

EFEITOS CITOGENÉTICOS DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM *Allium cepa* E *Vicia faba*.

João Vitor F. Silva¹, Marisa D. Scherer², Bruno A. Crispim³, Alexéia B. Grisolia⁴.

¹Discente do curso de Biotecnologia da UFGD – Dourados;

²Bióloga, doutora e bolsista desenvolvimento científico e regional fundect/cnpq pela UFMS;

³Pós doutorado em biologia geral/bioprospecção da UFGD – Dourados;

⁴Orientadora do trabalho, docente do curso de Biotecnologia da UFGD – Dourados.

Resumo

As nanopartículas (NPs) vêm sendo utilizadas com diferentes aplicações e áreas de estudo. O estudo tem como objetivo avaliar dois modelos vegetais submetidos a tratamento com diferentes dimensões de NPs de prata e comparar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagenéticos. Sementes de *Allium cepa* e *Vicia faba* foram expostas a diferentes dimensões de NPs de prata. Como controle negativo (CN) foi utilizado água ultrapura e controle positivo Trifuralina (0,84 mg.L⁻¹). O índice mitótico (IM) mostraram uma redução significativa das células meristemáticas de *A. cepa* e *V. faba* à medida que reduziu o tamanho das NPs quando comparado com o CN, índice de alterações cromossômicas (IAC) e índice de micronúcleos (IMT), notou um aumento significativo à medida que diminui o tamanho das NPs comparado com o CN. Assim sendo, essas nanopartículas podem penetrar na planta, causando danos celulares. Esses resultados fornecem informações sobre a mutagenicidade e genotoxicidade das NPs de prata em plantas.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Nanomateriais; Tecidos vegetais.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Trabalho selecionado para a JNIC: UFGD

Introdução

Na última década intensificou-se a utilização das nanopartículas em produtos comercializados. Considerando as suas características nanométricas em relação ao tamanho, possibilita a sua entrada em células ou em materiais abióticos facilmente (SIMONET et al., 2009).

Porém, o que torna as nanopartículas tão atrativas no mercado, pode acabar constituindo um problema para os organismos vivos, principalmente para o homem, uma vez que não se conhecem as implicações do seu acúmulo nos mesmos (WEI et al., 2010).

Os nanoproductos são inúmeros e estão presentes em todas as áreas das grandes indústrias. A crescente produção e disponibilização destes produtos traz consigo um grande problema ambiental a ser enfrentado. Esses nanomateriais estão sendo processados, produzidos e sintetizados em escalas cada vez maiores, e estão sendo descartados em efluentes sem um aviso prévio de sua toxicidade (LOVERN et al., 2007).

Dentre as várias nanopartículas metálicas, pode-se destacar a nanopartícula de prata que possui maior relevância na área da saúde, pelas suas propriedades antimicrobianas. Estas são de vasta comercialização no mercado (LU et al., 2010), por serem de fácil incorporação em diferentes materiais (SOUZA et al., 2013).

Esses produtos contendo NPs são bioacumulados pelos organismos, uma vez que as nanopartículas e os íons de prata são liberados e não são biodegradáveis (GOTTSCHALK et al., 2009).

Para avaliação da toxicidade das nanopartículas de prata foram realizados ensaios ecotoxicológicos utilizando várias espécies bioindicadoras, particularmente plantas (KANAYA et al., 1994). *Allium cepa* e *Vicia faba* são exemplos de vegetais que são comumente utilizados para estudos de genotoxicidade e mutagenicidade. Esses bioindicadores também têm grande importância no monitoramento ambiental, permitindo avaliar a toxicidade de muitos outros compostos químicos (BAGATINI et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade causadas pelas diferentes dimensões de AgNPs em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* e *Vicia faba* e comparar as respostas aos tratamentos de nanopartículas de prata entre as espécies: *Allium cepa* e *Vicia faba*.

Metodologia

Preparação das nanopartículas:

Para os testes, utilizou-se soluções de nanopartículas de prata da marca NanoComposix® adquiridas comercialmente, com as dimensões: 5, 25, 50 e 75 nm. Nas soluções de nanopartículas (NPs) de prata, foram acrescentadas 50 mL de água destilada e dispersadas por vibração ultrassônica por 30 min.

Modelo vegetal para bioensaios:

As sementes utilizadas para os experimentos, de *Allium cepa* (variedade Baia Periforme), e de *Vicia faba* foram adquiridas comercialmente da Marca Isla® (Isla Sementes Ltda., Brasil). Livres de agroquímicos.

Bioensaio *Allium cepa* e *Vicia faba*:

Para os testes com *Allium cepa* e *Vicia faba* utilizou-se 50 sementes de cada espécie para cada dimensão. Para *A. cepa* as sementes foram dispersas em placas de petri com papel filtro, e para *V. faba* foram colocadas em bandejas entre duas camadas de algodão. Foram regadas com água destilada em ambiente controlado a 24 °C até as raízes atingirem aproximadamente 1 a 2 cm de comprimento. Após o período de germinação, selecionou-se 10 raízes e transferidas por 24 h para Beckers contendo as NPs para cada tratamento (5, 25, 50 e 75 nm) e também para o controle negativo (CN) com água destilada. Após 24 h de tratamento, as sementes expostas as NPs e CN foram transferidas para placas de petri contendo água destilada por um período de 24 h para recuperação. Posterior a esse tempo de recuperação, as sementes foram fixadas em solução de Carnoy, imersas numa solução contendo álcool e ácido acético na proporção de 3:1 v/v, durante 24 h. Foram lavadas com água destilada e coradas com Schiff. As raízes foram hidrolisadas com HCL 1N a 60°C durante 10 min para a preparação das lâminas, e posteriormente lavadas com água destilada e coradas com reativo de Schiff por 2 h. Posterior a esses procedimentos, as pontas das raízes meristemáticas de *A. cepa* e *V. faba* foram cortadas em uma lâmina e então coradas com 0,5 mL de Carmim acético 45% e coberto com uma lamínula e realizado o esmagamento. Para cada bioensaio e tratamento foram preparadas cinco lâminas. Observadas em microscópio óptico Nikon, em aumento de 400x. Um total de 1000 células por lâminas foram observadas e contadas no programa de contagem ImageJ (SCHINDELIN et al., 2012). Para o cálculo dos índices mitótico (IM), de anormalidades nucleares (IAN) e de micronúcleo (IMC), e consequentemente avaliação de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$IM = (Total\ de\ células\ em\ divisão / Total\ de\ células\ observadas) \times 100$$

$$IAN = (Total\ de\ células\ alteradas / Total\ de\ células\ observadas) \times 100$$

$$IMC = (Total\ de\ células\ com\ micronúcleo / Total\ de\ células\ observadas) \times 100$$

Análise estatística:

Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições, obtendo-se resultados para IM, IAN e IMC. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), utilizando o software Origin 8.5. Para tais análises foi realizado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparação das médias.

Resultados e Discussão

Os resultados mostram que quanto menor a nanopartícula de prata, maior é a redução do índice mitótico das células meristemáticas, tanto para *Allium cepa* quanto para *Vicia faba* (figura 1). Essa redução do índice mitótico nos tratamentos indica que as NPs de prata foram citotóxicas, podendo ter ocorrido devido a uma inibição na síntese de DNA na fase S das células dos bioensaios (MOHAMMED et al., 2015).

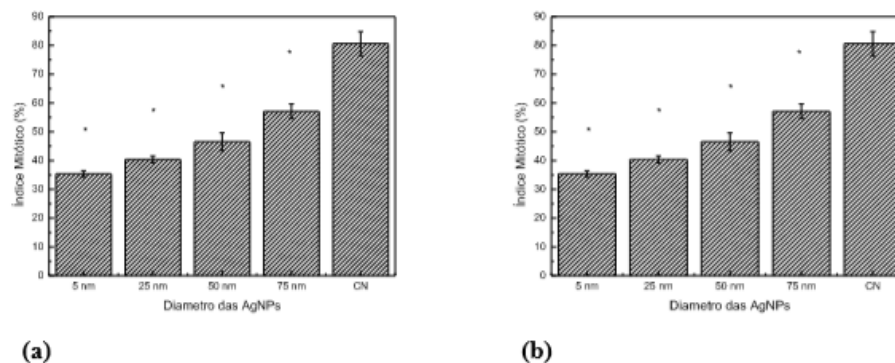


Figura 1: Resultado de índice mitótico (%) em células meristemáticas de *Allium cepa* (a) e *Vicia faba* (b) em relação ao diâmetro (nm) das AgNPs. A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi representada por (*).

Os resultados de índice de anormalidades nucleares indicam que quanto menor a nanopartícula de prata, mais anormalidades as mesmas causaram para as células, tanto de *Allium cepa* quanto de *Vicia faba*. As anormalidades nucleares dos cromossomos são causadas pelas alterações de sua estrutura, que pode ser resultado de rupturas ou troca de material genético (figura 2). A aderência dos cromossomos pode ser atribuída ao emaranhamento das fibras de cromatina, sendo comum quando os cromossomos são expostos em agentes genotóxicos sendo provavelmente irreversível (DARLINGTON et al., 1951).

Anormalidades nucleares também foram visualizadas em células meristemáticas de plantas agrícolas como na *Zea mays* quando expostas em NPs metálicas (RACUCIU et al., 2007).

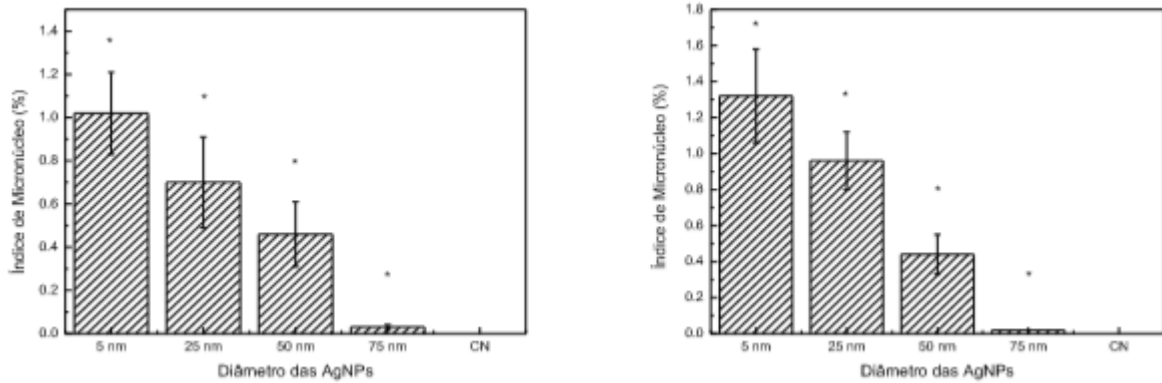


Figura 2: Resultado de índice de anomalias nucleares (%) em células meristemáticas de *Allium cepa* (a) e *Vicia faba* (b) em relação ao diâmetro (nm) das AgNPs. A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi representada por (*).

Os mesmos resultados foram observados para o índice de micronúcleo, onde quanto menor as nanopartículas mais micronúcleos apareceram nas células (figura 3). A formação de micronúcleo mostra que as NPs de prata são mutagênicas. Foram observados resultados semelhantes em outras pesquisas (XU et al., 2012), onde as nanopartículas possuem potencial mutagênico.

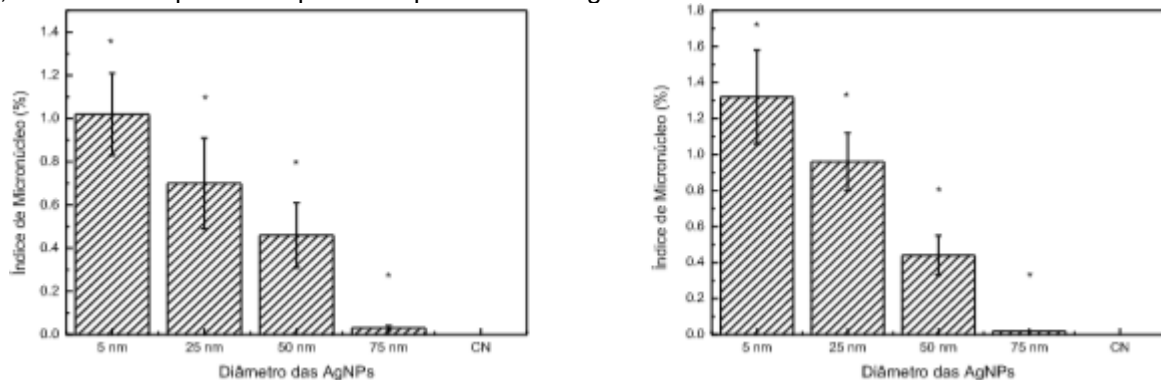


Figura 3: Resultado de índice de micronúcleo (%) em células meristemáticas de *Allium cepa* (a) e *Vicia faba* (b) em relação ao diâmetro (nm) das AgNPs. A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi representada por (*).

As nanopartículas de menores dimensões causaram maiores danos nas células dos dois bioindicadores, provavelmente as partículas maiores seriam muito grandes para atravessar os poros das paredes celulares das raízes, assim a acumulação das partículas na parede pode conduzir a uma diminuição na condutividade dessas paredes, pela acumulação das mesmas na camada limite da célula. O que pode explicar os maiores danos causados pelas menores dimensões (menores que 25 nm) das nanopartículas (ASLI et al., 2009).

Os resultados indicam que as nanopartículas de prata são capazes de atravessar a parede celular das células vegetais e causarem danos no material genético. E ainda que, as plantas apresentam classes e famílias distintas, os resultados foram parecidos, sendo os efeitos dependentes do tamanho das nanopartículas.

Conclusões

As AgNPs podem penetrar nas células das plantas através da parede celular, e assim em contato direto com a planta alterar a divisão celular e provocar alterações nucleares tanto em *A. cepa* quanto na *V. fava*. Notou-se que a medida que o tamanho das AgNPs diminuiu houve aumento dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos nas células. Assim, essas constatações apresentam que esses resultados estão relacionados ao tamanho das NPs, pois a medida que diminui seu tamanho aumenta a sua área superficial total interagente com a planta para uma dada concentração de NPs.

Portanto, estes resultados contribuem com informações complementares sobre a toxicidade das AgNPs em sistemas de plantas superiores e bases para o entendimento da importância das propriedades das diversas NPs e seus riscos para o meio ambiente.

Além disso, podemos concluir que os dois sistemas usados para os testes (*A. cepa* e *V. fava*) mesmo apresentando classes e famílias distintas, obtiveram resultados parecidos e complementares, nos mostrando que tanto a *Allium cepa* quanto a *Vicia faba* são organismos competentes para nos dar respostas quando expostas a substâncias tóxicas.

Referências bibliográficas

- ASLI, S.; NEUMANN, P. M. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. **Plant, cell & environment**, v. 32, n. 5, p. 577-584, 2009.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F. da; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 444-7, 2007.
- DARLINGTON, C. D.; MCLEISH, J. Action of maleic hydrazide on the cell. **Nature**, v. 167, n. 4245, p. 407, 1951.
- GOTTSCHALK, F. et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 24, p. 9216-9222, 2009.
- KANAYA, N.; GILL, B. S.; GROVER, I.S.; MURIN, A.; OSIECKA, R.; SANDHU, S.S.; ANDERSON, H. C. Vicia faba chromosomal aberration assay. **Mutat. Res.**, 310:231-247, 1994.
- LOVERN, S. B.; STRICKLER, J. R.; KLAPER, R. Behavioral and physiological changes in Daphnia magna when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nanoC60, and C60HxC70Hx). **Environmental science & technology**, v. 41, n. 12, p. 4465-4470, 2007.
- LU, W. et al. Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. **Chemical physics letters**, v. 487, n. 1, p. 92-96, 2010.
- MOHAMMED, K. P. et al. Forskolin: genotoxicity assessment in Allium cepa. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 777, p. 29-32, 2015.
- RACUCIU, M. et al. TMA-OH coated magnetic nanoparticles internalized in vegetal tissue. **Romanian Journal of Physics**, v. 52, n. 3/4, p. 395, 2007.
- SCHINDELIN, Johannes et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 676, 2012.
- SIMONET, B. M.; VALCÁRCEL, Miguel. Monitoring nanoparticles in the environment. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 393, n. 1, p. 17, 2009.
- SOUZA, Gustavo Duarte de et al. Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación química**, v. 24, n. 1, p. 14-16, 2013.
- SOUZA, Gustavo Duarte de et al. Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación química**, v. 24, n. 1, p. 14-16, 2013.
- WEI, L. et al. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, Dunaliella tertiolecta. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 194-201, 2010.
- XU, Liming et al. Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel. **Journal of nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 16, 2012.