

**EFEITO CARCINOGENICO DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO POR MEIO DO TESTE PARA DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

CARCINOGENIC EFFECT OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES BY MEANS OF THE TEST FOR DETECTION OF EPITHELIAL TUMOR IN SOMATIC CELLS OF *Drosophila melanogaster*

Matheus Henrique da Silva<sup>1</sup>  
Cássio Resende de Moraes<sup>2</sup>

**RESUMO:** Nanopartículas (NPs) são moléculas de pequena dimensão (entre 1 e 100 nm). Dependendo da síntese química (temperatura, pressão, concentração dos reagentes) podem adquirir formas diversificadas como, cristais cúbicos, triangulares e formato filamentosos, sendo apreciados devido à resistência oferecida (100 vezes mais resistente do que o aço). Essas moléculas são comumente aplicadas na biotecnologia com ênfase na nanotecnologia e tem propiciado uso muito diversificado nas diversas áreas das ciências como saúde, e produção de tintas, substituindo o chumbo na fabricação. Devido ao grande uso de nanopartículas pelo homem, este trabalho objetivou avaliar o potencial carcinogênico do dióxido de titânio por meio do Teste para Detecção de Tumor Epitelial em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster*. Larvas de 3º estágio descendentes do cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, sb<sup>1</sup>* e machos *mwh/mwh* foram submetidas ao tratamento crônico com diferentes concentrações (3,125; 6,25; 12,5 e 25 mM) de TiO<sub>2</sub> durante 48 horas. Os resultados revelaram efeito carcinogênico de maneira dose dependente.

**Palavras-chave:** Câncer; nanopartículas; TiO<sub>2</sub>

**ABSTRACT:** Nanoparticles (NPs) are small molecules (between 1 and 100 nm). Depending on the chemical synthesis (temperature, pressure, concentration of the reactants), they can acquire diverse forms such as, cubic, triangular and filamentous crystals, being appreciated due to the resistance offered (100 times more resistant than steel). These molecules are commonly applied in biotechnology with an emphasis on nanotechnology and have provided very diversified use in various areas of science such as health, and production of paints replacing lead in manufacturing. Due to the great use of nanoparticles by man, this work

- 
1. Licenciado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Mário Palmério – UNIFUCAMP.
  2. Licenciado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Mário Palmério – UNIFUCAMP. Especialista em Biotecnologia Ambiental pelo Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. Especialista em Toxicologia e Bioquímica pela Faculdade Metropolitana do Estado de São Paulo – FAMEESP. Especialista em Biologia Celular e Molecular pelo Centro Universitário FAVENI - UNIFAVENI. Mestre e Doutor em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU. Docente e Pesquisador pelo UNIFUCAMP. [cassio.1015@hotmail.com](mailto:cassio.1015@hotmail.com))

aimed to evaluate the carcinogenic potential of titanium dioxide through the *Drosophila melanogaster* Somatic Cell Tumor Detection Test. 3-stage descending larvae of the cross between virgin females *wts/TM3*, *sb'* and *mwh/mwh* males were submitted to chronic treatment with different concentrations (3,125, 6,25, 12,5 and 25 mM) of TiO<sub>2</sub> for 48 hours. The results showed a carcinogenic effect in a dose-dependent manner.

**Keywords:** Cancer; Nanoparticles; TiO<sub>2</sub>

## 1 INTRODUÇÃO

Nanopartículas (NPs) são moléculas de pequena dimensão (entre 1 e 100 nm). Dependendo da síntese química (temperatura, pressão, concentração dos reagentes) podem adquirir formas diversificadas como, cristais cúbicos, triangulares e formato filamentosos, sendo apreciados devido à resistência oferecida (100 vezes mais resistente do que o aço). Essas moléculas são comumente aplicadas na biotecnologia com ênfase na nanotecnologia e tem propiciado uso muito diversificado nas diversas áreas das ciências (Ferreira e Rangel, 2009).

As NPs podem ser produzidas de vários materiais. Entre os materiais usados na produção de NPs, destacam-se as de ouro, prata, dióxido de titânio, carbono, sílica, cobre e zinco, onde cada material tende a apresentar características funcionais distintas, que são usadas para produção de novos produtos que irão contribuir de maneira efetiva em várias áreas da saúde, além de grande apreciação no ramo industrial, em função da excelência conferida pela molécula na condução de energia, construção civil, e produtos cosméticos (Magalhães e Sansivieiro, 2010; Ventura; Carneiro; Souto, 2011).

O dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) é o nono composto mais encontrado no meio terrestre, tem três fases: rutila (tetragonal) que é formado em alta temperatura, anatasia (tetragonal), formado em baixas temperaturas e a fase brookita (Ortorrômbico). A maioria das aplicações o TiO<sub>2</sub> é usado na fase oxidada (Costa et al., 2006).

O TiO<sub>2</sub> começou a ser produzido em meados dos anos 20, tendo sido amplamente empregado como substituto de tintas à base de chumbo (atualmente 70% do TiO<sub>2</sub> é usado para este fim). NPs de TiO<sub>2</sub> é usado na produção de protetores de corrosão, geração de gás hidrogênio, sensor de gás, na produção de protetores solares, roupas e cosméticos. Na indústria alimentícia, NPs de TiO<sub>2</sub> é usado como corante alimentar em laticínios, doces e ainda usado para maximizar o sabor dos alimentos como nozes, cervejas, vinhos e sementes.

Além disso, são usadas na descontaminação de impactos ambientais de origem antrópica, por meio da decomposição da matéria orgânica presente na água (Pereira, 2010).

Considerado um composto de baixa toxicidade  $\text{TiO}_2$  tende a ser inerte quimicamente, mas quando usado na forma de NPs, estudos tem comprovado diferentes efeitos tóxicos (Zhang et al., 2007).

Quando expostas a NPs de  $\text{TiO}_2$  células humanas do epitélio bronquial apresentaram frequência de micronúcleos acima do limite tolerável, acompanhada de degradação oxidativa de lipídios, devido as propriedades oxidativas de NPs de  $\text{TiO}_2$  (Oberdörster et al., 1992; Gurr et al., 2005).

Oya (2013) observou danos no DNA de hemácias e no tecido cerebral de *Rhamdia quelen* após injeção intraperitoneal de NPs de  $\text{TiO}_2$  na dosagem de  $5\mu\text{g/g}$ . Outros trabalhos evidenciaram efeitos genotóxicos e mutagênicos de NPs de  $\text{TiO}_2$  em diferentes sistemas testes (Oberdörster, 2004; )

A ANVISA (2013) diz que para o uso seguro de diferentes produtos de natureza química diversificada é imprescindível padrão de biossegurança, possibilitado pela análise das moléculas em diferentes sistemas testes e organismos modelos. Partindo da premissa que mutações podem atuar a nível molecular na instalação de células cancerígenas, eventos genotóxicos e mutagênicos podem diretamente resultar na evolução de células com comportamento neoplásico, sendo evidente a necessidade de ensaios que possam detectar instabilidade genética.

Um bom bioindicador para monitorar possíveis efeitos carcinogênicos devem apresentar dentre outras características o comportamento de sensibilidade e resposta, característica esta observada em moscas da espécie *Drosophila melanogaster*. Além disso, a *D. melanogaster*, apresenta cerca de 75% de homologia a doenças humanas (Kim et al., 2011; (Nepomuceno, 2015), possibilitando a extrapolação dos resultados obtidos para mamíferos superiores, incluindo o homem.

O Teste para Detecção de Tumor Epitelial em células somáticas de *D. melanogaster* (TDTE) é um eficiente teste empregado na detecção de xenobióticos com propriedade carcinogênica. Diversos trabalhos confirmaram a sensibilidade do teste (Sidorov et al., 2001; Orsolin e Nepomuceno, 2009; Silva e Nepomuceno, 2011; Costa, 2011; Furtado e Nepomuceno, 2012; Orsolin; Silva-Oliveira; Nepomuceno, 2012; Moraes et al., 2016; Moraes et al., 2017).

Devido a ampla utilização de nanomaterias pela sociedade, em especial NPs de  $\text{TiO}_2$ , o presente trabalho tem como objetivo, avaliar o potencial carcinogênico de diferentes concentrações de NPs de  $\text{TiO}_2$  por meio do TDTE em células somáticas de *D. melanogaster*.

Avaliar substâncias que são de fácil exposição a seres humanos em sistemas *in vivo* é de suma importância no intuito de prevenir doenças associadas a danos genéticos, por exemplo o câncer.

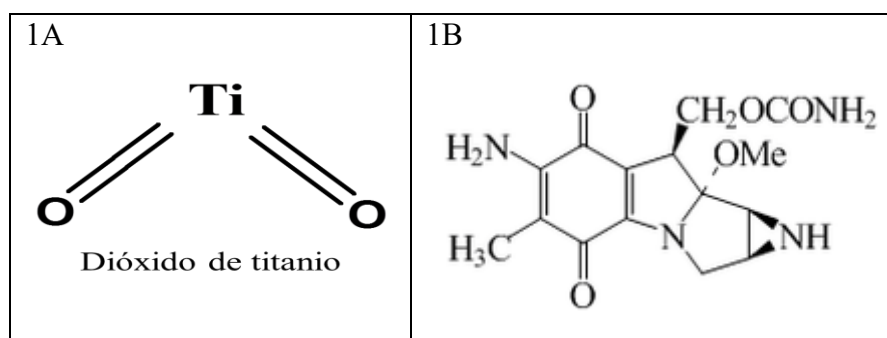
## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Agentes químicos

Nanopartículas de dióxido (NPs  $\text{TiO}_2$ ) foram sintetizadas e caracterizadas no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia Brasil. As NPs de  $\text{TiO}_2$  utilizadas nesse trabalho tem o tamanho de 5,2 nm.

Mitomicina C (CAS 50-07-7) na formulação em pó liofilizado é fabricado por Kyowa Hakko Kirin Co. Ltda. Shizuoka (Japão), embalado por Bristol-Myers Squibb S.r.l Sermoneta-Latina-Italia e importado por Bristol-Myers Squibb Farmacêutico S.A.

A estrutura química de  $\text{TiO}_2$  e MMC esta representado na **Figura 1A** e **1B**, respectivamente.



**Figura 1:** Estrutura química de nanopartículas de Dióxido de Titânio (1A) e Mitomicina C (1B).

### 2.2 Síntese dos nanopartículas de $\text{TiO}_2$

#### 2.2.1 Síntese dos nanocristais

Os nanocristais de  $\text{TiO}_2$  foram sintetizados via solução aquosa à temperatura ambiente. O processo de síntese consiste das seguintes etapas: (i) preparou-se, à temperatura ambiente, uma solução contendo 300 ml de água ultrapura e 90 ml de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ , 70%, Sigma

Aldrich), sob agitação magnética por 20 minutos; (ii) adicionou-se 60 ml de isopropóxido de titânio ( $\text{Ti}(\text{OCH}(\text{CH}_3)_2)_4$ , 97%, Sigma-Aldrich).

O pH desta solução foi regulado para 5,6, utilizando uma solução de 4M de hidróxido de sódio (NaOH, 98%, Sigma-Aldrich) e acrescentou-se posteriormente 400 mL de água ultrapura, mantendo-se sob a agitação magnética por 30 minutos. A solução resultante foi mantida em repouso, para ocorrer o processo de precipitação dos nanocristais de  $\text{TiO}_2$ . O precipitado foi monodisperso em água ultrapura, sob agitação magnética e centrifugado a 6000 rpm/10 minutos. Este procedimento de purificação foi repetido várias vezes até a solução atingir pH=7. Finalmente, o precipitado resultante dessa solução purificada foi submetido aos seguintes tratamentos térmicos sucessivos em atmosfera ambiente: (i) 100°C/12h, 500°C/1h, 650°C/1h e 800°C/1h.

### 2.2.2 Caracterização dos nanocristais

Os difratogramas de raios-X (DRX) foram registrados com um DRX-6000 (SHIMADZU), usando radiação monocromática Cu- $K_{\alpha 1}$  ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ), para confirmar a formação dos nanocristais de  $\text{TiO}_2$ , bem como a estrutura cristalina, tamanho médio e fração de massa da fase rutila. O tamanho nos nanocristais foi estimado baseando na fórmula de Debye-Scherrer (GUINIER, 1963). Nos difratogramas das amostras tratadas a 100°C/24h e 500°C/1h utilizou o pico de difração de Bragg (101) da fase anatase localizado em torno de  $2\theta=25.4^\circ$ . Já nas amostras tratadas a 800°C/1h utilizou o pico (110) da fase rutila localizado em torno de  $2\theta=27.8^\circ$ . A fração de massa da fase rutila foi calculada utilizando a seguinte equação (KOO et al., 2006; YU et al., 2003).

$$W_R = \frac{A_R}{K_A A_A + A_R + K_B A_B},$$

Onde  $A_B$  é a intensidade integrada do pico (121) da fase brookite,  $K_A$  e  $K_B$  são os dois coeficientes com os seus respectivos valores 0,886 e 2,721, respectivamente. O espectro de micro-Raman foi obtido, utilizando como fonte de excitação a linha 780 nm do espectrômetro da Ocean Optics. Todas as caracterizações foram feitas à temperatura ambiente.

### 2.3 Teste para detecção de Tumor Epitelial em *Drosophila melanogaster*

### 2.3.1 Ensaio de Sobrevivência

Para avaliar os possíveis efeitos tóxicos de NPs de  $\text{TiO}_2$ , 20 larvas de terceiro estágio de *D. melanogaster* foram transferidas para *vials* contendo 1,5 g de purê de batatas (Yoki® Alimentos S.A) hidratados com 5 mL de solução de NPs de  $\text{TiO}_2$  nas concentrações de 25; 12,5; 6,25 e 3,125 mM. As larvas foram submetidas a tratamento crônico por 48 horas e os imagos foram quantificados após processo de metamorfose, expressando o valor em porcentagem.

### 2.3.2 Linhagens e cruzamento

Neste trabalho foi utilizado duas linhagens de *Drosophila melanogaster*, a saber *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e a linhagem *warts* (*wts*,3-100). A linhagem *multiple wing hairs* foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Mário Antônio Spanó e a linhagem *warts* pelo Profa. Dra. Ana Maria Bonetti, ambos professores titulares da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

A linhagem *multiple wing hairs* possui o marcador cromossômico *mwh*, mantido em homozigose recessiva nos cromossomos homólogos 3 da mosca (SIDOROV et al., 2001). Quando expresso em homozigose recessiva as asas da mosca apresentam fenótipo de pelos múltiplos, o que difere do fenótipo selvagem (um único pelo por célula). No teste *wts* a linhagem *mwh* tem por finalidade ao cruzar com a linhagem *warts* criar indivíduos heterozigóticos para o marcador *wts*.

A linhagem *warts* possui também no cromossomo 3 o marcador *wts* e devido a letalidade em homozigose recessiva para a mosca, é mantida pela presença do balanceador cromossômico *TM3, sb<sup>1</sup>*. A perda da heterozigose do marcador *wts* (viável para populações de células) resulta na formação de clones de células com fenótipo invasivo, incrementando a formação de massas tumorais no corpo da mosca.

Essas duas linhagens foram mantidas em frascos ¼ com meio de cultura á base de banana (1230 mL de água; 16,5 g de ágar; 234 g de banana; 37,5 g de fermento biológico e 1,5 g de nipagin em pó) em estufa B.O.D (SOLAB) em ciclos luz/escuro (12h:12h) na temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $65 \pm 5\%$  de umidade relativa, nas dependências do laboratório de Microbiologia da Fundação Carmelitana Mário Palmério (FUCAMP).

Foi realizado o cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts*, [1] in [1] kni [ri-1] p [p] *wts* [3-17]/TM3,S B [1]. Duas progênies foram geradas nesse cruzamento: Progênie MH, trans-heterozigoto marcado (*mwh*+/+*wts*) e progênie BH,

heterozigoto balanceado (*mwh*<sup>+/+</sup>*TM3, Sb'*). No Teste *wts*, apenas a progênie MH é analisada (MORAIS et al., 2016)

A identificação da progênie BH é feita mediante expressão do balanceador cromossômico *TM3, Sb'*, que resulta em fenótipo de pelos em formato curto e grossos, enquanto que indivíduos MH (ausência do balanceador), os pelos são longos e finos (selvagens).

### 2.3.3 Coleta de ovos e tratamento de larvas

A coleta de ovos resultantes do cruzamento *mwh*<sup>+/+</sup>*mwh* x *wts*<sup>+/</sup>*TM3, Sb'* foi feito no intervalo de 8 horas em frascos contendo meio de cultura a base de ágar (4%) e fermento biológico enriquecido com sacarose. Após 4 horas, as larvas de 3º estágio foram lavadas com água obtida por sistema de osmose reverse e foram coletadas com auxílio de peneira de vasão pequena.

Após a coleta, as larvas foram submetidas a tratamento crônico até completar o processo de metamorfose (48 horas). Larvas foram colocadas em *vials* (2,5 cm de diâmetro por 8 cm de comprimento) contendo 1,5 g de purê de batatas (Yoki® Alimentos S.A) e 5 mL de NPs de TiO<sub>2</sub> nas concentrações de 25; 12,5; 6,25 e 3,125 mM. As concentrações de TiO<sub>2</sub> usadas neste trabalho foram baseadas em ensaios prévios de sobrevivência em *D. melanogaster*.

O teste *wts* foi acompanhado de controle negativo, água obtida por sistema de osmose reverse e controle positivo, mitomicina C (MMC) na concentração de 0,1 mM. Essas concentrações foram baseadas em estudos sobre recombinação meiótica em *Drosophila melanogaster* (TSUDA; TAKEDA, 1987) e ensaios de carcinogênese (ORSOLIN, NEPOMUCENO, 2009; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012; MORAIS et al., 2016).

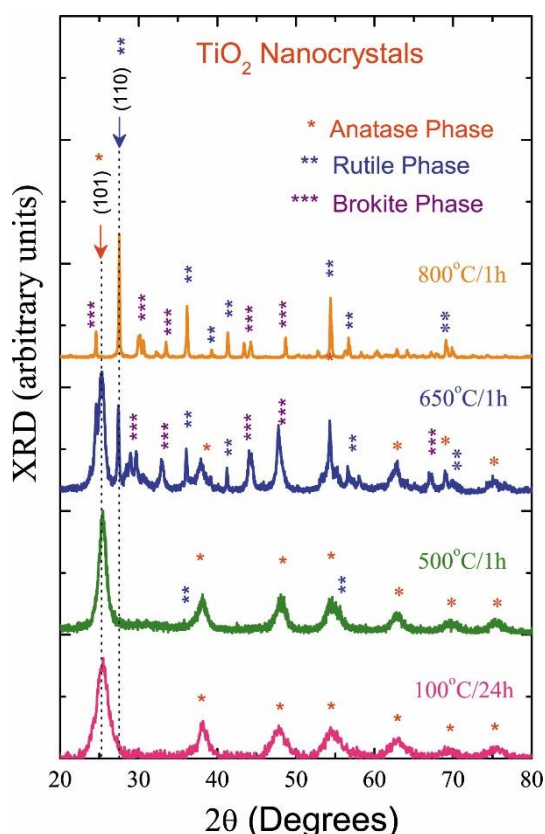
### 2.3.4 Análise estatística

Foi usado o teste U, não paramétrico, de Mann-Whitney, utilizando o nível de significância  $p < 0,005$  para calcular as diferenças estatísticas entre a frequência de tumores epiteliais nos compostos tratados com NPs de TiO<sub>2</sub> e os controles negativo e positivo.

Comparações estatísticas referentes à taxa de sobrevivência das moscas tratadas com NPs de TiO<sub>2</sub> e os controles negativo e positivo foram feitas por meio do teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Figura 2** está apresentado os difratogramas de raios-X das nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  submetidos a tratamento térmico a  $100^\circ\text{C}/24\text{h}$ ,  $500^\circ\text{C}/1\text{h}$ ,  $650^\circ\text{C}/1\text{h}$  e  $800^\circ\text{C}/1\text{h}$ . Nos difratogramas de todas as amostras são representados os padrões de difração característicos de nanocristais de  $\text{TiO}_2$  nas fases anatase (JCPDS: 1:21-1272), rutilo (JCPDS: 1:21-1276) e brookita (JCPDS: 29-1360), respectivamente, pelos símbolos (\*), (\*\*) e (\*\*\*). Observa-se no difratograma das nanopartículas  $\text{TiO}_2$  submetidas a tratamento térmico de  $100^\circ\text{C}/24\text{h}$  que todas estas nanopartículas são cristalinas e apresentam apenas a fase anatase.



**Figura 2.** Difratogramas de Raios-X dos NCs de  $\text{TiO}_2$  submetidos a tratamento térmico a  $100^\circ\text{C}/24\text{h}$ ,  $500^\circ\text{C}/1\text{h}$ ,  $650^\circ\text{C}/1\text{h}$  e  $800^\circ\text{C}/1\text{h}$ .

O aumento na temperatura de tratamento térmico de  $100^\circ\text{C}$  para  $500^\circ\text{C}$ , utilizando este procedimento de síntese, inibiu a transformação de fase anatase para rutilo. Já nas amostras tratadas a  $650^\circ\text{C}/1\text{h}$  verifica-se a transformação de fase anatase para brookita (Pottier et al., 2001).



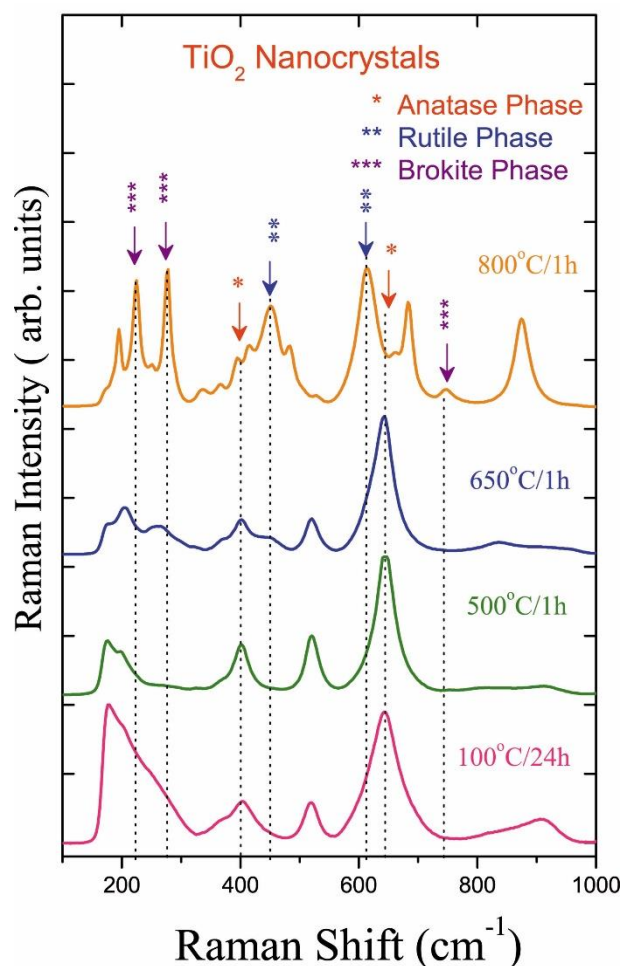
Com o aumento na temperatura de tratamento térmico para 800°C/1h, observa-se nos difratogramas que a o aumento na temperatura favoreceu a transformação de fase anatase para rutila. Isto é justificado devido o aumento na temperatura intensificar a transformação da fase anatase, que é metaestável termodinamicamente, para a fase rutila, que é mais estável (Wu et al., 2002; Gaynor et al., 1997). Além disso, observa-se, também, no difratograma a presença da fase brookite, que é presente devido o procedimento de síntese utilizado.

A **Tabela 1** apresenta os tamanhos médios e a fração de massa de rutila dos nanocristais (NCs) de TiO<sub>2</sub> submetidos a tratamento térmico a 100°C/24h, 500° C/1h, 650° C/1h e 800° C/1h. Observa-se, que o aumento na temperatura de tratamento térmico favorece o crescimento dos NCs TiO<sub>2</sub>. Já a fração de massa rutila diminui com o aumento na temperatura de tratamento. Esta redução é devido à transformação de fase anatase para brookite, como mostrado nos difratogramas da **Figura 2**.

**Tabela 1.** Tamanhos médios e a fração de massa de rutila dos NCs TiO<sub>2</sub> submetidos a tratamento térmico a 100°C/24h, 500°C/1h e 800°C/1h.

| Tamanho médio dos NCs     |                |                          |                          |
|---------------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| 100°C/24h                 | 500°C/1h       | 650°C/1h                 | 800°C/1h                 |
| 5.2 nm                    | 9.1 nm         | 38 nm                    | 55.1 nm                  |
| Fração de Massa de Rutila |                |                          |                          |
| Anatase                   | Anatase/Rutile | Anatase/Brookite /Rutile | Anatase/Brookite /Rutile |
| 100°C/24h                 | 500°C/1h       | 650°C/1h                 | 800°C/1h                 |
| ---                       | ---            | 0.37                     | 0.66                     |

Na **Figura 3** esta apresentado os espectros micro-Raman dos NCs TiO<sub>2</sub> submetidos a tratamentos térmicos a 100°C/24h, 500° C/1h, 650°C/1h e 800°C/1h. Todos os espectros foram normalizados em relação ao pico de maior intensidade, de modo que facilite a visualização dos modos micro-Raman ativos das fases anatase, brookite e rutila presente nos nanocristais de TiO<sub>2</sub>. Verifica-se que os NCs TiO<sub>2</sub> tratados termicamente a 100°C/24h apresentam bandas características de vibrações da fase anatase (Ohsaka et al., 1980; Zhang et al., 2000).



**Figura 3.** Espectros micro Raman dos nanocristais de  $\text{TiO}_2$  submetidos a tratamento térmico a  $100^\circ\text{C}/24\text{h}$ ,  $500^\circ\text{C}/1\text{h}$ ,  $650^\circ\text{C}/1\text{h}$  e  $800^\circ\text{C}/1\text{h}$ .

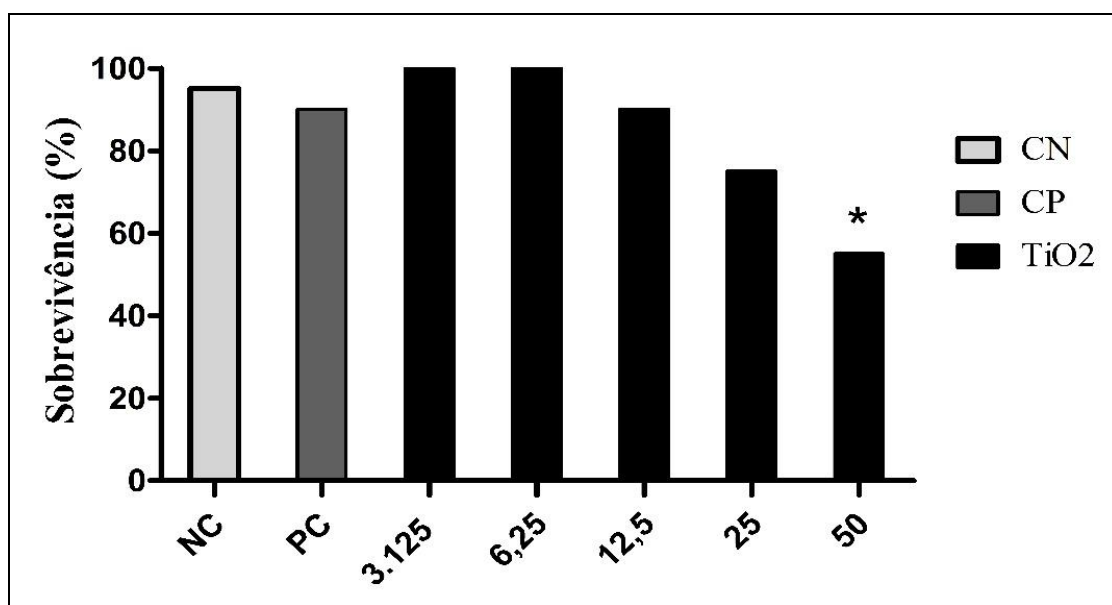
Entretanto, nesses espectros as bandas Raman estão deslocadas para maiores números de onda. Este efeito é associado com a diminuição de tamanho dos nanocristais (Choi et al., 2005), que está em acordo com os valores de tamanhos obtidos com base nos resultados de DRX (tabela 1). A banda Raman em torno de  $144\text{ cm}^{-1}$  não foi visualizada, devido o detector, do sistema Raman utilizado, no range de  $150$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$ , sendo observada apenas a descida da banda. Nos espectros micro-Raman das amostras tratadas termicamente a  $500^\circ\text{C}/1\text{h}$  verifica-se também os modos vibracionais da fase anatase. Já com o tratamento térmico de  $650^\circ\text{C}/1\text{h}$  é possível verificar algumas modificações nos espectros dos NCs  $\text{TiO}_2$ . Estas modificações estão relacionadas à transformação de fase anatase para brookite, como confirmado nos resultados de DRX.

Com o tratamento térmicos a  $800^\circ\text{C}/1\text{h}$ , os espectros apresentam os modos vibracionais da fase brookite e rutila, estando em acordo com os difratogramas de DRX (Figura 2). Não foram observadas bandas Raman relacionadas a outros compostos. Assim,

tanto com base nos resultados de DRX como nos de micro-Raman, pode-se concluir que os NCs TiO<sub>2</sub> apresentam alta pureza e diferentes fases em função do tratamento térmico.

Neste trabalho foi avaliado o potencial carcinogênico de nanopartículas de dióxido de titânio na fase rutila (9,1 nm), em quatro concentrações subletais. As concentrações foram baseadas em ensaios prévios de sobrevivência. Como apresentado na **Figura 3** foi observado efeito tóxico de maneira dose dependência (exceto entre as concentrações de 3,125 e 6,25 mM), onde, a medida em que se aumenta a concentração de TiO<sub>2</sub> uma redução na taxa de sobrevivência de moscas é observada.

Devido a diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) observado na taxa de sobrevivência de moscas tratadas com 50 mM de TiO<sub>2</sub> e o controle negativo, esta concentração foi considerada tóxica. Para análise de frequência de tumor epitelial em *D. melanogaster* foram usadas apenas concentrações consideradas subletais.



**Figura 3.** Taxas de sobrevivência das progênes de *Drosophila melanogaster* resultantes do cruzamento *wts* x *mwh*. NC = Controle negativo (Água); PC = Controle positivo (Mitomicina C10 mM).

\*Diferença estatisticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste do Chi- quadrado para razões de amostras independentes.

Neste trabalho foi avaliado a capacidade carcinogênica de NPs de TiO<sub>2</sub> por meio do Teste para detecção de Tumor Epitelial em células somáticas de *D. melanogaster* (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wt*s, com diferentes concentrações de Dióxido de Titânio - fase rutila (9,1 nm).

| Tratamento           |      | Número de tumores analisados (total de tumores) |                |            |                 |                 |             |             |              |
|----------------------|------|-------------------------------------------------|----------------|------------|-----------------|-----------------|-------------|-------------|--------------|
| TiO <sub>2</sub>     | MMC  | Número de indivíduos                            |                |            |                 |                 |             |             |              |
| (concentração)<br>mM | (mM) |                                                 | Olhos          | Cabeça     | Asas            | Corpo           | Pernas      | Halteres    | Total        |
| Contr. Água          | 0    | 140                                             | 0,007 (01)     | 0.028 (04) | 0.036 (05)      | 0.043 (06)      | 0.007 (01)  | 0.000 (00)  | 0.121 (17)   |
| Contr. Positivo      | 0.1  | 140                                             | 0.186<br>(26)* | 0.043 (06) | 1.250<br>(175)* | 1,114<br>(156)* | 0.186 (26)* | 0.043 (06)* | 2.821 (395)* |
| 3,125                | 0    | 140                                             | 0.000 (00)     | 0.007 (01) | 0.085 (12)      | 0.050 (07)      | 0.000 (00)  | 0.007 (01)  | 0.150 (21)   |
| 6,25 mM              | 0    | 140                                             | 0.028 (04)     | 0.043 (06) | 0.050 (07)      | 0.421 (59)*     | 0.021 (03)  | 0.000 (00)  | 0.564 (79)*  |
| 12,5 mM              | 0    | 140                                             | 0.007 (01)     | 0.100 (14) | 0.114 (16)*     | 0.300 (42)*     | 0.021 (03)  | 0.000 (00)  | 0.543 (76)*  |
| 25 mM                | 0    | 140                                             | 0.014 (02)     | 0.028 (04) | 0.114 (16)*     | 0.293 (41)*     | 0.007 (01)  | 0.000 (00)  | 0.457 (64)*  |

Diagnostico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância  $P \leq 0.05$

\* Valor considerado diferente do controle negativo ( $P \leq 0.05$ ).

MMC, mitomicina C.

Os resultados observados revelaram efeito carcinogênico nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25 mM. A ausência do comportamento dose dependência para a frequência de tumor epitelial em *D. melanogaster* é justificada pela redução da frequência total de tumor nas moscas a medida que se aumenta a concentração de TiO<sub>2</sub>. Nós enquanto autores, sugerimos que a redução da frequência de tumor epitelial nas maiores concentrações, pode ser resultante de eventos associados a citotoxicidade.

Esta afirmativa é corroborada com os resultados apresentados na **Figura 3**. Neste sentido, a presença de eventos citotóxicos tornaria inviável a visualização de massa tumoral no epitélio da mosca, já que as células morreram, devido sobretudo aos danos induzidos pelas NPs.

Diferentes trabalhos demonstram a aplicabilidade de NPs. Mesmo sendo de grande uso pela população, diferentes trabalhos têm demonstrado que a exposição crônica em diferentes vias a NPs, pode desencadear uma série de eventos adversos no organismo exposto (Adamcakova-Dodd et al., 2014; Know et al., 2014) incluindo danos genéticos (Sharma et al., 2009; Reis et al., 2015; Gumus et al., 2014; Demir et al., 2014; Osman et al., 2010).

Em relação a NPs de TiO<sub>2</sub> os dados não diferem dos aqui apresentados. Girardello (2016) avaliou o efeito de diferentes concentrações de NPs de TiO<sub>2</sub> em mexilhões dourados e verificou eventos tóxicos e genotóxicos nos organismos expostos.

Oya (2013) observou danos em hemácias de *Rhamdia quelen* após exposição crônica com NPs de TiO<sub>2</sub>. Resultados similares foram observados em camundongos expostos a NPs de TiO<sub>2</sub>, sendo evidenciado processos inflamatórios e danos mutagênicos (Troulierr et al., 2009).

Reis et al (2016) avaliaram o efeito de NPs de TiO<sub>2</sub> na forma Anatase (tamanho de 3,4 e 6,2 nm) e um complexo de rutila (64%), brookite (35%) e anatase (1%) em diferentes concentrações subletais. Os resultados revelaram efeito mutagênico na concentração de 120 µM de anatase (3,4 nm), por meio do Teste do micronúcleo e células V79. Além disso foi constatado efeito mutagênico nas concentrações de 1,562 e 3,125 mM de anatase (3,4 nm) e nas concentrações de 1,562; 3,125; 6,25 e 12,5 mM do complexo rutila/brookite/anatase, por meio do (Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *D. melanogaster* – SMART).

#### 4 CONCLUSÃO

Concluímos que NPs de TiO<sub>2</sub> apresenta efeito tóxico e carcinogênico de maneira dose dependência. Mais estudos devem ser conduzidos para dirimir a segurança individual e/ocupacional ao que diz respeito a utilização de NPs de TiO<sub>2</sub> pelo homem.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Z; HOLMBERG, J.P; HELLSTROM, A.K; HAGSTROM, M; BERGENHOLTZ, J; HASSELLOV, M et al. Synthesis, characterization and particle size distribution of TiO<sub>2</sub> colloidal nanoparticles, *Colloid Surface A*, v. 384, p. 254-61, 2011.
- ADAMCAKOVA-DODD, A., LARISSA V STEBOUNOVA<sup>2</sup>, JONG SUNG KIM<sup>1</sup>, SABINE U VORRINK<sup>1</sup>, ANDREW P AULT, PATRICK T O'SHAUGHNESSY<sup>1</sup>, VICKI H GRASSIAN<sup>2</sup> AND PETER S THORNE. Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles using sub-acute and sub-chronic murine inhalation models. *Particle and Fibre Toxicology*, v. 11, n. 15, p. 1-15, 2014.
- CHOI, H.C; JUNG, Y.U; KIM, SB. Size effects in the Raman spectra of TiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Vibrational Spectroscopy*, V. 37, p. 33-8, 2005.
- COSTA, A. C. F. M.; VILAR, M. A.; LIRA, H. L.; KIMINAMI, R. H. G. A.; GAMA, L. Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. *Cerâmica*, São Paulo, v.52, n.324, p. 255-259, 2006.
- COSTA, W.F.; OLIVEIRA, A.B.; NEPOMUCENO, J.C. Lapachol as an epithelial tumor inhibitor agent in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor supressor gene wts. *Genetics and Molecular Research*, v. 10, p. 3236-3245, 2011.
- DEMIR, E.; KAYA, N.; KAYA, B. Genotoxic effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on root meristem cells of *Allium cepa* by comet assay. *Turkish Journal of Biology*, v. 38, n. 1, p. 31-39, 2014.
- FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. NANOTECNOLOGIA: ASPECTOS GERAIS E POTENCIAL DE APLICAÇÃO EM CATÁLISE. *QUÍMICA NOVA*, SÃO PAULO, V. 32, N. 7, P. 1860-1870, 2009.
- FURTADO, S.G.; NEPOMUCENO, J.C. Redução de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*, pela enzima metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, por meio do teste wts (Warts). *Perquirere*, v. 9, p. 224-240, 2012.
- GAYNOR, A.G; GONZALEZ, R.J; DAVIS, R.M; ZALLEN, R. Characterization of nanophase titania particles synthesized using in situ steric stabilization, *J Mater Res*, V. 12, p. 1755-65, 1997.
- GIRARDELLO, F. NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO E AVALIAÇÃO DA SUA TOXICIDADE NO MEXILHÃO DOURADO (LIMNOPERNA FORTUNEI). 2016-5-23 ,100 TESE , UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL , CAXIAS DO SUL, URI: [HTTPS://REPOSITORIO.UCS.BR/HANDLE/11338/119](https://repositorio.ucs.br/handle/11338/119) ULTIMO ACESSO 03 DE NOVEMBRO 2017

- GURR JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY: Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 2005, 213: 66–73.
- GUINIER. A. X-ray diffraction in crystals, imperfect crystals, and amorphous bodies, San Francisco: W.H. Freeman, 1963.
- GUMUS, D. BERBER, A.A.; ADA, K.; AKSOY, H. In vitro genotoxic effects of ZnO nanomaterials in human peripheral lymphocytes. *Cytotechnology*, v. 66, n. 2, p. 317-325, 2014.
- KIM, S. I.; J. W.; JUNG, J. W.; A. H. N, Y. J.; RESTIFO, L. L.; KWON, H. W. *Drosophila* as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 14, n. 4, p.509-517, 2011.
- KNOW, J. Y.; LEE, S. Y.; KOEDRITH, P.; LEE, J. Y.; KIM, K. M.; YANG, S. I.; KIM, M. K.; LEE, J. K.; JEONG, J.; MAENG, E. H.; LEE, B. J.; SEO, Y. R. Lack of genotoxic potential of ZnO nanoparticles in *in vitro* and *in vivo* tests. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, V. 761, p. 1-9, 2014.
- KOO, B; PARK, J; KIM, Y; CHOU, S.H; SUNG, Y.E; HYEON, T. Simultaneous phase and size controlled synthesis of TiO<sub>2</sub> nanorods via non-hydrolytic sol gel reaction of syringe pump delivered precursors, *Journal physucal Chemical*, v. 110, p. 12318-23, 2006.
- MORAIS, C.R.; BONETTI, A.N.; CARVALHO, S.M.; REZENDE, A.A.A; ARAUJO, G.R.; SPANÓ, M.A. Assessment of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of Fipronil insectide in somatc cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, v. 165, p. 342-351, 2016.
- NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents through the test for detection of epithelial tumor clones (Warts). *Advacend Techniques in Biology and Medicine*, v. 3, n. 3, p. 1-8, 2015.
- ORSOLIN, P.C.; NEPOMUCENO, J.C. Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma Longa L*) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melannogaster*. *Perquiere*, v. 6, p. 55-69, 2009.
- ORSOLIN, P.C.; SILVA-OLIVEIRA, R.G.; NEPUMOCENO, J.C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n.8, p. 2598-2604, 2012.
- OYA, L.F. Avaliação genotóxica em eritrócitos e tecido cerebral de Rhamdia quelen (Siluriformes, Heptapteridae) após exposição aguda à Nanopartícula de Dióxido de Titânio (TiO<sub>2</sub>) e Chumbo Inorgânico Pb(II). Monografia para Bacharel em Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2013. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/32176>>. Acesso em: 30/09/17

- OBERDÖRSTER G, SHARP Z, ATUDOREI V, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicol.* 2004;16:437–45.
- OBERDÖRSTER G, FERIN J, GELEIN R, SODERHOLM SC, FINKELSTEIN J (1992) Role of the alveolar macrophage in lung injury—studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 97:193–199, 1992.
- OSMAN, i. F.; BAUMGARTNER, A.; CEMELI, E.; FLETCHER, J. N.; ANDERSON, D. Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide abd titanium dioxide in HEp-2 cells. *Nanomedicine*, v. 5, n. 8, p. 1193-1203, 2010.
- OHSAKA, T. Temperature-Dependence of the Raman-Spectrum in Anatase Tio<sub>2</sub>, *J Phys Soc Jpn*, v. 48, p. 1661-8, 1980.
- PEREIRA, J. C.; Estudo do comportamento de nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes suspensões; Tese de Mestrado em Engenharia de Materiais; Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa. Lisboa (2010).
- POTTIER, A; CHANEAC, C; TRONC, E; MAZEROLLES, L; JOLIVER, J.P. Synthesis of brookite TiO nanoparticles by thermolysis of TiCl in strongly acidic aqueous media, *J Mater Chem*, v. 11, p. 1116-21, 2001.
- REIS, E. D. E. M.; DE REZENDE, A. A.; SANTOS, D. V.; DE OLIVERIA, P. F.; NICOLELLA, H. D.; TAVARES, D. C.; SILVA, A. C.; DANTAS, N. O.; SPANO, M. A. Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide sources (amorphous and nanoparticles) using the in vitro micronucleus test and the in vivo wing somatic mutation and recombination test. *Food and Chemical Toxicology*, v. 84, p.53-63, 2015.
- SHARMA V., SHUKLA K., SAXENA N., PARMAR D., DAS M., DHAWAN A. Dna damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology Letters*, v. 185, p. 211–18, 2009.
- SIDOROV, R. A.; UGNIVENKO, E. G.; KHOVANOVAE, E. M.; BELISTSKY, G. A. Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogeneses. *Mutation Research*, v. 498, n.1, p. 181-191, 2001.
- SILVA, S. S.; MAGALHÃES, F.; SANSIVIERO, M. T. C. Nanocompósitos semicondutores ZnO/TiO<sub>2</sub>. Teste fotocatalíticos. *Quimica Nova*. v. 33, n. 1, p. 85-89, 2010.
- SILVA, L.M.; NEPOMUCENO, J.C. Efeito modulador da polpa da graviola (*Annona muricata*) sobre a carcinogenicidade da mitomicina C, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. *Perquirere*, v. 8, p. 80-94, 2011.
- TSUDA, H.; TAKEDA, N. Effect of tumor promoter TPA on spontaneous and Mitomycin C induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, v. 189, n. 375-379, 1987.



- TROUILLER B, RELIENE R, WESTBROOK A, SOLAIMANI P, SCHIESTL RH (2009) Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res* 69(22):8784–8789
- VENTURA, S., CARNEIRO, N., SOUTO, A. P.; Acabamento de têxteis multifuncionais com nanocompósitos poliméricos. Universidade do Minho, Portugal, 2011.
- WU, M; LIN, G; CHEN, D; WANG, G; HE, D; FENG, S et al., Sol-Hydrothermal Synthesis and Hydrothermally Structural Evolution of Nanocrystal Titanium Dioxide, *Chem Mater*, V. 14, p. 1974-80, 2002.
- YU, J; YU, J.C; LEUNG, M.K.P; HO, W; CHENG, B; ZHAO, X et al. Effects of acidic and basic hydrolysis catalysts on the photocatalytic activity and microstructures of bimodal mesoporous titania, *Journal of Catalysis*, v. 217, p. 69-78, 2003.
- ZHANG, X. et. al. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere*. v. 67. p. 160–166. 2007.
- ZHANG, W.F; HE, Y.L; ZHANG, M.S; YIN, Z; CHEN, Q. Raman scattering study on anatase TiO<sub>2</sub> nanocrystals, *J Phys D Appl Phys*, v. 33, p.912-6, 2000.