

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VITÓRIA COLUCCI DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO
DE ZINCO - NÃO DOPADAS E DOPADAS POR ÉRBIO - EM LINHAGEM
CELULAR DE TRUTA ARCO-ÍRIS (RTG-2)

CURITIBA

2023

VITÓRIA COLUCCI DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO
DE ZINCO - NÃO DOPADAS E DOPADAS POR ÉRBIO - EM LINHAGEM
CELULAR DE TRUTA ARCO-ÍRIS (RTG-2)

Monografia apresentada ao curso de Graduação
em Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Bacharela
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Oliveira, Vitória Colucci de

Avaliação ecotoxicológica de nanopartículas de óxido de zinco – não dopadas e dopadas por érbio – em linhagem celular de truta arco-íris (RTG-2) / Vitória Colucci de Oliveira. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curso de graduação em Ciências Biológicas.

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

1. Citotoxicidade. 2. Genotoxicidade. 3. Cultivo celular. I. Cestari, Marta, 1959. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Curso de graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Bibliotecária: Camila de Souza Dorneles. CRB-9/2056

TERMO DE APROVAÇÃO

VITÓRIA COLUCCI DE OLIVEIRA

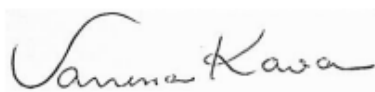
AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO
DE ZINCO - NÃO DOPADAS E DOPADAS POR ÉRBIO - EM LINHAGEM
CELULAR DE TRUTA ARCO-ÍRIS (RTG-2)

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.



Profª. Drª. Marta Margarete Cestari

Orientadora – Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Vanessa Merlo Kava

Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná



Dr. Rafael Shinji Akiyama Kitamura

Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 19 de dezembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e a todos os professores que estiveram presentes em meu percurso acadêmico. O conhecimento que compartilharam foi fundamental para o meu desenvolvimento e formação ao longo deste curso.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marta Margarete Cestari, que gentilmente abriu as portas do Laboratório de Mutagênese Ambiental para mim e aceitou conduzir meu trabalho. Agradeço por todo o apoio e ensinamentos que levarei para minha vida profissional e pessoal.

Aos meus pais e à minha irmã, agradeço por todo o amor incondicional, apoio constante e incentivo. Sem vocês, esta conquista não seria possível. Obrigada por serem minha fonte de inspiração e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu namorado, Pedro, expresso minha gratidão por estar presente, por sua paciência, por compreender minhas ausências e por me incentivar constantemente. Seu apoio foi fundamental para superar os momentos mais desafiadores. Sou profundamente grata por compartilhar a vida ao seu lado.

Aos meus amigos feitos ao longo da graduação, vocês são uma parte valiosa da minha jornada, tenho muito orgulho de todos vocês. Um agradecimento especial à Rebeca Pegollo, Júlia Liz e Pedro Macedo, agradeço pela amizade, pelos momentos incríveis compartilhados e por sempre estarem ao meu lado.

Aos meus colegas do laboratório e à equipe de pesquisa do Laboratório de Mutagênese Ambiental, especialmente à Natalia Guerra, Luis Phelipe Miranda, Eduarda Bordin e Welton Motta. Agradeço pela colaboração, troca de conhecimento e companheirismo. Valorizo todas as nossas conversas, risadas, conselhos e cafés ao longo do nosso trabalho juntos.

“A sabedoria dura mais que a beleza. E isto explica o fato de nos esforçarmos tanto para nos educarmos de modo tão exagerado.”

Oscar Wilde

RESUMO

A nanotecnologia tem sido uma área de constante crescimento, impulsionando avanços significativos na produção e consumo de nanopartículas (NPs). Um dos aspectos cruciais no desenvolvimento das NPs é a compreensão de sua toxicidade e impacto no meio ambiente, especialmente considerando sua dispersão no ecossistema aquático, que gera preocupações acerca de seus possíveis efeitos nesse ambiente. As nanopartículas de Óxido de Zinco (NP ZnO) têm despertado grande interesse devido às suas propriedades únicas e aplicações potenciais em diversos setores industriais, sendo reconhecidas por sua elevada toxicidade para organismos aquáticos. Para avaliar a toxicidade de diferentes contaminantes, modelos *in vitro* que utilizam células de peixes têm se mostrado valiosos em estudos ecotoxicológicos. Esses testes são alternativas para substituir os testes *in vivo* de toxicologia aguda em peixes. Neste contexto, esse estudo destaca o uso da linhagem RTG-2, derivada de gônadas de truta-arco-íris, com o objetivo de avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos da exposição de nanopartículas de ZnO, dopadas e não dopadas com Érbio [NP ZnO-Er]. As concentrações selecionadas (0,4; 4; 2; 4; 60; 80, 100 e 400 µg/mL) foram baseadas em estudos que comprovaram sua ação bactericida. A citotoxicidade foi avaliada através dos testes de AlamarBlue (AB), Vermelho Neutro (VN) e 5-Carboxyfluorescein Diacetate, Acetoxymethyl Ester (CFDA-AM). A genotoxicidade foi avaliada através do biomarcador genético Ensaio Cometa, utilizado para investigar possíveis danos no DNA induzidos pelas NP ZnO não dopadas e dopadas com Er. Como resultados, foram obtidos valores de IC₅₀ de 22,07, 22,17 e 52,64 µg/mL para os indicadores AB, CFDA e VN, para NP ZnO-Er e de 113,03, 105,15 e 76,06 µg/mL para NP ZnO, respectivamente. Observou-se um potencial citotóxico superior para NP ZnO dopadas com Er quando comparadas às não-dopadas. Quanto aos dados de genotoxicidade, estes apresentaram resultados significativos ($p < 0,05$) para ambas NPs, indicando danos no DNA na linhagem RTG-2 quando exposta à dopadas e não dopadas. Esse estudo se torna relevante devido a sua contribuição para o avanço do conhecimento na área da nanotecnologia, visto que compreender a toxicidade dessas nanopartículas é essencial para maximizar os benefícios e minimizar os riscos associados ao seu uso, impulsionando o progresso da nanotecnologia e suas aplicações futuras.

Palavras-chave: citotoxicidade; genotoxicidade; cultivo celular; modelos *in vitro*; células de peixe.

ABSTRACT

Nanotechnology has been an area of constant growth, driving innovative advances in the production and consumption of nanoparticles (NPs). One of the crucial aspects in the development of NPs is the understanding of their toxicity and impact on the environment, especially considering their dispersion in the aquatic ecosystem, which raises concerns about their possible effects in this environment. Zinc Oxide nanoparticles (NP ZnO) arouse great interest due to their unique properties and potential applications in various industrial sectors, being recognized for their high toxicity to aquatic organisms. To evaluate the toxicity of different contaminants, *in vitro* models using fish cells have been shown to be beneficial in ecotoxicological studies. These tests are alternatives to replace *in vivo* acute toxicology tests on fish. In this context, this study highlights the use of the RTG-2 strain, derived from rainbow trout gonads, with the aim of evaluating the genotoxic and cytotoxic effects of exposure to ZnO nanoparticles, doped and undoped with Erbium [NP ZnO -Er]. The selected concentrations (0.4; 4; 2; 4; 60; 80, 100 and 400 µg/mL) were based on studies that proved its bactericidal action. Cytotoxicity was evaluated using the AlamarBlue (AB), Neutral Red (VN) and 5-Carboxyfluorescein Diacetate, Acetoxymethyl Ester (CFDA-AM) tests. Genotoxicity was evaluated using the genetic biomarker Cometa Assay, used to investigate possible DNA damage induced by undoped and Er-doped ZnO NPs. As results, IC₅₀ values of 22.07, 22.17 and 52.64 µg/mL were obtained for the indicators AB, CFDA and VN, for NP ZnO-Er and 113.03, 105.15 and 76.06 µg/mL for NP ZnO, respectively. A higher cytotoxic potential was observed for ZnO NPs doped with Er when compared to non-doped ones. As for genotoxicity data, these showed significant results ($p < 0.05$) for both NPs, reducing DNA damage in the RTG-2 lineage when exposed to doped and undoped. This study becomes relevant due to its contribution to the advancement of knowledge in the area of nanotechnology, as understanding the toxicity of these nanoparticles is essential to maximize the benefits and minimize the risks associated with their use, boosting the progress of nanotechnology and its future applications.

Keywords: citotoxicology; genotoxicology; cell culture, *in vitro* models; fish cells.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DESENHO EXPERIMENTAL UTILIZADO NA PLACA DE CITOTOXICIDADE	27
FIGURA 2 – DESENHO EXPERIMENTAL UTILIZADO NA PLACA DE GENOTOXICIDADE	27
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DE DANO AOS NUCLEÓIDES	29
FIGURA 4 – VIABILIDADE CELULAR OBTIDA UTILIZANDO O INDICADOR DE CITOTOXICIDADE ALAMARBLUE, EM LINHAGEM RTG-2, APÓS EXPOSIÇÃO A NP ZnO-Er	31
FIGURA 5 – VIABILIDADE CELULAR OBTIDA UTILIZANDO O INDICADOR DE CITOTOXICIDADE CFDA-AM, EM LINHAGEM RTG-2, APÓS EXPOSIÇÃO A NP ZnO-Er	32
FIGURA 6 – VIABILIDADE CELULAR OBTIDA UTILIZANDO O INDICADOR DE CITOTOXICIDADE VERMELHO NEUTRO, EM LINHAGEM RTG-2, APÓS EXPOSIÇÃO A NP ZnO-Er.	32
FIGURA 7 – VIABILIDADE CELULAR OBTIDA UTILIZANDO O INDICADOR DE CITOTOXICIDADE ALAMARBLUE, EM LINHAGEM RTG-2, APÓS EXPOSIÇÃO A NP ZnO.	33
FIGURA 8 – VIABILIDADE CELULAR OBTIDA UTILIZANDO O INDICADOR DE CITOTOXICIDADE CFDA-AM, EM LINHAGEM RTG-2, APÓS EXPOSIÇÃO A NP ZnO.	33
FIGURA 9 – VIABILIDADE CELULAR OBTIDA UTILIZANDO O INDICADOR DE CITOTOXICIDADE VERMELHO NEUTRO, EM LINHAGEM RTG-2, APÓS EXPOSIÇÃO A NP ZnO.	34
FIGURA 10 – ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE PARA NP ZnO E NP ZnO-Er, OBTIDA ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA.	35
FIGURA 11 – ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOTOXICIDADE ENTRE NP ZnO E NP ZnO-Er, PARA CONCENTRAÇÃO DE 80 µg/mL	35

LISTA DE ABREVIATURAS

β -gal	- β galactosidase
AB	- AlamarBlue™ (resazurina)
CEC's	- <i>Contaminants of Emerging Concern</i>
CFDA-AM	- <i>5-Carboxyfluorescein Diacetate, Acetoxymethyl Ester</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EDTA	- Ácido etileno diamino tetra acético
Er	- Érbio
EROS	- Espécies Reativas de Oxigênio
GST	- Glutathione S-transferase
IC50	- Concentração Inibitória 50%
LMP	- <i>low melting point</i>
MMS	- Metil-metanosulfonato
MTT	- 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio
NPs	- Nanopartículas
NP ZnO	- Nanopartículas de Óxido de Zinco
NP ZnO-Er	- Nanopartículas de Óxido de Zinco dopadas com Érbio
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
RPM	- Rotações por minuto
RTG-2	- <i>Rainbow Trout Gonad</i>
RTgill	- <i>Rainbow Trout Gill</i>
SBF	- Soro Bovino Fetal
SCGE	- <i>Single Cell Gell Eletrophoresis</i>
tGSH	- Total de glutathione celular
VN	- Vermelho Neutro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo geral	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 IMPACTOS ANTRÓPICOS NOS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS	15
2.2 NANOTECNOLOGIA.....	16
2.3 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO	17
2.4 DOPAGEM DE NANOPARTÍCULAS E AÇÃO BACTERICIDA DE NP ZnO	19
2.5 ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA E APLICAÇÕES DE MODELOS <i>IN VITRO</i>	20
2.6 BIOMARCADORES	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO	23
3.2 CULTIVO DA LINHAGEM RTG-2	24
3.2.1 Descongelamento	24
3.2.2 Subcultivo.....	25
3.3 PLAQUEAMENTO	25
3.4 EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES.....	26
3.5 TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE	28
3.5.1 Testes de Citotoxicidade	28
3.5.2 Testes Genotóxicos.....	28
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
3.6.1 Testes de citotoxicidade	30
3.6.2 Testes de genotoxicidade.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 TESTES DE CITOTOXICIDADE	31

4.2 TESTES DE GENOTOXICIDADE	34
5 DISCUSSÃO	36
5.1 TESTES DE CITOTOXICIDADE	36
5.2 TESTES DE GENOTOXICIDADE	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

As indústrias são uma das principais responsáveis pela poluição ambiental, interferindo na saúde e preservação do meio ambiente através da liberação de diferentes produtos residuais tóxicos (Montagner; Vidal; Acayaba, 2017; Patel *et al.*, 2019). Os efluentes industriais apresentam um impacto significativo na contaminação de recursos ambientais, na qualidade das águas superficiais e subterrâneas, reduzindo o rendimento das culturas e prejudicando a vida aquática (Ibrahim; Ibrahim; Yusuf, 2021; Yadu *et al.*, 2020).

Atualmente, o campo científico-tecnológico da nanotecnologia passa por uma rápida evolução, resultando na produção em larga escala de produtos feitos com nanomateriais, principalmente nanopartículas (NPs). Esses materiais são muito cobiçados em indústrias por conta de suas propriedades funcionais únicas (Klingelfus *et al.*, 2019), como tamanho reduzido e alta reatividade (Bordin *et al.*, 2023; Bondarenko *et al.*, 2016; Gubala *et al.*, 2018; Serrà *et al.*, 2020).

Uma das nanopartículas (NPs) consideradas mais importantes são as nanopartículas de Óxido de Zinco (NP ZnO), graças a sua ampla utilização em diferentes áreas industriais, como cosmética, farmacêutica, de alimentos, e campos da agricultura e biomedicina (Bordin *et al.*, 2023; Mirzaei; Darroudi, 2017).

Sendo reconhecidamente tóxicas, as NP ZnO são bioacumuláveis em organismos aquáticos (Zhao *et al.*, 2013) e representam riscos para os organismos aquáticos (Cong *et al.*, 2017; Fernández *et al.*, 2013; Hao; Chen, 2012; Wu *et al.*, 2021). Graças a seu alto consumo e produção, a liberação desses materiais no meio ambiente acaba crescendo, tendo como resultado a ação tóxica nos organismos e em seus ecossistemas (Choi *et al.*, 2016), principalmente no ecossistema aquático.

Sabe-se que as NP ZnO possuem atividade bactericida devido a sua capacidade de geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), sendo capazes de causar ruptura do envelope celular, aumento da internalização celular e danos mecânicos (Król *et al.*, 2017). No entanto, seu desempenho individual para aplicações específicas ainda é limitado. Para superar essa limitação, a dopagem das NPs tem sido explorada com o objetivo de aprimorar suas características para diferentes fins (Patrinoiu *et al.*, 2019; Sánchez-López *et al.*, 2022). A dopagem de NPs com o elemento terra rara Érbio (Er) tem sido explorada como uma abordagem promissora para melhorar as propriedades das NPs, especialmente em relação ao possível aumento da atividade bactericida (Guanem *et al.*, 2019; Sánchez-López *et al.*, 2022).

Como objetivo de avaliar os efeitos tóxicos de diferentes agentes contaminantes no ecossistema aquático, peixes são considerados destaque como organismos-teste em testes toxicológicos (Hartl, 2015; Klingelfus *et al.*, 2019; Lapuente *et al.*, 2015). Porém, modelos alternativos como o uso de células de peixe (*in vitro*) têm ganhado espaço em estudos ecotoxicológicos como alternativa aos testes de toxicidade aguda em peixes. Sendo considerados sistemas experimentais eficazes, ideais para estudar mecanismos tóxicos em nível molecular e celular em ambiente controlado (Castano *et al.*, 2003; Žegura; Filipic, 2019). Nesses testes, é necessária a descrição prévia da identidade e caracterização dos nanomateriais utilizados, incluindo suas propriedades físico-químicas, comportamento e destino, para evitar a superestimação ou subestimação dos efeitos e conclusões errôneas (Lammel, 2018).

Uma das linhagens celulares amplamente utilizadas como modelo para prever a toxicidade em peixes é a linhagem proveniente da gônada do peixe truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Sendo conhecida como RTG-2 (*Rainbow trout gonad*), essa linhagem tem sido empregada em diferentes estudos de toxicidade (Fischer *et al.*, 2019; Natsch *et al.*, 2018; Tanneberger *et al.*, 2013).

Os testes com essa linhagem vêm sendo conduzidos através de modificações, obtidas a partir da diretriz de teste da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organisation for Economic Cooperation and Development* - OECD) (TG) N° 249 (OECD, 2021), que combina a utilização de diferentes biomarcadores de citotoxicidade, que medem a integridade da membrana, atividade lisossomal e atividade mitocondrial, em células de truta arco-íris.

Os biomarcadores, por sua vez, desempenham um papel fundamental como indicadores biológicos, permitindo a detecção de efeitos subletais e a avaliação da exposição a produtos químicos tóxicos em diferentes organismos (Connon; Geist; Werner, 2012). Tendo em vista a avaliação de danos genotóxicos causados por contaminantes, um dos biomarcadores mais utilizados é o Ensaio Cometa, usado para identificação de danos no DNA, sendo considerado um teste sensível, confiável, rápido e eficiente (Collins *et al.*, 2023; Scherer; Strohschoen, 2013). Esse teste é amplamente utilizado na genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, podendo ser aplicado em diversos tecidos animais, destacando-se por sua relevante vantagem em detectar toxicidade específica em órgãos ou tecidos investigados (Azqueta; Dusinska, 2015).

Devido ao avanço da nanotecnologia e à crescente dispersão de nanopartículas no ambiente, torna-se necessária a realização de estudos abrangentes para avaliar os potenciais impactos desses compostos em ecossistemas, principalmente aquáticos, bem como seus mecanismos de ação em diferentes organismos. Sendo interessante a utilização de modelos *in vitro* como método alternativo à experimentação animal, tendo em vista a aplicação dos 3R's de Russel e Burc (1959): *replacement*, *reduction* e *refinement* (substituição, redução e refinamento).

Com isso, este trabalho busca avaliar os efeitos toxicológicos das nanopartículas de óxido de zinco, não dopadas e dopadas com o elemento Érbio (Er) em diferentes concentrações que apresentam atividade bactericida comprovada, em linhagem celular de peixe (RTG-2) mediante aos testes citotóxicos (AlamarBlue™, CFDA-AM e Vermelho Neutro) e genotóxicos (Ensaio Cometa).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos toxicológicos da exposição de nanopartículas de ZnO não dopadas e dopadas com Érbio (Er), em células de cultivo de truta arco-íris RTG-2, a fim de elucidar o mecanismo de toxicidade destas nanopartículas e contribuir para o conhecimento referente a área da nanotoxicologia.

1.1.2 Objetivos específicos

- Definir a Concentração Inibitória de 50% (IC50) das NP ZnO não dopadas e dopadas com Érbio em linhagem celular RTG-2;
- Avaliar os efeitos citotóxicos de NP ZnO e NP ZnO-Er em linhagem celular RTG-2, utilizando os testes AlamarBlue, CFDA-AM e Vermelho Neutro;
- Avaliar os efeitos genotóxicos de NP ZnO e NP ZnO-Er em linhagem celular RTG-2, utilizando o Ensaio Cometa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPACTOS ANTRÓPICOS NOS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

A presença da água na Terra é abundante, representando um recurso natural vital e irremediável para a sobrevivência e manutenção das diversas formas de vida (Vörösmarty *et al.*, 2010). A utilização dos recursos hídricos pode ser classificada em diversas categorias de grande escala, incluindo o abastecimento público e industrial, recreação, produção de energia elétrica, entre outros. Essas atividades estão diretamente relacionadas à sociedade humana e ao desenvolvimento econômico.

A grande importância desse recurso faz com que seja crucial implementar medidas legais que assegurem a qualidade da água tanto superficial quanto subterrânea. A resolução CONAMA nº 430/2011 estabelece "condições e padrões de qualidade de água necessários para atender aos usos predominantes atuais e futuros". Em outras palavras, são definidas classes com base nos requisitos de qualidade da água, que são avaliados por meio de substâncias como oxigênio dissolvido na água e fósforo, presença de organismos como bactérias coliformes termotolerantes, e características físicas como transparência e odor, bem como características químicas como pH.

Com o desenvolvimento da civilização humana, os impactos gerados por ações de natureza antrópica no meio ambiente se tornaram um tema de grande relevância (Montagner; Vidal; Acayaba, 2017). Tendo em vista os recursos hídricos, as atividades humanas têm causado a deterioração das fontes naturais de água, agravada pelo contínuo crescimento do setor industrial e demográfico, junto com o descarte inadequado de esgotos sanitários e efluentes industriais tóxicos, sendo uma das principais fontes de contaminação dos corpos d'água (Bashir *et al.*, 2020; Cavalcante, 2020; Coutinho *et al.*, 2013; Lins *et al.*, 2010). Com o decorrer do tempo, essas ações têm causado consequências negativas principalmente aos ecossistemas aquáticos, modificando-o e alterando sua qualidade, devido serem utilizados como destino final para diversos compostos estranhos ao meio (Cavalcante, 2020).

No estudo feito por Ruddimann (2013), evidencia-se que as atividades industriais acarretam diversas consequências ambientais, incluindo: erosão profunda do solo, assoreamento das bacias hidrográficas, escoamento para as costas e

proliferação de algas, acidificação de lagos, córregos e rios, aumento da acidez dos oceanos em 30%, esgotamento/colapso da pesca primária, poluição de rios e fragmentação do ecossistema levando à perda de espécies - sendo a última considerada irreversível para os ecossistemas.

Dentre os diversos compostos produzidos pela ação antrópica, muitos podem ser classificados como contaminantes emergentes, ou CECs (*Contaminants of Emerging Concern*), substâncias que não são comumente monitoradas no meio-ambiente, mas que apresentam potencial de causar efeitos adversos à vida aquática, e até mesmo à saúde humana (Montagner *et al.*, 2019; Pastorino, 2021). Substâncias como fármacos, produtos de cuidado pessoal, pesticidas, nanomateriais e drogas ilícitas, são algumas das substâncias mais investigadas como contaminantes emergentes (Montagner *et al.*, 2019).

2.2 NANOTECNOLOGIA

No contexto do avanço industrial e tecnológico, o campo científico-tecnológico da nanotecnologia está passando por um rápido desenvolvimento. Sendo considerado um dos campos mais inovadores e amplamente estudados na atualidade, explorando as propriedades físicas e químicas da matéria que estão intrinsecamente relacionadas com as dimensões nanométricas (Dobretsov *et al.*, 2020; Khosravi-Katuli *et al.*, 2018). Esse progresso resulta na produção em grande escala de produtos fabricados com nanomateriais.

Essas estruturas nanométricas consistem em compostos com pelo menos uma de suas dimensões situada entre 1-100 nanômetros (nm) (European Commission, 2011). Esses nanomateriais são produzidos em grande escala e utilizados em uma variedade de setores – incluindo produção de energia, embalagens, cosméticos e fármacos – devido à sua capacidade de modificar drasticamente propriedades fundamentais, como físicas, químicas e mecânicas (ABDI, 2010; Bordin *et al.*, 2023).

Entre esses compostos, merece destaque a produção de nanopartículas (NPs), que despertam interesse para integração em tecnologias industriais e médicas, devido às suas propriedades óticas, estabilidade química e capacidade de penetração aprimorada, devido à sua vasta área superficial (Borm *et al.*, 2006; Kreyling *et al.*, 2006; Senthamarai; Malaikozhundan, 2022). Estima-se que cerca de 60.000 toneladas de NPs sejam sintetizadas anualmente (Murthy *et al.*, 2022). Essa produção

impulsiona soluções inovadoras em diversos setores industriais, permitindo aprimoramentos baseados em características específicas, como área superficial, tamanho da partícula, distribuição e morfologia (Candeia, 2021), viabilizando o desenvolvimento de materiais mais leves, resistentes e eficientes.

No entanto, devido ao seu alto consumo e produção, a liberação desses materiais no meio ambiente acaba aumentando, podendo apresentar ação tóxica nos organismos e em seus ecossistemas, exigindo uma avaliação das implicações ambientais decorrentes do uso generalizado de nanopartículas (Choi *et al.*, 2016). Níveis elevados de poluição são frequentemente observados, especialmente no ecossistema aquático (Serrà *et al.*, 2020), sendo um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo.

Diferentes estudos (Bordin *et al.*, 2023; Quina, 2004; Kennedy *et al.*, 2008; Hao; Chen, 2012) têm levantado preocupações acerca dos possíveis impactos de nanopartículas (NPs) em ecossistemas. Isso ocorre devido à capacidade desses compostos de interagirem com diferentes componentes do ecossistema aquático, alterando suas propriedades físicas ou químicas (Gubala *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2020), resultando em sua toxicidade para o meio ambiente. O tamanho das nanopartículas torna mais fácil a sua dispersão na atmosfera, em solos e águas, o que dificulta sua remoção e favorece sua entrada e acumulação em células vivas (Barbosa, 2017). Outros estudos (Farré *et al.*, 2009, Heinlaan *et al.*, 2008, Zhu *et al.*, 2010) também ressaltam a importância de considerar os efeitos das nanopartículas nos organismos aquáticos e a necessidade de preocupação com esses impactos.

2.3 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

Dentre a variedade de nanopartículas existentes, temos como destaque as Nanopartículas de Óxido de Zinco (NP ZnO), por permitirem alterações em seu tamanho, forma e química de superfície (Wu *et al.*, 2019). Devido a sua ampla aplicabilidade, se destacam pelo seu amplo uso em diversas áreas comerciais, sendo utilizadas em áreas como agricultura, biomedicina e cosméticos (Motta *et al.*, 2020; Murthy *et al.*, 2022; Noor *et al.*, 2021).

Essas NPs desempenham um papel essencial em uma ampla variedade de produtos de cuidados pessoais e cosméticos, sendo utilizadas na indústria cosmética para a formulação de cremes dentais e protetores solares (Khan *et al.*, 2016; Starnes

et al., 2019). Na indústria alimentícia, são empregadas para melhorar as embalagens plásticas destinadas ao armazenamento de alimentos (Ismail *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2021). Além disso, na indústria farmacêutica e biomédica, elas são utilizadas na composição de medicamentos, mostrando potencial de ação contra agentes microbianos (Li *et al.*, 2011). Além dessas aplicações, as nanopartículas também são empregadas em células solares (Jeong; Kim; Park, 2006), sensores de gás (Xu *et al.*, 2000), dispositivos fotocatalíticos, elétricos e óticos (Rekha *et al.*, 2010), bem como na formulação de produtos têxteis e tintas (Ma *et al.*, 2013; Motta *et al.*, 2020).

A ampla utilização das nanopartículas de ZnO resulta em um aumento de sua liberação direta ou indireta no meio ambiente, especialmente em ambientes aquáticos. Concentrações mais elevadas de nanopartículas de ZnO no ambiente aquático do que em outros ambientes têm sido identificadas, uma vez que esses ambientes representam o destino final de várias substâncias (Bystrzejewska-Piotrowska *et al.*, 2009). Esse cenário gera preocupações quanto à interação das nanopartículas de ZnO com organismos vivos, particularmente aqueles encontrados em ambientes aquáticos, uma vez que têm sido expostos a essas nanopartículas manufaturadas (Almansour *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2010).

Estudos têm sido conduzidos para investigar a toxicidade de NP ZnO em organismos aquáticos, sugerindo que esses compostos podem afetar a sobrevivência, o crescimento, a reprodução e o comportamento desses organismos (Falfushynska *et al.*, 2019; Noor *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Os principais mecanismos de toxicidade propostos pela literatura são: (1) os danos físicos diretos causados pelas NPs, devido a suas características específicas; (2) a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que inibem enzimas antioxidantes e induzem estresse oxidativo; e (3) a liberação de íons Zn^{2+} , que perturbam a homeostase dos sistemas (Bondarenko *et al.*, 2016; Falfushynska *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2020; Gubala *et al.*, 2018; Serrà *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

A toxicidade das NPs pode atingir diferentes magnitudes de complicações para os organismos aquáticos, ocasionando desde danos fisiológicos até danos genéticos, atingindo vários níveis biológicos, como molecular, celular e sistêmico (Gubala *et al.*, 2018). O estresse oxidativo, danos à membrana celular e ao envoltório nuclear, além da ruptura de atividade metabólica são apenas alguns mecanismos pelos quais as NPs podem causar toxicidade (Li *et al.*, 2020).

Estudos mostram que as NP ZnO apresentam danos significativos para os

organismos aquáticos devido ao seu caráter bioacumulador (Wu *et al.*, 2022). Além disso, podem induzir estresse oxidativo, danos em órgãos, mutagenicidade, genotoxicidade, malformação e anormalidades morfológicas em larvas de peixes, entre outros tipos de danos (Cong *et al.*, 2017; Hao; Chen, 2012; Kteeba *et al.*, 2017; Motta *et al.*, 2020; Murthy *et al.*, 2022). Esses estudos indicam que as NP ZnO podem representar riscos para os organismos aquáticos. No entanto, é importante ressaltar que os efeitos tóxicos podem variar dependendo da sua síntese e de suas condições específicas – como a concentração das nanopartículas, a duração da exposição e as características do organismo em estudo – que devem ser consideradas para não gerar interpolação/extrapolação referente aos riscos que a substância pode gerar (McCarty *et al.*, 2020).

Nesse contexto, as nanopartículas de ZnO são consideradas como contaminantes emergentes, devido ao aumento de seu uso e à falta de monitoramento de sua presença nos compartimentos ambientais (Gubala *et al.*, 2018). No Brasil, elas ainda não são abordadas em legislações ambientais - essa lacuna é motivo de grande preocupação devido ao baixo índice de tratamento de efluentes, que representa o principal fator de contaminação das águas nacionais (Disner, 2018).

2.4 DOPAGEM DE NANOPARTÍCULAS E AÇÃO BACTERICIDA DE NP ZnO

A dopagem intencional de NPs tem sido explorada com vários objetivos, incluindo aplicações biomédicas, agrícolas e de sensores, sendo descrita como “a inserção intencional de elementos estranhos em uma rede cristalina vazia de outro elemento para alterar suas propriedades” (Shenoy *et al.*, 2022). É considerado um método padrão utilizado para alterar as características físicas, químicas, óticas, elétricas e biológicas das nanopartículas, buscando melhorar seu desempenho em aplicações específicas (Rekha *et al.*, 2010).

De acordo com Freitas (2018), diversos metais podem ser utilizados como dopantes, dentre os quais pode-se destacar o alumínio, prata, molibdênio, níquel, gálio, cobalto, cobre e elementos terras raras (Karthikeyan *et al.*, 2019). Uma das consequências da dopagem é a redução do *band gap*, que consiste na quantidade de energia necessária para a promoção do elétron a um nível superior da banda de valência (Raja *et al.*, 2014, Freitas, 2018).

A dopagem das nanopartículas tem sido explorada para adaptar as

propriedades das nanopartículas para atender a requisitos específicos de aplicação, sendo que o mecanismo da dopagem depende do material e do tipo de substância introduzida. Suas aplicações consistem em: aumento da tolerância ao estresse das nanopartículas de ferro na agricultura (Sharma *et al.*, 2022); produção de semicondutores com altos graus de precisão (Cho *et al.*, 2017; Gong *et al.*, 2018); melhoramento da condutividade elétrica de polímeros condutores para o uso de células solares, catálise, células de combustível, entre outros (Wang *et al.*, 2018). Na medicina, nanopartículas de óxido de zinco dopadas têm sido exploradas para uso potencial na administração de medicamentos, geração de imagens e terapia contra o câncer (Carofiglio *et al.*, 2020).

As nanopartículas de ZnO possuem atividade bactericida devido à sua capacidade de gerar Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), resultantes da atividade fotocatalítica que envolve a movimentação de elétrons na superfície dessas nanopartículas, as quais podem provocar a ruptura do envelope celular, aumento da internalização celular e danos mecânicos (Król *et al.*, 2017). No entanto, o desempenho individual dessas partículas para aplicações específicas permanece limitado. Como solução para essa limitação, a dopagem das nanopartículas tem sido explorada com o intuito de aprimorar suas características para diferentes fins (Sánchez-López *et al.*, 2022; Patrinoiu *et al.*, 2019).

A dopagem das nanopartículas com o elemento de terra rara Érbio (Er) tem sido investigada como uma abordagem promissora para a melhoria das propriedades das nanopartículas, especialmente em relação ao possível aumento da atividade antimicrobiana (Ghanem *et al.*, 2019; Sánchez-López *et al.*, 2022).

2.5 ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA E APLICAÇÕES DE MODELOS *IN VITRO*

Considerando que o ecossistema aquático é o principal destino final de NPs, testes de toxicidade em organismos aquáticos têm sido amplamente utilizados para compreender os impactos ecológicos de diferentes contaminantes (Bashir *et al.*, 2020; Klingelfus, 2019; Sedeño-Díaz; López-López, 2012). Os peixes merecem destaque devido a sua ampla utilização como organismos modelo, sua representatividade ecológica, sua posição chave nas cadeias alimentares e sua sensibilidade a diversas substâncias (Mishra *et al.*, 2005; Montanha, 2012). Por ocuparem diversos níveis da cadeia trófica, permitem uma maior compreensão dos efeitos tóxicos das substâncias

ao longo da cadeia alimentar e suas potenciais consequências para a biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas (Carvalho, 2009).

Como alternativa aos testes de toxicidade em peixes, o uso de linhagens celulares de peixe (*in vitro*) tem sido amplamente utilizado em estudos ecotoxicológicos. Esse método apresenta grande relevância no auxílio da implementação do princípio dos 3R's de Russel e Burc (1959) – *replacement, reduction e refinement* – na experimentação animal, sendo uma abordagem ética e científica que visa reduzir, refinar e substituir o uso de animais em pesquisas científicas (OECD, 2012). Linhagens celulares derivadas de peixes são consideradas modelos experimentais adequados para estudar a toxicidade de poluentes ambientais, permitindo a compreensão do mecanismo de ação dos contaminantes a nível celular, sendo um teste delicado que fornece resultados rápidos, acessíveis e eticamente elegíveis (Castano *et al.*, 2003; Žegura; Filipic, 2019).

Tendo em vista as espécies utilizadas em estudos de ecotoxicologia, é relevante a espécie *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), sendo uma espécie com bom grau de sensibilidade a diversos compostos. As linhagens celulares RTG-2, obtidas a partir das gônadas de uma truta arco-íris juvenil, e a linhagem RTgill-W1, proveniente dos filamentos branquiais, são muito utilizadas em estudos ecotoxicológicos para prever a toxicidade em peixes (Fischer *et al.*, 2019; Natsch *et al.*, 2018; Tanneberger *et al.*, 2013).

No contexto de citotoxicidade *in vitro*, os testes são realizados utilizando-se uma ampla faixa de concentrações crescentes da substância, a fim de determinar a resposta celular em relação à toxicidade. As pesquisas de citotoxicidade recentemente obtiveram a regulamentação validada pela OECD, para a linhagem RTgill (*rainbow trout guill*) (OECD, 2021). Entretanto, para as linhagens RTG-2 não existem protocolos legitimados para sua utilização, porém já existem trabalhos que utilizam adaptações dos protocolos da OECD (de Souza *et al.*, 2023) para que seja possível trabalhar com essas diferentes linhagens.

2.6 BIOMARCADORES

Seguindo a *World Health Organization* (1996), os biomarcadores podem ser definidos como qualquer substância, produto de biotransformação, ou até mesmo

alterações bioquímicas precoces, cuja determinação nos fluídos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde, auxiliando na avaliação da qualidade de vida do organismo e fazendo inferências sobre o meio ambiente. Esses indicadores biológicos fornecem informações sobre a exposição a agentes genotóxicos e os danos resultantes no material genético, sendo essenciais para identificar, quantificar e monitorar os efeitos genotóxicos de substâncias em organismos (Amorim, 2003; WHO, 1993).

2.6.1 Biomarcadores Genotóxicos

A eletroforese de célula única (*Single Cell Gell Eletrophoresis* - SCGE), mais conhecida como Ensaio Cometa, é um dos biomarcadores mais amplamente utilizados em estudos de genotoxicidade, para a avaliação de danos no DNA de células individualizadas. Podendo ser aplicado em uma variedade de tipos de células eucarióticas, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Azqueta; Dusinska, 2015; Ferraro *et al.*, 2004). É uma técnica extensamente utilizada e reconhecida para analisar lesões, monitorar danos e detectar os efeitos de reparo no DNA em células individuais expostas a agentes genotóxicos, fornecendo informações valiosas sobre o potencial genotóxico de substâncias químicas, radiação e outros agentes ambientais (Cordelli *et al*, 2021; Scherer; Strohschen, 2013).

2.6.2 Biomarcadores Citotóxicos

Tendo em vista que a OECD tem publicado diretrizes para vários métodos *in vivo* validados e padronizados para ensaios de citotoxicidade, cobrindo diferentes parâmetros que buscam avaliar a viabilidade do metabolismo celular, o *Guideline* OECD (TG) N°. 249 permite a avaliação de três parâmetros de viabilidade celular, sendo elas Vermelho Neutro (VN), Resazurina (*AlamarBlue*TM - AB) e 5-*Carboxyfluorescein Diacetate, Acetoxymethyl Ester* (CFDA-AM), para a determinação do valor de IC50. Esse índice representa a concentração da substância testada que tem capacidade de causar efeito citotóxico em 50% das células expostas, durante determinado período. Assim, é possível quantificar a eficácia da substância em inibir o crescimento celular ou induzir a morte celular (OECD, 2021).

O indicador Vermelho Neutro tem como medida a atividade lisossomal e

consequente viabilidade celular, sendo esse ensaio baseado na absorção do corante VN e internalização em lisossomos por células vivas, aferindo a permanência do corante através da absorbância (Repetto *et al.*, 2008). O ensaio da resazurina (*AlamarBlue™*), indicador de óxido-redução, se baseia na conversão da resazurina em resorufina, através de oxidoredutases mitocondriais, onde em células tratadas com substâncias que prejudiquem o metabolismo não ocorrerá a conversão da resafurina, sendo aferido pelas leituras de absorbância (O'Brien *et al.*, 2000; OECD, 2021). O indicador CFDA, é um substrato de esterase que atua na avaliação da integridade da membrana celular, se baseando na fluorescência emitida pelo corante para medir se ocorreu a retenção intracelular adequada de seu produto fluorescente, ou se ocorreu alguma perturbação na membrana plasmática (OECD, 2021).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foi utilizada a linhagem celular pertencente à espécie *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), conhecida popularmente como RTG-2 (ECACC 90102529), proveniente do tecido das gônadas de uma truta arco-íris saudável. Esta linhagem foi fornecida pela *University of Washington*, em parceria com a Prof^a. Daniela Leme, do laboratório de Ecotoxicologia *in vitro* da Universidade Federal do Paraná.

Durante a pesquisa, a linhagem passou por um procedimento de cultivo rotineiro, abrangendo as etapas de descongelamento, subcultivo, plaqueamento e exposição, para posterior avaliação nos testes citotóxicos e genotóxicos. Os protocolos de experimentos com RTG-2 seguiram a padronização da OECD (OECD, 2021), com modificações de Souza *et al.* (2023). Sendo o experimento realizado em triplicata.

3.1 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

As nanopartículas de ZnO foram fornecidas pelo Prof. Dr. Ney Pereira Mattoso Filho do Departamento de Física da Universidade Federal do Paraná. Estas NP ZnO (não dopadas e dopadas com Er), foram produzidas através do método sol-gel em sistema aberto.

As NP ZnO sintetizadas possuíam forma hexagonal cristalina, seu tamanho aproximado se deu no intervalo de 28 ± 1 nm. O material era composto por 41 ± 3 % de zinco e 59 ± 5 % de oxigênio, já o material dopado continha as concentração de zinco de 47 ± 2 %, de oxigênio de 52 ± 3 %, e de érbio 2%.

3.2 CULTIVO DA LINHAGEM RTG-2

As células RTG-2 são cultivadas em meio de cultura *Leibovitz-15* (L-15) completo, suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 1% de Penstrep (penicilina 1 µg/mL, estreptomicina 1 µg/mL).

3.2.1 Descongelamento

As células estoque foram conservadas em nitrogênio líquido, sendo realizado o processo de descongelamento para sua utilização. Esse processo foi feito rapidamente, não excedendo mais que 5 minutos, em prol de não prejudicar a viabilidade celular, evitando a formação de cristais de gelo no interior das células (Freshney, 2010).

O vial foi retirado do nitrogênio líquido e aquecido rapidamente em banho-maria a 22°C, até que as células estivessem descongeladas. Em seguida, o conteúdo do vial foi transferido para um tubo de 15 mL, contendo 9 mL de meio L-15 completo, previamente estabilizado em incubadora do tipo BOD (20°C). Essa transferência foi realizada vagarosamente, iniciando por gotejamento e aumentando gradativamente a velocidade de adição ao meio, para que não ocorresse choque osmótico nas células. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e o tubo foi centrifugado durante 5 minutos, a 1500 rpm. Após o tempo de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de meio completo.

A suspensão de células obtida (1 mL - 1×10^6 células) foi semeada em garrafa de cultivo de 75 cm², contendo 14 mL de meio completo L-15. O frasco de cultivo foi mantido incubado a 22 °C, em BOD, para crescimento da cultura até que se atingisse a confluência ideal para o subcultivo.

3.2.2 Subcultivo

O crescimento das células foi acompanhado até se verificar visualmente uma confluência de aproximadamente 80%, a qual foi atingida cerca de uma semana após o descongelamento. Nesse momento, o subcultivo foi realizado para evitar o crescimento excessivo das células na garrafa de cultivo, a qual pode provocar alterações na morfologia das células, devido a inibição de crescimento por contato entre as células.

Primeiramente, o meio de cultivo completo L-15 consumido foi descartado e a garrafa de cultivo foi lavada com solução tampão fosfato-salina (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), mantendo o pH da solução em torno de 7. Em seguida, foi adicionada a enzima tripsina 1x concentrada (0,05%) para dissociar as células aderentes na superfície da garrafa de cultivo, através da quebra das proteínas de membrana, sendo o frasco incubado durante 4-5 minutos a 22°C.

Decorrido o tempo de incubação, a tripsina foi inativada imediatamente com a adição de meio completo contendo SBF. Em seguida, o conteúdo do frasco de cultivo foi transferido para um tubo de 15 mL, sendo centrifugado a 1500 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1 mL de meio completo L-15. Por fim, as células foram semeadas em uma nova garrafa de cultivo de maior área, de 175 cm² (T175), contendo 30 mL de meio completo, a qual foi incubada a 22°C na BOD.

3.3 PLAQUEAMENTO

Quando verificada uma confluência de 100% na garrafa T175, as células foram plaqueadas, de modo que cada garrafa foi utilizada para obtenção de duas placas. O plaqueamento ocorreu nas placas de 96 poços (densidade celular de 2×10^4 células por poço) e 24 poços (densidade celular de 7×10^4 células por poço), destinadas aos testes de citotoxicidade e genotoxicidade, respectivamente.

Foram seguidos os procedimentos de subcultivo apresentados anteriormente (item 3.2.2). No entanto, após processo de centrifugação, as células foram contabilizadas na Câmara de Neubauer. Para determinação da quantidade de células presentes na suspensão celular, uma alíquota de 10 µL foi coletada e adicionada a um microtubo, sendo corada com 10 µL de Trypan blue. Em seguida, 10 µL dessa

solução foram adicionados à Câmara de Neubauer, onde foram contabilizadas as células do quadrante central, sendo determinadas a quantidade de células totais presentes na amostra para o plaqueamento (Equação 1). Dessa maneira, na placa de 96 poços foram depositadas 20 mil células por poço, enquanto na placa de 24 poços foram depositadas 70 mil células por poço. As placas foram mantidas em processo de estabilização em incubadora BOD por até 48 horas, a 20°C.

EQUAÇÃO 1 - EQUAÇÃO DE CONTABILIZAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS NA SOLUÇÃO

$$N^{\circ} \text{ total de células} = N^{\circ} \text{ de células contabilizadas} \times 10^4 \times \text{fator de diluição}$$

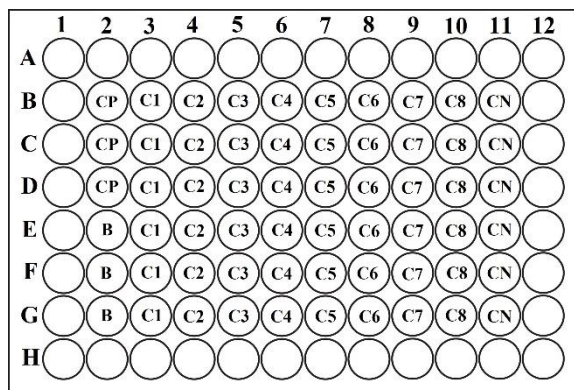
3.4 EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES

Passado o tempo ideal de estabilização das placas, ocorreu a exposição aos contaminantes. A determinação do intervalo de concentrações utilizado foi fundamentada nos estudos de Bondarenko *et al.* (2016), Dasari *et al.* (2013), Dobretsov *et al.* (2020), Feng *et al.* (2020), Schiavo *et al.* (2018), Wu *et al.* (2019), onde a concentração de NP ZnO variou de 0,1 até 100 µg/mL.

Desta maneira, primeiramente as NP ZnO e NP ZnO-Er foram diluídas em meio L-15/ex (meio de exposição sem proteínas) (testes citotóxicos) ou meio L-15 completo (testes genotóxicos), e homogeneizadas em banho ultrassônico por 30 minutos. As concentrações utilizadas foram: 0,4; 4; 20; 40; 60; 80; 100 e 400 µg/mL, sendo expostas posteriormente ao banho ultrassônico. Essas concentrações utilizadas concordam com o apresentado na literatura, onde estas nanopartículas mostraram atividade antibiótica combatendo tanto bactérias gram-negativas quanto gram-positivas.

Para realizar a exposição, cada placa foi distribuída da seguinte forma: 1) A placa de citotoxicidade foi dividida em seis poços para cada concentração do contaminante, seis poços para controle negativo (somente meio L-15 ex), três poços para controle positivo (Triton x-100) e três poços para branco (ausência de células) (Figura 1).

FIGURA 1 – DESENHO EXPERIMENTAL UTILIZADO NA PLACA DE CITOTOXICIDADE

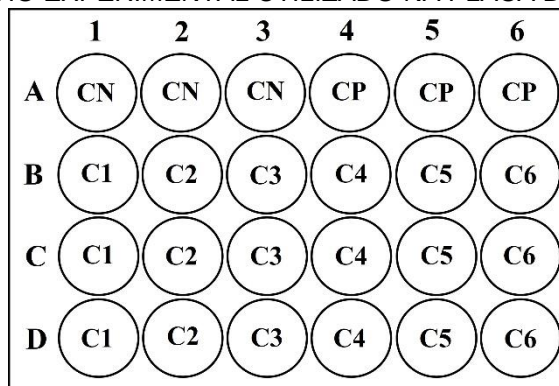


FONTE: A autora (2023).

LEGENDA: CP=triton x-100; CN=meio L-15/ex; C1=400 µg/mL; C2=100 µg/mL; C3=80 µg/mL; C4=60 µg/mL; C5=40 µg/mL; C6=20 µg/mL; C7=4 µg/mL; C8= 0,4 µg/mL. Os poços sem identificação foram expostos com apenas meio L-15/ex.

2) A placa de genotoxicidade seguiu a distribuição de três poços para cada concentração, três poços para controle negativo e três poços para controle positivo (MMS - Metil-metanosulfonato [1mM]) (Figura 2).

FIGURA 2 – DESENHO EXPERIMENTAL UTILIZADO NA PLACA DE GENOTOXICIDADE



FONTE: A Autora (2023).

LEGENDA: CN= meio L-15 completo; CP= MMS; C1=80 µg/mL; C2= 60 µg/mL; C3=40 µg/mL; C4=20 µg/mL; C5=4 µg/mL; C6= 0,4 µg/mL.

Para o teste de genotoxicidade as duas maiores concentrações (100 e 400 µg/mL) não foram utilizadas por conta de serem comprovadamente citotóxicas por estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) (grupo de pesquisa de Citogenética e Mutagênese em Peixes). No procedimento, o meio L-15 completo foi removido de cada poço, sendo executada uma lavagem com PBS imediatamente antes da exposição. Após esse procedimento, cada poço recebeu sua solução correspondente, sendo adicionados 100 µL em cada poço da placa de 96 poços (L-1ex) e 500 µL em cada poço da placa de 24 poços (L-15). As placas foram incubadas por 24 horas a 20°C, sendo cobertas com alumínio para manter a condição

de escuro.

3.5 TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

3.5.1 Testes de Citotoxicidade

Para a avaliação da viabilidade celular após a exposição às NP ZnO e NP ZnO-Er, foram aplicados três indicadores fluorescentes: AlamarBlue™, CFDA e Vermelho Neutro. Esses testes foram conduzidos seguindo o protocolo disponibilizado pela OECD *guideline* nº 249 (OECD, 2021) com adaptações (de Souza *et al.*, 2023). Esses testes foram utilizados com o objetivo de determinar a IC₅₀, que representa a concentração da substância em estudo que causa um efeito citotóxico em 50% das células expostas durante 24 horas..

Após o tempo de exposição, as células foram lavadas com PBS 1x e incubadas com solução AlamarBlue/CFDA (100 µL/poço) por 30 min. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas nos comprimentos de onda de 530 e 493 nm. Em seguida, a solução dos poços foi descartada e as células foram incubadas com solução de Vermelho Neutro (100 µL/poço), durante 3 horas. Após o tempo decorrido, foi realizada uma lavagem com PBS e a placa foi incubada com solução de extração por 10 min (150 µL/poço), sendo homogeneizada levemente em shaker, na ausência de luz. A leitura de absorbância foi realizada com comprimento de onda de 540 nm.

3.5.2 Testes Genotóxicos

A genotoxicidade do contaminante foi analisada através do Ensaio Cometa Alcalino. O ensaio foi conduzido a partir da metodologia proposta por Singh *et al.* (1988), com modificações (Almeida *et al.*, 2023).

Como primeira etapa, as soluções de contaminante foram removidas e cada poço foi lavado com 1 mL de PBS 1x. A suspensão celular necessária foi obtida através da tripsinização da placa de 24 poços (500 µL/poço), sendo inativada com meio L-15 completo (500 µL/poço), onde cada poço foi ressuspensionado vagarosamente várias vezes. As amostras de cada poço foram coletadas e depositadas em seus respectivos microtubos (1,5 mL), devidamente identificados, que passaram por uma centrifugação a 1500 rpm, durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante

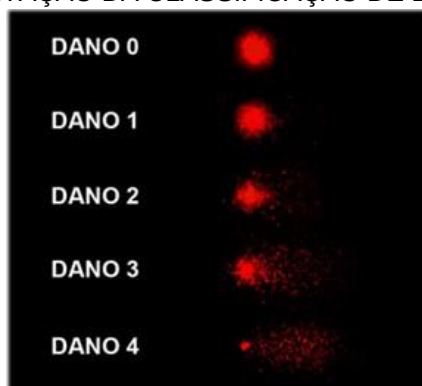
foi descartado e o pellet foi ressuspendido com aproximadamente 150 μ L de agarose LMP (*low melting point agarose*, 0,5%) para a montagem das lâminas em duplicata para cada respectivo poço. Foram adicionados 100 μ L do conteúdo restante em cada lâmina, que for cobertas por lamínulas e armazenadas em refrigeração por 10 minutos.

Decorrido o tempo de refrigeração, as lamínulas foram removidas e as lâminas mantidas imersas em solução de lise (10 mM Tris; 100 mM ácido etileno diamino tetra acético (EDTA), 2,5 M cloreto de sódio (NaCl); dimetilsulfóxido (DMSO) 10%, pH>10) durante 12 horas, a 4 °C. Decorrido o tempo de lise, as lâminas foram retiradas da solução de lise e acondicionadas em cubas de eletroforese, sendo estabilizadas em tampão alcalino de eletroforese (300 mM hidróxido de sódio (NaOH); 1 M EDTA; pH>13), por um período de 25 minutos. Em seguida, ocorreu a corrida eletroforética por 25 minutos a 300 mA, 1V/cm e a 4°C.

Após a corrida eletroforética, as lâminas foram neutralizadas com solução de neutralização (0,4 M Tris; pH 7,5), por 3 vezes durante 5 minutos, sendo fixadas em etanol absoluto por 5 minutos, após sua secagem ao ar. Para a análise, as lâminas foram coradas com 25 μ L de brometo de etídio, sendo imediatamente recobertas com lamínula e analisadas no microscópio de epifluorescência (Leica) 400x.

A análise se deu por teste cego de 100 nucleóides por lâmina, sendo seguida a classificação proposta por Collins *et al.* (1997) (Figura 3). A classificação se baseia na migração dos fragmentos de DNA, dividindo os danos em classes de 0 a 4, sendo: 0 (nenhum dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano moderado), 3 (dano extenso) e 4 (dano máximo). Após a contagem, escores foram aplicados a cada lâmina para posterior análise estatística.

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DE DANO AOS NUCLEÓIDES



FONTE: Klingelfus (2013).

LEGENDA: Dano 0 = nenhum dano aparente; Dano 1 = dano pequeno; Dano 2 = dano moderado; Dano 3 = dano extenso; Dano 4 = dano máximo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística de ambos os testes de citotoxicidade e genotoxicidade, foi utilizado o pacote estatístico GraphPad Prism m® 6.00(Trial).

3.6.1 Testes de citotoxicidade

Para os testes de citotoxicidade, os dados de viabilidade foram primeiramente transformados em log ($X=\log(X)$) para obtenção da curva de viabilidade. Em seguida, os dados foram analisados a partir de uma regressão não-linear, para que os valores de IC50 pudessem ser obtidos. Os valores de IC50 obtidos foram novamente transformados para que se obtivesse a real concentração em µg/mL.

3.6.2 Testes de genotoxicidade

Para avaliar a genotoxicidade, os dados foram inicialmente verificados quanto à normalidade por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Para mitigar possíveis influências de valores atípicos, outliers foram excluídos sempre que sua presença resultou em p-values inferiores a 0,01. Em seguida, os dados foram submetidos novamente aos testes de normalidade. Caso as distribuições não atendessem aos pressupostos paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi empregado, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. Em contrapartida, quando as distribuições foram consideradas paramétricas, o teste de ANOVA foi aplicado, seguido pelo teste de Dunnett para análises post-hoc.

Ao comparar as nanopartículas dopadas e não dopadas, a análise foi realizada da mesma forma, considerando a exclusão de outliers antes dos testes de normalidade. Posteriormente, nos casos em que as distribuições permitiram abordagens paramétricas, o teste t de Student foi empregado. Para situações não paramétricas foi adotado o teste de Mann-Whitney. Ambos os testes foram conduzidos de forma unicaudal, conforme a natureza das comparações realizadas. É relevante ressaltar que diferenças significativas entre as comparações foram consideradas apenas quando os valores de p foram inferiores a 0,05, indicando um nível aceitável de significância estatística.

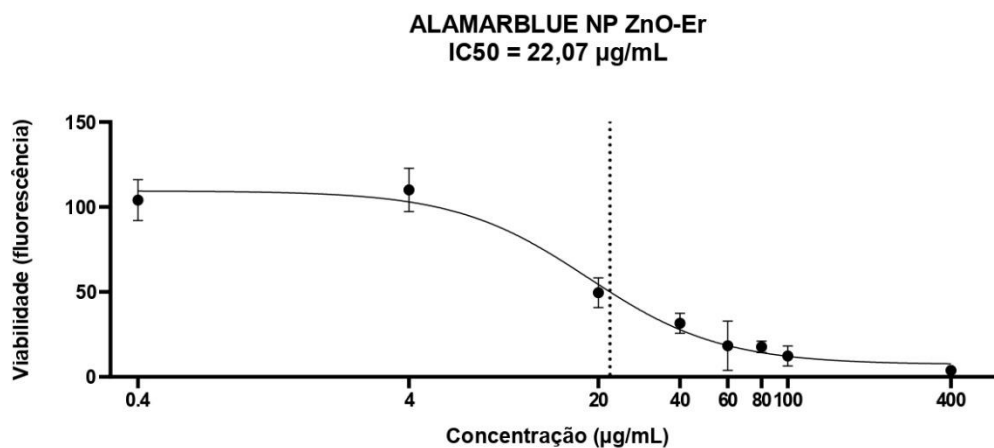
4 RESULTADOS

4.1 TESTES DE CITOTOXICIDADE

Para os testes citotóxicos do tratamento com as NP ZnO-Er foram obtidas três replicatas para cada indicador de viabilidade analisado (AlamarBlue™, CFDA-AM e Vermelho Neutro).

Todos os *endpoints* analisados diminuíram em concentrações superiores a 20 µg/mL. As replicatas de função mitocondrial (AB) e de integridade da membrana celular (CFDA-AM) resultaram em uma IC₅₀ de 22,07 µg/mL (Figura 4) e 22,17 µg/mL (Figura 5), respectivamente.

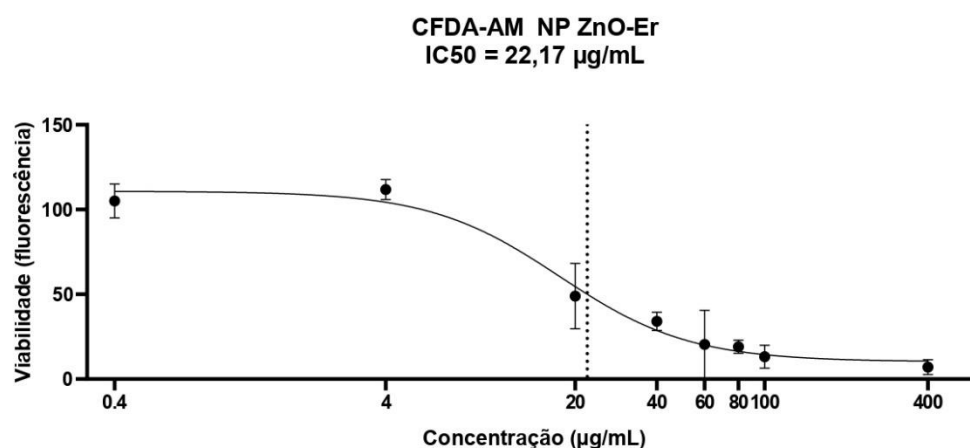
FIGURA 4 – VIABILIDADE CELULAR OBTIDA UTILIZANDO O INDICADOR DE CITOTOXICIDADE ALAMARBLUE, EM LINHAGEM RTG-2, APÓS EXPOSIÇÃO A NP ZnO(Er)



FONTE: A Autora (2023).

LEGENDA: Linha tracejada indica o valor IC₅₀ (22,07 µg/mL), determinado através do teste de citotoxicidade CFDA-AM, por regressão não-linear.

FIGURA 5 – VIABILIDADE CELULAR OBTIDA UTILIZANDO O INDICADOR DE CITOTOXICIDADE CFDA-AM, EM LINHAGEM RTG-2, APÓS EXPOSIÇÃO A NP ZnO(Er)

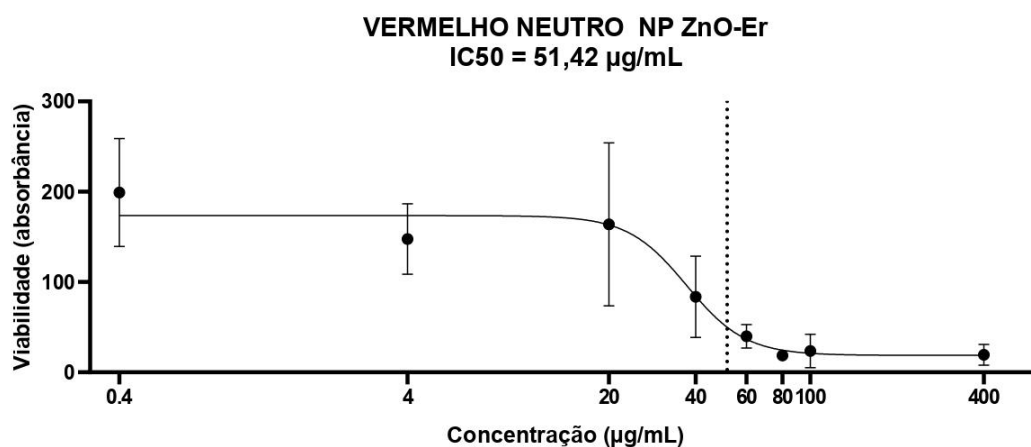


FONTE: A Autora (2023).

LEGENDA: Linha tracejada indica o valor IC₅₀ (22,17 µg/mL), determinado através do teste de citotoxicidade CFDA-AM, por regressão não-linear.

Em relação às replicatas para o *endpoint* de atividade lisossomal (VN), estas resultaram em uma IC₅₀ maior de 51,42 µg/mL (Figura 6), com maiores desvios-padrões entre os resultados.

FIGURA 6 – VIABILIDADE CELULAR OBTIDA UTILIZANDO O INDICADOR DE CITOTOXICIDADE VERMELHO NEUTRO, EM LINHAGEM RTG-2, APÓS EXPOSIÇÃO A NP ZnO(Er)



FONTE: A Autora (2023).

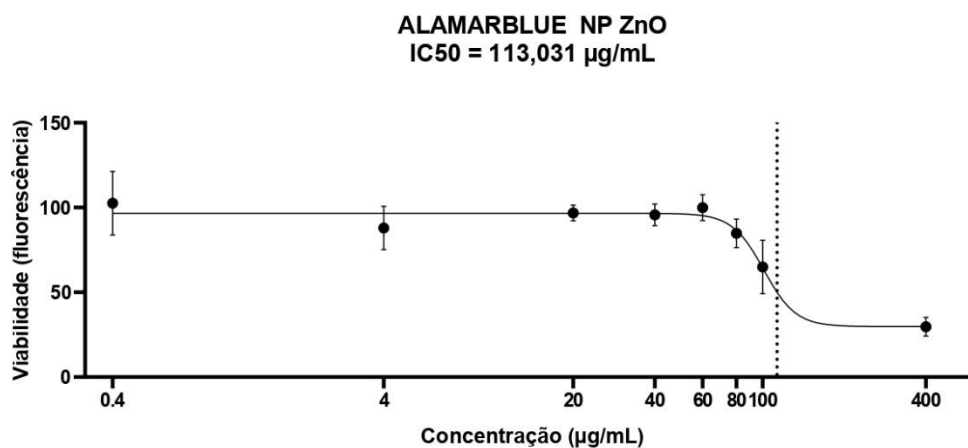
LEGENDA: Linha tracejada indica o valor IC₅₀ (51,42 µg/mL) determinado através do teste de citotoxicidade Vermelho Neutro, por regressão não-linear.

Em relação às respostas celulares, no tratamento com as NP ZnO foram obtidas apenas duas replicatas confiáveis para os indicadores AlamarBlue, CFDA-AM e Vermelho Neutro.

Nas análises de AB e CFDA foi possível observar que a função mitocondrial e

a integridade da membrana celular diminuíram em concentrações superiores a 60 $\mu\text{g/mL}$, sendo um valor duas vezes maior do que para as nanopartículas dopadas. Resultando em valores de IC_{50} maiores, sendo eles 113,03 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7) e 105,15 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8), para AB e CFDA-AM, respectivamente.

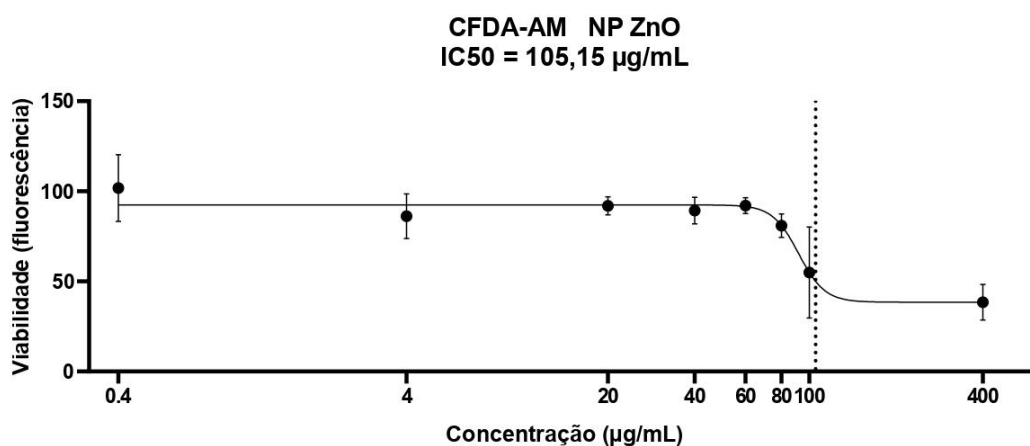
FIGURA 7 – VIABILIDADE CELULAR OBTIDA UTILIZANDO O INDICADOR DE CITOTOXICIDADE ALAMARBLUE, EM LINHAGEM RTG-2, APÓS EXPOSIÇÃO A NP ZnO



FONTE: A Autora (2023).

LEGENDA: Linha tracejada indica o valor IC_{50} (113,03 $\mu\text{g/mL}$), determinado através do teste de citotoxicidade Alamarblue, por regressão não-linear.

FIGURA 8 – VIABILIDADE CELULAR OBTIDA UTILIZANDO O INDICADOR DE CITOTOXICIDADE CFDA-AM, EM LINHAGEM RTG-2, APÓS EXPOSIÇÃO A NP ZnO



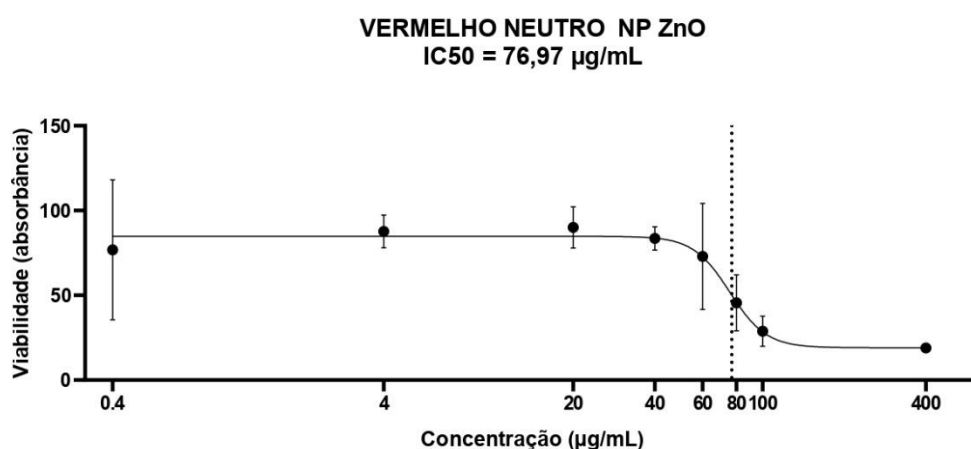
FONTE: A Autora (2023).

LEGENDA: Linha tracejada indica o valor IC_{50} (105,15 $\mu\text{g/mL}$), determinado através do teste de citotoxicidade CFDA-AM, por regressão não-linear.

Para os resultados de VN, apesar da atividade lisossomal seguir um padrão de diminuição da atividade semelhante aos outros indicadores diminuindo em

concentrações superiores a 60 $\mu\text{g/mL}$, o valor de IC50 foi menor (76,07 $\mu\text{g/mL}$). Para esse *endpoint*, o resultado foi o contrário do observado para as NP ZnO-Er, onde teve um IC50 superior em relação aos outros indicadores analisados.

FIGURA 9 – VIABILIDADE CELULAR OBTIDA UTILIZANDO O INDICADOR DE CITOTOXICIDADE VERMELHO NEUTRO, EM LINHAGEM RTG-2, APÓS EXPOSIÇÃO A NP ZnO



FONTE: A Autora (2023).

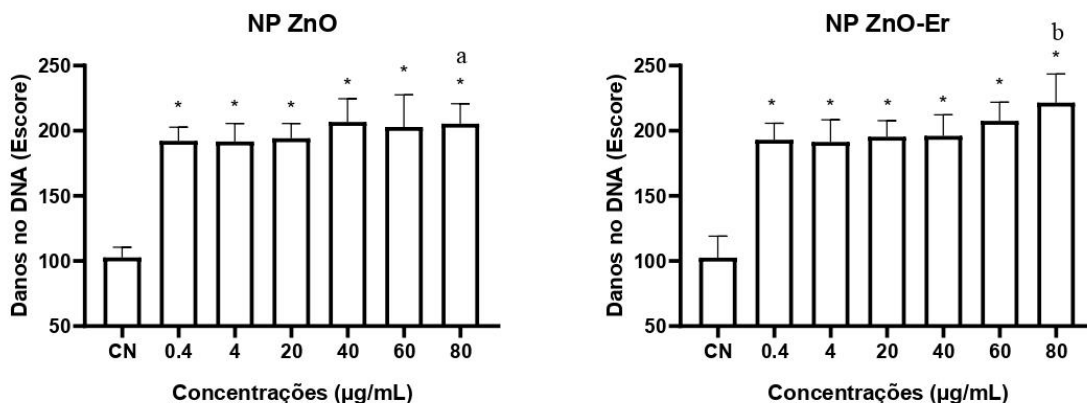
LEGENDA: Linha tracejada indica o valor IC₅₀ (76,97 $\mu\text{g/mL}$) determinado através do teste de citotoxicidade Vermelho Neutro, por regressão não-linear.

Logo, os resultados demonstram uma maior citotoxicidade para as NP ZnO-Er. De modo que, para o intervalo de concentração testado (0,4 a 400 $\mu\text{g/mL}$), temos como valores de IC₅₀ conservadores de 22,07 $\mu\text{g/mL}$ para as NP ZnO-Er e 76,97 $\mu\text{g/mL}$ para as NP ZnO.

4.2 TESTES DE GENOTOXICIDADE

Para ambos os tratamentos (NP ZnO e NP ZnO-Er) foram observados danos significativos ($p < 0.05$) ao DNA na linhagem RTG-2 para todas as concentrações utilizadas, quando comparada ao controle negativo (CN) (Figura 10). Mostrando a presença de danos genotóxicos na linhagem celular RTG-2, quando exposta a essas nanopartículas.

FIGURA 10 – ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE PARA NP ZnO e NP ZnO-Er

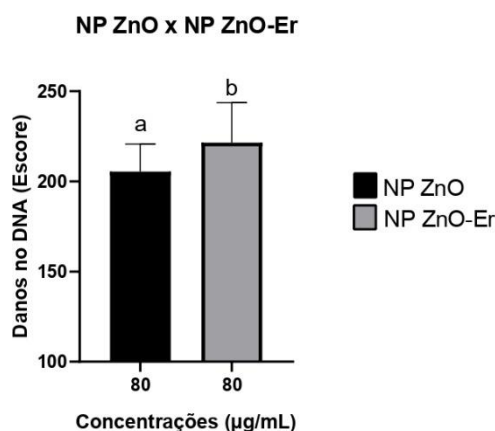


FONTE: A Autora (2023).

LEGENDA: Danos ao DNA em linhagem RTG-2 via ensaio cometa. (A) Análise do tratamento com NP ZnO-Er e (B) Análise do tratamento com NP ZnO. Asterisco (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo, através do teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn (NP ZnO-Er) e através ANOVA (NP ZnO). Letras diferentes (a e b) indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos, para concentração de 80 µg/mL.

A análise comparativa entre os tratamentos indicou diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para a concentração mais alta (80 µg/mL), onde as nanopartículas dopadas com Er indicaram uma genotoxicidade superior, quando comparada com as não dopadas ($p \leq 0,01$) (Figura 11).

FIGURA 11 – ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOTOXICIDADE ENTRE NP ZnO E NP ZnO-Er, PARA CONCENTRAÇÃO DE 80 µg/mL



FONTE: A Autora (2023).

LEGENDA: Danos ao DNA na concentração de 80 µg/mL, em linhagem RTG-2 via ensaio cometa, comparativamente para os tratamentos com dopagem e sem dopagem. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação aos tratamentos, e (**) indica diferença estatística significativa de $p \leq 0,01$, através do Kolmogorov-Smirnov, seguido de t-student.

5 DISCUSSÃO

5.1 TESTES DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade das NP ZnO foi observada em diferentes linhagens celulares, como linhagens de mamíferos (MCF, HeLa, GC-1, HepG2) e de peixes (RTG-2, RTH-149 and RTL-W1), sendo a toxicidade desses compostos atribuída principalmente à sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) e induzir a morte celular (Li *et al.*, 2020). As EROS são moléculas quimicamente reativas contendo oxigênio, podendo ser geradas pela exposição a estressores ambientais. Essas moléculas podem causar danos oxidativos a componentes celulares, como lipídios, proteínas e DNA, levando à morte celular e danos aos tecidos (Silva; Gonçalves, 2010).

Neste trabalho foi observado uma diminuição da viabilidade celular a medida que a concentração aplicada de NP ZnO aumentava, para ambos os tratamentos, sendo que as curvas de viabilidade celular começaram a apresentar decréscimo entre as concentrações de 4 µg/mL e 20 µg/mL, de forma menos acentuada nas NPs não dopadas. Tais resultados foram observados de forma similar em diferentes estudos (Fernandez *et al.*, 2013; Sánchez-Argüello *et al.*, 2023).

No estudo de Fernandez *et al.* (2013), foram analisadas as respostas celulares induzidas por NP ZnO em células RTG-2, avaliando a citotoxicidade dessas substâncias a partir de ensaios como AB, CFDA-AM e MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio). Embora os autores não tenham fornecido um valor de IC₅₀, as curvas de citotoxicidade em resposta às NP ZnO demonstraram uma relação dose-dependente, revelando significância estatística ($p < 0,05$) para concentrações de 6,25 µg/mL e acima (concentrações usadas na faixa de 0.78 a 25 µg/ml), após 24 horas de exposição em RTG-2 – sendo similar aos resultados obtidos no presente trabalho. Visto que é possível observar nas Figuras 1, 2 e 3, a diminuição da viabilidade celular a partir das concentrações de 4 e 20 µg/mL, sendo similares às concentrações utilizadas pelos autores.

Os resultados do estudo de Fernandez *et al.* (2013) sugerem que a citotoxicidade das NP ZnO pode ser atribuída à liberação de íons zinco provenientes das NPs assim como a citotoxicidade intrínseca. Segundo os autores, essas nanopartículas demonstraram capacidade de induzir formação de espécies reativas

de oxigênio (EROs). Com a liberação dessas EROS, houve alteração na atividade enzimática de estresse oxidativo, indução significativa da atividade de Glutathione S-transferase (GST). Ao mesmo tempo em que esses compostos reduziam a atividade da enzima β -galactosidase (β -gal), comprometiam a função mitocondrial (MTT), diminuíram a atividade da enzima redutase (AB) e o conteúdo total de glutathione celular (tGSH). De modo que as NP ZnO induziram estresse oxidativo de maneira proporcional à dose administrada (Fernandez *et al.*, 2013).

Complementarmente aos resultados observados no trabalho de Fernandez *et al.* (2013), no estudo de Sánchez-Argüello *et al.* (2023), foram analisados os efeitos de exposições únicas e combinadas de NPs de ZnO e clorpirifós (CPF) em RTG-2, através de *endpoints* celulares, incluindo viabilidade celular e vermelho neutro. Os principais resultados de citotoxicidade de NP ZnO mostraram um aumento dose dependente na geração de EROS em linhagens celulares de peixes nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 mg/L, sendo que a menor concentração analisada (10 mg/L) não mostrou toxicidade para a maioria dos parâmetros medidos, enquanto a concentração mais elevada (100 mg/L) alterou todos os diferentes *endpoints* celulares.

Em relação às análises com as NP ZnO(Er), essas tiveram resultados semelhantes aos mostrados anteriormente para as NP ZnO não dopadas. De modo que, é possível demonstrar que há diminuição da viabilidade celular, relacionada com o aumento da concentração administrada das nanopartículas.

As NP ZnO(Er) apresentaram valores de IC₅₀ superiores aos das NP ZnO. Considerando o significado de IC₅₀ como “a concentração de uma substância necessária para reduzir uma atividade biológica específica em 50%” (Sebaugh, 2011; OECD, 2021; OECD, 2012), quanto menor o valor de IC₅₀, mais eficiente é a substância analisada. Logo, na análise apresentada neste estudo, as NP ZnO(Er) apresentaram um potencial citotóxico superior ao observado para as NP ZnO.

O aumento da citotoxicidade após exposição a nanopartículas dopadas foi observado anteriormente no estudo de Al-Enazi *et al.* (2023), onde NP ZnO foram dopadas com o elemento Cobalto (Co) (NP ZnO (Co)), e testadas em linhagem celular de câncer de mama MCF. Neste estudo, os autores observaram um aumento de toxicidade das nanopartículas dopadas com Co, em comparação com nanopartículas não dopadas. Uma vez que a dopagem levou à diminuição do tamanho das NP ZnO, o que pode garantir melhor penetração e solubilidade desse composto, aumentando

sua toxicidade. Nos resultados obtidos pelos autores foram encontrados valores de IC50 de 100 µg/mL para NP ZnO, enquanto o valor de IC50 para NP ZnO (Co) diminuiu significativamente para 50 µg/mL.

No que diz respeito à atividade bactericida das NP ZnO, no estudo de Sanchez-López *et al.* (2022), a atividade antimicrobiana das NP ZnO-Er aumentou significativamente em comparação com NP ZnO não dopadas. Considerando que uma das maneiras em que as nanopartículas podem exercer atividade antimicrobiana em bactérias inclua a geração de EROs, de modo que as EROs geradas podem danificar a membrana celular bacteriana e as proteínas intracelulares, levando à morte celular, é possível que a citotoxicidade maior das NPs dopadas seja graças ao possível aumento na geração de EROs nas células, aumentando o estresse oxidativo e consequentemente, levando a morte celular.

5.2 TESTES DE GENOTOXICIDADE

Embora a literatura descreva a avaliação genotóxica de diferentes nanopartículas por meio do ensaio cometa (Disner, 2018; Klingelfus *et al.*, 2017; Klingelfus *et al.*, 2019; Vicari *et al.*, 2018), a maioria dos estudos *in vitro* que investigam os danos genotóxicos de NP ZnO concentram-se em linhagens celulares de mamíferos. Assim, há uma lacuna nos estudos envolvendo a avaliação de danos genotóxicos de NP ZnO em linhagens celulares de peixe.

Apesar da existência de lacunas nos estudos que envolvem a linhagem celular de peixe RTG-2 e outras, há pesquisas cujos resultados foram significativos, evidenciando a genotoxicidade das NP ZnO em linhagens celulares de mamíferos (Guan *et al.*, 2012; Zijno *et al.*, 2015).

O estudo realizado por Guan *et al.* (2012) investigou a genotoxicidade das NP ZnO em hepatócitos humanos e células renais embrionárias, utilizando o Ensaio Cometa. Os resultados revelaram um aumento significativo na extensão dos danos em ambas as linhagens celulares, indicando uma relação dose-dependente no aumento do dano ao DNA. Em hepatócitos (L02), foi observado um efeito significativo nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL após 24 horas de exposição. Nas células renais embrionárias (HEK293), o aumento do dano ao DNA foi inicialmente percebido nas concentrações de 50, 75 e 100 µg/mL após 4 horas, tornando-se significativo em todas as concentrações utilizadas após 24 horas de exposição. Em

ambos os tipos celulares, ficou evidente uma clara dependência da dose em relação ao aumento do dano ao DNA.

O resultado dose-dependente na genotoxicidade causada pelas NP ZnO também foi observado no estudo de Zijno *et al.* (2015), ao avaliarem o potencial genotóxico de NP ZnO em células carcinoma do cólon humano (Caco-2). Após exposição de 1, 2, 5, 10 e 20 lg/cm^2 (correspondente à 6,4 - 128,0 $\mu\text{g/ml}$) o protocolo do ensaio cometa alcalino foi realizado com algumas modificações, sendo combinado com enzimas Fpg e Endo III. Os resultados relatados mostraram um aumento dependente da dose nos danos no DNA causados por NP ZnO, sendo o nível mais alto de genotoxicidade observado após 2 e 4 horas, diminuindo lentamente após 24 horas.

O potencial genotóxico de NP ZnO foi observado em diferentes estudos, causando danos ao DNA nas células do sangue periférico e da medula óssea (Pati *et al.*, 2016), nas células de linfoblastóide humana Tk6 (Demir *et al.*, 2014a), nas células humanas de carcinoma laríngeo Hep-2 (Osman *et al.*, 2010), em leucócitos salivares (Valdiglesias *et al.*, 2021), em células epidérmicas humanas (Sharma *et al.*, 2009), e em fibroblastos embrionários de camundongos (Demir *et al.*, 2014b). Todos esses estudos abordaram a genotoxicidade das NP ZnO em concentrações semelhantes às empregadas no presente trabalho.

Em relação às NP ZnO-Er, não existem estudos que investigam a genotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco dopadas com outros materiais em linhagens celulares, utilizando o ensaio cometa. Porém, considerando novamente o aumento na geração de EROs nas células, causado pela indução de dopagem das nanopartículas, a produção de EROs e o dano oxidativo são considerados os principais mecanismos responsáveis pela genotoxicidade induzida por nanopartículas de óxidos metálicos (Donaldson *et al.*, 2010). Dessa maneira, a indução de danos ao DNA por estresse oxidativo, causada por NP ZnO, tem sido indicada por vários estudos (Guan *et al.*, 2012; Hackenberg *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2012).

Logo, o aumento na genotoxicidade observado na concentração mais elevada das NP ZnO-Er (80 $\mu\text{g/mL}$), pode ter ocorrido devido a um aumento da produção de EROs, que levam a uma maior taxa de estresse oxidativo nas células, aumentando a geração de danos ao DNA.

Além disso, apesar da significância dos resultados de genotoxicidade para

todas as concentrações testadas, é relevante ponderar sobre a capacidade das nanopartículas de aderir ao DNA, o que pode induzir a ocorrência de falsos negativos. Esta situação foi evidenciada no estudo de Klingelfus *et al.* (2019), em que nanopartículas de prata causaram *crosslink* (ligação entre DNA e proteína) no DNA da linhagem celular RTG-2, resultando em falsos negativos no Ensaio Cometa. Assim, considerar a aplicação do Ensaio Cometa oxidativo, uma variação da técnica convencional, torna-se interessante, pois isso permitiria a detecção de possíveis falsos negativos relacionados às NP ZnO, potencialmente revelando danos no DNA ainda mais substanciais do que os observados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Graças ao avanço da nanotecnologia e aumento na produção de NPs, se torna necessário o crescimento de estudos que analisam o impacto dessas substâncias nos ecossistemas, principalmente no ecossistema aquático. Este trabalho destacou o uso de nanopartículas de óxido de zinco, amplamente utilizadas em diversos ramos industriais, e seu potencial toxicológico. Sendo realizada a avaliação citotóxica e genotóxica dessas NPs, dopadas e não dopadas com o elemento terra rara Érbio baseadas em concentrações bactericidas na linhagem celular RTG-2.

Os resultados citotóxicos indicaram uma diminuição na viabilidade celular, em todos os *endpoints* analisados, para ambas as nanopartículas. Sendo observado um aumento da citotoxicidade com o aumento da concentração.

Além disso, a análise das NP ZnO-Er revelou uma citotoxicidade ainda mais pronunciada, indicada por valores de IC50 inferiores aos das partículas não dopadas. Isso sugere um potencial citotóxico amplificado com a introdução do Er nas NP ZnO, possivelmente relacionado a um aumento na geração de EROs.

Os resultados de genotoxicidade mostraram a presença de danos genotóxicos expressivos ($p < 0.05$) no DNA na linhagem RTG-2, em todas as concentrações testadas, para ambos os tratamentos de nanopartículas.

O aumento da genotoxicidade em NP ZnO-Er quando comparadas a NP ZnO, apresentada na maior concentração analisada (80 µg/ml), pode ser explicada por um aumento na indução de danos ao DNA por estresse oxidativo, relacionada a maior geração de EROs pelas NPs dopadas.

Este estudo contribui para a compreensão dos mecanismos de citotoxicidade

das nanopartículas de ZnO não dopadas e dopadas, ressaltando a complexidade das interações entre nanopartículas de ZnO e células, e para o avanço do conhecimento na área da nanotecnologia. Destaca-se a necessidade do desenvolvimento contínuo de trabalhos que contribuam para o conhecimento referente a toxicidade dessas nanopartículas, especialmente devido à lacuna existente em pesquisas envolvendo linhagens celulares de peixes, sendo essencial para maximizar os benefícios e minimizar os riscos associados ao seu uso, impulsionando o progresso da nanotecnologia e suas aplicações futuras.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. Cartilha sobre nanotecnologia. 2.ed. Brasília: **ABDI**, 2010. p. 58.

AL-ENAZI, N.M.; ALSAMHARY, K.; AMEEN, F.; KHA, M. Plant extract-mediated synthesis Cobalt doping in zinc oxide nanoparticles and their in vitro cytotoxicity and antibacterial performance. **Heliyon**: Volume 9, Issue 9, 2023. ISSN 2405-8440. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19659>.

AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. São Paulo: **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.

ALMANSOUR, M.I., *et al.* Zinc oxide nanoparticles hepatotoxicity: Histological and histochemical study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.51, p. 124-130, 2017 doi:10.1016/j.etap.2017.02.015.

ALMEIDA, W.; MATEI, J. C.; AKIYAMA, R. S.; GOMES, M. P.; LEME, D. M.; ASSIS, H. C. S.; CESTARI, M. M. Alkylphenols cause cytotoxicity and genotoxicity induced by oxidative stress in RTG-2 cell line. **Chemosphere**, Volume 313, 2023. ISSN 0045-6535 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137387>.

AZQUETA, A.; DUSINSKA, M. The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. **Frontiers in Genetics**, Volume 6, 2015. ISSN 1664-8021. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00239>

BARBOSA, R. Z. **Influência da nanopartícula de prata na toxicidade do lixiviado de reatores piloto com resíduos sólidos urbanos (RSU)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, UFSC. Florianópolis, 2017.

BASCHIR, I.; LONE, F.; BHAT, R.; MIR, S.; DAR, Z.; DAR, S. Concerns and Threats of Contamination on Aquatic Ecosystems. **Bioremediation and Biotechnology**, 1 - 26, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35691-0_1.

BONDARENKO, O.M.; HEINLAAN, M.; SIHTMÄE, M.; *et al.* Multilaboratory evaluation of 15 bioassays for (eco)toxicity screening and hazard ranking of engineered nanomaterials: FP7 project NANOVALID. **Nanotoxicology** v. 10, p. 1229–1242, 2016. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1196251>

BORDIN, E.; RAMSDORF, W.; DOMINGOS, L.; MIRANDA, L.; FILHO, N.; CESTARI, M. Ecotoxicological effects of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on aquatic organisms: Current research and emerging trends. **Journal of Environmental Management**, Volume 349, 2024, ISSN 0301-4797, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119396>.

BORM, P. J., *et al.* The Potential Risks of Nanomaterials: A Review Carried out for ECETOC. **Particle and Fibre Toxicology**, 2006.

BROWN, D.M.; JOHNSTON, H.J.; GAISER, B.; PINNA, N.; CAPUTO, G.; CULHA, M.; KELESTEMUR, S.; ALTUNBEK, M.; STONE, V.; ROY, J.C.; KINROSS, J.H.; FERNANDES, T.F. A cross-species and model comparison of the acute toxicity of nanoparticles used in the pigment and ink industries. **NanoImpact**, v. 11, p. 20–32, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2018.02.001>

BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G., *et al.* Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. **Waste Management**, v. 29, Issue 9, p. 2587–2595, 2009. doi:10.1016/j.wasman.2009.04.001.

CANDEIA, G. **Síntese e caracterização de nanopartículas de ZnO obtidas pelo método de Pechini adaptado e pela decomposição térmica de hidroxissais lamelares.** Dissertação (Mestrado) em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2021.

CAROFIGLIO, M.; BARUI, S.; CAUDA, V.; LAURENTI, M. Doped Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Potential Use in Nanomedicine. **Applied Sciences (Basel)**, 2020. doi: 10.3390/app10155194. PMID: 33850629.

CARVALHO, S. **Toxicidade do sulfato de cobre para a tilápia. Oreochromis niloticus e teste ecotoxicológico com Ceriodaphnia dubia e Pseudokirchneriella subcapitata.** 2009. 103 f. Tese (Doutorado) em Aquicultura - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2009.

CASTAÑO A.; BOLS N.; BRAUNBECK T.; *et al.* The use of Fish Cells in Ecotoxicology: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 47. **Alternatives to Laboratory Animals**., v. 31(3), p. 317–351, 2003, doi:10.1177/026119290303100314

CAVALCANTE, R. M. (Org.). Contaminantes orgânicos em ambientes aquáticos. Fortaleza: **Imprensa Universitária**, 2020.

CHOI J.S.; KIM, R.O.; YOON, S.; KIM, W.K. Developmental toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish (Danio rerio): a transcriptomic analysis. **PLoS One**, v.11 (8), 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160763>.

CHUPANI, L.; NIKSIRAT, H.; VELÍŠEK, J.; STARÁ, A.; HRADLOVÁ, Š.; KOLAŘÍK, J.; PANÁČEK, A.; ZUSKOVÁ, E. Chronic dietary toxicity of zinc oxide nanoparticles in common carp (Cyprinus carpio L.): Tissue accumulation and physiological responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.147, p. 110–116, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.024>

CHO, S.; KOH, H.; YOO, H.; KIM, J.; JUNG, H. Tunable Volatile-Organic-Compound Sensor by Using Au Nanoparticle Incorporation on MoS₂. **ACS Sensors**, v. 2(1), p.183–189, 2017.

COLLINS, A.; MØLLER, P.; GAJSKI, G.; *et al.* Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. **Nature Protocols**, v. 18, p. 929–989, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00754-y>

CONG, Y.; JIN, F.; WANG, J.; MU, J. The embryotoxicity of ZnO nanoparticles to marine medaka, *Oryzias melastigma*. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 11–18, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.01.006>

CONNON, R.; GEIST, J.; WERNER, I. Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. **Sensors** (Basel, Switzerland), v. 12, p. 12741 – 12771, 2012. <https://doi.org/10.3390/s120912741>.

CORDELLI, E.; *et al.* Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing, **Toxicology Research**, v. 10, Issue 1, January 2021, Pages 68 -78, <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa093>

COUTINHO, F. H. *et al.* Antibiotic resistance in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. In: AHMAD, I.; DAR, M. A. (Org.). **Perspectives in water pollution**. Rijeka: InTech, 2013. p. 1-22.

DEMIR, E.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity and DNA Repair Processes of Zinc Oxide Nanoparticles. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 77, p. 1292 – 1303, 2014a,. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.935540>.

DEMIR, E.; AKÇA, H.; KAYA, B.; BURGUCU, D.; TOKGÜN, O.; TURNA, F.; AKSAKAL, S.; VALES, G.; CREUS, A.; MARCOS, R. Zinc oxide nanoparticles: genotoxicity, interactions with UV-light and cell-transforming potential. **Journal of hazardous materials**, v. 264, 2014b. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.043>.

DISNER, G. **Aspectos toxicológicos de nanopartículas metálicas: Estudos in vivo (Hoplais intermedius) & in vitro (células RTG2) e a questão ambiental**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, 2018.

DOBRETISOV, S.; SATHE, P.; BORA, T.; *et al.* Toxicity of Different Zinc Oxide Nanomaterials at 3 Trophic Levels: Implications for Development of Low-Toxicity Antifouling Agents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 39, p. 1343–1354, 2020. <https://doi.org/10.1002/etc.4720>

DONALDSON, K.; POLAND, C.A.; SCHINS, R.P. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. **Nanotoxicology**, v.4(4), p. 414–420, 2010. doi: 10.3109/17435390.2010.482751.

EUROPEAN COMMISSION. **Commission Recommendation** of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU), Official J. ed.

FALFUSHYNSKA, H.; GNATYSHYNA, L.; HORYN, O.; SHULGAI, A.; STOLIAR, O. A calcium channel blocker nifedipine distorts the effects of nano-zinc oxide on metal metabolism in the marsh frog *Pelophylax ridibundus*. **Saudi J. Biol. Sci.**, v. 26, p. 481–489, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.004>

FENG, J.; GUO, X.; CHEN, Y.; LU, D.; NIU, Z.; TOU, F.; HOU, L.; XU, J.; LIU, M.; YANG, Y. Time-dependent effects of ZnO nanoparticles on bacteria in an estuarine aquatic environment. **Science of The Total Environment**, 698, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134298>

FERNÁNDEZ D.; GARCÍA-GÓMEZ C.; BABÍN M. In vitro evaluation of cellular responses induced by ZnO nanoparticles, zinc ions and bulk ZnO in fish cells. **Science of The Total Environment**, 452-453:262-74, 2013. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.02.079.

FISCHER, M., *et al.* Repeatability and Reproducibility of the RTgill-W1 Cell Line Assay for Predicting Fish Acute Toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 169(2), p. 353-364, 2019. doi: 10.1093/toxsci/kfz057.

FRESHNEY; R. I. Culture of Animal Cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6 ed. **John Wiley & Sons**, 2010.

GONG, T.; ZHANG, H.; HUANG, W.; MAO, L.; KE, Y.; GAO, M.; YU, B. Highly responsive flexible strain sensor using polystyrene nanoparticle doped reduced graphene oxide for human health monitoring. **Carbon**, v.140, p. 286–295, 2018

GUAN, R.; KANG, T.; LU, F.; ZHANG, Z.; SHEN, H.; LIU, M. Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, 602, 2012. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-602>

GUANEM, M.G.; BADR, Y.; HAMEED, T.; MARSSI, M. E.; LAHMAR, A.; WAHAB, H. A.; BATTISHA, I.K. (2019). Synthesis and characterization of undoped and Er-doped ZnO nano-structure thin films deposited by sol-gel spin coating technique. **Materials Research Express**, v. 6, N 8, 2019.

GUBALA, V.; JOHNSTON, L.; KRUG, H.; MOORE, C.; OBER, C.; SCHWENK, M.; VERT, M. Engineered nanomaterials and human health: Part 2. Applications and nanotoxicology (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**. v. 90, p. 1325–1356, 2018. <https://doi.org/10.1515/pac2017-0102>

HACKENBERG, S.; SCHERZED, A.; KESSLER, M.; HUMMEL, S.; TECHNAN, A.; FROELICH, K.; GINZKEY, C.; KOEHLER, C.; HAGEN, R.; KLEINSASSER, N. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. **Toxicology Letters**, v. 20(1), p. 27-33, 2011. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.12.001.

HANDY, R.D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 315-325, 2008.

HARTL, M. Fish Ecotoxicology in a Changing World: do we Need New Biomarker Endpoints in Light of Climate Change?. **Journal of Fisheries sciences**, v. 9, p. 49-51, 2015.

HAO, L.; CHEN, L. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 80, p. 103-110, 2012 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.017>

HEINLAAN, M.; IVASK, A.; BLINOVA, I.; *et al.* Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. **Chemosphere**, v. 71, n. 7, 2008.

HOGSTRAND, C. Part A. In: Zinc, Wood, Chris M., Farrell, Anthony P., Brauner, Colin J. (Eds.), **Fish Physiology**, vol. 31. Academic Press, p. 135–200, 2011.

IBRAHIM, A.; IBRAHIM, M.; YUSUF, A. Implications of industrial effluents on surface water and ground water. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, v. 09(03), p. 330–336, 2021. <https://doi.org/10.30574/WJARR.2021.9.3.0110>.

ISMAIL, A.; SIAL, N.; REHMAN, R.; ABID, S.; ISMAIL, M. Survival, growth, behavior, hematology and serum biochemistry of mice under different concentrations of orally administered amorphous silica nanoparticle. **Toxicology Reports**, v. 10, p. 659-668, 2023 doi:10.1016/j.toxrep.2023.05.006.

JEONG, W.J.; KIM, S.K.; PARK, G.C. Preparation and characteristic of ZnO thin film with high and low resistivity for an application of solar cell. **Thin Solid Films**, n. 506, p. 180–183, 2006.

JURAS, I. Os impactos da indústria no meio ambiente. In: GANEM, R. S. (Org.). **Políticas setoriais e meio ambiente**. Brasília: Câmara dos Deputados, Edições Câmara, 2015. P. 374.

KARTHIKEYAN, M.; AHAMED, A.J.; KARTHIKEYAN, C.; *et al.* Enhancement of antibacterial and anticancer properties of pure and REM doped ZnO nanoparticles synthesized using *Gymnema sylvestre* leaves extract. **Springer Link**, v. 1 (355), 2019.

KASHIWADA, S. Distribution of nanoparticles in the see-through Medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 1697– 1702 , 2006.

KENNEDY, A.J.; HULL, M.S.; STEEVENS, J.A.; DONTSOVA, K.M.; CHAPPELL, M.A.; GUNTER, J.C.; WEISS, C.A. Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, p. 1932-1941, 2008

KHAN, M.F. *et al.* Sol-gel synthesis of thorn-like ZnO nanoparticles endorsing mechanical stirring effect and their antimicrobial activities: Potential role as nano-antibiotics. **Scientific Reports**, v. 6, 27689, 2016 doi: 10.1038/srep27689.

KHOSRAVI-KATULI, K.; LOFRANO, G.; PAK NEZHAD, H.; GIORGIO, A.; GUIDA, M.; ALIBERTI, F.; SICILIANO, A.; CAROTENUTO, M.; GALDIERO, E.; RAHIMI, E.; LIBRALATO, G. Effects of ZnO nanoparticles in the Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*). **Science of the Total Environment**, 626, p. 30–41, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.085>

KLINGELFUS, T. **Efeitos tóxicos de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e chumbo inorgânico (PbII) em *Rhamdia quelen* (Siluiformes, Heptapteridae).** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

KLINGELFUS, T. ; LIROLA, J.R. ; OYA SILVA, L.F. ; DISNER, G.R. ; VICENTINI, M. ; NADALINE, M.J.B. ; ROBLES, J.C.Z. ; TREIN, L.M. ; VOIGT, C.L. ; SILVA DE ASSIS, H.C.; MELA, M. ; LEME, D.M. ; CESTARI, M.M. . Acute and long-term effects of trophic exposure to silver nanospheres in the central nervous system of a neotropical fish *Hoplias intermedius*. **Neurotoxicology**, v. 63, p. 146-154, 2017.

KLINGELFUS, T; DISNER, G.R.; VOIGT, C.L.; ALLE, L.F.; CESTARI, M.M.; LEME, D. M. Nanomaterials induce DNA-protein crosslink and DNA oxidation: A mechanistic study with RTG-2 fish cell line and Comet assay modifications. **Chemosphere**, v. 215, p. 703-709, 2019 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.118>.

KREYLING, W.; SEMMLER-BEHNKE, M.; MULLER, W. Health Implications of Nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 8, p. 543-562, 2006.

KRÓL, A.; POMASTOWSKI, P.; RAFINSKA, K.; RAILE-PLUGARU, V.; BUSZEWSKI, B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 37-52, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.033>.

KTEEBA, S.M.; EL-ADAWI, H.I.; EL-RAYIS, O.A.; EL-GHOBASHY, A.E.; SCHULD, J.L.; SVOBODA, K.R.; GUO, L. Zinc oxide nanoparticle toxicity in embryonic zebrafish: Mitigation with different natural organic matter. **Environmental Pollution**, v. 230, p. 1125–1140, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.042>

LAMMEL, T.; STURVE, J. Assessment of titanium dioxide nanoparticle toxicity in the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) liver and gill cell lines RTL-W1 and RTgill-W1 under particular consideration of nanoparticle stability and interference with fluorometric assays. **NanoImpact**, v. 11, p. 1-19, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2018.01.001>.

LAPUENTE, J.; LOURENÇO, J.; MENDO, S.; BORRÀS, M.; MARTINS, M.; COSTA, P.; PACHECO, M. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 6, 2015 <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00180>.

LI, M.; LIU, W.; SLAVERYKOVA, V.I. Effects of mixtures of engineered nanoparticles and metallic pollutants on aquatic organisms. **Environments** 7 (27), 2020 <https://doi.org/10.3390/environments7040027>

LI, M.; ZHU, L.; LIN, D. Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: Mechanism and the influence of medium components. **Environmental Science and Technology**, v. 45 (5), p.1977–1983, 2011.

MA, H.; WILLIAMS, P. L.; DIAMOND, S. A. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles – a review. **Environmental Pollution**, v. 172, p. 76–85, 2013. doi:10.1016/j.envpol.2012.08.011

MA, X.; GEISER-LEE, J; DENG, Y.; KOLMAKOV, A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of the Total Environment**, v. 408, Issue 16, p. 3053-3061, 2010. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.03.031

MCCARTY, L. S.; BORGERT, C. J.; BURGOON, L. D. Evaluation of the Inherent Toxicity Concept in Environmental Toxicology and Risk Assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 39(12), p. 2351–2360, 2020. doi:10.1002/etc.4881

MIRZAEI, H.; DARROUDI, M. Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications. **Ceramics International**, v. 43, p. 907-914, 2017. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2016.10.051>.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, 40(9), 1094–1110, 2017. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T.. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes - Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 18, p.1-58, Semestral. Ano IX, 2012.

MOTTA, A.G.C.; DO AMARAL, D.F.; BENVINDO-SOUZA, M.; ROCHA, T.L.; DE MELO E SILVA, D. Genotoxic and mutagenic effects of zinc oxide nanoparticles and zinc chloride on tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae). **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 14, 100356, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100356>

MURTHY, M.K.; MOHANTY, C.S.; SWAIN, P.; PATTANAYAK, R. Assessment of toxicity in the freshwater tadpole *Polypedates maculatus* exposed to silver and zinc oxide nanoparticles: A multi-biomarker approach. **Chemosphere**, v. 293, 133511, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133511>

NATSCH, A.; LAUE, H.; HAUPT, T.; VON NIEDERHAUSERN, V.; SANDERS, G. Accurate prediction of acute fish toxicity of fragrance chemicals with the RTgill-W1 cell assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, p. 931–941, 2018.

NOOR, M.N.; WU, F.; SOKOLOV, E.P.; FALFUSHYNSKA, H.; TIMM, S.; HAIDER, F.; SOKOLOVA, I.M. Salinity-dependent effects of ZnO nanoparticles on bioenergetics and intermediate metabolite homeostasis in a euryhaline marine bivalve, *Mytilus edulis*. **Science of the Total Environment**, v. 774, 145195, 2021 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145195>

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ Health Perspect**, v. 113 (7), p. 823-839, 2005. doi: 10.1289/ehp.7339. Erratum in: *Environ Health Perspect*. 2010 Sep;118(9):A380.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267 (17), p. 5421-5426, 2000 doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x. PMID: 10951200.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Series on Testing and Assessment. **Fish Toxicity Testing Framework**, 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2. Test No. 249: Fish Cell Line Acute Toxicity - The RTgill-W1 cell line assay**, 2021.

OSMAN, I.; BAUMGARTNER, A.; CEMELI, E.; FLETCHER, J.; ANDERSON, D. Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEp-2 cells. **Nanomedicine**, v. 5(8), p. 1193-1203, 2010. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.52>.

OSTI, S. C.; VAROLI, F. M. F.; MATUSHIMA, E. R.; BERNARDI, M. M. Comparative studies of deltamethrin acute toxicity in exotic and brasilian fish. **Journal of the Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 2, n. 2, p.101-106, 2007.

PASTORINO, P.; GINEBREDI, A. Contaminants of Emerging Concern (CECs): Occurrence and Fate in Aquatic Ecosystems. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 18(24), 2021. doi:10.3390/ijerph182413401.

PATEL, B.; PATEL, H.; SINGH, R.; SARVAIYA, V.; PAWAR, M.; MODY, S. Comparative Study on Heavy Metal Contamination in Soil, Water and Fodder between Industrial and Non-industrial Areas of Kutch District, Gujarat, India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 8(10), p. 2096-2103, 2019. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.810.244>.

PATI, R.; DAS, I.; MEHTA, R.; SAHU, R.; SONAWANE, A. Zinc-Oxide Nanoparticles Exhibit Genotoxic, Clastogenic, Cytotoxic and Actin Depolymerization Effects by Inducing Oxidative Stress Responses in Macrophages and Adult Mice. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 150 (2), 454-472, 2016. . <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw010>.

PATRINOIU, G *et al.* Self-assembled zinc oxide hierarchical structures with enhanced antibacterial properties from stacked chain-like zinc oxalate compounds, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 552, p. 258-270, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.05.051>.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, 27(6), p. 1028–1029, 2004. doi:10.1590/s0100-40422004000600031

REKHA, K.; NIRMALA, M.; NAIR, M.G.; ANUKALIANI, A. Structural, optical, photocatalytic and antibacterial activity of zinc oxide and manganese doped zinc oxide nanoparticles. **Physica B Condensed Matter**, v. 405(15), p. 3180-3185, 2010.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3(7), p. 1125-1131, 2008. doi: 10.1038/nprot.2008.75. PMID: 18600217.

DE SOUZA, I. R.; WILKE SIVEK, T.; VAZ DE OLIVEIRA, J.B.; DI PIETRO MICALI CANAVEZ, A.; DE ALBUQUERQUE VITA, N.; CIGARAN SCHUCK, D.; DE SOUZA, I. R.; CESTARI, M.M.; LORENCINI, M.; LEME, D.M. Cytotoxicity Assays with Zebrafish Cell Lines. **Journal of Visualized Experiments**, v. 6 (191), 2023.

RUDDIMAN, W.F. The Anthropocene. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 41, p. 45-68, 2013. doi:10.1146/annurev-earth-050212-123944

RUSSEL; W. M. S.; BURCH; R. L. The principles of humane experimental technique. London: **The Medical Journal of Australia**, v. 1, Issue 13, 1959.

SÁNCHEZ-ARGÜELLO, P.; FRANCO, D.; FERNÁNDEZ, M. D. Combined cytotoxicity of ZnO nanoparticles and chlorpyrifos in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, gonadal cell line RTG-2. **Aquatic Toxicology**, v. 261, 106612, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106612>.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, A. L. *et al.* Influence of erbium doping on zinc oxide nanoparticles: Structural, optical and antimicrobial activity. **Applied Surface Science**, v. 575, 151764, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.151764>.

SCHERER, K.; STROHSCHOEN, A. Padronização do Teste Cometa para análise de Genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 5, n. 3, 2013. ISSN 2176-3070.

SEBAUGH, J.L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. **Pharmaceutical Statistics**, v. 10(2), p. 128-134, 2011. doi: 10.1002/pst.426.

SEDEÑO-DÍAZ, J.; LÓPEZ-LÓPEZ, E. Freshwater Fish as Sentinel Organisms: From the Molecular to the Population Level, a Review. **InTechOpen: New Advances and Contributions to Fish Biology**, 2012. <https://doi.org/10.5772/54825>.

SENTHAMARAI, M.D.; MALAIKOZHUNDAN, B., 2022. Synergistic action of zinc oxide nanoparticle using the unripe fruit extract of *Aegle marmelos* (L.). **Materials Today Communications**, v. 30, 103228, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103228>

SERRÀ, A.; ZHANG, Y.; SEPÚLVEDA, B.; GÓMEZ, E.; NOGUÉS, J.; MICHLER, J.; PHILIPPE, L. Highly reduced ecotoxicity of ZnO-based micro/nanostructures on aquatic biota: Influence of architecture, chemical composition, fixation, and photocatalytic efficiency. **Water Research**, v. 169, 115210, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115210>

SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40(4), p. 994–1002, 2010. doi:10.1590/s0103-84782010005000037

SHARMA, B.; SONI, U.; AFONSO, L.; CAHILL, D. M. Nanomaterial doping: Chemistry and strategies for agricultural applications. **ACS Agricultural Science & Technology**, v. 2, p. 240–257, 2022. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.1c00273>

SHARMA, V.; SHUKLA, R.; SAXENA, N.; PARMAR, D.; DAS, M.; DHAWAN, A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. **Toxicology letters**, v. 185 (3), p. 211-218, 2009 . <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2009.01.008>.

SHENOY, R.; RAMA, A.; GOVINDAN, I.; NAHA, A. The purview of doped nanoparticles: Insights into their biomedical applications. **OpenNano**, v. 8, 100070, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100070>.

STARNES, D. *et al.* Toxicogenomic responses of *Caenorhabditis elegans* to pristine and transformed zinc oxide nanoparticles. **Environmental Pollution**, v. 247, p. 917-926, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.077>

TANNEBERGER, K.; KNÖBEL, M.; BUSSE, F.J.; SINNIGE, T.; HERMENS, J.; SCHIRMER, K. Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay. **Environmental Science & Technology**, v. 47(2), p. 1110-1119, 2013 doi: 10.1021/es303505z.

VALDIGLESIAS, V.; FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, N.; LEMA-ARRANZ, C.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, R.; PÁSARO, E.; REIS, A.; TEIXEIRA, J.; COSTA, C.; LAFFON, B. Salivary Leucocytes as In Vitro Model to Evaluate Nanoparticle-Induced DNA Damage. **Nanomaterials**, v. 11 (8), 2021. <https://doi.org/10.3390/nano11081930>.

VICARI, T. ; DAGOSTIM, A. C. ; KLINGELFUS, T. ; GALVAN, G; MONTEIRO, P. S.; DA SILVA, L. P.; SILVA DE ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M. Co-exposure to titanium dioxide nanoparticles (NpTiO₂) and lead at environmentally relevant concentrations in the Neotropical fish species *Hoplias intermedius*. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 1032-1043, 2018.

VOROSMARTY, C.J.; MCINTYRE, P.B.; GESSNER, M.O.; DUDGEON, D.; PRUSEVICH, A.; GREEN, P.; GLIDDEN, S.; BUNN, S.E.; SULLIVAN, C.A.; LIERMANN, C.R.; DAVIES, P.M. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, v. 467 (7315), p. 555-561, 2010.

WANG, G.; MORRIN, A.; LI, M.; LIU, N.; LUO, X. Nanomaterial-doped conducting polymers for electrochemical sensors and biosensors. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, p. 4173-4190, 2018.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental health criteria 155: biomarkers and risk assessment: concepts and principles. **Geneva: World Health Organization**, 1993.

WONG, S.W.Y.; ZHOU, G. J.; KWOK, K.W.H.; DJURIŠIĆ, A.B.; HAN, J.; LEE, J.S.; LEUNG, K.M.Y. In vivo toxicities of nine engineered nano metal oxides to the marine diatom *Skeletonema costatum* and rotifer *Brachionus koreanus*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 153, 110973, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.110973>

WU, F.; HARPER, B.J.; HARPER, S.L. Comparative dissolution, uptake, and toxicity of zinc oxide particles in individual aquatic species and mixed populations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, p. 591–602, 2019. <https://doi.org/10.1002/etc.4349>

WI, M.; ZHOU, Z.; YANG, J.; ZHANG, M.; CAI, F.; LU, P. ZnO nanoparticles stabilized oregano essential oil Pickering emulsion for functional cellulose nanofibrils packaging films with antimicrobial and antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, p. 433-440, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.210>.

XU, J.; PAN, Q.; SHUN, Y.Y.; TIAN, Z. Grain size control and gas sensing properties of tin oxide. **Sensors and Actuators B Chemical**, v. 66(1-3), p. 277-279, 2000.

YADU, A.; SATAPATHY, M.; SAHARIAH, B.; ANANDKUMAR, J. Realistic Approach for Bioremediation of Heterogeneous Recalcitrant Compounds. **Combined Application of Physico-Chemical & Microbiological Processes for Industrial Effluent Treatment Plant**, p. 237-260, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0497-6_11.

YU, Q.; WANG, Z.; WANG, G.; PEIJNENBURG, W.J.G.M.; VIJVER, M.G. Effects of natural organic matter on the joint toxicity and accumulation of Cu nanoparticles and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 292 (part b), 118413, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118413>

ŽEGURA, B.; FILIPIČ, M. The application of the Comet assay in fish cell lines. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, p. 72-84, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.01.011>.

ZHANG, C.; JANSEN, M.; DE MEESTER, L.; STOKS, R.. Rapid evolution in response to warming does not affect the toxicity of a pollutant: Insights from experimental evolution in heated mesocosms. **Evolutionary Applications**, v. 12, p. 977–988, 2019. <https://doi.org/10.1111/eva.12772>

ZHAO, X.; WANG, S.; WU, Y.; YOU, H.; LV, L. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 136, p. 49–59, 2013. <https://doi.org/10.1016/j>.

ZHU, X.; CHANG, Y.; CHEN, Y. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 78, Issue 3, p. 209-215, 2010

ZIJNO, A.; DE ANGELIS, I.; DE BERARDIS, B.; ANDREOLI, C.; RUSSO, M.T.; PIETRAFORTE, D.; SCORZA, G.; DEGAN, P.; PONTI, J.; ROSSI, F.; BARONE, F. Different mechanisms are involved in oxidative DNA damage and genotoxicity induction by ZnO and TiO₂ nanoparticles in human colon carcinoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, Issue 7, p. 1503-1512, 2015 <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.009>.