078-3](https://doi.org/10.1016/s1005-0302(10)60078-3)

Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P. M., & Woutersen, R. A. (2011). Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic Pathology*, 39(5), 759–775. <https://doi.org/10.1177/0192623311409597>

Moatamed, E. R., Hussein, A. A., El-desoky, M. M., & Khayat, Z. E. L. (2019). Comparative study of zinc oxide nanoparticles and its bulk form on liver function of Wistar rat. *Toxicology and Industrial Health*, 35(10), 627–637. <https://doi.org/10.1177/0748233719878970>

Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455(1–2), 29–60. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00064-6)

Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2020). Safe nanoparticles: Are we there yet? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 385. <https://doi.org/10.3390/ijms22010385>

Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by

microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1–2), 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001>

Nicolette, J. (2017). Genetic toxicology testing. Em *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development* (p. 129–154). Elsevier.

OECD. (2013). *Test no. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test*. OECD.

OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: Health effects. (2009). OECD.

Pan, X., & Zhang, B. (Orgs.). (2021). *Environmental toxicology and toxicogenomics: Principles, methods, and applications*. Springer US. Park, J.-H., Gu, L., von Maltzahn, G., Ruoslahti, E., Bhatia, S. N., & Sailor, M. J. (2009). Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications. *Nature Materials*, 8(4), 331–336.
<https://doi.org/10.1038/nmat2398>

Pan, X. (2021). Mutagenicity Evaluation of Nanoparticles by the Ames Assay. Em *Environmental Toxicology and Toxicogenomics* (p. 275–285). Springer US.

Patil, S. P., & Burungale, V. V. (2020). Physical and chemical properties of nanomaterials. Em *Nanomedicines for Breast Cancer Theranostics* (p. 17–31). Elsevier.

Peskin, A. V., & Winterbourn, C. C. (2017). Assay of superoxide dismutase activity in a plate assay using WST-1. *Free Radical Biology & Medicine*, 103, 188–191.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.033>

Rai, M., & Yadav, A. (2013). Plants as potential synthesiser of precious metal nanoparticles: progress and prospects. *IET Nanobiotechnology*, 7(3), 117–124. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2012.0031>

Rasmussen, J. W., Martinez, E., Louka, P., & Wingett, D. G. (2010). Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(9), 1063–1077. <https://doi.org/10.1517/17425247.2010.502560>

Rather, M. A., Bhat, I. A., Sharma, N., & Sharma, R. (2018). Molecular and cellular toxicology of nanomaterials with related to aquatic organisms. Em *Advances in Experimental Medicine and Biology* (p. 263–284). Springer International Publishing. Ribeiro, O. M. R., Pinto, M. Q. P., Félix, L., Monteiro, S., Fernandes, A., Carrola, J. S. C., UTAD, UTAD, UTAD, UTAD, UTAD, & Porto, U. do. (2022). O peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo emergente na ecotoxicologia. *Revista de ciência elementar*, 10(2).
<https://doi.org/10.24927/rce2022.021>

Rubinstein, A. L. (2006). Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(2), 231–240. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.2.231>

Rougier, F., Menudier, A., Bosgiraud, C., & Nicolas, J. A. (1996). Copper and zinc exposure of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton–buchaman): Effects in experimental listeria infection. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34(2), 134–140.
<https://doi.org/10.1006/eesa.1996.0054>

Scown, T. M., Santos, E. M., Johnston, B. D., Gaiser, B., Baalousha, M., Mitov, S., Lead, J. R., Stone, V., Fernandes, T. F., Jepson, M., van Aerle, R., & Tyler, C. R. (2010). Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *115*(2), 521–534.

<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq076>

Scarcello, E., Lambremont, A., Vanbever, R., Jacques, P. J., & Lison, D. (2020). Mind your assays: Misleading cytotoxicity with the WST-1 assay in the presence of manganese. *PloS One*, *15*(4), e0231634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231634>

Seabra, A., & Durán, N. (2015). Nanotoxicology of metal oxide nanoparticles. *Metals*, *5*(2), 934–975. <https://doi.org/10.3390/met5020934>

Ševců, A., El-Temsah, Y. S., Joner, E. J., & Černík, M. (2011). Oxidative stress induced in microorganisms by zero-valent iron nanoparticles. *Microbes and Environments*, *26*(4), 271–281. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me11126>

Sharma, V., Anderson, D., & Dhawan, A. (2012). Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, *17*(8), 852–870. <https://doi.org/10.1007/s10495-012-0705-6>

Shen, C., James, S. A., de Jonge, M. D., Turney, T. W., Wright, P. F. A., & Feltis, B. N. (2013). Relating cytotoxicity, zinc ions, and reactive oxygen in ZnO nanoparticle-exposed human immune cells. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *136*(1), 120–130. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft187>

Shnoudeh, A. J., Hamad, I., Abdo, R. W., Qadumii, L., Jaber, A. Y., Surchi, H. S., & Alkelany, S. Z. (2019). Synthesis, characterization, and applications of metal nanoparticles. *Em Biomaterials and Bionanotechnology* (p. 527–612). Elsevier.

Siddiqi, K. S., Husen, A., & Rao, R. A. K. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>

Stankic, S., Suman, S., Haque, F., & Vidic, J. (2016). Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. *Journal of Nanobiotechnology*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0225-6>

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., & Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, *291*(5813), 293–296. <https://doi.org/10.1038/291293a0>

Toni, M., Arena, C., Cioni, C., & Tedeschi, G. (2023). Temperature- and chemical-induced neurotoxicity in zebrafish. *Frontiers in physiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1276941>

Torres-Ruiz, M., De la Vieja, A., de Alba Gonzalez, M., Esteban Lopez, M., Castaño Calvo, A., & Cañas Portilla, A. I. (2021). Toxicity of nanoplastics for zebrafish embryos, what we know and where to go next. *The Science of the Total Environment*, *797*(149125), 149125. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149125>

Vaisman, A., McDonald, J. P., & Woodgate, R. (2012). Translesion DNA Synthesis. *Ecosal Plus*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.7.2.2>

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>

Wang, Z., & Wang, Z. (2020). Nanoparticles induced embryo–fetal toxicity. *Toxicology and Industrial Health*, 36(3), 181–213. <https://doi.org/10.1177/0748233720918689>

Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., & von Goetz, N. (2012). Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental Science & Technology*, 46(4), 2242–2250. <https://doi.org/10.1021/es204168d>

Xia, T., Zhao, Y., Sager, T., George, S., Pokhrel, S., Li, N., Schoenfeld, D., Meng, H., Lin, S., Wang, X., Wang, M., Ji, Z., Zink, J. I., Mädler, L., Castranova, V., Lin, S., & Nel, A. E. (2011). Decreased dissolution of ZnO by iron doping yields nanoparticles with reduced toxicity in the rodent lung and zebrafish embryos. *ACS Nano*, 5(2), 1223–1235. <https://doi.org/10.1021/nn1028482>

Zeiger, E. (2019). The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 841, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.007>

Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S., & Farokhzad, O. C. (2008). Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 83(5), 761–769. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100400>

Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>