

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RONALDO DOS SANTOS FILHO

AVALIAÇÃO GENOTOXICOLÓGICA E MORFOLÓGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO UTILIZANDO O SISTEMA
TESTE DE *Allium cepa*

CURITIBA

2016



RONALDO DOS SANTOS FILHO

AVALIAÇÃO GENOTOXICOLÓGICA E MORFOLÓGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO UTILIZANDO O SISTEMA
TESTE DE *Allium cepa*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Morais Leme

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo assinados, membros da banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado, a qual se submeteu **RONALDO DOS SANTOS FILHO**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética são de parecer que se aprove o candidato.

Secretaria da Coordenação do Programa do Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 29 de março de 2016

Doutor Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos
Universidade Federal do Paraná - Membro Titular

Doutora Taynah Vicari
Pós-doutoranda/Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Membro Titular

Doutora Daniela Morais Leme
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Presidente

Visto

Doutora Lupe Furtado Alle
Coordenadora

Lupe Furtado Alle
Coordenadora do PPG-GEN / UFPR
Matrícula 200309

Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Marina e Ronaldo, por todo cuidado, apoio, ensinamentos e dedicação que tiveram e sempre tem comigo ao longo desta vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Daniela Morais Leme, por todo ensinamento de técnicas, valores e conhecimento ao longo desses dois anos. Obrigado por confiar em mim e sempre me incentivar a realizar todas as atividades da melhor maneira possível, sempre com paciência e a disposição para ajudar na execução do trabalho. Sem você, não teria sido possível.

Agradeço minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Marta Margarete Cestari, por acreditar em mim e abrir espaço para eu desenvolver meu trabalho na universidade, pelas conversas e conselhos que tivemos ao longo desses dois anos que foram fundamentais para o êxito deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Bruno Francisco Sant'Anna Santos e o seu aluno Samuel Alves dos Santos que contribuíram para este trabalho, realizando análises morfológicas que contribuíram para qualificar este trabalho.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) pela concessão da bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e Fundação Araucária (Brasil) pelo apoio financeiro.

Agradeço aos professores do departamento de genética da UFPR pelos valiosos conhecimentos transmitidos ao longo do mestrado.

Agradeço aos meus ex-professores de Biologia da Faculdade Espírita por fazerem eu me apaixonar por biologia, em especial a professora Cleusa, que sempre me fascinou com suas aulas de genética.

Agradeço aos meus colegas de laboratório que estiveram sempre presentes e a disposição para ajudar, tirar dúvidas: Ananda, Antônio, Beatriz, Cintya, Fabi, Flávio, Gabi, Gê, Gus, Juliana, Júlio, Júnior, Laercio, Laís, Manu, Mari, Miriam, Nati e Tatiane.

Agradeço em especial a Taynah, que foi a primeira pessoa a me receber e ensinar técnicas no laboratório e que acompanhou este trabalho até o final, mesmo quando estava bem longe.

Agradeço à Karoline e Jéssica, sempre presentes nas aventuras do *Allium cepa*, pela ajuda que me deram em vários momentos do trabalho, e por compartilharem comigo esta aventura.

Agradeço aos meus amigos que estiveram sempre presentes, seja aqueles que estão bem perto ou aqueles que estão a quilômetros de distância, por sempre proporcionarem risos e alegria, muitas vezes quando eu já estava perto de enlouquecer.

Agradeço a minha família, tios, primos, afilhado por fazerem parte da minha história.

Agradeço aos meus pais, que sempre me ensinaram a importância de estudar e que o conhecimento seria a maior riqueza que eu poderei ter. Por todo amor, paciência, ensinamentos. Não existem palavras que possam ser usadas para agradecer tudo que fizeram por mim.

Peço desculpas se esqueci de alguém, mas meu muito obrigado a todos que passaram pelo meu caminho ao longo desses dois anos e que de alguma forma acrescentaram alguma coisa nesta caminhada.

RESUMO

A preocupação com os impactos antrópicos causados ao ambiente e aos seres vivos faz necessário estudos toxicológicos de diferentes xenobióticos, em especial contaminantes emergentes, como as nanopartículas (NPs). As NPs tem sido amplamente utilizadas sem um real conhecimento dos seus efeitos nocivos. Apesar de estudos toxicológicos de NPs já serem encontrados na literatura, muitos são inconclusivos quanto a real periculosidade destes agentes, devido à alta instabilidade de suas propriedades físico-químicas e uma incerteza quanto a biodisponibilidade das NPs aos sistemas teste biológicos. Diferentes modelos biológicos tem sido empregados na Toxicologia, dentre eles, as plantas são importantes organismos para compreender impactos ambientais. Frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de indução de danos no DNA e alterações morfológicas de NPs de dióxido de titânio (NPTiO₂) por meio do sistema teste de *Allium cepa*. Além disso, para garantir uma precisa estimativa dos efeitos nocivos destas NPs, este trabalho também avaliou diferentes metodologias de exposição, buscando garantir a biodisponibilidade destas NPs para *A. cepa*. A comparação dos diferentes protocolos de exposição do teste de *A. cepa* (sementes germinadas em placas de Petri de poliestireno com papel filtro ou rede de nylon e bulbos dispostos em tubos de poliestireno), mostrou que não houve diferença entre os protocolos com sementes quanto a genotoxicidade das NPTiO₂ observada. Tal resultado sugere que não houve interferência destes dois protocolos na biodisponibilidade das NPs. No entanto, uma diferença significativa foi observada entre os protocolos com semente e bulbos, porém, este resultado está relacionado com a maior sensibilidade das sementes a detecção de xenobióticos já demonstrada na literatura. Desta forma, o protocolo utilizando sementes e rede de nylon foi adotado para a avaliação genotoxicológica e de alterações morfológicas das NPTiO₂ em *A. cepa*. Foram evidenciadas redução do Índice Mitótico (IM) e aumento nas frequências de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleo (MN) nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas as NPTiO₂ de maneira concentração-dependente. Estes resultados mostram a periculosidade das NPTiO₂ quanto a sua ação de citotóxica e a capacidade de indução de danos, por um modo de ação clastogênico para este sistema vegetal. Além disso, a análise morfológica evidenciou uma maior condensação da cromatina, um aumento no número de vacúolos, sendo estes mais volumosos que o controle negativo e uma grande quantidade de corpos de óleos com localização adjacente a membrana plasmática. Tais resultados apontam para um mecanismo de defesa celular contra a entrada das NPs na tentativa de minimizar os efeitos deletérios por elas causados. A avaliação genotoxicológica e morfológica realizada neste trabalho, nos permite concluir que as NPTiO₂ causam efeitos adversos nestes organismos, sendo real a preocupação com seus efeitos.

Palavras-chave: contaminantes emergentes; nanopartículas; danos celulares; danos no DNA.

ABSTRACT

Concern about the anthropogenic impacts on the environment and living beings is necessary toxicological studies of different xenobiotics, especially emerging contaminants, such as nanoparticles (NPs). NPs have been widely used without a real knowledge of its harmful effects. Although toxicological studies of NPs already be found in the literature, many are inconclusive as the real danger of these agents due to the high instability of its physicochemical properties and uncertainty about the bioavailability of NPs to biological test systems. Different biological models have been used in toxicology, among them, the plants are important organisms for understanding environmental impacts. Based on these, this study aimed to evaluate the potential damage induction in DNA and morphological changes of titanium dioxide NPs (NPTiO₂) through the *Allium cepa* test system. In addition, to ensure precise estimate of the harmful effects of these NPs, this study also evaluated different methods of exposure, seeking to ensure the bioavailability of these NPs to *A. cepa*. Comparison of different protocols exposure of *A. cepa* test (germinated seeds in polystyrene Petri dishes with filter paper or nylon net and bulbs arranged in polystyrene tubes), showed no difference between the protocols with seeds as genotoxicity of NPTiO₂ observed. This result suggests that there was no interference of two protocols on the bioavailability of NPs. However, a significant among the protocols and seed bulbs, however, this result is related to the higher sensitivity difference was observed of detection seeds xenobiotics been demonstrated in the literature. Thus, using the protocol seeds and nylon net it was evaluated genotoxicologic and morphologic changes in the NPTiO₂ *A. cepa*. Were evidenced reduction in the mitotic index (MI) and an increase in the frequency of chromosome aberrations (CA) and micronuclei (MN) in the meristematic cells of *A. cepa* the exposed so NPTiO₂ concentration-dependent. These results show the dangerousness of NPTiO₂ as their cytotoxic action and inducing ability damage, for clastogenic action mode in plant systems. Furthermore, the morphological analysis showed greater chromatin condensation, an increase in the number of vacuoles, which are more bulky than the negative control and a large amount of oil bodies located adjacent to the plasma membrane. These results point to a cellular defense mechanism against the entry of NPs in an attempt to minimize the deleterious effects caused by them. The genotoxicologic and morphological evaluation performed in this work shows that the NPTiO₂ cause the adverse effects on organisms, with real concern for its effects.

Keywords: emerging contaminants; nanoparticles; cell damage; DNA damage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grande área de absorção das nanopartículas.....	15
Figura 2. Disposição geométrica das estruturas das NPTiO ₂	18
Figura 3. Nanopartículas em banho sonicador para evitar sua agregação.....	29
Figura 4. Diferentes formas de exposição ao teste <i>A. cepa</i>	30
Figura 5. Procedimentos anteriores a montagem das lâminas de <i>A. cepa</i>	31
Figura 6. Preparo de lâmina permanente de <i>A. cepa</i>	31

ARTIGO 01

Figura 1. Diferentes formas de exposição das nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO ₂) ao teste <i>Allium cepa</i>	40
Figura 2. Distribuição de tamanho da NP por intensidade	43

ARTIGO 02

Figura 1. Distribuição de tamanho das NPs por intensidade	58
Figura 2. Células normais e alteradas nas diferentes fases do ciclo celular....	61
Figura 3. Ápice radicular de <i>A. cepa</i> (cortes longitudinais) ao microscópio de luz não exposto (A-B) e exposto a 1 mg/mL de nanopartículas de dióxido de titânio (C-D).....	63
Figura 4 Ápice radicular de <i>A. cepa</i> (cortes longitudinais) ao microscópio eletrônico de transmissão não exposto (A) e exposto a 1 mg/mL de nanopartículas de dióxido de titânio (B-E).....	64

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 01

Tabela 1. Resultados de Índice Mitótico, Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expostas a nanopartículas de dióxido de titânio por três diferentes protocolos de exposição	44
Tabela 2. Comparativo do valor de p entre as diferentes metodologias do teste <i>A. cepa</i>	45

ARTIGO 02

Tabela 1. Caracterização das suspensões de nanopartículas de dióxido de titânio.....	57
Tabela 2. Resultado de Índice Mitótico, Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expostas as nanopartículas de dióxido de titânio.....	59
Tabela 3. Tipos de Aberrações Cromossômicas observados em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expostas as nanopartículas de dióxido de titânio...	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

NPs	-	Nanopartículas
TiO ₂	-	Dióxido de titânio
NPTiO ₂	-	Nanopartículas de dióxido de titânio
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
AC	-	Aberrações cromossômicas
MN	-	Micronúcleo
IM	-	Índice Mitótico
CN	-	Controle Negativo
CP	-	Controle Positivo
MMS	-	Metil-Metano-Sulfonato
hrs.	-	Horas
min.	-	Minutos
EPA	-	<i>Environmental Protection Agency</i>
IPCS	-	Programa Internacional de Química Segura
UNEP	-	Programa das Nações Unidas para o ambiente
IUPAC	-	União Internacional de Química Pura e Aplicada

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Contaminação ambiental	15
2.2 Nanopartículas	16
2.3 Genotoxicidade ambiental	19
2.4 Sistema Teste de <i>Allium cepa</i>	21
2.5 Nanopartículas e seus efeitos em vegetais superiores	23
2.6 Alterações morfológicas em vegetais superiores	25
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Material	28
4.2 Preparo das suspensões teste de NPTiO ₂	28
4.3 Caracterização da NPTiO ₂ e de suas suspensões teste	29
4.4 Experimentos de padronização da melhor metodologia de exposição das NPTiO ₂ AO sistema-teste de <i>A. cepa</i>	30
4.5 Teste de Aberrações Cromossômicas (AC) e Micronúcleos (MN) em células meristemáticas de <i>A. cepa</i>	32
4.6 Análise estatística referente aos dados dos experimentos de padronização em <i>A. cepa</i>	32
4.7 Avaliação da periculosidade de NPTiO ₂ utilizando o sistema teste de <i>A. cepa</i>	32
4.7.1 Avaliação genotoxicológica	33
4.7.1.1 Análise estatística referente aos dados da avaliação genotoxicológica	33
4.7.2 Avaliação de alterações morfológicas	33
4.7.2.1 Análise em microscopia de luz (ML)	34
4.7.2.2 Análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	34
ARTIGO 1	35
AVALIAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS VISANDO GARANTIR A BIODISPONIBILIDADE DAS NPTIO ₂ AO SISTEMA TESTE <i>Allium cepa</i> .	
ARTIGO 2	49
EFEITOS CITO- E GENOTÓXICOS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR NANOPARTÍCULAS DE DIOXIDO DE TITANIO EM RAÍZES DE <i>Allium cepa</i> .	
5. CONCLUSÕES GERAIS	73
6. REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

O aumento populacional aliado ao desenvolvimento de novas tecnologias intensificam o impacto ocasionado pela ação antrópica ao meio ambiente. Desta forma, estudos apontam para um agravamento da problemática da contaminação ambiental ocasionada por diferentes poluentes (ZHANG *et al.*, 2014; TOPUZ *et al.*, 2015; JAYAPRAKASH *et al.*, 2015).

Atualmente, há uma crescente preocupação com um grupo específico de contaminantes ambientais, os contaminantes emergentes, dentre os quais podemos destacar as nanopartículas (NPs), que são bastante atrativas para a indústria e para a medicina, mas que ainda não possuem esclarecimento quanto aos seus possíveis efeitos deletérios para o ambiente e seres vivos (BHARALI *et al.*, 2011).

Neste cenário, é extremamente importante avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos de diferentes substâncias químicas, pois a avaliação dos danos no DNA é um dos parâmetros para dimensionar a periculosidade dessas substâncias (LANDOLPH, 2014).

Os vegetais superiores são considerados excelentes modelos genéticos para avaliação de mutágenos ambientais, tanto pela sua sensibilidade de detecção, como pela possibilidade de avaliação de diferentes *endpoints* genéticos, os quais abrangem desde as mutações pontuais até as aberrações cromossômicas (AC), passíveis de serem observadas em diferentes órgãos e células (GRANT, 1994).

Entre os vegetais superiores utilizados como modelos-teste, *Allium cepa* vem se destacando devido a sua eficiência em avaliar danos genéticos induzidos por poluentes ambientais ou por substâncias químicas puras. Este teste permite a avaliação de micronúcleo (MN) e AC nas diferentes fases da divisão celular (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Além da sua alta sensibilidade, esta espécie tem sido também utilizada por outras vantagens, como baixo custo de obtenção, fácil manuseio e armazenamento, e principalmente, por apresentar boas condições cromossômicas. O *A. cepa* apresenta cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$), sendo este fator fundamental para estudos de avaliação de danos cromossômicos e/ou de

distúrbios do ciclo de divisão celular (FISKESJÖ, 1985). Adicionalmente, o teste de *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Química Segura (IPCS) e pelo Programa das Nações Unidas para o Ambiente (UNEP) e vem sendo utilizado desde 1920 para avaliações toxicológicas (KUMARI, MUKHERJEE e CHANDRASEKARAN, 2009)

Contudo, a avaliação toxicológica de NPs enfrenta problemas metodológicos, como a garantia de sua biodisponibilidade para o sistema-teste, que podem levar a resultados falso negativos. Desta forma, assegurar sua biodisponibilidade para o sistema teste é fundamental para que seja possível obter resultados satisfatórios quanto ao seu potencial genotóxico (TEUBL *et al.*, 2014).

A definição de uma metodologia de exposição que assegure a biodisponibilidade das NPs ao sistema-teste é fundamental, pois visa obter resultados confiáveis que permitam estimar a periculosidade destes nanomateriais. Este cenário, torna importante o estudo das NPs no sistema-teste *A. cepa*, permitindo uma melhor compreensão de seus efeitos deletérios, uma vez que estes nanomateriais estão presentes em nosso cotidiano e podem impactar o meio ambiente. A periculosidade destas NPs pode ser observada por meio da demonstração da existência de efeitos genotóxicos e também pelas alterações morfológicas provocadas pela nanopartícula de dióxido de titânio (NPTiO₂).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contaminação ambiental

Ao longo do tempo, as atividades antrópicas tem causado profundas mudanças no ambiente, culminando com os níveis alarmantes de contaminação de todos os ecossistemas, em uma clara demonstração da existência de desequilíbrio na relação homem-natureza (RICKLEFS, 2013).

A demanda por fontes de água pura e de qualidade para o consumo humano e agricultura é grande. Geralmente, ela provém de reservatórios naturais, como rios e lagos, que estão sujeitos à contaminação por xenobióticos. Em razão disso, há uma procura por fontes de água cada vez mais distantes dos grandes centros de consumo, devido a problemática com a eliminação de resíduos, que corresponde a uma das maiores fontes de poluição aquática, liberando neste ambiente os mais diversos tipos de contaminantes e suas toxinas, prejudicando o ambiente e os organismos. (FRENZILLI *et al.*, 2009; JHANSI, CAMPUS e MISHRA, 2013).

O ambiente aquático é afetado por diferentes contaminantes, dentre eles, contaminantes sabidamente conhecidos e legislados, como os metais (JAYAPRAKASH *et al.*, 2015; SALLEM, IQBAL e SHAH, 2015) e contaminantes para os quais ainda não foram estabelecidos valores limites de aceitação em corpos d'água, que são atualmente denominados de contaminantes emergentes.

Contaminantes aquáticos emergentes podem ser amplamente definidos como compostos químicos ou agentes biológicos (e.g., microrganismos) que não são normalmente monitorados nos sistemas aquáticos, mas que apresentam recentemente um aumento de suas incidências neste meio e que podem conferir um perigo, real ou suspeito, a saúde dos organismos vivos (JONES e GRAVES, 2010). Estudos da EPA (*U.S. Environmental Protection Agency*) têm mostrado um aumento significativo de compostos químicos classificados como poluentes emergentes (RICHARDSON, 2007, 2009). Dentre os contaminantes emergentes atuais, temos diversos nanomateriais, incluindo

as NPs (COLEMAN *et al.*, 2014; CANESI, CIACCI e BALBI, 2015; OKUPNIK, JARA e PFLUGMACHER, 2015).

A identificação e quantificação dos poluentes emergentes em sistemas aquáticos é necessária para avaliar e elucidar seus impactos ao ambiente e aos organismos vivos, tanto do ponto de vista ecotoxicológico quanto para garantia da saúde humana (TERNER, 2015).

Desde 2006, a nanociência tem atraído a atenção de gestores ambientais e políticos sobre o possível potencial toxicológico para o ambiente e saúde humana (MOORE, 2006). Contudo, apesar do crescente uso de NPs por diferentes setores industriais, até o momento os estudos toxicológicos são inconclusivos quanto a periculosidade destes nanomateriais. Adicionalmente, devido à complexidade da especiação dos metais associados as NPs, há dificuldade em testar todos os possíveis cenários de contaminação ambiental, o que dificulta ainda mais a elucidação da problemática toxicológica das NPs (FABREGA, *et al.*, 2010).

2.2. Nanopartículas

As NPs são definidas como partículas que contem pelo menos uma característica microestrutural com dimensões de até 150 nanômetros (PIERRI *et al.*, 2005). Devido à sua singularidade em relação às propriedades físico-químicas, tais como grande área de superfície (Figura 1) e atividade química, grande capacidade de penetração, mostram-se potencialmente atrativas em tecnologias industriais e medicinais, (BHARALI *et al.*, 2011).

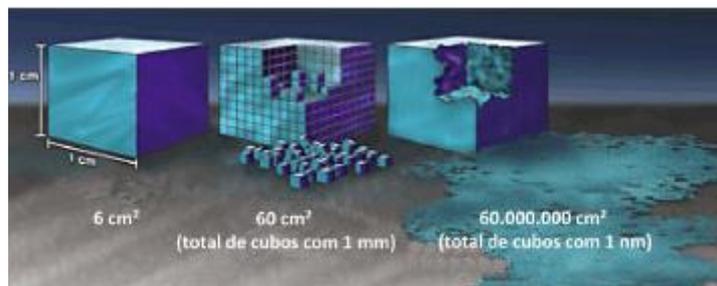


Figura 1. Grande área de adsorção das nanopartículas.FONTE:Nano.gov acesso em fevereiro de 2016.

As NPs metálicas podem ser obtidas por métodos químicos, físicos ou biológicos. No entanto, a síntese biológica tem recebido atenção especial. De fato, existem diferentes espécies de fungo e bactérias capazes de reduzir íons metálicos produzindo NPs metálicas com propriedades antimicrobianas (DURAN *et al.*, 2010).

Existem diversos estudos envolvendo diversos tipos de NPs, por exemplo, prata (NELLGUND *et al.*, 2015), ouro (SATO *et al.*, 2015), zinco (MAO *et al.*, 2015), dióxido de titânio (LI *et al.*, 2015), sílica (ASHRAFMANSOURI e ESFAHANY, 2015), entre outras, o que resulta em diversas aplicações para estes nanomateriais, como por exemplo, cosméticos, embalagens, chips eletrônicos, tintas e indústria têxtil.

A aplicação das NPs em diversos setores industriais, requer a certificação da segurança toxicológica tanto ambiental como para a saúde humana destes nanomateriais. Neste aspecto, criou-se a nanotoxicologia, que é uma disciplina que compreende o estudo da interação das nanoestruturas com os sistemas biológicos, com ênfase na elucidação da relação entre as propriedades físico-químicas das NPs e a indução de respostas tóxicas em sistemas biológicos (FORBE *et al.*, 2011).

As NPs apresentam diversas vantagens terapêuticas, sendo bastante utilizadas na medicina por apresentarem capacidade de atravessar barreiras biológicas (KIM *et al.*, 2006). Existe a necessidade de aumentar a biodisponibilidade para os órgãos alvo de agentes terapêuticos no tratamento de doenças, e as NPs contribuem para uma maior biodisponibilidade destes agentes. Isto é possível devido a forma, o tamanho e as propriedades físico-químicas das NPs (STAQUICINI *et al.*, 2011; SCHWARTZ *et al.*, 2014).

Segundo a IUPAC, a solubilidade pode ser expressada como uma proporção de um soluto designada no seio de um solvente determinado, em outras palavras, é a quantidade máxima que uma substância pode dissolver-se em um líquido, e expressa-se em mols por litro, gramas por litro. As nanopartículas não são solúveis em água, caracterizando uma suspensão coloidal, fazendo necessária a avaliação do potencial zeta para entender o comportamento desta substância (SILVA, *et al.*, 2010).

Para um sistema em suspensão, o Potencial Zeta é um índice importante que reflete a intensidade da força de repulsão entre as partículas e a estabilidade da dispersão, porém, o papel dos íons especificamente adsorvidos sobre as NPs ainda não está completamente compreendido (LIUFU, XIAO e LI, 2005). Estudos demonstram que o Potencial Zeta das NPs depende de diversos fatores, como a composição do solvente, a composição química das superfícies das partículas, o valor de pH e íons na suspensão. Sabe-se que suspensões que apresentam valores de Potencial Zeta superiores a + 30 mV ou inferiores a -30 mV são estáveis, enquanto aquelas cujo valor encontra-se entre esses valores são instáveis (MANDZY, GRULKE e DRUFFEL, 2005).

A biodisponibilidade das NPs depende de sua internalização celular, e é importante para garantir que os estudos sobre essas substâncias não apresentem resultados falso negativos, uma vez que a avaliação da sua genotoxicidade depende de sua internalização na célula, para que então seja possível avaliar seus efeitos em diferentes concentrações (PAKRASHI *et al.*, 2014).

O dióxido de titânio em sua forma nanoestruturada tem atraído muito interesse em diversas áreas por apresentar diversas aplicações em diferentes setores de indústria, como por exemplo, nas indústrias alimentícias, cosmética, de papel, farmacêutica, de tintas, de plásticos e têxtil, além de apresentar potencial em aplicações na eletrônica e genômica, devido as suas propriedades físico-químicas (WENSUN, DUA e BOYANG, 2009). As águas residuais são apontadas como principal ponto de entrada das NPTiO_2 no ambiente aquático (KAEGI, 2010).

As NPTiO_2 podem se apresentar sob três formas: anatase, rutilo e brookita (FIGURA 2). A forma mais encontrada e tóxica é anatase, onde os cristais estão isolados e bem desenvolvidos do que na forma rutilo, onde os cristais estão maclados em um sistema tetragonal. Foi observado que as NPTiO_2 na estrutura cristalina anatase são tóxicos nos diversos testes realizados e na forma rutilo, as NPs formam agregados maiores, apresentando menores efeitos sobre os organismos biológicos (CLEMENT, HUREL e MARMIER, 2013).

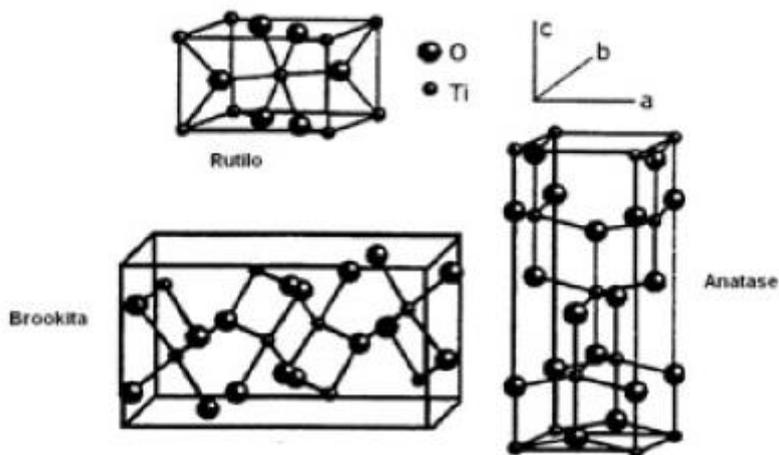


Figura 2. Disposição geométrica das estruturas Rutilo, Anatase e Brookita das NPTiO_2 . FONTE: Mo e Ching (1995)

2.3. Genotoxicidade ambiental

Segundo a *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA, 2015), a poluição é caracterizada pela presença de quaisquer substâncias na água, solo ou ar que degradam a qualidade natural do ambiente, alterando o aspecto visual, o gosto, ou cheiro, podendo causar riscos à saúde dos organismos vivos. A presença de poluentes inviabiliza a utilização dos recursos naturais, cada vez mais alterados, devido ao modo de vida humano, comprometendo a qualidade dos ecossistemas.

A preocupação com o ambiente aquático é grande, pois uma ampla variedade de resíduos são despejados de maneira inadequada diretamente neste ecossistema, trazendo diversas consequências, como o comprometimento da saúde dos organismos que vivem neste ambiente e que muitas vezes são fontes de alimentos para os seres humanos. Além disso, a água é capaz de transportar estas substâncias químicas para longe dos focos de contaminação, podendo afetar também outros ambientes (TERNER, 2015).

A Toxicologia Genética é uma área de pesquisa que surgiu a partir da preocupação com a degradação ambiental e os possíveis danos causados ao material genético. Estudos nesta área visam avaliar o potencial de indução de danos no DNA causados por agentes físicos e/ou químicos em células de organismos procariontes e eucariontes. A molécula de DNA está sujeitada a

sofrer alterações aleatórias denominadas mutações que podem ser induzidas por erros durante o ciclo celular, mas que também podem ser decorrentes da ação de radiação UV ou xenobióticos (LANDOLPH, 2014).

Existem três classes de danos no DNA: (1) Mutação Gênica – são mutações pontuais que causam alterações na sequência do DNA dentro do gene; (2) Mutação Cromossômica Estrutural – são alterações na estrutura cromossômica; (3) Mutação Cromossômica Numérica – são alterações no número de cromossomos (HOUK, 1992).

Os agentes genotóxicos são aqueles que podem interagir tanto com o material genético, como com outros componentes da célula, como as fibras do fuso e enzimas celulares. Logo, o termo genotoxicidade se designa a formação de aductos de DNA, síntese de DNA não programada, lesões na fita de DNA, trocas entre cromátides-irmãs, ou seja, são transitórios, sendo suscetíveis ou não de reparo, podendo ou não induzir uma mutação. Já a mutagenicidade corresponde a alterações permanentes em nível gênico ou cromossômico (DEARFIELD *et al.*, 2002).

As substâncias químicas causadoras de danos à molécula de DNA podem ser agrupadas em quatro diferentes grupos: (1) aquelas que agem diretamente sobre a molécula de DNA; (2) as que requerem via de metabolização para causarem danos; (3) as que promovem a produção de espécies reativas de oxigênio; (4) aquelas que causam inibição no reparo e na síntese do DNA (LEE e STEINERT, 2003).

Os mecanismos de reparo existem com a finalidade de manter a integridade genômica, seja quando o DNA sofre com danos espontâneos, seja quando sofre com danos provocados pela ação de toxicantes. (GUNES, AL-SADAAN e AGARWAL, 2015).

A avaliação de danos no DNA causados por xenobióticos pode ser realizada fazendo uso de diferentes metodologias e organismos-teste. Segundo Fiskesjo (1985) é importante que os teste de monitoramento ambiental apresentem fácil execução e produzam resultados rápidos e reprodutíveis, uma vez que, alertam para a periculosidade destas substâncias. Houk (1992) completa que a escolha do teste utilizado deve considerar fatores como a executabilidade, o custo e a característica da amostra.

Pode-se destacar o uso de sistema-teste vegetais no monitoramento de poluentes ambientais, uma vez que são capazes de detectar mutágenos em diferentes ambientes e são capazes de avaliar diferentes *endpoints* genéticos, como mutações pontuais, alterações morfológicas, IM, AC e MN (GRANT, 1994). White e Claxton (2004) relatam o uso de diferentes sistemas vegetais na avaliação de genotoxicidade, como por exemplo, *Tradescantia sp.*, *Zea mays*, *Vicia faba* e *Allium cepa*.

2.4 Sistema teste de *Allium cepa*

Conhecida popularmente como cebola, a espécie *Allium cepa* é um vegetal superior bastante empregado em avaliações de toxicidade de poluentes ambientais. Vários fatores contribuem para o uso deste sistema-teste: (1) apresenta alta sensibilidade na detecção de mutágenos; (2) alta correlação com outros sistema-teste, como os de mamíferos; (3) baixo custo; (4) possui boas condições cromossômicas, apresentando cromossomos de tamanho grande e em número reduzido ($2n=16$), o que facilita a análise e quantificação das AC (FISKESJO, 1985; FERNANDES *et al.*, 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2007; MOHAMMED, *et al.*, 2015).

O teste do *A. cepa* é um sistema teste vegetal eficiente, pois além de apresentar as vantagens descritas acima, permitindo a avaliação de IM, MN e AC (LEME e MARIN-MORALES, 2009), ele permite também avaliações morfológicas que confirmam o efeito dos toxicantes no organismo-teste

Levan, pode ser considerado o pioneiro no teste do *A. cepa*, em 1938 observou distúrbios no fuso mitótico a partir da utilização de colchicina, mais tarde, em 1945 mostrou que diferentes soluções de sais orgânicos eram capazes de induzir AC nas células meristemáticas das raízes deste vegetal (LEVAN, 1945). Com o passar dos anos, foram realizadas adaptações na metodologia deste teste para permitir uma avaliação mais abrangente de substâncias químicas. Neste contexto, destaca-se as adaptações de Fiskesjo (1985) e Rank (1993) para permitir o uso do teste de *A. cepa* no monitoramento ambiental, tornando-o eficaz na avaliação de misturas complexas e capaz de detectar agentes potencialmente genotóxicos, por meio da avaliação de AC nas

diferentes fases do ciclo celular. A inclusão da avaliação de efeitos mutagênicos a partir da observação de MN em células de F₁ de *A. cepa* expostas à poluentes ambientais aconteceu com Ma *et al.*, (1995).

Mohammed *et al.* (2015) destacam que o teste de *A. cepa* permite a avaliação de diversos parâmetros, como avaliação do IM para citotoxicidade, de AC para genotoxicidade e do MN para mutagenicidade. Há discordância entre diferentes autores sobre qual seria o melhor *endpoint*. Ma *et al.* (1995) consideram os MN, o melhor parâmetro, pois são os mais simples e efetivos indicadores de danos no DNA. Por outro lado, Rank e Nielsen (1997) defendem a avaliação das AC, uma vez que, permitem tanto detectar o potencial genotóxico, como avaliar os mecanismos de ação dos agentes testados, podendo o dano gerado ter efeito aneugênico ou clastogênico.

A toxicidade é um parâmetro inicial utilizado, capaz de fazer uma análise prévia do contaminante, estabelecendo os primeiros indicativos de seus riscos, por meio da avaliação do índice de germinação e da medição do crescimento das raízes (RANK, 2003).

A citotoxicidade é avaliada através do IM, que é caracterizado pela razão entre o número de células em divisão celular sobre o número total de células. Tanto o aumento como a diminuição do IM são indicativos de citotoxicidade (FERNANDES, MAZZEO e MARIN-MORALES, 2007). A redução pode indicar alterações provocadas pela ação química da substância testada no crescimento e desenvolvimento dos organismos, enquanto o aumento do IM pode resultar em uma proliferação desordenada das células, podendo culminar em um processo tumoral (HOSHINA, 2002).

A região meristemática usada neste teste apresenta rápido crescimento e grande quantidade de células em divisão (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Indicadores de mutagenicidade, os MN são identificados em qualquer tipo de célula, podendo ser usado para monitorar ambientes através de teste com roedores e plantas (SILVA *et al.*, 2011). Em plantas, como no caso do *A. cepa*, este teste pode ser avaliado isoladamente em células da região F₁ ou em conjunto com as AC em células meristemáticas (MA *et al.*, 1995). Em *A. cepa* a avaliação do tamanho do MN pode sugerir ações aneugênicos e clastogênicos, onde MN pequenos indicariam efeitos clastogênicos resultantes de quebra

cromossômica e MN grandes indicam efeitos aneugênicos, resultantes da perda cromossômica, isto está relacionado com a constituição cromossômica desta espécie (LEME, ANGELIS e MARIN-MORALES, 2008).

O teste do *A. cepa* pode ser desenvolvido tanto a partir da semente, como do bulbo da cebola. No Brasil, há maior facilidade do uso de sementes, pois é mais fácil adquirir de uma mesma variedade e lote, com um número de amostras maior. Elas apresentam ótima faixa de germinação a 25°C, sendo apropriado testar algumas marcas de semente, para verificar qual apresenta melhor germinação (PINHEIRO *et al.*, 2014). Fatores como a temperatura e a umidade relativa do ar influenciam a qualidade fisiológica das sementes, e apresentam menor interferência em sua germinação quando estão armazenadas em latas (CANEPPELE, 1995). A coleta das raízes deve ser feita quando atingirem 2 cm de comprimento (OLIVEIRA, *et al.*, 2010).

Ao longo dos anos, diversos trabalhos tem sido realizados com *A. cepa*, utilizando diferentes contaminantes, como por exemplo, hidrocarbonetos aromáticos (LEME, ANGELIS e MARIN-MORALES, 2008), metais (SINGH e GOEL, 2015), praguicidas (BIANCHI, FERNANDES e MARIN-MORALES, 2016) e nanopartículas (PAKRASHI *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, diversos estudos envolvendo diferentes tipos de NPs utilizando *A. cepa* como sistema teste tem sido realizados (KLANCNIK *et al.*, 2010; GHODAKE, SEO e LEE, 2011; KUMARI *et al.*, 2011; PAKRASHI *et al.*, 2014).

2.5. Nanopartículas e seus efeitos em vegetais superiores

Muitos estudos (AKERMANN *et al.*, 2002; HOSHINO *et al.*, 2004 e SUZUKI *et al.*, 2007) envolvendo NPs e plantas alertam para possíveis efeitos adversos, uma vez que as NPs funcionam como transportadores de outras substâncias, carreando-as para o interior das células. Devido a sua elevada relação superfície-volume, as NPs são extremamente reativas e podem passar através da membrana plasmática (SUZUKI *et al.*, 2007), serem absorvidas por

processos de endocitose e ainda por aquaporinas, que atuam como vias de captação de NPs (SCHWAB *et al.*, 2016).

O uso de NPs na agricultura tem mostrado resultados satisfatórios quanto ao cultivo de algumas plantas. Em um estudo realizado com espinafre foi observado uma melhoria no crescimento das plantas em que as NPTiO_2 foram administradas nas sementes ou pulverizadas sobre as folhas. Elas ainda aumentaram a atividade de várias enzimas e promoveram a absorção de nitrato, que acelerou a transformação de nitrogênio inorgânico em orgânico (ZHENG *et al.*, 2005). Outro trabalho mostrou o uso de NPs para aumentar o crescimento, melhorar a porcentagem de germinação e aumentar o vigor das mudas de *Tridax procumbens L.*, conhecida como Erva de Touro (KUSHWARA, KAUR e MALIK, 2013).

É importante ressaltar que algumas NPs podem apresentar um efeito protetor, sendo benéficas aos organismos. Em um estudo realizado com *Pisum sativum* observou-se que em contato com o cromo havia diminuição no crescimento, entretanto com a adição de NPs de silício juntamente com o cromo, observa-se uma espécie de proteção, reduzindo o estresse oxidativo e reduzindo a acumulação do cromo, permitindo o crescimento das ervilhas (TRIPATHI *et al.*, 2015).

Diversos autores, verificam efeitos ocasionados pelas NPs em vegetais. MA *et al.* (2010) destacam a interação das NPs com as plantas, em relação a absorção e acumulação de biomassa vegetal, afetando seu destino e transporte no ambiente. Lin e Xing (2007) testaram cinco tipos diferentes de NPs e observaram efeitos no índice germinativo e no crescimento das raízes nas seis espécies testadas. Clement, Hure e Marmier (2013) ainda destacam que as NPTiO_2 na forma anatase mostram-se mais tóxicas que as na forma de rutilo. Kumari, *et.al* (2011) avaliam a toxicidade de NPs de óxido de zinco e observou-se efeitos em nível celular, molecular e nuclear, relação direta entre o aumento do número de AC com a elevação das concentrações da NP.

Como já relatado, as NPs interagem com diferentes tipos de vegetais, resultando em diferentes efeitos a estes organismos. Em *A. cepa* verifica-se aumento significativo do crescimento das raízes (CANAS *et al.*, 2008), em *Solanum lycopersicum* observa-se aumento significativo do índice de

germinação, (KHODAKOVSAJA *et al.*, 2009), em *Oryza sativa* onde nota-se atraso e diminuição da floração (LIN *et al.*, 2009), em *Curcubita pepo* verifica-se redução da biomassa (STAMPOULIS *et al.*, 2009), em *Lactuca sativa* verifica-se redução do comprimento da raiz (LIN e XING, 2007), em *Zea Mays* percebe-se inibição da condutividade hidráulica, além de afetar o crescimento e a transpiração (ASLI e NEUMANN, 2009) e danos no DNA em *A. cepa* (KUMARI *et al.*, 2009), em *Glycine max* percebe-se aumento do crescimento da raiz (LOPEZ-MORENO *et al.*, 2010a), em *Zea mays* nota-se aumento das raízes (LOPEZ-MORENO *et al.*, 2010b).

A interação entre NPs e *A. cepa* também é observadas nos estudos de Kumari *et al.* (2009), utilizando NPs de prata verificaram um padrão dose-respostas para as concentrações de 0,025; 0,5; 0,075 e 0,1 mg/mL, com diminuição do índice mitótico, e com a presença de AC, indicando o efeito citotóxico e genotóxico desta NP. Em outro trabalho, Pakrashi *et al.* (2014), utilizando NPTiO₂ verificaram resultados semelhantes, com diminuição do IM em padrão dose-dependente, fato que indica que o toxicante testado afeta o crescimento e o desenvolvimento do organismo, e aumento de AC, concluindo que estas NPs são capazes de induzir toxicidade nos sistemas vegetais mesmo em baixas concentrações, devido a sua internalização e indução de estresse oxidativo.

2.6. Alterações morfológicas em vegetais superiores

Alterações morfológicas foram observadas em *Genipa americana*, em região de chuva ácida. Foram observadas nas folhas desse vegetal: necrose pontuais, colapso das células do mesófilo e epiderme, hipertrofia parenquimática e ainda plasmólise das células guardas. Estas observações demonstram para a importância das análises anatômicas na avaliação de danos ao vegetal (SANT'ANNA-SANTOS *et al.*, 2006)

Plantas *Commelina benghalensis* expostas ao glifosato foi observado danos morfológicos associados aos tricomas e as células epidérmicas próximas aos estômatos, sendo verificada ainda perda de turgescência, ruptura da cutícula (SANTOS, *et al.*, 2015).

Corpos de óleo são pequenos corpos intracelulares, que tem função protetora nos vegetais. Segundo Zhao *et al.*, (2016) e Karkani *et al.*, (2013) o aumento no número destas estruturas pode indicar um mecanismo de proteção da célula. Logo, o aumento de corpos de óleo observado na análise morfológica realizada neste trabalho pode ser um indicativo da entrada da NPTiO₂ no protoplasto.

Também são observadas alterações morfológicas provocadas por NPs em *A. cepa*, Kumari *et al.*, (2011) observam desintegração da matriz celular e deformação de estruturas em comparação ao CN, como a presença de aglomerados particulados na matriz citoplasmática, provavelmente sendo aglomerados de NPs. O aumento na quantidade de *Oil bodies*, relatada por Zhao *et al.*, (2016) e Karkani *et al.*, (2013) pode representar um mecanismo de proteção da célula, sendo outra alteração morfológica observada.

Em seu trabalho com nanopartículas de óxido de zinco, Kumari *et al.*, (2011) também observaram alterações morfológicas a partir da exposição de *A. cepa* a suspensão de NPs e verificou desintegração da matriz celular e deformação de estruturas em comparação ao CN, como a presença de aglomerados particulados na matriz citoplasmática, provavelmente sendo aglomerados de NPs, podendo ser as alterações morfológicas mais um mecanismo eficiente para demonstrar a real preocupação a periculosidade das NPs.

São evidenciadas alterações na morfologia da folha de *Viburnum tinus*, expostas a águas residuais (BELLOT *et al.*, 2015). Já em um estudo realizado em *Adenium obesum* observam-se características evidentes de apoptose, como diminuição da densidade celular, após a exposição a NPs de prata (FARAH *et al.*, 2016).

Após exposição de milho e repolho à NPs de prata e óxido de zinco foi verificado a existência de alterações anatômicas no desenvolvimento dessas espécies (POKHREL e DUBEY, 2013).

3. OBJETIVOS

Este estudo visou garantir a biodisponibilidade das NPTiO₂ para o sistema-teste de *A. cepa*, permitindo uma avaliação adequada da periculosidade deste nanomaterial quanto a sua capacidade de indução de alterações morfológicas, efeitos citotóxicos e danos no DNA.

Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Padronização da melhor metodologia de exposição das raízes de *A. cepa* a NPTiO₂, sendo utilizados três diferentes métodos de tratamento contínuo: (1) semente em placa de Petri de plástico com papel filtro; (2) semente em placa de Petri de plástico com rede de nylon; (3) bulbo dispostos em recipientes de plástico;
- Avaliação da periculosidade das NPTiO₂ quanto à citotoxicidade (IM), genotoxicidade (AC) e mutagenicidade (MN), por meio de experimento dose-resposta, utilizando a metodologia do teste de *A. cepa* que apresentou melhor resposta quanto a biodisponibilidade das NPTiO₂;
- Avaliações de alterações morfológicas em raízes de *A. cepa* expostas as NPTiO₂ na metodologia que apresentou melhor resposta quanto a biodisponibilidade destas NPs, por meio da análise estrutural e ultra-estrutural.

4. MATERIAL E METODOS

4.1. Material

O agente teste utilizado neste trabalho foram as NPTiO₂, obtidas de Sigma-Aldrich® [*Titanium (IV) oxide nanopowder, 21 nm particle size (TEM), ≥99.5% trace metals basis*], 100% anatase.

O organismo biológico utilizado foi *Allium cepa*, da variedade baia periforme. Foram utilizados sementes deste vegetal obtidas diretamente do fornecedor da marca Feltrin® e também bulbos, da mesma variedade, obtidos de fornecedor confiável.

4.2. Preparo das suspensões teste de NPTiO₂

O teste de padronização da melhor metodologia de exposição das NPTiO₂ a *A. cepa* foi realizado utilizando a concentração de 1 mg/mL. Para a avaliação de alterações morfológicas e genotoxicológicas, um experimento dose-resposta foi realizado com as seguintes concentrações de NPTiO₂: 0,01; 0,1 e 1 mg/mL.

Estas concentrações de NPTiO₂ foram definidas com base no trabalho de Zhu et al. (2010), realizado com *Daphnia magna*, no qual a maior concentração testada foi de 1 mg/mL. A partir da concentração de 1 mg/mL, foram definidas outras duas concentrações teste 10 e 100 vezes menores (0,1 mg/ml e 0,01 mg/ml) que a maior concentração. Outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Citogenética de Peixes e Mutagênese Ambiental, Universidade Federal do Paraná) tem conduzidos experimentos com estas mesmas concentrações, como o estudo de Vicari (2015) utilizando *Hoplias intermedius* em exposição trófica (60 dias) e em contaminação por injeção intraperitoneal (96 horas).

As soluções teste de NPTiO₂ foram preparadas em água ultrapura e sonicadas em lavadora ultrassônica por 30 min, na frequência de 42 Hz, antes da realização de cada experimento com *A. cepa* (Figura 4). As suspensões de NPTiO₂ foram substituídas a cada 24 h, em todas os experimentos realizados para evitar agregação das NPs e garantir a biodisponibilidade das mesmas ao sistema teste.



Figura 3. Suspensões de NPTiO₂ em banho sonicador para evitar agregação.
FONTE: O autor.

4.3. Caracterização da NPTiO₂ e de suas suspensões teste

Para a caracterização do pó de NPTiO₂ foram utilizadas os métodos de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Difração de Raio-X para verificar a estrutura cristalina, Teoria da Adsorção Multimolecular (BET - *Brunauer–Emmett–Teller theory*) para a área de superfície específica; Difusão dinâmica da luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*) para o tamanho médio e índice de Polidispersão; Velocimetria laser (LDV - *Laser Doppler Velocimetry*) e eletroforese para potencial zeta; Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS - *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*) para a química de superfície.

A caracterização das suspensões teste de NPTiO₂ foi feita pela doutoranda Tatiane Klingelfus, sendo realizada pelo aparelho Zetasizer® Nano Series ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) no qual se verificou o tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta. As medidas foram realizadas a 28°C. Para análise de tamanho das partículas e índice de polidispersão utilizou-se cubeta de poliestireno, cada análise durou em média 105 s e foi obtida com um ângulo de detecção de 90° e laser vermelho 633 nm. Para determinar o potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido, realizando em média 12 corridas para cada amostra. Por meio do índice de polidispersão foi possível calcular a % de polidispersão [% Polidispersão (%Pd) = (Pdl) ^{1/2} x 100], para verificar a homogeneidade de tamanhos de partículas presentes na suspensão coloidal, sendo considerada como suspensão homogênea quando %Pd < 20 (MALVERN, 2015).

4.4. Experimentos de padronização da melhor metodologia de exposição das NPTiO₂ AO sistema-teste de *A. cepa*

Foram utilizadas três metodologias de crescimento do meristema apical da raiz de *A. cepa* referente a um tratamento contínuo para a identificação do melhor sistema de exposição de *A. cepa* às NPs, como segue:

- (1) Sementes de *A. cepa* foram submetidas a germinação em placas de Petri de poliestireno forradas com papel filtro (100 sementes/placa), umedecidas pelas soluções testes;
- (2) Sementes de *A. cepa* foram submetidas a germinação em placas de Petri de poliestireno forradas com uma rede de nylon (100 sementes/placa), umedecidas pelas soluções teste;
- (3) Bulbos de *A. cepa* dispostos em tubos de poliestireno foram expostos as soluções teste de forma que a extremidade do vegetal ficasse em contato com as soluções (5 bulbos/tratamento, sendo 1 bulbo por tubo) (Figura 4).



Figura 4. Diferentes formas de exposição das nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂) ao teste *Allium cepa*. (A) Sementes na placa de Petri de poliestireno com papel filtro. (B) Sementes na placa de Petri de poliestireno com rede de nylon. (C) Bulbos imersos em tubo de poliestireno. FONTE: O autor.

Quando as raízes atingiram cerca de 2 cm de comprimento (6 dias), elas foram coletadas e fixadas em álcool ácido-acético (3:1–v/v) por 6 horas em temperatura ambiente. Após este tempo, realizou-se a troca por fixador recém-preparado, para armazenamento das raízes a 4°C, até a sua utilização na confecção das lâminas. Todos os experimentos foram realizados em estufa incubadora BOD, com temperatura constante (25°C) e ausência de luz. Os

tratamentos controles foram realizados em água ultrapura (CN - controle negativo) e em 10 mg/L de metil metanosulfonato (MMS, CAS 66-27-3, Sigma-Aldrich) para o controle positivo (CP). A suspensão teste de NPTiO₂ utilizada nesta etapa de padronização foi a de 1 mg/mL.

4.5. Teste de Aberrações Cromossômicas (AC) e Micronúcleos (MN) em células meristemáticas de *A. cepa*

O teste de AC e MN em células meristemáticas de *A. cepa* foi realizado de acordo Grant (1982) e Leme e Marin-Morales (2008).

As raízes fixadas foram submetidas à coloração em reativo de Schiff (Figura 5). Para o preparo das lâminas, os meristemas foram recobertos com lamínulas e, suavemente, esmagados em uma gota de carmim acético (2%). As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética (Figura 6), para serem, posteriormente, analisadas.



Figura 5. Coloração das raízes de *A. cepa* utilizando reativo de Schiff. **A.** Raízes fixadas; **B.** Remoção do fixador; **C.** Hidrólise ácida; **D.** Interrupção da hidrólise ácida; **E.** Incubação das raízes em reativo de Schiff; **F.** Remoção do excesso de corante.

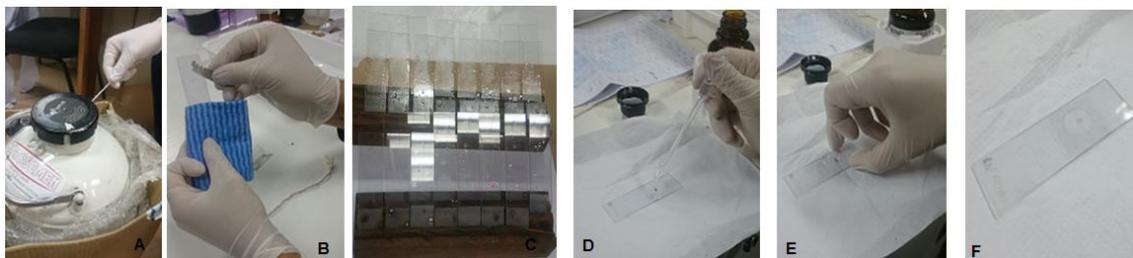


Figura 6. Preparo de lâmina permanente de *A. cepa*. **A.** Lâmina mergulhada em nitrogênio líquido; **B.** Remoção da lamínula provisória; **C.** Lâminas secando *overnight*; **D.** Adição do meio de montagem (Entellan®); **E.** Adição de uma lamínula previamente limpa; **F.** Lâmina permanente. FONTE: O autor.

Para avaliar os danos celulares, 10 lâminas por tratamento foram preparadas. Aproximadamente 500 células por lâmina foram quantificadas, o que totaliza 5000 células por tratamento.

A determinação do número de células em divisão celular foi utilizado para estabelecimento do IM, o qual por sua vez é utilizado como indicativo de citotoxicidade. A genotoxicidade foi determinada pela observação e quantificação de qualquer tipo de AC a anormalidade nuclear nas células meristemáticas de todos os tratamentos. A avaliação dos efeitos mutagênicos se deu pela contagem de células micronucleadas.

4.6. Análise estatística referente aos dados dos experimentos de padronização em *A. cepa*

Para análise estatística inicialmente foi realizado um teste de normalidade segundo Shapiro-Will, averiguando se os dados deveriam ser analisados com testes paramétricos ou não paramétricos. Ao comparar o tratamento de NP com o CN, para avaliar o efeito da NP, foi realizado teste de Mann-Whitney. O nível de significância estabelecido foi com $p < 0,05$.

Para comparar as metodologias de exposição, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Will e aplicado na sequência o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Student. O nível de significância estabelecido foi com $p < 0,05$.

4.7. Avaliação da periculosidade de NPTiO₂ utilizando o sistema teste de *A. cepa*

A investigação sobre o potencial de indução de danos no DNA (análise genotoxicológica) e celulares (análise morfológica) das NPTiO₂ foi conduzida utilizando o protocolo com sementes de *A. cepa* dispostas em placas de Petri forradas com rede de nylon com base nos resultados obtidos na etapa inicial de padronização da melhor metodologia de exposição do teste de *A. cepa*.

Como mencionado acima, os experimentos de avaliação da periculosidade das NPTiO₂ foram realizados com três suspensões destas NPs, como segue: 0,01; 0,1 e 1 mg/mL. As mesmas condições de ensaio anteriormente descritas no item 4.4 desta sessão foram seguidas para esta avaliação.

4.7.1. Avaliação genotoxicológica

O teste de AC e MN em células meristemáticas de *A. cepa* assim como o descrito no item 4.5. desta sessão.

Além dos parâmetros avaliados anteriormente (IM, AC e MN), também foi verificado o modo de ação da NP. Esta avaliação é determinada a partir da quantificação da frequência de cada tipo de AC. Consideram-se como alterações aneugênicas pontes e quebras, sendo as demais (perda, atraso, aderência, broto) classificadas como clastogênicas. Então, somam-se as frequências das AC aneugênicas e das AC clastogênicas, e a partir do maior valor determina-se o modo de ação da substância.

4.7.1.1. Análise estatística referente aos dados da avaliação genotoxicológica

Para análise estatística inicialmente foi realizado um teste de normalidade segundo Shapiro-Will, averiguando se os dados deveriam ser analisados com testes paramétricos ou não paramétricos. A partir da caracterização dos dados como não paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para comparar o CN com os três tratamentos de NPs, seguido de pós teste Student. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

4.7.2. Avaliação de alterações morfológicas

Amostras do ápice radicular de *A. cepa* foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965). Para melhor penetração da solução fixadora, as amostras foram colocadas em dessecador, sendo o ar retirado com bomba de vácuo (0,1 mm Hg) por 20 min. Parte delas foram destinadas para análise em microscopia de luz (ML) e outra parte para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET).

4.7.2.1. Análise em microscopia de luz (ML)

Para análise em ML, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídas em resina acrílica tipo metacrilato. Cortes longitudinais com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo manual Reichert, corados em azul de toluidina pH=4,0 (O'Brien & McCully, 1981) e montados em lâmina e lamínula, utilizando como meio de montagem o Entellan®. Após observação, foi realizada documentação fotográfica, utilizando microscópio de luz (modelo Zeiss Axioskop 2) com câmera digital acoplada (modelo MRC3).

4.7.2.2. Análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para análise em MET, as amostras foram retiradas da solução de Karnovsky, lavadas por três sessões (10 minutos cada) em tampão cacodilato a 0,05 M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por uma hora. Em seguida, contrastadas em acetato de uranila a 0,5% (pernoite), desidratadas em acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídas em resina (SPURR), permanecendo em estufa a 60 °C por período de 2 dias. Após obtenção dos blocos (material polimerizado), foram realizados cortes ultrafinos (70 nm de espessura), que foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), sendo observados ao microscópio eletrônico de transmissão.

ARTIGO 01**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS VISANDO GARANTIR A BIODISPONIBILIDADE DAS NPTIO₂ AO SISTEMA TESTE *Allium cepa*.**

FILHO, R.D.S.¹; VICARI, T. ¹; FELISBINO, K. ¹; CESTARI, M.M.¹; LEME, D.M.^{1*}

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR Brasil

*Autor de correspondência: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciência Biológica - Departamento de Genética. Rua Francisco H. dos Santos, s/n, Jardim das América, 81531-990, Curitiba/PR-Brasil. Tel.: +55 41 3361-1740. E-mail: danielamoraisleme@gmail.com ou daniela.leme@ufpr.br

RESUMO

O aumento do uso de nanopartículas (NPs) em produtos comercializados pode levar a sua liberação no meio ambiente, e os seus efeitos para o ecossistema são motivo de preocupação. A apuração precisa da toxicidade das NPs depende da sua biodisponibilidade ao sistema-teste, que pode ser afetada, entre outros motivos, pela agregação das NPs aos materiais usados durante o experimento, resultando em resultados falsos negativos. Este estudo compara diferentes protocolos do teste de *A. cepa*, objetivando minimizar os problemas de biodisponibilidade das NPs e evitar interferências na sua avaliação genotoxicológica. *A. cepa* foi exposto a água ultrapura como controle negativo, a metil metano-sulfonato 10 mg/L como controle positivo e a NPTiO₂ 1 mg/mL em três metodologias de exposição: Sementes germinando em placas de Petri de poliestireno (1) cobertas com papel filtro; (2) cobertas com rede de nylon; (3) bulbos dispostos em recipientes de poliestireno. A suspensão de NPTiO₂ era substituída diariamente. As raízes foram fixadas e analisadas ao microscópio. Aumentos significativos de IM, AC e MN foram observados nas metodologias com sementes. Resultados similares foram obtidos em bulbos, exceto para IM que não apresentou diferença significativa. A comparação entre estes protocolos do teste *A. cepa* mostra que não há diferença entre as metodologias com semente, entretanto há diferença quando comparado ao protocolo com bulbos. Isto se deve ao fato da sensibilidade das sementes ser maior que dos bulbos. Apesar disso, todos os protocolos do teste de *A. cepa* são capazes de detectar efeitos genotoxicológicos das NPTiO₂, indicando a capacidade desta substância em induzir efeitos deletérios aos organismos, embora os protocolos com sementes sejam mais eficazes na detecção de efeitos genotoxicológicos e o uso da rede de nylon contribua para a garantia da biodisponibilidade das NPTiO₂ ao sistema-teste.

PALAVRAS CHAVE: padronização, genotoxicidade, mutagenicidade, rede de nylon, bulbos, sementes.

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas (NPs) são definidas como partículas que possuem dimensão entre 1 e até 100 nanômetros que apresentam singularidade em propriedades físico-químicas, tais como grande área de superfície e grande capacidade de penetração, sendo potencialmente atrativas para indústria, (BHARALI, SIDDIQUI e ADHAMI, 2011), além disso apresentam diversas vantagens terapêuticas, como a capacidade de atravessar barreiras biológicas (KIM, *et al.*, 2006), potencializar o sistema imunológico, aumentar a duração da presença de antígenos e os proteger contra degradações enzimáticas (LIU, *et al.*, 2016) e ainda como marcadores, direcionando aonde quimioterápicos devem agir (ROSENBERGER, *et al.*, 2015). Desta forma, as NPs estão presentes em nosso cotidiano nos mais diversos produtos, em especial, as nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂), as quais são encontradas em cosméticos, embalagens, tintas e na indústria têxtil (LI, *et al.*, 2015).

Apesar das vantagens no seu uso, as NPs podem representar um perigo para o ecossistema, uma vez que ainda não foram elucidados totalmente seus efeitos sobre os seres vivos e o ambiente (BHARALI, SIDDIQUI e ADHAMI, 2011), embora sua periculosidade já seja relatada por autores, como Kumari, *et al.*, (2009) que observam efeitos citotóxicos e genotóxicos em *A. cepa* nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1 mg/mL.

O comportamento das NPs é influenciado pelo potencial zeta, que é um índice que reflete a intensidade da força de repulsão entre as partículas e a estabilidade da dispersão (LIUFU, XIAO e LI, 2005). A natureza dinâmica das NPs é motivo de estudo, pois o comportamento de aglomeração é relevante para estudo de seus efeitos toxicológicos, uma vez que a aglomeração afeta a biodisponibilidade e a toxicidade das NPs (NUR, LEAD e BAALOUSHA, 2015).

Tendo em vista ainda o potencial de agregação das NPs, para avaliar uma possível absorção da solução pelo papel filtro, buscamos padronizar a melhor metodologia para realização do teste, utilizando tanto bulbo como sementes em papel filtro ou rede de nylon.

Todos estes fatores dificultam a avaliação do real efeito das NPs. Assegurar a biodisponibilidade da NP ao sistema-teste é fundamental para a

correta avaliação da periculosidade da NP. Estando biodisponível as NPs podem se internalizar na célula, e isto é importante para garantir que os estudos sobre essas substâncias representem o real efeito que elas causam no ambiente e nos seres vivos, uma vez que a avaliação de sua genotoxicidade depende deste processo, para avaliar corretamente seus efeitos em diferentes concentrações (PAKRASHI, *et al.*, 2014).

O objetivo deste estudo é comparar diferentes metodologias de exposição das NPTiO₂ para garantir sua biodisponibilidade ao sistema teste, permitindo uma elucidação do real efeito das NPs.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Sementes e bulbos de *A. cepa* (2n=16 cromossomos) do mesmo lote (marca Feltrin[®]) e cultivar (Baia Periforme) foram utilizadas como organismo teste, pois apresentam homogeneidade genética e fisiológica e estão disponíveis por ao longo de todo período do ano.

As NPTiO₂ foram adquiridas da Sigma-Aldrich[®] (*Titanium (IV) oxide nanopowder, 21 nm particle size (TEM), ≥99.5% trace metals basis, 100% anatase*).

2.2. Preparo da suspensão teste de NPTiO₂

A comparação dos diferentes protocolos de *A. cepa* foi realizado com a NPTiO₂ a 1 mg/mL. Esta concentração foi baseada no trabalho de Zhu et al. (2010), que demonstrou efeito tóxico para as NPTiO₂ em *Daphnia magna* na concentração de 1 mg/mL (máxima testada). A escolha da concentração teste também se baseou em estudos prévios de nosso grupo (Laboratório de Citogenética de Peixes e Mutagênese Ambiental, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR/Brasil), os quais tem demonstrado efeitos deletérios das NPTiO₂, nesta mesma concentração, em peixes neotropicais (dados não publicados).

A suspensão teste de NPTiO₂ (1 mg/mL) foi preparada em água ultrapura e sonicada em lavadora ultrassônica por 30 min, na frequência de 42 Hz, antes da realização de cada experimento com *A. cepa*. Realizou-se a troca das suspensões de NPTiO₂ a cada 24 h, a fim também de evitar agregação das NPs em estudo.

2.3. Caracterização das NPTiO₂

Para a caracterização do pó de NPTiO₂ foram utilizadas os métodos de Difração de Raio-X para verificar a estrutura cristalina; Teoria da Adsorção Multimolecular (BET - *Brunauer–Emmett–Teller theory*) para a área de superfície específica; Velocimetria laser (LDV - *Laser Doppler Velocimetry*) e eletroforese para potencial zeta; Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS - *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*) para a química de superfície.

A caracterização da suspensão teste de NPTiO₂ (1 mg/mL) foi realizada pelo aparelho Zetasizer[®] Nano Series ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), no qual se verificou o tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta. As medidas foram realizadas a 28°C. Para análise de tamanho das partículas e índice de polidispersão utilizou-se cubeta de poliestireno, cada análise durou em média 105 s e foi obtida com um ângulo de detecção de 90° e laser vermelho 633 nm. Para determinar o potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido, realizando em média 12 corridas para cada amostra. Por meio do índice de polidispersão foi possível calcular a % de polidispersão [% Polidispersão (%Pd) = (Pdl)^{1/2} x 100], para verificar a homogeneidade de tamanhos de partículas presentes na suspensão coloidal, sendo considerada como suspensão homogênea quando %Pd < 20 (MALVERN, 2015).

2.4. Bioensaios com *A. cepa*

As NPs apresentam capacidade de agregação e aderência a diversos materiais (RABOLLI, *et al.*, 2011), isto fez com que ao invés de utilizarmos placas de Petri de vidro, estas fossem substituídas por placas de Petri de plástico em Poliestireno, substituídas diariamente, já que o uso de plástico descartável evita esse tipo de problema (HANDY, *et al.*, 2012).

Foram utilizadas três metodologias de crescimento do meristema apical da raiz de *A. cepa* referente a um tratamento contínuo para a identificação do melhor sistema de exposição de *A. cepa* às NPTiO₂, como segue:

- (1) Sementes de *A. cepa* foram submetidas a germinação em placas de Petri de poliestireno forradas com papel filtro (100 sementes/placa), umedecidas pelas soluções testes;
- (2) Sementes de *A. cepa* foram submetidas a germinação em placas de Petri de poliestireno forradas com uma rede de nylon (100 sementes/placa), umedecidas pelas soluções teste;
- (3) Bulbos de *A. cepa* dispostos em tubos de poliestireno foram expostos as soluções teste de forma que a extremidade do vegetal ficasse em contato com as soluções (5 bulbos/tratamento, sendo 1 bulbo por tubo) (Figura 1).



Figura 1. Diferentes formas de exposição das nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂) ao teste *Allium cepa*. (A) Sementes na placa de Petri de poliestireno com papel filtro. (B) Sementes na placa de Petri de poliestireno com rede de nylon. (C) Bulbos imersos em tubo de poliestireno. FONTE: O autor.

Quando as raízes atingiram cerca de 2 cm de comprimento (6 dias), elas foram coletadas e fixadas em álcool ácido-acético (3:1–v/v) por 6 h em temperatura ambiente. Após este tempo, realizou-se a troca por fixador recém-preparado, para armazenamento das raízes a 4°C, até a sua utilização na confecção das lâminas.

Todos os experimentos foram realizados com controle de temperatura (25°C) e ausência de luz. Os tratamentos controles foram realizados em água ultrapura (CN - controle negativo) e em 10 mg/L de metil metanosulfonato (MMS, CAS 66-27-3, Sigma-Aldrich) para o controle positivo (CP). Como acima mencionado, a suspensão teste de NPTiO₂ utilizada foi de 1 mg/mL.

2.5. Teste de Aberrações Cromossômicas (AC) e Micronúcleos (MN) em células meristemáticas de *A. cepa*

O teste de AC e MN em células meristemáticas de *A. cepa* foi realizado de acordo Grant (1982) e Leme; Marin-Morales (2008).

As raízes fixadas foram submetidas à coloração em reativo de Schiff. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram recobertos com lamínulas e, suavemente, esmagados em uma gota de carmim acético (2%). As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética, para serem, posteriormente, analisadas.

Para avaliar os danos celulares, 10 lâminas por tratamento foram preparadas. Aproximadamente 500 células por lâmina foram quantificadas, o que totaliza 5000 células por tratamento.

A determinação do número de células em divisão celular foi utilizado para estabelecimento do IM, o qual por sua vez é utilizado como indicativo de citotoxicidade. A genotoxicidade foi determinada pela observação e quantificação de qualquer tipo de AC a anormalidade nuclear nas células meristemáticas de todos os tratamentos. A avaliação dos efeitos mutagênicos se deu pela contagem de células micronucleadas.

2.6. Análise estatística

Para análise estatística inicialmente foi realizado um teste de normalidade segundo Shapiro-Wilk, averiguando se os dados deveriam ser analisados com testes paramétricos ou não paramétricos. Ao comparar o tratamento de NP com o CN, em cada metodologia, para avaliar o efeito da NP, foi realizado teste de Mann-Whitney. O nível de significância estabelecido foi com 5%.

Para comparar as metodologias de exposição, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e aplicado na sequência o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Student-Newman-Keuls. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos métodos de TEM e de Difração de Raio-X foi possível confirmar que o pó de NPTiO_2 utilizado possui em sua composição 100% da forma cristalina anatase. Segundo Clement, Hurel e Marmier (2013) a forma anatase é caracterizada por ser mais tóxica que a forma rutilo. Isto se deve ao fato de na forma de anatase os cristais estarem mais individualizados e apresentarem menor agregação.

A NPTiO_2 de 1 mg/mL potencial zeta em -4.92 mV e o percentual de polidispersão foi de 57,27% e a distribuição do tamanho desta NP está representado na Figura 2.

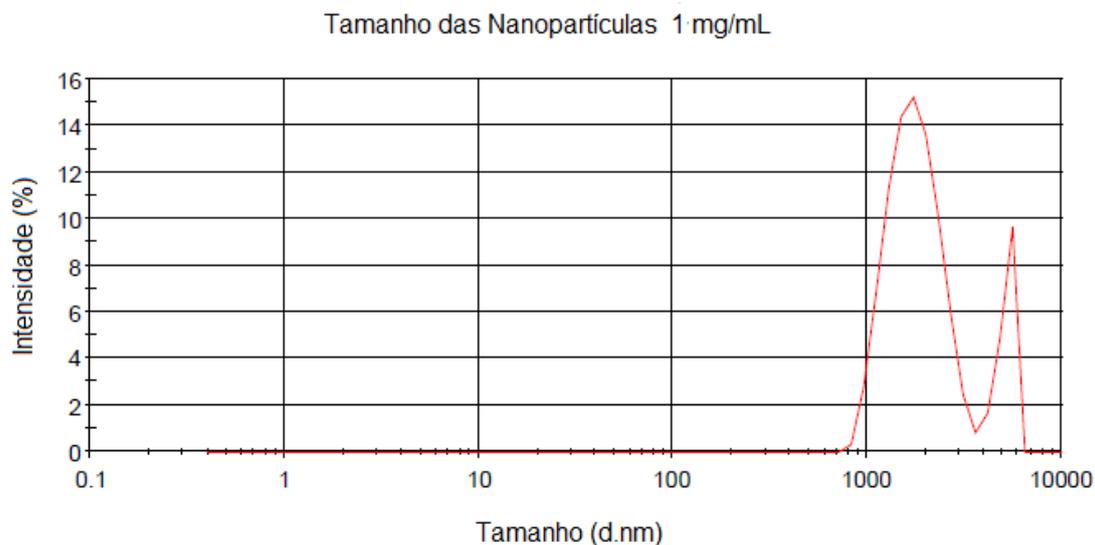


FIGURA 2 – Distribuição do tamanho da NP por intensidade.

A magnitude do potencial zeta fornece uma indicação das condições de estabilidade do sistema. Se todas as partículas apresentam um potencial zeta suficientemente elevado, ou seja, $+30 \text{ mV} < \zeta < -30 \text{ mV}$, elas vão se repelir, garantindo a estabilidade da dispersão. Se as partículas possuem valor de potencial zeta baixo, ou seja, $+30 \text{ mV} > \zeta > -30 \text{ mV}$, então não haverá forças suficientes para evitar que as partículas se aproximem, estando sujeitas à floculação, ocorrendo instabilidade na dispersão (MALVERN, 2015). Todas as suspensões apresentaram valores de potencial zeta negativos, e instáveis, $0 > \zeta > -30 \text{ mV}$.

Apesar do tamanho superior a 100nm, Kumari *et al.* 2011 também observam efeitos genotóxicos em estudo realizado com nanopartículas de oxido de zinco, resultado que é confirmado pela análise em *TEM*, onde é visualizada a internalização da NP na célula.

A tabela 1 apresenta os resultados referentes a avaliação de diferentes parâmetros nos diferentes protocolos do teste de *A. cepa*, objetivando identificar aquele que não interfira na biodisponibilidade das NPs.

Tabela 1. Resultados de Índice Mitótico, Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a nanopartículas de dióxido de titânio por três diferentes protocolos de exposição.

Protocolos de exposição	Tratamento	IM		AC		MN	
		%	X ± S	%	X ± S	%	X ± S
Sementes em placas de Petri de plástico com papel filtro	CN	49,96	249,8 ±2,34	0,12	0,59 ±0,51	0,32	1,59 ±0,83
	MMS	45,44	227,2 ±2,66*	1,75	8,73 ±1,92*	5,94	29,7 ±3,15*
	NPTiO ₂ 1 mg/mL	47,44	237,2 ±1,78*	1,07	5,36 ±0,95*	1,11	5,56 ±1,07*
Sementes em placas de Petri de plástico com rede de nylon	CN	49,80	248,9 ±3,07	0,12	0,59 ±0,51	0,28	1,39 ±0,69
	MMS	45,01	225,1 ±2,44*	1,41	7,06 ±1,19*	5,79	28,9 ±2,46*
	NPTiO ₂ 1 mg/mL	47,39	236,9 ±1,02*	1,00	4,98 ±0,94*	1,00	4,98 ±1,05*
Bulbo em tubos plásticos	CN	44,00	219,9 ±8,50	0,08	0,39 ±0,51	0,35	1,76 ±0,78
	MMS	41,74	208,7 ±2,11*	0,77	3,86 ±0,99*	5,21	26,1 ±6,87*
	NPTiO ₂ 1 mg/mL	43,61	218,1 ±2,74	0,54	2,68 ±0,66*	0,85	4,27 ±0,67*

5000 células analisadas por tratamento.

IM: índice mitótico; AC: aberrações cromossômicas; MN: micronúcleo; X: média, S: desvio padrão; CN: controle negativo (água ultrapura); MMS: metil metano-sulfonato 10 mg/L (controle positivo); NPTiO₂: nanopartícula de dióxido de titânio

*Diferente significativamente do controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com teste Mann-Whitney.

Houve diferença significativa praticamente em todos os parâmetros ao comparar o CN com o tratamento com NPTiO₂, com exceção do IM no bulbo. Isto sugere que não há retenção das NPs em nenhum dos materiais utilizados neste trabalho, como placas de poliestireno, papel filtro, rede de nylon e tubos de poliestireno, considerando todos os sistemas válidos para avaliação genotoxicológica das NPs. Esses dados apontam para uma periculosidade das NPTiO₂, o que se confirma nos estudos de Ghosh, Bandyopadhyay e Mukherjee (2010) e de Pakrashi et al., (2014) também realizados com a NPTiO₂.

Os dados da Tabela 2 representam um comparativo entre as diferentes metodologias utilizadas neste experimento.

Tabela 2. Comparativo do valor de p entre as diferentes metodologias do teste *A. cepa*.

Tratamentos	Comparativo entre protocolos de exposição	IM	AC	MN
CN	Filtro e Rede	0,6294	0,4399	0,3116
	Filtro e Bulbo	0,0001*	0,1537	0,4251
	Rede e Bulbo	0,0004*	0,1365	0,4699
MMS	Filtro e Rede	0,2228	0,0140*	0,5337
	Filtro e Bulbo	0,0001*	0,0010*	0,0170*
	Rede e Bulbo	0,0014*	0,0010*	0,0775
NPTiO ₂ 1 mg/mL	Filtro e Rede	0,8192	0,6475	0,6294
	Filtro e Bulbo	0,0001*	0,0001*	0,0103*
	Rede e Bulbo	0,0002*	0,0003*	0,0373*

5000 células analisadas por tratamento. Valor de p.

*Diferença significativa a $p < 0,05$, de acordo com teste ANOVA ou Kruskal-Wallis.

Legenda: CN = Controle Negativo (Água Ultrapura), MMS = Metil Metano Sulfonato 10 mg/L, NPTiO₂ = Nanopartícula de dióxido de titânio, IM = Índice mitótico, AC = Aberrações cromossômicas, MN = micronúcleos. M+DP = média + desvio padrão.

Ao comparar os três parâmetros em relação as NPTiO₂ observa-se que não existe diferença significativa entre as metodologias envolvendo papel filtro e rede, o que sugere que não há interferência ocasionada por absorção da NPTiO₂ pelo papel filtro no período de 24 h, uma vez que as soluções são substituídas diariamente. Entretanto, ao comparar estas duas metodologias com o bulbo verifica-se uma diferença significativa. Os resultados de Klancnik *et al.*, 2010 corroboram com esta observação, trabalhando com NPTiO₂ na concentração de 1 mg/mL, observaram valores bem inferiores aos aqui observados com sementes, se assemelhando mais ao valores de bulbo, em especial para AC, observando uma frequência de 0,31% de pontes, próximas dos 0,54% encontrados neste trabalho para bulbo, mas inferiores aos 1% encontrados nas metodologias com semente. Isto sugere uma menor sensibilidade do bulbo na exposição as NPTiO₂ se comparados as sementes (KLANCNIK, *et al.*, 2010).

A partir dos resultados obtidos, descartou-se a utilização do bulbo na padronização da metodologia. Com os resultados de papel filtro e rede de nylon sendo bastante semelhantes estatisticamente, optou-se pela padronização com a rede de nylon com a finalidade de assegurar a

biodisponibilidade das nanopartículas ao organismo-teste, uma vez que o uso da rede não permite que a adesão das NPs a ela, enquanto que no papel filtro isto é possível.

4. CONCLUSÃO

Os métodos de exposição das NPs utilizados neste trabalho mostraram-se eficientes, uma vez que foram observados efeitos genotoxicológicos em todos eles. O uso de materiais plásticos de poliestireno substituídos diariamente evitou problemas de biodisponibilidade, pois não permitiu que as NPs se aderissem a ele. Não houve diferença significativa entre as metodologias que utilizaram sementes, entretanto ao comparar estas com a metodologia de bulbo, houve diferença significativa, com as sementes apresentando maior sensibilidade a exposição das NPTiO₂. Todos estes fatores foram considerados para definir a metodologia ideal, que foi o modo de exposição utilizando sementes dispostas em placas de Petri de poliestireno com rede de nylon, pois apesar de o papel filtro não ter interferido na biodisponibilidade, sugerimos o uso da rede de nylon para evitar qualquer possibilidade de retenção das NPs e interferência nos resultados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) pela concessão da bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e Fundação Araucária (Brasil) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

BHARALI, D.J; SIDDIQUI, I.A; ADHAMI, V.M. **Nanoparticle Delivery of Natural Products in the Prevention and Treatment of Cancers: Current Status and Future Prospects.** *Cancers*, v. 3, n. 4, p. 4024-4045, 2011.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. **Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes.** *Chemosphere*, vol. 81, p. 1253-1262, 2010.

GRANT, W.F, **Chromosome aberration assays in *Allium***, Mutat. Res, vol. 99 p. 273-291, 1982.

HANDY, R.D.; BRINK, N.V.D.; CHAPPELL, M.; MUHLING, M.; BEHRA, R.; DUSINSKA, M.; SIMPSON, P.; AHTIAINEN, J.; JHA, A.N.; SEITER, J.; BEDNAR, A.; KENNEDY, A.; FERNANDES, T.F.; RIEDIKER, M. **Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far?** Ecotoxicology, vol.21, p. 933-972, 2012.

KIM, J.H.; KIM, J.H.; PARK, J.A.; LEE, S.W.; KIM, W.J.; YU, Y.S.; KIM, K.W. **Blood-neural barrier: Intercellular communication at glio-vascular interface.** J. Biochem. Mol. Biol., vol. 39, p. 339-345, 2006.

KLANCNIK, K.; DROBNE, D.; VALANT, J.; KOCE, J.D. **Use of a modified *Allium* test with nano TiO₂.** Ecotoxicology and Environmental Safety, vol.74, p.85-92, 2010.

KUMARI, M.; KHAN, S.S.; PAKRASHI, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. **Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*.** Journal of Hazardous Materials, v. 190, p. 613-621, 2011.

LI, Z.; ZHU, Y.; WANG, J.; GUO, Q.; LI, J. **Size-controlled synthesis of dispersed equiaxed amorphous TiO₂ nanoparticles.** Ceramics International, vol. 41, p. 9057-9062, 2015.

LIU, L.; MA, P.; WANG, H.; ZHANG, C.; SUN, H.; WANG, C.; SONG, C.; LENG, X.; KONG, D.; MA, G. **Immune responses to vaccines delivered by encapsulation into and or adsorption onto cationic lipid-PLGA hybrid nanoparticles.** Journal of Controlled Release, vol. 225, p.230-239, 2016.

LIUFU, S.C.; XIAO, H.N.; LI, Y.P. **Adsorption of poly onto the surface of titanium dioxide and the colloidal stability of aqueous suspension.** J. Colloid Interface Sci., vol. 281, p. 155-163, 2005.

NUR, Y.; LEAD, J.R.; BAALOUSHA, M. **Evaluation of charge and agglomeration behavior of TiO₂ nanoparticles in ecotoxicological media.** Science of the Total Environment, vol. 535, p. 45-53, 2015.

PAKRASHI, S.; JAIN, N.; DALAI, S.; JAYAKUMAR, J.; CHANDRASEKARAN, P.T. **In Vivo Genotoxicity Assessment of Titanium Dioxide Nanoparticles by *Allium cepa* Root Tip Assay at High Exposure Concentrations.** PLoS ONE 9(2): e87789. doi:10.1371/journal.pone.0087789, 2014.

RABOLLI, V.; THOMASSEN, L.C.J.; UWAMBAYINEMA, F.; MARTENS, J.A. **The cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles is mainly influenced by surface area and not by aggregation.** Toxicology Letters, vol. 206, p. 197-203, 2011.

ROSENBERGER, I.; STRAUSS, A.; DOBIASCH, S.; WEIS, C.; SZANYI, S.; ICETA, L.; ALONSO, E.; ESPARZA, M.G.; VALLEJO, V.G.; SZCZUPAK, B.; GARCIA, S.P.; MIRZAEI, S.; ISRAEL, L.L.; BIANCHETTI, S.; SCANZIANI, E.; LELLOUCHE, J.P.; KNOLL, P.; WERNER, J.; FELIX, K.; GRENACHER, L.; REESE, T. **Targeted diagnostic magnetic nanoparticles for medicinal imaging of pancreatic cancer.** *Journal of Controlled Release*, vol. 214, p. 76-84, 2015.

ARTIGO 02**EFEITOS CITO- E GENOTÓXICOS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS
INDUZIDAS POR NANOPARTÍCULAS DE DIOXIDO DE TITANIO EM RAÍZES
DE *ALLIUM CEPA***

FILHO, R.D.S.¹; VICARI, T.¹; FELISBINO, K.¹; CESTARI, M.M.¹; SANT'ANNA-
SANTOS, B.F..²; SANTOS, S.A.³; LEME, D.M.^{1*}

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR),
Curitiba-PR Brasil

² Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-
PR Brasil

³ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal do Viçosa (UFV),
Viçosa-MG Brasil

*Autor de correspondência: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciência
Biológica - Departamento de Genética. Rua Francisco H. dos Santos, s/n,
Jardim das América, 81531-990, Curitiba/PR-Brasil. Tel.: +55 41 3361-1740. E-
mail: danielamoraisleme@gmail.com ou daniela.leme@ufpr.br

RESUMO

A preocupação com os impactos antrópicos causados ao ambiente e aos seres vivos faz necessário estudos toxicológicos de diferentes xenobióticos. As nanopartículas (NPs) tem sido amplamente utilizadas sem um real conhecimento dos seus efeitos nocivos devido à alta instabilidade de suas propriedades físico-químicas e uma incerteza quanto a sua biodisponibilidade aos sistemas-teste biológicos. As plantas são importantes modelos biológicos para compreender impactos ambientais. Frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de indução de danos no DNA e alterações morfológicas de NPs de dióxido de titânio (NPTiO₂) por meio do sistema teste de *Allium cepa* a partir de uma metodologia que assegure a biodisponibilidade destas NPs para o sistema-teste. Foram evidenciadas redução do Índice Mitótico (IM) e aumento nas frequências de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleo (MN) nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas as NPTiO₂ de maneira concentração-dependente. Estes resultados mostram a periculosidade das NPTiO₂ quanto a sua ação citotóxica e a capacidade de indução de danos, por um modo de ação clastogênico, em sistemas vegetais. Além disso, a análise morfológica evidenciou uma maior condensação da cromatina, um aumento no número de vacúolos, sendo estes mais volumosos que o controle negativo e uma grande quantidade de corpos de óleos com localização adjacente a membrana plasmática. Tais resultados apontam para um mecanismo de defesa celular contra a entrada das NPs na tentativa de minimizar os efeitos deletérios por elas causados. A avaliação genotoxicológica e morfológica realizada neste trabalho, nos permite concluir que as NPTiO₂ causam efeitos adversos nos organismos.

Palavras-chave: contaminantes emergentes; nanopartículas; fitotoxicidade; danos celulares; danos no DNA.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial e a eliminação inadequada de resíduos liberam os mais diversos tipos contaminantes e toxinas causadoras de efeitos prejudiciais ao ambiente e aos organismos (JHANSI, CAMPUS e MISHRA, 2013; ZHANG *et al.*, 2014; TOPUZ *et al.*, 2015; JAYAPRAKASH *et al.*, 2015). Dentre estes, destacam-se os metais, já reconhecidos e legislados (JAYAPRAKASH *et al.*, 2015; SALLEM, IBQAL e SHAH, 2015), além de contaminantes para os quais ainda não foram estabelecidos valores limites de aceitação em corpos d'água, que são atualmente denominados de contaminantes emergentes, e que podem conferir um perigo, real ou suspeito, a saúde dos organismos vivos (JONES E GRAVES, 2010). Dentre os contaminantes emergentes atuais, temos diversos nanomateriais, incluindo as NPs (COLEMAN *et al.*, 2014; CANESI, CIACCI, BALBI, 2015; OKUPNIK, JARA e PFLUGMACHER, 2015)

Atualmente, há uma grande preocupação com as NPs, substâncias que apresentam propriedades físico-químicas bastante particulares, como grande área de absorção. Apesar de serem bastante atrativas para indústria e medicina, ainda falta uma total elucidação quanto aos efeitos deletérios das NPs para o ambiente e seres vivos (BHARALI, SIDDIQUI e ADHAMI, 2011).

Em especial, as NPTiO₂ tem atraído bastante interesse em diversas áreas por apresentar diversas aplicações em diferentes setores de indústria, por exemplo, nas indústrias alimentar, cosmética, de papel, farmacêutica, de tintas, de plásticos e têxtil, além de apresentar potencial em aplicações na eletrônica e genômica, devido as suas propriedades físico-químicas (WENSUN, DUA e BOYANG, 2009).

Nos últimos anos, houve progresso notável no desenvolvido da nanotecnologia, com grande aplicação comercial, no desenvolvimento de uma grande variedade de NPs manufaturadas. Isto gera uma preocupação de como este material irá impactar o meio ambiente, uma vez que existem muitas lacunas sobre a ecotoxicidade das NPs (MONICA e CREMONINI, 2009).

A fitotoxicidade avalia a ação tóxica que uma substância provoca nos vegetais. Considerando que as plantas são componentes básicos de todos os

ecossistemas e participam da cadeia alimentar (MA *et al.*, 2010), elas são comumente utilizadas como um organismo indicador para estudos toxicológicos, inclusive com NPs, pois desempenham um papel fundamental no seu destino e transporte no meio ambiente, uma vez que podem ser absorvidas pelas plantas e se bioacumularem, além disso, os vegetais apresentam uma variedade de mecanismos genéticos bem definidos (MONICA e CREMONINI, 2009), conforme descrito para *A. cepa* (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

O teste do *A. cepa* é um sistema teste vegetal eficiente, que apresenta alta correlação com os sistemas teste de mamíferos, permitindo a extrapolação dos resultados e que permite a avaliação de diferentes *endpoints*, como AC e MN, referindo-se respectivamente a genotoxicidade e mutagenicidade (LEME e MARIN-MORALES, 2009), IM sendo indicador de citotoxicidade (KLANCNIK *et al.*, 2010) e alterações morfológicas (KUMARI *et al.*, 2011), permitindo avaliar a periculosidade das NPTiO₂. Além disso, este sistema teste apresenta outras vantagens, como baixo custo, fácil manuseio, e, principalmente, por apresentar bons parâmetros cromossômicos, com a presença de cromossomos grandes e em número reduzido (2n=16) (FISKESJO, 1985).

Alguns trabalhos (LIN e XING, 2007; CLEMENT, HUREL e MARMIER, 2013; ARRUDA, *et al.*, 2015) já mostram a ação tóxica das nanopartículas sobre os vegetais. Apesar disso, o estudo de Navarro *et al.*, (2008) enfatiza que a compreensão do mecanismo de toxicidade das nanopartículas manufaturadas e os seus efeitos no organismo e nas cadeias alimentares, afetando os ecossistemas são limitados, pois existem poucos estudos a respeito da fitotoxicidade das NPs.

Diante disso, se faz necessário a realização de mais estudos para avaliação da periculosidade das NPTiO₂, uma vez que apesar de seu grande uso comercial, seus efeitos deletérios ainda não foram completamente elucidados. Neste contexto, este estudo objetivou por meio do teste de *A. cepa* avaliar o efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico, além de alterações morfológicas provocadas por estas NPs nas concentrações de 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL e 1 mg/mL visando averiguar a periculosidade das NPTiO₂.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Nanopartícula teste e caracterização

As NPTiO₂ foram adquiridas na forma em pó [*Titanium (IV) oxide nanopowder*] da Sigma-Aldrich®. As características físicas informadas pelo fornecedor são: titânio (IV) oxído em nano pó tamanho da partícula 21 nm (TEM), ≥99.5% vestígios a base de metal, 100% anatase.

Para a caracterização do pó de NPTiO₂ foram utilizados os métodos de Difração de Raio-X para verificar a estrutura cristalina; Teoria da Adsorção Multimolecular (BET - *Brunauer–Emmett–Teller theory*) para a área de superfície específica; Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS - *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*) para a química de superfície.

2.2. Preparo da suspensão teste de NPTiO₂ e caracterização

As avaliações genotoxicológicas e morfológicas das NPTiO₂ em *A. cepa* foram realizadas com as concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/mL. Estas concentrações foram definidas com base no trabalho de Zhu et al. (2010), que demonstrou efeito tóxico para as NPTiO₂ em *Daphnia magna* na concentração de 1 mg/mL (máxima testada). Desta forma, a partir da concentração de 1 mg/mL, foram definidas outras duas concentrações teste 10 e 100 vezes menores (0,01 mg/ml e 0,1 mg/ml) que a maior concentração. A escolha da concentração teste também se baseou em estudos prévios de nosso grupo (Laboratório de Citogenética de Peixes e Mutagênese Ambiental, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR/Brasil), os quais tem demonstrado efeitos deletérios das NPTiO₂, nestas mesmas concentrações, em peixes Neotropicais (dados não publicados).

As suspensões teste de NPTiO₂ foram preparadas em água ultrapura e sonicadas em lavadora ultrassônica por 30 min, na frequência de 42 Hz, antes da realização do experimento com *A. cepa*. Durante a execução do experimento, foi realizada a troca das suspensões de NPTiO₂ a cada 24 h,

aonde a alíquota de NPs utilizada era sonicada mais uma vez por 30 min, visando evitar agregação das NPs.

A caracterização das suspensões teste de NPTiO₂ foram realizada pelo aparelho Zetasizer[®] Nano Series ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), no qual se verificou o tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta, obtido por meio de Velocimetria laser (LDV - *Laser Doppler Velocimetry*) e eletroforese. As medidas foram realizadas a 28°C. Para análise de tamanho das partículas e índice de polidispersão utilizou-se cubeta de poliestireno, cada análise durou em média 105 s e foi obtida com um ângulo de detecção de 90° e laser vermelho 633 nm. Para determinar o potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido, realizando em média 12 corridas para cada amostra. Por meio do índice de polidispersão foi possível calcular a % de polidispersão [% Polidispersão (%Pd) = (Pdl) ^{1/2} x 100], para verificar a homogeneidade de tamanhos de partículas presentes na suspensão coloidal, sendo considerada como suspensão homogênea quando %Pd < 20 (MALVERN, 2015).

2.3. Sistema teste e exposição

Sementes de *A. cepa* (2n=16 cromossomos) do mesmo lote (marca Feltrin[®]) e cultivar (Baia Periforme) foram utilizadas como organismo teste, pois apresentam homogeneidade genética e fisiológica e estão disponíveis por ao longo de todo período do ano.

As sementes de *A. cepa* (n=100) foram dispostas em uma placa de Petri de poliestireno forrada com rede de nylon, e submetidas a germinação em diferentes concentrações de NPTiO₂ (0,01; 0,1 e 1 mg/mL); água ultrapura (Controle negativo -CN); Metil Metanosulfonato (MMS) a 10 mg/L (Controle positivo - CP);

Quando as raízes atingiram cerca de 2 cm de comprimento (6 dias), foram fixadas em álcool ácido-acético (3:1-v/v) para as análises citogenotóxica (LEME e MARIN-MORALES, 2008) e solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) para as análises morfológicas.

Todos os experimentos foram realizados em condições controladas de temperatura (25°C) e ausência de luz.

2.4. Análise cito- e genotoxicológica

As lâminas utilizadas para a análise cito- genotoxicológica foram preparadas com células meristemáticas de *A. cepa* de acordo com o protocolo descrito por Leme e Marin-Morales (2008).

Para avaliar os danos celulares, 10 lâminas por tratamento foram confeccionadas. Aproximadamente 500 células por lâmina foram quantificadas, totalizando a análise de 5000 células por tratamento.

A determinação do número de células em divisão celular foi utilizado para estabelecimento do IM, o qual por sua vez é utilizado como indicativo de citotoxicidade. A genotoxicidade foi determinada pela observação e quantificação de qualquer tipo de AC a anormalidade nuclear nas células meristemáticas de todos os tratamentos. A avaliação dos efeitos mutagênicos se deu pela contagem de células micronucleadas.

Além dos parâmetros avaliados anteriormente (IM, AC e MN), também foi verificado o modo de ação da NP. Esta avaliação é determinada a partir da quantificação da frequência de cada tipo de AC. Consideram-se como alterações aneugênicas pontes e quebras, sendo as demais (perda, atraso, aderência, broto) classificadas como clastogênicas. Então, somam-se as frequências das AC aneugênicas e das AC clastogênicas, e a partir do maior valor determina-se o modo de ação da substância.

Para análise estatística inicialmente foi realizado um teste de normalidade segundo Shapiro-Wilk, averiguando se os dados deveriam ser analisados com testes paramétricos ou não paramétricos. A partir da caracterização dos dados como não paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para comparar o CN com os três tratamentos de NPs, seguido de pós teste Student-Newman-Keuls. O nível de significância foi de 5%.

2.5. Análise anatômica

2.5.1. Microscopia de luz (ML)

Para análise em ML, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídas em resina acrílica tipo metacrilato. Cortes longitudinais com 5 μm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo manual Reichert, corados em azul de toluidina pH=4,0 (O'Brien & McCully, 1981) e montados em lâmina e lamínula, utilizando como meio de montagem o Entellan[®]. Após observação, foi realizada documentação fotográfica, utilizando microscópio de luz (modelo Zeiss Axioskop 2) com câmera digital acoplada (modelo MRC3). Vale ressaltar que o processo de análise morfológica foi realizado somente no CN e no tratamento de NPTiO₂ na concentração de 1 mg/mL.

2.5.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para análise em MET, as amostras foram retiradas da solução de Karnovsky, lavadas por três sessões (10 minutos cada) em tampão cacodilato a 0,05 M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por uma hora. Em seguida, contrastadas em acetato de uranila a 0,5% (pernoite), desidratadas em acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídas em resina (SPURR), permanecendo em estufa a 60 °C por período de 2 dias. Após obtenção dos blocos (material polimerizado), foram realizados cortes ultrafinos (70 nm de espessura), que foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963), sendo observados ao microscópio eletrônico de transmissão.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização das NPTiO₂

Apresenta em sua composição em pó 100% da forma cristalina anatase, área de superfície específica com 83.47 m²/g tamanho médio de 107 nm e tamanho de dispersão de 45 nm (DLS) e a química de superfície composta por 28.42% de titânio e 71.58% de oxigênio (XPS).

Os dados da Tabela 1 apresentam os resultados das suspensões coloidais, com valores de potencial zeta e % de polidispersão. Na figura 1 é possível observar a distribuição de tamanhos das NPs nas diferentes concentrações.

Tabela 1. Caracterização das suspensões de nanopartículas de dióxido de titânio.

Concentração (mg/mL)	Potencial Zeta (mV)	% de Polidispersão
0.01	-2,99 mV	91,10
0.1	-21,2 mV	76,48
1	-4,92 mV	57,27

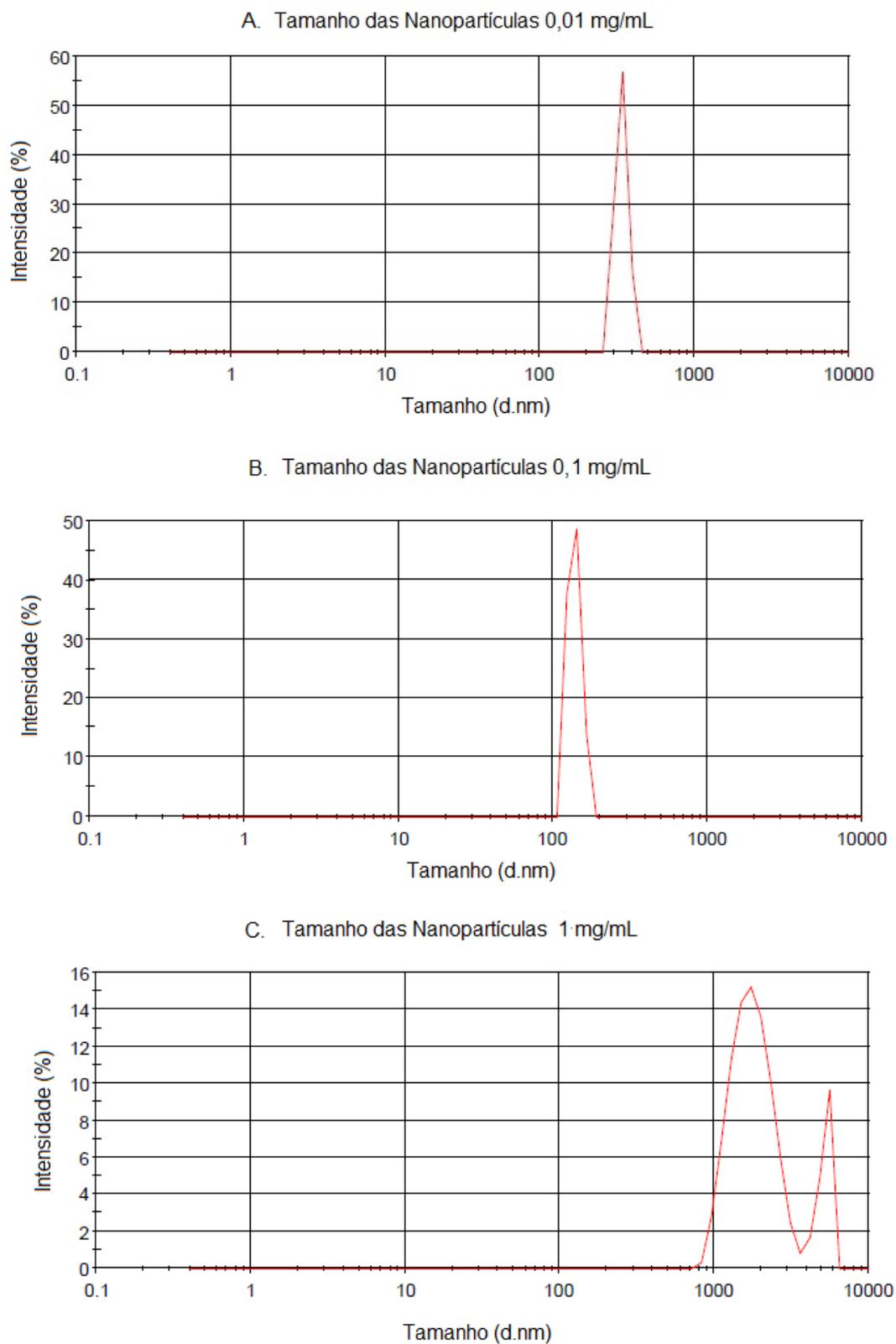


FIGURA 1 – Distribuição de tamanho das NPs por intensidade nas concentrações de 0,01 mg/mL; 0,1 mg/mL e 1 mg/mL.

3.2. Avaliação cito- e genotoxicológica

Os efeitos das NPTiO₂ nas células de meristemáticas de *A. cepa* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultado de Índice Mitótico, Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa* expostas as nanopartículas de dióxido de titânio.

T	C	IM	AC	MN			
	(mg/mL)	%	X ± S	%	X ± S	%	X ± S
CN		49,38	246,9 ±1,55	0,14	0,70 ±0,67	0,12	0,60 ±0,69
NPTiO ₂	0,01	48,84	244,2 ±1,75	0,22	1,10 ±0,73	0,12	0,60 ±0,69
	0,1	48,15	240,7 ±1,15*	0,44	2,19 ±0,63	0,48	2,39 ±0,70
	1	47,30	236,5 ±2,43*	1,06	5,28 ±1,06*	0,98	4,88 ±0,88*
CP		45,31	226,5 ±1,90*	1,61	8,05 ±1,44*	6,66	33,3 ±2,42*

5000 células analisadas por tratamento. Média ± desvio padrão

*Diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com Kruskal-Wallis

T: Tratamento; C: concentração; IM: índice mitótico; AC: aberrações cromossômicas; MN: micronúcleo; CN: controle negativo; CP: controle positivo (Metil Metanosulfonato 10 mg/L); X±S: média ± desvio padrão.

As células meristemáticas de *A. cepa* expostas a NpTiO₂ mostrando uma redução significativa no IM de forma concentração dependente. Valores significativamente maiores que o CN de AC e MN também foram visualizados após o tratamento das raízes de *A. cepa* com NPTiO₂.

Os tipos de AC encontradas nas células meristemáticas de *A. cepa* podem ser visualizadas na Figura 1. Da análise das frequências de cada tipo de AC (Tabela 3), as AC mais frequentes são as do tipo ponte que apresentaram valores significativamente maiores que o CN após a exposição das raízes de *A. cepa* as NPTiO₂ nas concentrações de 0,1 e 1 mg/mL, seguidas por quebra que apresentam valores significativamente maiores que o CN nas três concentrações expostas as NPTiO₂.

Tabela 3. Tipos de Aberrações Cromossômicas observados em células meristemáticas de *A. cepa* expostas as nanopartículas de dióxido de titânio

AC	CN	Concentrações de NPTiO ₂ (mg/mL)			CP
		0,01	0,1	1	
Clastogênicas					
Ponte cromossômica	0,1	0,06	0,22*	0,36*	0,66*
Quebra cromossômica	0,02	0,08*	0,1*	0,36*	0,48*
Total	0,12	0,14	0,32	0,72	1,14
Aneugênicas					
Perda cromossômica	0	0,02	0,02	0	0,02
Atraso cromossômica	0	0	0,04	0,1*	0,04
Aderência cromossômica	0	0,02	0,06	0,16*	0,22*
Broto nuclear	0	0,04	0	0,08*	0,12*
Total	0	0,08	0,12	0,34	0,40

NPTiO₂: nanopartícula de dióxido de titânio; AC: aberrações cromossômicas; CN: controle negativo; CP: controle positivo.

Dados expressos em frequência (%). 5000 células analisadas por tratamento.

* diferença significativa em relação ao controle negativo, $p < 0,05$ de acordo com teste de Kruskal-Wallis.

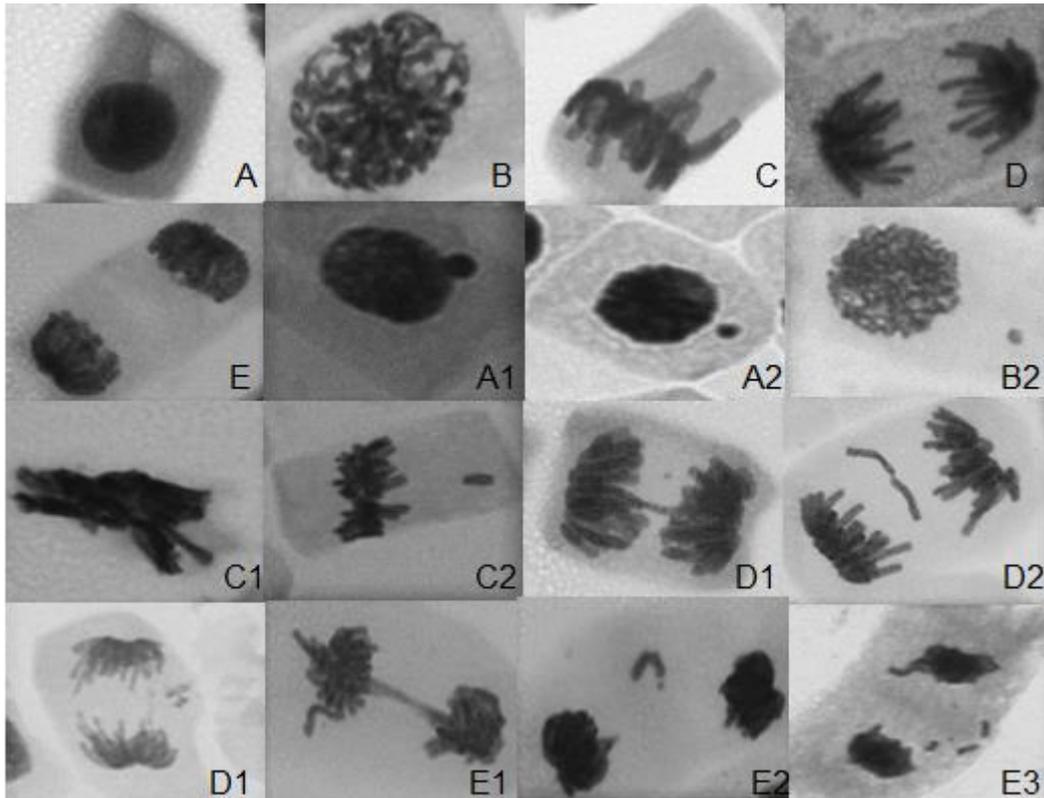


FIGURA 2 - Células normais e alteradas nas diferentes fases do ciclo celular. A: Intérfase, B: Prófase, C: Metáfase; D: Anáfase; E: Telófase; A1: Broto, A2: Intérfase com MN; B2: Prófase com MN; C1: Metáfase com aderência; C2: Metáfase com quebra; C3: Metáfase com ponte; D1: Anáfase com Ponte; D2: Anáfase com Perda; D1: Anáfase com quebra; E1: Telófase com Ponte; E2: Telófase com Perda; E3: Telófase com quebra.

3.3. Avaliação morfológica

No CN, ao microscópio de luz, as células meristemáticas apresentam parede delgada, vacúolos em geral pequenos e dispersos, núcleo denso e “volumoso” com um ou dois nucléolos e citoplasma parietal (Figuras. 2A-B). No único tratamento analisado com NPTiO₂ na concentração de 1 mg/mL, os núcleos aparecem mais condensados (Figuras. 2C-D) com até 3 nucléolos (Figuras. 3D) e os vacúolos aumentam em volume e quantidade.

No CN, ao microscópio eletrônico de transmissão, o complexo de Golgi (→) e organelas semelhantes a proplastídeos e/ou mitocôndrias (o) ocorrem em grande quantidade no citoplasma (Figura. 3A). Os vacúolos apresentam duas conformações (Figura. 3A): os hialinos (●), que são menores e arredondados e os líticos (●), com conteúdo no suco vacuolar e formato lenticular e com atividade digestiva. No citoplasma, corpos de óleo (*oil bodies*) (→) ocorrem dispersos ou em associação com vacúolos líticos (o). No tratamento com as NPTiO₂, a principal alteração citológica é o grande aumento na quantidade de corpos de óleos (→), densamente concentrados nas adjacências da membrana plasmática (Figuras 3B-E).

Além disso, as células meristemáticas de *A. cepa* expostas as NPTiO₂ apresentam também maior quantidade de os vacúolos líticos (●) e com considerável aumento de volume.

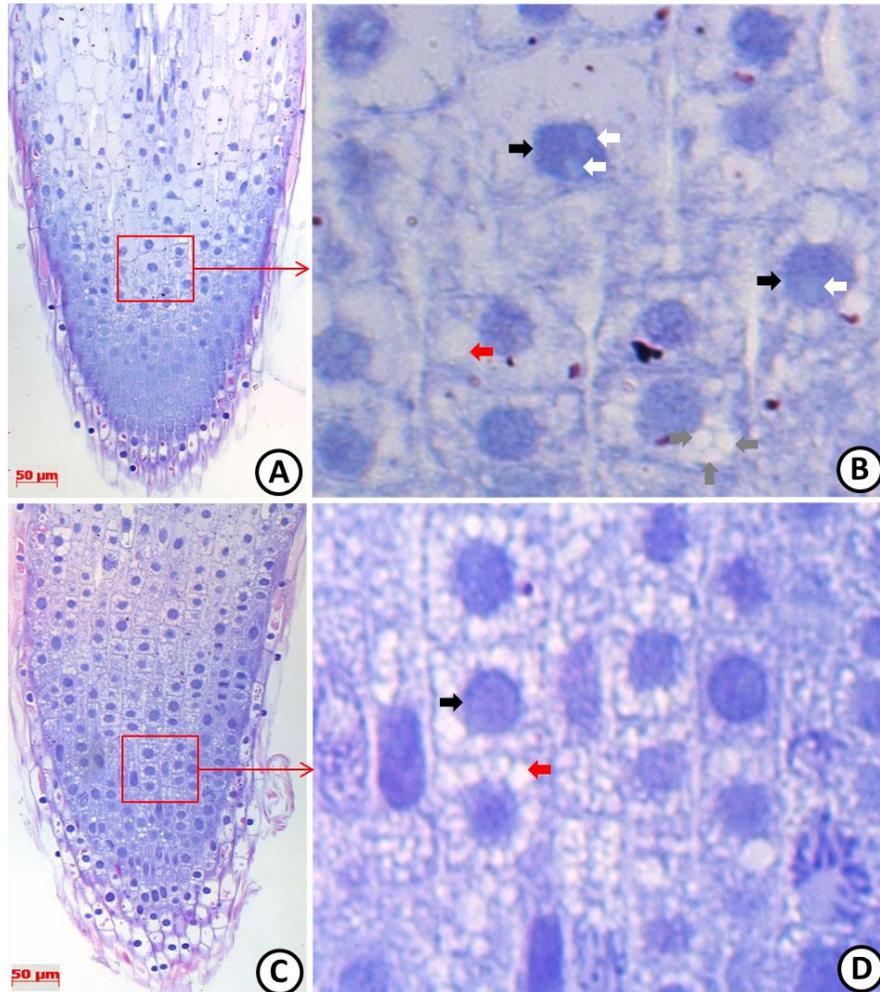


Figura 2. Ápice radicular de *A. cepa* (cortes longitudinais) ao microscópio de luz não exposto (A-B) e exposto a 1 mg/mL de nanopartículas de dióxido de titânio (C-D). **A.** Detalhe da região amostrada; **B.** Células meristemáticas com núcleo (→) e nucléolos (setas brancas) evidentes; **C.** Detalhe da região amostrada; **D.** Núcleo (→) com nucléolos não evidentes e aumento no volume e na quantidade de vacúolos (→) com disposição parietal.

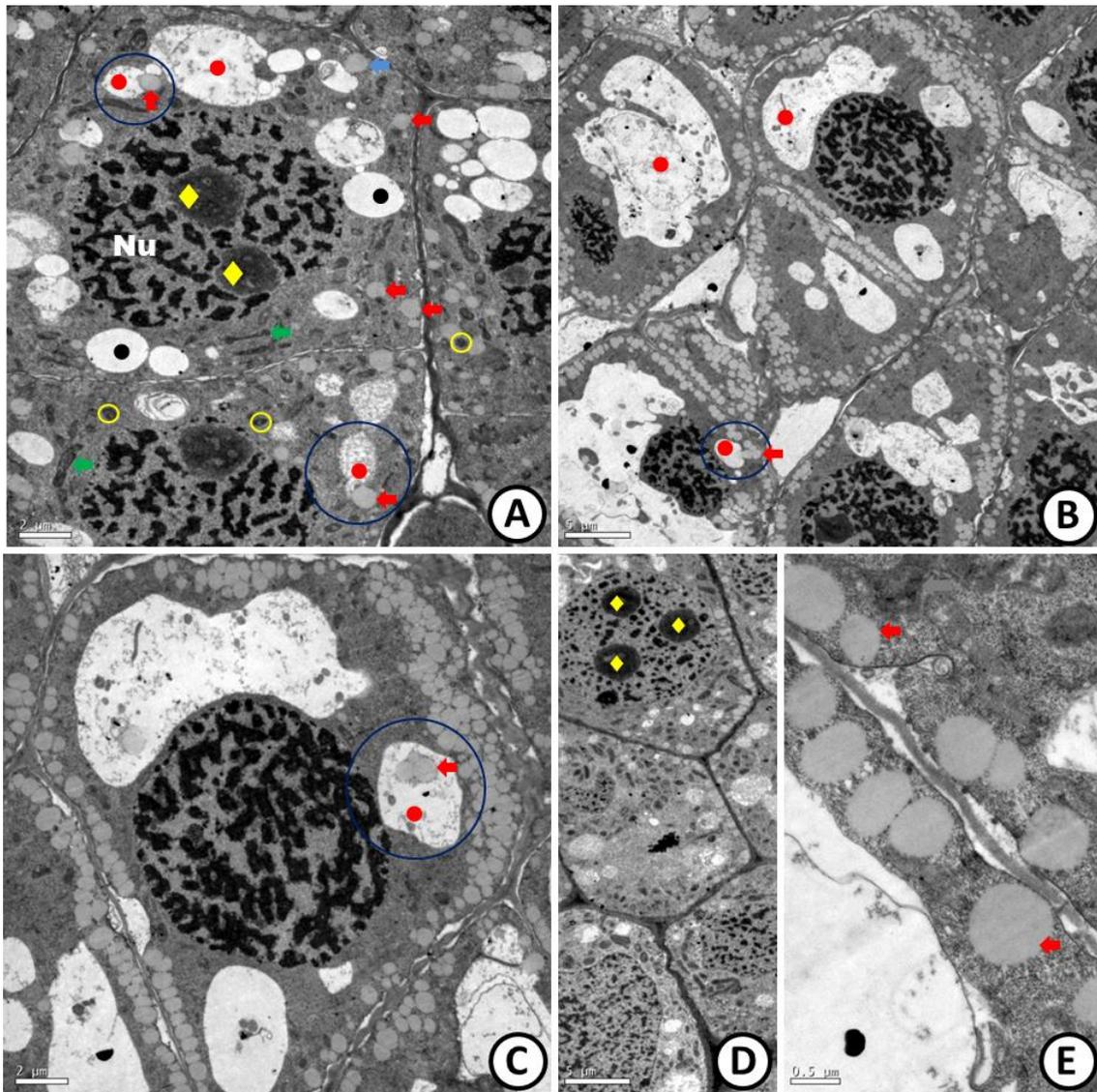


Figura 3. Ápice radicular de *A. cepa* (cortes longitudinais) ao microscópio eletrônico de transmissão não exposto (A) e exposto a 1 mg/mL de nanopartículas de dióxido de titânio (B-E). **A.** Célula com vacúolos líticos (○) e hialinos (◊) e núcleo (Nu) com dois nucléolos (◆); **B.** Aumento no volume e na quantidade de vacúolos líticos; **C.** Corpos de óleos (*Oil bodies*) em associação com vacúolos líticos; **D.** Núcleo com três nucléolos (◆); **E.** Disposição parietal dos corpos de óleos (●).

4. DISCUSSÃO

O uso da nanotecnologia na agricultura é tido como benefício por ocasionar a produção de uma maior quantidade de alimentos com menor custo. Apesar das vantagens apresentadas em relação ao cultivo vegetal, estas NPs

podem atingir outros vegetais causando efeitos deletérios (SERVIN e WHITE, 2016). Esta controvérsia sobre o efeito das NPs aos seres vivos e ao ambiente é relatada nos estudos de Canas *et al.* (2008) e Lopez-Moreno *et al.* (2010) onde verificam aumento significativo do crescimento das raízes, enquanto Lin *et al.* (2009) observam atraso e diminuição da floração, Lin e Xing, (2007) verificam redução no comprimento das raízes e Kumari, Mukherjee e Chandrasekaran (2009) constataam danos no DNA.

Sem estar associado as NPs, o dióxido de titânio tem seu efeito toxicológico depende da espécie e linhagem celular analisada. No estudo de Frenzilli *et al.*, (2014) realizado em golfinhos verifica-se a indução de efeitos genotóxicos na presença de dióxido de titânio. Por outro lado Warheit, Boatman e Brown, (2015) em um estudo com ratos, verificam a ausência de toxicidade tanto nas três formas isoladas de dióxido de titânio estudadas, como nas três formas nanoparticuladas, sugerindo que não existem diferenças do TiO_2 isolado ou na forma de NP.

O IM mostrou-se comprometido, sendo reduzido, mesmo em baixas doses de NPs no trabalho de Klancnik *et al.* (2010), mostrando que esse parâmetro é sensível a exposição das NPs, indicando sua citotoxicidade. Estes dados corroboram com os encontrados neste trabalho que também demonstram redução do IM. Kumari, Mukherjee e Chandrasekaran (2009) observam em concentrações intermediárias as nossas (0,025 e 0,05 mg/mL), redução do IM, indicando citotoxicidade mesmo em baixas concentrações corroborando com os resultados deste trabalho.

Foi verificado aumento de AC e MN nas células de *A. cepa* expostas a $NPTiO_2$, o que indica o potencial de indução de danos no DNA esta NP. Kumari, Mukherjee e Chandrasekaran, (2009) verificaram genotoxicidade, por meio do aumento de AC, enquanto Klancnik *et al.*, (2010) detectaram efeitos genotóxicos e mutagênicos somente na concentração de 1 mg/mL, mesma faixa de concentração usada neste trabalho, onde também foi observado aumento na quantidade de AC. Isto indica a genotoxicidade das $NPTiO_2$.

Este padrão de dose resposta também foi observado em outros trabalhos. Khana, Naqvib, Ahmada (2015) ao analisarem em linfócitos humanos, os efeitos das $NpTiO_2$ nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,25 e 0,5

mg/mL também observaram efeitos genotóxicos em uma escala dose dependente. Hamzeh e Sunahara (2012) ao observar os efeitos das NPTiO₂ em hamsters, também verificou efeitos citotóxicos e genotóxicos em uma escala dose dependente. Isto sugere que as NPTiO₂ podem ter sido internalizadas pelas células

Ekstrand-Hammarstrom *et al.* (2015) verificam em doses 0,00005 mg/mL, a ativação de um sistema de defesa que é ativado somente em situações adversas, após exposição a NpTiO₂.

Avaliações toxicológicas de NPTiO₂ empregando outros sistemas-teste, como peixes e roedores, também apontaram o efeito nocivo deste nanomaterial quanto a indução de danos celulares (e.g. morte celular) e no DNA (Johnson *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014). Tais dados reforçam a periculosidade das NPTiO₂ em organismos vivos.

A análise dos tipos de AC nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas as NPTiO₂, permitiu identificar que esta NP exerce sua genotoxicidade por meio de ação clastogênica, devido as elevadas frequências de pontes e quebras cromossômicas visualizadas. O modo de ação clastogênico de NPTiO₂ está de acordo com outros trabalhos na literatura conduzidos também com sistemas teste vegetais, especialmente *A. cepa* (Kumari, Mukherjee e Chandrasekaran, 2009; Ghosh, Bandyopadhyah e Mukherjee, 2010; Pakrashi *et al.* 2014).

Segundo Humphrey e Brinkley (1969), as pontes podem resultar de mudanças estruturais entre cromátides irmãs ou entre cromossomos diferentes devido a quebras, ou seja, quebras poderão resultar na formação de pontes, e também devido a deleções terminais e pela adesão dos ribossomos ou nucléolos persistentes, além disso Marcano *et al.* (2004), relatam que pontes cromossômicas podem ser originadas a partir de aderências. Giacomelli (1999) pondera ainda que estas pontes podem ser múltiplas e persistirem até a telófase. Segundo Terzoudi *et al.* (2011) as quebras são provocadas geralmente por agentes externos, como xenobióticos, que afetam a dinâmica da cromatina, sendo que estas alterações bruscas na cromatina podem causar o rompimento de processos de reparação e ocasionar quebras, e segundo Tsujii e Kamada, (2012) também pela radiação. De acordo com Landolph,

(2014) a exposição a xenobióticos e radiação pode resultar na labilização da ligação de fosfato base-açúcar DNA. As bases podem ser despurinizadas ou acontecer a dissociação das base da estrutura de fosfato ou do açúcar. Isto pode deixar essa cadeia de DNA, que está sem uma base de DNA suscetível ao ataque por endonucleases, levando a clivagem da cadeia, o que resultará numa ruptura em um único fio de DNA, ocasionando uma quebra. Handy *et al.*, (2012) relata que os MNs podem se originar a partir de pontes e quebras cromossômicas.

Corpos de óleo são pequenos corpos intracelulares, que tem função protetora nos vegetais. Segundo Zhao *et al.*, (2016) e Karkani *et al.*, (2013) o aumento no número destas estruturas pode indicar um mecanismo de proteção da célula. Logo, o aumento de corpos de óleo observado na análise morfológica realizada neste trabalho pode ser um indicativo da entrada da NPTiO₂ no protoplasto.

Em seu trabalho com nanopartículas de óxido de zinco, Kumari *et al.*, (2011) também observaram alterações morfológicas a partir da exposição de *A. cepa* a suspensão de NPs e verificou desintegração da matriz celular e deformação de estruturas em comparação ao CN, como a presença de aglomerados particulados na matriz citoplasmática, provavelmente sendo aglomerados de NPs, podendo ser as alterações morfológicas mais um mecanismo eficiente para demonstrar a real preocupação a periculosidade das NPs.

5. CONCLUSÃO

O teste de *A. cepa* demonstra que as NPTiO₂, apresentam efeitos nocivos aos organismos, por meio da observação da redução do IM nas concentrações de 0,1 e 1 mg/mL, sendo indicativo de citotoxicidade, do aumento das AC e MN na concentração de 1 mg/mL indicando genotoxicidade e mutagenicidade respectivamente e também pelas alterações morfológicas provocadas pelas NPTiO₂ na concentração de 1 mg/mL com a formação de corpos de óleo e pelo aumento do número de vacúolos, o que indica um mecanismo de defesa a ação de uma substância nociva. Tais resultados

confirmam a preocupação com os efeitos das NPTiO₂ sobre os organismos e o ambiente e confirmar a espécie *A. cepa* como um eficiente organismo teste para avaliação da periculosidade de xenobióticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) pela concessão da bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e Fundação Araucária (Brasil) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, S.C.C.; SILVA, A.L.D.; GALAZZI, R.M.; AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, M.A.Z. **Nanoparticles applied to plant science: A review**. *Talanta*, vol. 131, p. 693-705, 2015.

BHARALI, D.J; SIDDIQUI, I.A; ADHAMI, V.M. **Nanoparticle Delivery of Natural Products in the Prevention and Treatment of Cancers: Current Status and Future Prospects**. *Cancers*, v. 3, n. 4, p. 4024-4045, 2011.

CANAS, J.E.; LONG, M.; NATIONS, S.; VADAN, R.; DAI, L.; LUO, M. **Effects of functionalized and non functionalized single-walled carbon-nanotubes on root elongation of select crop species**. *Nanomater. Environ.*, vol. 27, p. 1922-1931, 2008.

CANESI, L.; CIACCI, C.; BALBI, T. **Interactive effects of nanoparticles with other contaminants in aquatic organisms: Friend or foe?** *Marine Environmental Research*, vol. 3, p. 1-7, 2015.

CHEN, Z.; WANG, Y.; LI, Y.; PU, J.; CHEN, T.; SONG, Y.; GU, Y.; QIAN, Q.; YANG, J.; JIA, G. **Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro**. *Toxicology Letters*, vol. 226, p.314-319, 2014.

CLEMENT, L.; HUREL C.; MARMIER, N. **Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants – Effects of size and crystalline structure**. *Chemosphere*, vol.90, p. 1083-1090, 2013.

COLEMAN, C.M.; LIU, Y.V.; MU, H.; TAYLOR, J.K.; MASSARE, M.; FLYER, D.C.; GLENN, G.M.; SMITH, G.E.; FRIEMAN, M.B. **Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice**. *Vaccine*, vol.32, p.3169-3174, 2014.

EKSTRAND-HAMMARSTREOM, B.; HONG, J.; DAVOODPOUR, P.; SANDHOLM, K.; EKDAHL, K.N.; BUCHT, A.; NILLSON, B. **TiO₂ nanoparticles tested in a novel screening whole human blood model of toxicity trigger adverse activation of the kallikrein system at low concentrations.** *Biomaterials*, vol.51, p.58-68, 2015.

FISKESJÖ, G. **The *Allium* test as a standard in environmental monitoring,** *Hereditas*, v.102, p. 99-112, 1985.

FRENZILLI, G.; BERNARDESCHI, M.; GUIDI, P.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; MARSILI, L.; FOSSI, M.C.; BRUNELLI, A.; GUILIO, P.; MARCOMINI, A.; NIGRO, M. **Effects of in vitro exposure to titanium dioxide on DNA integrity of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) fibroblasts and leukocytes.** *Marine Environmental Research*, vol. 100, p. 68-73, 2014.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. **Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes.** *Chemosphere*, vol. 81, p. 1253-1262, 2010.

GIACOMELLI, F.R.B. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para região sul.** 1999. 131f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR, 1999

HAMZEH, M.; SUNAHARA, G.I. **In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells.** *Toxicology in Vitro*, vol.27, p.864-873, 2013.

HANDY, R.D.; BRINK, N.V.D.; CHAPPELL, M.; MUHLING, M.; BEHRA, R.; DUSINSKA, M.; SIMPSON, P.; AHTIAINEN, J.; JHA, A.N.; SEITER, J.; BEDNAR, A.; KENNEDY, A.; FERNANDES, T.F.; RIEDIKER, M. **Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far?** *Ecotoxicology*, vol.21, p. 933-972, 2012.

HUMPHREY, R.M.; BRINKLEY, B.R. **Ultrastructural studies of radiation induces chromosome damage.** *J. Cell Biol.*, vol.42, p.745-753, 1969.

JAYAPRAKASH, M.; KUMAR, R.S.; GIRIDHARAN, L.; SUJTHA, S.B.; SARKAR, S.K.; JONATHAN, M.P. **Bioaccumulation of metals in fish species from water and sediments in macrotidal Ennore creek, Chennai, SE coast of India: A metropolitan city effect.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 120, p. 243-255, 2015.

JHANSI, S.C.; CAMPUS, S.M.; MISHRA, S.K. **Wastewater Treatment and Reuse: Sustainability Options.** *Consilience: The Journal of Sustainable Development*, vol. 10, p. 1-15, 2013.

JOHNSON, B.; GILBERT, S.L.; KHAN, B.; CARROLL, D.L.; RINGWOOD, A.H. **Cellular responses of eastern oysters. *Crassostrea virginica* to titanium dioxide nanoparticles.** Marine Environmental Research, vol. 111, p. 135-143, 2015.

JONES, M.C.; GRAVES, B. **State experiences with emerging contaminants: recommendations for federal action.** Environmental Council of the States, 2010.

KARKANI, O.A.; NENADIS, N.; NIKIFORIDIS, C.V.; KIOSSEOGLOU, V. **Effect of recovery methods on the oxidative and physical stability of oil body emulsions.** Food Chemistry, vol. 139, p. 640-648, 2013.

KARNOVSKY, M.J. **A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy.** Journal of Cell Biology, vol. 27, p. 137-138, 1965.

KHANA, M.; NAQVIB, A.H.; AHMADA, M. **Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles.** Toxicology Reports, vol.2, p.765-774, 2015.

KLANCNIK, K.; DROBNE, D.; VALANT, J.; KOCE, J.D. **Use of a modified *Allium* test with nano TiO₂.** Ecotoxicology and Environmental Safety, vol.74, p.85-92, 2010.

KUMARI, M.; KHAN, S.S.; PAKRASHI, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. **Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*.** Journal of Hazardous Materials, v. 190, p. 613-621, 2011.

KUMARI, M.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. **Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*.** Science of the Total Environment, vol. 407, p. 5243 – 5246, 2009.

LANDOLPH, J.R. **Genetic Toxicology.** Encyclopedia of Toxicology, vol. 2, p. 715-725, 2014.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. **Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study.** Mutation Research, vol. 650, p. 80-86, 2008.

LEME, D.M.; MARIN MORALES M.A. ***Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application.** Mutation research, v. 682, p. 71 -81, 2009.

LIN, D.; XING, B. **Phototoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth.** Environ. Pollut., vol. 150, p. 243-250, 2007.

LIN, S.; REPERT, J.; HU, Q.; HUDSON, J.S.; REID, M.L.; RATNIKOVA, T.A. **Uptake, translocation and transmission of carbon nanomaterials in rice plants.** *Small*, vol. 5, p. 1128-1132, 2009.

LOPEZ- MORENO, M.L.; DE LA ROSA, G.; HERNANDEZ, J.A.; CASTILO, H.; BOTEZ C.E.; PERALTA, J.R. **Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants.** *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, p. 7315-7320, 2010a.

MA, X.; LEE, J.G.; DENG, Y.; KOLMAKOV, A. **Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation.** *Science of the Total Environment*, vol.408, p.3053-3061, 2010

MALVERN, 2015. **A basic guide to particle characterization.** Disponível em <http://www.malvern.com/en/>. Acesso em setembro de 2015.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. **Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L.** *Environmental Research*, v.94, p.221-226, 2004.

MONICA, R.C.; CREMONINI, R. **Nanoparticles and higher plants.** *Caryologia*, vol.62, p.161-165, 2009.

NAVARRO, E.; BAUN, A.; BEHRA, R.; HARTMANN, N.B.; FILSER, J.; MIAO, A.J.; QUIGG, A.; SANTSCHI, P.H.; SIGG, L. **Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi.** *Ecotoxicology*, vol. 17, p.372-386, 2008.

O`BRIEN, P.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plants structure principles and selected methods.** Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltda, p.345, 1981.

OKUPNIK, A.; JARA, V.C.; PFLUGMACHER, S. **Potential role of engineered nanoparticles as contaminant carriers in aquatic ecosystems: Estimating sorption processes of the cyanobacterial toxin microcystin-Lr by TiO₂ nanoparticiles.** *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 481, p. 460-467, 2015.

PAKRASHI, S.; JAIN, N.; DALAI, S.; JAYAKUMAR, J.; CHANDRASEKARAN, P.T. **In Vivo Genotoxicity Assessment of Titanium Dioxide Nanoparticles by *Allium cepa* Root Tip Assay at High Exposure Concentrations.** *PLoS ONE* 9(2): e87789. doi:10.1371/journal.pone.0087789, 2014

REYNOLDS, E. **The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.** *J Cell Biol.*, vol. 17, p. 208-212, 1963.

SALLEM, P.M.; IQBAL, J.; SHAH, M.H. **Geochemical speciation, anthropogenic contamination, risk assessment and source identification**

of selected metals in freshwater sediments – A case study from Mangla Lake. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, vol. 4, p. 27-36, 2015.

SERVIN, A.; WHITE, J.C. **Nanotechnology in agriculture: Next steps for understanding engineered nanoparticle exposure and risk.** Nanoimpact, vol. 1, p. 9-12, 2016.

TERZOUDI, G.I.; HATZI, V.I.; BAKOYIANNI, C.D.; PANTELIAS, G.E. **Chromatin dynamics during cell cycle mediate conversion of DNA damage into chromatid breaks and affect formation of chromosomal aberrations: Biological and clinical significance.** Mutation Research, vol. 711, p.174-186, 2011.

TOPUZ, E.; TRABER, J.; SIGG, L.; TALINLI I. **Agglomeration of Ag and TiO₂ nanoparticles in surface and wastewater: Role of calcium ions and of organic carbon fractions.** Environmental Pollution, v. 204, p. 313-323, 2015.

TSUJII, H.; KAMADA, T. **A review of update clinical results of carbon ion radiotherapy.** Jap. J. Clin. Oncol, vol. 42, p.670-685, 2012
WARHEIT, D.B.; BOATMAN, R.; BROWN, S.C. **Developmental toxicity studies with 6 forms of titanium dioxide test materials (3 pigment-different grade & 3 nanoscale) demonstrate na absence of effects in orally-exposed rats.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol. 73, p. 887-896, 2015.

WENSUN, Y.; DUA, J.C; BOYANG, Y.J. **Interaction between titanium dioxide nanoparticles and human serum albumin revealed by fluorescence spectroscopy in the absence of photoactivation.** J Lumin, vol. 129, p.778–783, 2009

ZHANG, J.; FAN, S.; YANG, J.; DU, X.; LI, F.; HOU, H. **Petroleum contamination of soil and water, and their effects on vegetables by statistically analyzing entire data set.** Science of the total Environment, v. 476 477, p. 258-265, 2014.

ZHAO L.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; KONG, X.; HUA, Y. **Effects of pH on protein componentes of extracted oil bodies from diverse plant seeds and endogenous protease-induced oleosin hydrolysis.** Food Chemistry, vol. 200, p. 125-133, 2016.

ZHU X.; CHANG Y.; CHEN, Y. **Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticles aggregates in Daphnia magna.** Chemosphere, vol.78, p. 209 215, 2010.

5. CONCLUSÕES GERAIS:

As NPs estão presentes no nosso cotidiano, na agricultura, na indústria, na medicina. Este aumento da nanotecnologia, nos remete a pensar e se preocupar com o seu destino no ambiente e no impacto que isto irá representar para o ecossistema. Responder corretamente a esta questão tem sido um desafio, uma vez que as NPs acabam apresentando problemas de biodisponibilidade ao sistema-teste, uma vez que podem se aderir a materiais como vidro, papel filtro. A partir da análise de diferentes metodologias de exposição do teste de *A. cepa*, foi possível concluir que a substituição das suspensões a cada 24h e o uso de material plástico de poliestireno e de redes de nylon assegura a biodisponibilidade das NPTiO₂ ao sistema-teste. Apesar das outras metodologias também mostrarem resultados satisfatórios, as sementes apresentam maior sensibilidade do que os bulbos e o uso da rede de nylon é uma segurança extra a garantia da biodisponibilidade. Após a realização do experimento de padronização, foi realizado outro experimento nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mg/mL visando avaliar a periculosidade das NPTiO₂. Este experimento nos permitiu concluir a partir da redução do IM nas concentrações de 0,1 e 1 mg/mL, do aumento de AC, especialmente pontes e quebras, devido ao modo de ação clastogênico desta NP, do aumento de MN que esta NP tem potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico. A presença de alterações morfológicas ao comparar a NPTiO₂ de 1 mg/mL com o CN, visualizando aumento na quantidade de vacúolos e a presença de corpos oleosos, representando mecanismos de defesa, enfatiza a periculosidade desta NP. Diante disso é possível concluir que a preocupação com os efeitos deletérios das NPTiO₂ aos organismo e ambiente é coerente e que os vegetais, em especial a espécie *A. cepa* é eficaz na avaliação genotoxicológica das NPs.

6. REFERÊNCIAS

- AKERMAN, M.E; CHAN, W.C.; LAAKKONEN, P.; BHATIA S.N.; RUOSLAHTI, E. **Nanocrystal targeting *in vivo***. Proc. Natl. Acad. Sci, vol. 99, p. 12617-12621, 2002.
- ARRUDA, S.C.C.; SILVA, A.L.D.; GALAZZI, R.M.; AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, M.A.Z. **Nanoparticles applied to plant science: A review**. Talanta, vol. 131, p. 693-705, 2015.
- ASHRAFMANSOURI, S.S.; ESFAHANY, M.N. **The influence of silica nanoparticles on hydrodynamics and mass transfer in spray liquid-liquid extraction column**. Separation and Purification Technology, vol. 151, p. 74-81, 2015.
- ASLI, S.; NEUMANN, M. **Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport**. Plant Cell Environ., vol. 32, p. 577-584, 2009.
- ÁVALOS, A.; HAZA, A.I.; DROSOPOULOU, E.; TSIPIDOU, P.M.; MORALES, P. **In vivo genotoxicity assesment of silver nanoparticles of different sizes by the somatic mutation and recombination test (SMART) on Drosophila**. Journal Food and Chemical Toxicology, vol.85, p.114-119, 2015.
- BHARALI, D.J; SIDDIQUI, I.A; ADHAMI, V.M. **Nanoparticle Delivery of Natural Products in the Prevention and Treatment of Cancers: Current Status and Future Prospects**. Cancers, v. 3, n. 4, p. 4024-4045, 2011.
- BIANCHI, J.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. **Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them**. Chemosphere, vol.144, p. 475-483, 2016
- BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu**. Ed. Rima, 278 p, São Carlos, 2003
- CANAS, J.E.; LONG, M.; NATIONS, S.; VADAN, R.; DAI, L.; LUO, M. **Effects of functionalized and non functionalized single-walled carbon-nanotubes on root elongation of select crop species**. Nanomater. Environ., vol. 27, p. 1922-1931, 2008.
- CANEPPELE, M.A.B. *et al.* **Influência da embalagem, do ambiente e do período de armazenamento na qualidade de sementes de cebola (*Allium cepa* L.)**. Revista Brasileira de Sementes, v. 17, n. 2, p. 249-257, 1995.
- CANESI, L.; CIACCI, C.; BALBI, T. **Interactive effects of nanoparticles with other contaminants in aquatic organisms: Friend or foe?** Marine Environmental Research, vol. 3, p. 1-7, 2015.

CHEN, T.; YAN, J.; LI, Y. **Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles.** Journal of food and drug analysis, vol. 22, p.95-104, 2014.

CHEN, Z.; WANG, Y.; LI, Y.; PU, J.; CHEN, T.; SONG, Y.; GU, Y.; QIAN, Q.; YANG, J.; JIA, G. **Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro.** Toxicology Letters, vol. 226, p.314-319, 2014.

CLEMENT, L.; HUREL, C.; MARMIER, N. **Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants – Effects of size and crystalline structure.** Chemosphere, vol. 90, p. 1083-1090, 2013.

COLEMAN, C.M.; LIU, Y.V.; MU, H.; TAYLOR, J.K.; MASSARE, M.; FLYER, D.C.; GLENN, G.M.; SMITH, G.E.; FRIEMAN, M.B. **Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice.** Vaccine, vol.32, p.3169-3174, 2014.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. **Genotoxicity risk assessment a proposed classification strategy.** Mutation Research, v.521, p.121-135, 2002.

DURAN, N; *et al.* **Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action.** J. Braz. Chem. Soc., vol.21, n.6, p. 949-959, 2010.

[EPA] **Environmental Protect Agency.** Disponível em: <http://www.epa.gov/search.html>. Acesso em: setembro de 2015.

EKSTRAND-HAMMARSTREOM, B.; HONG, J.; DAVOODPOUR, P.; SANDHOLM, K.; EKDAHL, K.N.; BUCHT, A.; NILLSON, B. **TiO₂ nanoparticles tested in a novel screening whole human blood model of toxicity trigger adverse activation of the kallikrein system at low concentrations.** Biomaterials, vol.51, p.58-68, 2015.

FABREGA, J.; LUOMA, S.N.; TYLER, C.R.; GALLOWAY, T.S.; LEAD, J.R. **Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment.** Environment International, vol. 37, p. 517-531 , 2010

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. **Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide.** Pesticide Biochemistry and Physiology, vol. 88, p. 252-259, 2007.

FISKESJÖ, G. **The *Allium* test as a standard in environmental monitoring,** Hereditas, v.102, p. 99-112, 1985.

FORBE, T.; GARCIA, M; GONZALEZ, E. **Potencial risks of nanoparticles.** Ciênc. Tecnol. Aliment. vol. 31, n. 4, p. 835-842, 2011.

FRANCHI, L.P.; MANSHIAN, B.B.; SOUZA, T.A.J.; SOENEN, S.J.; MATSUBARA, E.Y.; ROSOLEN, J.M.; TAKAHASHI, C.S. **Cyto- and genotoxic effects of metallic nanoparticles in untransformed human fibroblast.** Toxicology in Vitro, vol.29, p.1319-1331, 2015.

FRENZILLI, G.; BERNARDESCHI, M.; GUIDI, P.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; MARSILI, L.; FOSSI, M.C.; BRUNELLI, A.; GUILIO, P.; MARCOMINI, A.; NIGRO, M. **Effects of in vitro exposure to titanium dioxide on DNA integrity of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) fibroblasts and leukocytes.** Marine Environmental Research, vol. 100, p. 68-73, 2014.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B.P. **The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments.** Mutation Research, vol. 681, p. 80-92, 2009

GIACOMELLI, F.R.B. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para região sul.** 1999. 131f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR, 1999

GHODAKE, G.; SEO, Y.D.; LEE, D.S. **Hazardous phytotoxic nature of cobalt and zinc oxide nanoparticles assessed using *Allium cepa*.** Journal of Hazardous Materials, v. 186, p. 952-955, 2011.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. **Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes.** Chemosphere, vol. 81, p. 1253-1262, 2010.

GRANT, W.F. **Chromosome aberration assays in *Allium*,** Mutat. Res, vol. 99 p. 273-291, 1982.

GRANT, W.F. **The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens.** Mutation Research, v.310, p.175-185, 1994.

GUNES, S.; AL-SADAAN, M.; AGARWAL, A. **Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility.** Reproductive BioMedicine Online, vol. 31, p. 309-319, 2015.

HAMZEH, M.; SUNAHARA, G.I. **In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells.** Toxicology in Vitro, vol.27, p.864-873, 2013.

HANDY, R.D.; BRINK, N.V.D.; CHAPPELL, M.; MUHLING, M.; BEHRA, R.; DUSINSKA, M.; SIMPSON, P.; AHTIAINEN, J.; JHA, A.N.; SEITER, J.; BEDNAR, A.; KENNEDY, A.; FERNANDES, T.F.; RIEDIKER, M. **Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far?** Ecotoxicology, vol.21, p. 933-972, 2012.

HOSHINA, M.M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro – município de Rio Claro, pertencente a bacia do Rio Corumbataí, por meio de teste de mutagenicidade em *Allium cepa*.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharel e Licenciatura – Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, p.52, 2002.

HOSHINO, A.; FUJIOKA, K.; OKU, T.; NAKAMURA, S.; SUGA, M.; YAMAGUCHI, Y.; SUZUKI, K.; YASUHARA, M. **Quantum Dots Targeted to the Assigned Organelle in Living Cells.** Microbiology and Immunology, vol. 48, p. 985-994, 2004.

HOUK, V.S. **The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review.** Mutation Research, v. 277, p. 91-138, 1992.

HUMPHREY, R.M.; BRINKLEY, B.R. **Ultrastructural studies of radiation induces chromosome damage.** J. Cell Biol., vol.42, p.745-753, 1969.

JAYAPRAKASH, M.; KUMAR, R.S.; GIRIDHARAN, L.; SUJTHA, S.B.; SARKAR, S.K.; JONATHAN, M.P. **Bioaccumulation of metals in fish species from water and sediments in macrotidal Ennore creek, Chennai, SE coast of India: A metropolitan city effect.** Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 120, p. 243-255, 2015.

JHANSI, S.C.; CAMPUS, S.M.; MISHRA, S.K. **Wastewater Treatment and Reuse: Sustainability Options.** Consilience: The Journal of Sustainable Development, vol. 10, p. 1-15, 2013.

JOHNSON, B.; GILBERT, S.L.; KHAN, B.; CARROLL, D.L.; RINGWOOD, A.H. **Cellular responses of eastern oysters. *Crassostrea virginica* to titanium dioxide nanoparticles.** Marine Environmental Research, vol. 111, p. 135-143, 2015.

JONES, M.C.; GRAVES, B. **State experiences with emerging contaminants: recommendations for federal action.** Environmental Council of the States, 2010.

KAEGI, R. **Release of silver nanoparticles from outdoor facades.** Environmen Pollut vol.158, p. 2900–2905, 2010.

KARKANI, O.A.; NENADIS, N.; NIKIFORIDIS, C.V.; KIOSSEOGLOU, V. **Effect of recovery methods on the oxidative and physical stability of oil body emulsions.** Food Chemistry, vol. 139, p. 640-648, 2013.

KARNOVSKY, M.J. **A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy.** Journal of Cell Biology, vol. 27, p. 137-138, 1965.

KHANA, M.; NAQVIB, A.H.; AHMADA, M. **Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles.** Toxicology Reports, vol.2, p.765-774, 2015.

KHODAKOVSKAYA, M.; DERVISHI, E.; MAHMOOD, M.; XU, Y.; LI, Z.; WATANABE, F. **Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth.** ACS Nano, vol. 3, p. 3221-3227, 2009.

KIM, J.H.; KIM, J.H.; PARK, J.A.; LEE, S.W.; KIM, W.J.; YU, Y.S.; KIM, K.W. **Blood-neural barrier: Intercellular communication at glio-vascular interface.** J. Biochem. Mol. Biol., vol. 39, p. 339-345, 2006.

KLANCNIK, K.; DROBNE, D.; VALANT, J.; KOCE, J.D. **Use of a modified *Allium* test with nano TiO₂.** Ecotoxicology and Environmental Safety, vol.74, p.85-92, 2010.

KUMARI, M.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. **Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*.** Science of the Total Environment, vol. 407, p. 5243 – 5246, 2009.

KUMARI, M.; KHAN, S.S.; PAKRASHI, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. **Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*.** Journal of Hazardous Materials, v. 190, p. 613-621, 2011.

KUSHWAHA, K.B.; KAUR, A.; MALIK, C.P. **The synthesis and role of biogenic nanoparticles in overcoming chilling stress.** Indian Journal of Plant Sciences, vol. 2, p. 54-62, 2013.

LANDOLPH, J.R. **Genetic Toxicology.** Encyclopedia of Toxicology, vol. 2, p. 715-725, 2014.

LEE, R.F.; STEINERT, S. **Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals.** Mutation Research, v. 544, p. 43-64, 2003.

LEME, D.M.; ANGELIS D.F.; MARIN-MORALES, M.A. **Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells.** Aquat. Toxicology, vol. 88, p. 214-219, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. **Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study.** Mutation Research, vol. 650, p. 80-86, 2008.

LEME, D.M.; MARIN MORALES M.A. **Chromossome aberration and micronucleus frequencies in *Allium Cepa* cells exposed to petroleum polluted water – A case Study.** Mutation research, v. 650, p. 80-86, 2007.

LEME, D.M; MARIN MORALES M.A. **Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application.** Mutation research, v. 682, p. 71 -81, 2009.

LEVAN, A. **Cytological reactions induced by inorganic salt solutions.** Nature, v. 156, p. 751-752, 1945.

LEVAN, A. **The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*.** Hereditas, v. 24, p. 471-486, 1938.

LI, Z.; ZHU, Y.; WANG, J.; GUO, Q.; LI, J. **Size-controlled synthesis of dispersed equiaxed amorphous TiO₂ nanoparticles.** Ceramics International, vol. 41, p. 9057-9062, 2015.

LIN, D.; XING, B. **Phototoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth.** Environ. Pollut., vol. 150, p. 243-250, 2007.

LIN, S.; REPERT, J.; HU, Q.; HUDSON, J.S.; REID, M.L.; RATNIKOVA, T.A. **Uptake, translocation and transmission of carbon nanomaterials in rice plants.** Small, vol. 5, p. 1128-1132, 2009.

LIU, L.; MA, P.; WANG, H.; ZHANG, C.; SUN, H.; WANG, C.; SONG, C.; LENG, X.; KONG, D.; MA, G. **Immune responses to vaccines delivered by encapsulation into and or adsorption onto cationic lipid-PLGA hybrid nanoparticles.** Journal of Controlled Release, vol. 225, p.230-239, 2016.

LIUFU, S.C.; XIAO, H.N.; LI, Y.P. **Adsorption of poly onto the surface of titanium dioxide and the colloidal stability of aqueous suspension.** J. Colloid Interface Sci., vol. 281, p. 155-163, 2005.

LOPEZ- MORENO, M.L.; DE LA ROSA, G.; HERNANDEZ, J.A.; CASTILO, H.; BOTEZ C.E.; PERALTA, J.R. **Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants.** Environ. Sci. Technol., vol. 44, p. 7315-7320, 2010a.

LOPEZ-MORENO, M.L.; DE LA ROSA, G.; HERNANDEZ, J.A.; PERALTA, J.R.; GARDEA, J.L. **X-Ray absorption spectroscopy (XAS) corroboration of the uptake and storage of CeO₂ nanoparticles and assessment of their differential toxicity in four edible plant species.** J. Agric. Food Chem., vol. 58, p. 3689-3693, 2010b.

MA, T.H; XU, Z.; XU, C.; McCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. **The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants.** Mutation Research, v.334, p.185 195, 1995.

MA, X.; LEE, J.G.; DENG, Y.; KOLMAKOV, A. **Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation.** Science of the Total Environmental, vol.408, p.3053-3061, 2010

MAJER, B.J.; GRUMMT, T.; UHL, M.; KNASMULLER, S. **Use of Plant Bioassays for the detection of genotoxins in the Aquatic Environment.** Acta hydrochim. Hydrobiol, vol.33, p.45-55, 2005.

MALVERN, 2015. **A basic guide to particle characterization.** Disponível em <http://www.malvern.com/en/>. Acesso em setembro de 2015.

MANDZY, N.; GRULKE, E.; DRUFFEL, T. **Breakage of TiO₂ agglomerates in electrostatically stabilizes aqueous dispersions.** Powder Technol., vol. 160, p. 121-126, 2005.

MAO, Y.Z.; MA, S.Y.; LI, W.Q.; LUO, J.; CHENG, L.; GENGZANG, D.J.; XU, X.L. **Synthesis of porous small-sized ZnO nanoparticles and their gas-sensing performance.** Materials Letters vol. 157, p. 151–154 , 2015.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. **Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L.** Environmental Research, v.94, p.221-226, 2004.

MOHAMED, H.R.H. **Estimation of TiO₂ nanoparticles-induced genotoxicity persistence and possible chronic gastritis-induction in mice.** Food and Chemical Toxicology, vol.83, p.76-83, 2015.

MOHAMMED, K.P.; AAREY, A.; TAMKEEN, S.; JAHAN, P. **Forskolin: Genotoxicity assessment in *Allium cepa*.** Mutation Research, vol. 777, p. 29-32, 2015.

MOORE, M.N. **Do nanoparticles presente ecotoxicological risk for the health of the aquatic environment?** Environment International, vol. 32, p. 967 – 976, 2006.

MONICA, R.C.; CREMONINI, R. **Nanoparticles and higher plants.** Caryologia, vol.62, p.161-165, 2009.

NAVARRO, E.; BAUN, A.; BEHRA, R.; HARTMANN, N.B.; FILSER, J.; MIAO, A.J.; QUIGG, A.; SANTSCHI, P.H.; SIGG, L. **Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi.** Ecotoxicology, vol. 17, p.372-386, 2008.

NELLGUND, M.; KARTHIKEYAN, B.; SHIVASHANKAR, S.A.; OKI, A. **Single-step, size-controlled synthesis of colloidal silver nanoparticles stabilized by octadecylamine.** Applied Surface Science, vol. 356, p. 726–731 , 2015.

NIGRO, M.; BERNARDESCHI, M.; COSTAGIOLA, DELLATORRE, C.; FRENZILLI, G.; GUIDI, P.; LUCCHESI, P.; MOTTOLA, F.; SANTONASTASO M.; SCARCELLI, V.; MONACI, F.; CORSI, I.; STINGO, V.; ROCCO, L. **n-TiO₂ and CdCl₂ co-exposure to titanium dioxide nanoparticles and cadmium: Genomic, DNA and chromosomal damage evaluation in the marine fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax*).** Aquatic Toxicology, vol.168, p.72-77, 2015.

NUR, Y.; LEAD, J.R.; BAALOUSHA, M. **Evaluation of charge and agglomeration behavior of TiO₂ nanoparticles in ecotoxicological media.** Science of the Total Environment, vol. 535, p. 45-53, 2015.

O'BRIEN, P.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plants structure principles and selected methods.** Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltda, p.345, 1981.

OKUPNIK, A.; JARA, V.C.; PFLUGMACHER, S. **Potential role of engineered nanoparticles as contaminant carriers in aquatic ecosystems: Estimating sorption processes of the cyanobacterial toxin microcystin-Lr by TiO₂ nanoparticiles.** Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, v. 481, p. 460-467, 2015.

OLIVEIRA, I; MELO, C.A.F; SILVA, M.L; LIMA, L.G; CARVALHO, R. **Observação de cromossomos: Ciclo mitótico em vegetais.** X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, JEPEX, UFPRE, p. 1, 2010.

PAKRASHI, S.; JAIN, N.; DALAI, S.; JAYAKUMAR, J.; CHANDRASEKARAN, P.T. **In Vivo Genotoxicity Assessment of Titanium Dioxide Nanoparticles by *Allium cepa* Root Tip Assay at High Exposure Concentrations.** PLoS ONE 9(2): e87789. doi:10.1371/journal.pone.0087789, 2014.

PIERRI, J.J.; MAESTRELLI, S.C.; PALLONE, E.M.J.A.; TOMASI, R. **Dispersion of nanoparticles of ZrO₂ for the production of ZrO₂ nanocomposites in Al₂O₃ matrix.** Cerâmica, vol.51, p.8-12, 2005.

PINHEIRO, G.S.; ANGELOTTI, F.; SANTANA, C.V.; DANTAS, B.F.; COSTA, N.D. **Efeito da temperatura sobre a germinação de sementes de cebola.** Scientia Plena, vol. 10, n. 11, p. 1-6, 2014.

RABOLLI, V.; THOMASSEN, L.C.J.; UWAMBAYINEMA, F.; MARTENS, J.A. **The cytotoxic activity of amorphous sílica nanoparticles in mainly influenced by surface área and not by aggregation.** Toxicology Letters, vol. 206, p. 197-203, 2011.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. **A modified *Allium test* as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures.** Hereditas, v. 18, p. 49-53, 1993

RANK, J.; NIELSEN, M.H. ***Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on *N*-methyl-*N*-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate.** Mutation Research, v.390, p.121-127, 1997.

REYNOLDS, E. **The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.** J Cell Biol., vol. 17, p. 208-212, 1963.

RICHARDSON, S.D. **Water analysis: Emerging contaminants and current issues.** Analytical Chemistry, vol. 79, p. 4295-4324, 2007.

RICHARDSON, S.D. **Water Analysis: Emerging contaminants and current issues**. Anal. chem, vol. 81, p. 4645-4677, 2009.

RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.484, 2013.

ROSENBERGER, I.; STRAUSS, A.; DOBIASCH, S.; WEIS, C.; SZANYI, S.; ICETA, L.; ALONSO, E.; ESPARZA, M.G.; VALLEJO, V.G.; SZCZUPAK, B.; GARCIA, S.P.; MIRZAEI, S.; ISRAEL, L.L.; BIANCHESSI, S.; SCANZIANI, E.; LELLOUCHE, J.P.; KNOLL, P.; WERNER, J.; FELIX, K.; GRENACHER, L.; REESE, T. **Targeted diagnostic magnetic nanoparticles for medicinal imaging of pancreatic cancer**. Journal of Controlled Release, vol. 214, p. 76-84, 2015.

SALLEM, P.M.; IQBAL, J.; SHAH, M.H. **Geochemical speciation, anthropogenic contamination, risk assessment and source identification of selected metals in freshwater sediments – A case study from Mangla Lake**. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, vol. 4, p. 27-36, 2015.

SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; SILVA, L.C.D.; AZEVEDO, A.A.; AGUIAR, R. **Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae)**. Brazilian Archives of Biology and Technology, vol.49, p. 313-321, 2006.

SANTOS, S.A.D.; TUFFI-SANTOS, L.D.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, L.F.; JUNIOR, A.D.S. **Influence of shading on the leaf morphoanatomy and tolerance to glyphosate in *Commelina benghalensis* L. and *Cyperus rotundus* L.**

SATO, R.; ISHIKAWA, S.; SATO, H.; SATO, T. **Magnetic order of Au nanoparticle with clean surface**. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, vol. 393, p. 209-212, 2015.

SCHWAB, F.; ZHAI G.; KERN, M.; TURNER, A. **Barriers, pathways and processes for uptake translocation and accumulation of nanomaterials in plants – Critical review**. Nanotoxicology, vol. 10, p. 1-22, 2016.

SCHWARTZ, S.G.; SCOTT, I.U.; FLYNN J.H.W.; STEWART, M.W. **Drug delivery techniques for treating age-related macular degeneration**. Expert Opin Drug Deliv, vol. 11, p. 61-68, 2014.

SERVIN, A.; WHITE, J.C. **Nanotechnology in agriculture: Next steps for understanding engineered nanoparticle exposure and risk**. Nanoimpact, vol. 1, p. 9-12, 2016.

SILVA, F.C. *et al.* **Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos**. Revista Científica FAEMA, Rondônia, v. 2, n. 1, p. 13-21, 2011.

SILVA, F.O.; SOUZA, L.C.; FERREIRA, D.L.; ALVES, J.L.A.; SCHIAVON, M.A. **O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais.** Química nova, vol.33, p.1933-1939, 2010.

SINGH, T.; GOEL, R.K. **Neuroprotective effect of *Allium cepa L.* in aluminium chloride induced neurotoxicity.** NeuroToxicology, vol. 49, p. 1-7, 2015.

STAMPOULIS, D.; SINHA, S.K.; WHITE, J.C. **Assay dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants.** Environ. Sci. Technol, vol. 43, p. 9473-9479, 2009.

STAQUICINI F.I.; OZAWA, M.G.; MOYA, C.A.; DRIESSEN, W.H.; BARBU, E.M.; NISHIMORI, H.; *et al.* **Systemic combinatorial peptide selection yields a non canonical iron-mimicry mechanism for targeting tumors in a mouse model of human glioblastoma.** J. Clin. Invest., vol. 121, p. 161-173, 2011.

SUZUKI, K.G.N.; FUJIWARA, T.K.; EDDIN, M.; KUSUMI, A. **GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and G α for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study 1.** J. Cell Biol., vol. 177, p. 717-730, 2007.

TERNER, T. **Occurrence, fate, removal and assessment of emerging contaminants in water in the water cycle.** Water Research, vol. 72, p. 1-2, 2015.

TERZOUDI, G.I.; HATZI, V.I.; BAKOYIANNI, C.D.; PANTELIAS, G.E. **Chromatin dynamics during cell cycle mediate conversion of DNA damage into chromatid breaks and affect formation of chromosomal aberrations: Biological and clinical significance.** Mutation Research, vol. 711, p.174-186, 2011.

TEUBL, B.J.; LEITINGER, G.; SCHNEIDER, M.; LEHR, C.M.; FROHLICH, E.; ZIMMER, A.; ROBLEGG, E. **The buccal mucosa as a route for TiO₂ nanoparticle uptake.** Nanotoxicology, Early Online: 1–9, DOI: 10.3109/17435390.2014.921343, 2014.

TOPUZ, E.; TRABER, J.; SIGG, L.; TALINLI I. **Agglomeration of Ag and TiO₂ nanoparticles in surface and wastewater: Role of calcium ions and of organic carbon fractions.** Environmental Pollution, v. 204, p. 313-323, 2015.

TRIPATHI, D.K.; SINGH, V.P.; PRASAD, S.M.; CHAUHAN, D.K.; DUBEY, N.K. **Silicon nanoparticles alleviate chromium (VI) phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings.** Plant Physiology et Biochemistry, doi: 10.1016/j.plaphy.2015.07.026, 2015.

TSUJII, H.; KAMADA, T. **A review of update clinical results of carbon ion radiotherapy.** Jap. J. Clin. Oncol, vol. 42, p.670-685, 2012

VICARI, T. **Avaliação genotóxica na nanopartícula de Dióxido de Titânio (TiO₂), Chumbo Inorgânico e Alumínio em bioensaios tróficos com *Hoplias intermedius* a aplicações do cultivo celular primário tridimensional (cultivo 3D) nos estudos com nanopartículas.** Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, 2015.

WARHEIT, D.B.; BOATMAN, R.; BROWN, S.C. **Developmental toxicity studies with 6 forms of titanium dioxide test materials (3 pigment-different grade & 3 nanoscale) demonstrate na absence of effects in orally-exposed rats.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol. 73, p. 887-896, 2015.

WENSUN, Y.; DUA, J.C; BOYANG, Y.J. **Interaction between titanium dioxide nanoparticles and human serum albumin revealed by fluorescence spectroscopy in the absence of photoactivation.** J Lumin, vol. 129, p.778–783, 2009

WHITE, P.A.; CLAXTON, L.D. **Mutagens in contaminated soil: a review.** Mutation Research/Reviews in Mutation Research, v. 567, n. 2, p. 227-345, 2004.

ZHANG, J.; FAN, S.; YANG, J.; DU, X.; LI, F.; HOU, H. **Petroleum contamination of soil and water, and their effects on vegetables by statistically analyzing entire data set.** Science of the total Environment, v. 476-477, p. 258-265, 2014.

ZHAO L.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; KONG, X.; HUA, Y. **Effects of pH on protein componentes of extracted oil bodies from diverse plant seeds and endogenous protease-induced oleosin hydrolysis.** Food Chemistry, vol. 200, p. 125-133, 2016.

ZHENG, L.; HONG, F.; LU, S.; LIU, C. **Effects on nano TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach.** Biol. Trace Elem Res J., vol. 104, p. 83-91, 2005.

ZHU X.; CHANG Y.; CHEN, Y. **Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticles aggregates in *Daphnia magna*.** Chemosphere, vol.78, p. 209-215, 2010.