

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MICROPOLUENTES EMERGENTES: POTENCIAL GENOTÓXICO DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS METÁLICOS**

ISMAEL KRÜGER PESCKE

Porto Alegre, julho de 2022

MICROPOLUENTES EMERGENTES: POTENCIAL GENOTÓXICO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS METÁLICOS

Ismael Krüger Pescke

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Aprovado em: 8 de julho de 2022.

Orientação: Profa. Dra. Vera Maria Ferrão Vargas

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Luciane Oliveira Crossetti (UFRGS)

Profa. Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob (UFSCar)

Prof. Dr. Flávio Manoel Rodrigues da Silva Júnior (FURG)

Porto Alegre, julho de 2022

CIP - Catalogação na Publicação

Pescke, Ismael Krüger

Micropoluentes emergentes: potencial genotóxico de nanopartículas de óxidos metálicos / Ismael Krüger
Pescke. -- 2022.

75 f.

Orientadora: Vera Maria Ferrão Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Nanoecotoxicologia. 2. Genética Toxicológica. 3. Biomarcadores de Genotoxicidade. 4. Ecologia da Poluição. I. Vargas, Vera Maria Ferrão, orient. II. Título.

“A ecologia tem uma importância fundamental e tem de estar em qualquer prática educativa de caráter radical, crítico ou libertador” (Paulo Freire, 2000, p. 67).

AGRADECIMENTOS

Quero expressar meus agradecimentos à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo meu desenvolvimento como profissional e cidadão. Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e seu corpo docente pela dedicação em planejar e construir o conhecimento de maneira virtual nesse período pandêmico que nos surpreendeu. Ao Centro de Ecologia, seus servidores e terceirizados, que mesmo nos dois anos de pandemia e distanciamento social, quando pouco os encontrava, sempre foram muito acessíveis. Ao CNPq pelo apoio financeiro durante os 24 meses iniciais do período de pós-graduação (Processo 132045/2020-6). Agradeço à Profa. Dra. Vera Vargas pela oportunidade de realizar esse trabalho e pela confiança em construir mais este desafiador projeto. Fico imensamente grato por toda atenção, paciência e dedicação desde o início do trabalho, quando surgiu a ideia das nanopartículas! O apoio e a troca de conhecimento foram fundamentais para a conclusão de mais esta etapa e são o incentivo para as próximas. À Lívia, pela amizade, companheirismo e apoio para a conclusão da pesquisa (prontos para as próximas!), porque viu que não foi fácil trabalhar com essas gurias, as nanoparticles, e compartilhou a tensão dentro e fora do lab, além de ser uma grande motorista da rodada. Obrigado ao grupo que se dedicou em qualquer parte desta pesquisa. Meus agradecimentos à Profa. Tatiane, que resolveu conosco as dúvidas iniciais e auxiliou na obtenção do material. Ao Prof. Wladimir, que trabalhou na síntese e caracterização das nanopartículas. Ao Prof. Johnny pelas análises PIXE. À Karoline, que se manteve disposta a auxiliar e preparar nossas ferramentas de pesquisa. Aos demais colegas do Laboratório de Mutagênese Ambiental. Grato ao Dr. Alexandre, que instigou dúvidas e procurou nos auxiliar no desenvolvimento de outras etapas do trabalho, assim como o Prof. Rafael. Um agradecimento especial para a minha família, meus pais, minhas irmãs e sobrinhos, e ao Deivid, meu romance... grato pelo carinho e incentivo que somados resultam na concretização de mais essa etapa de crescimento pessoal e amadurecimento profissional. Obrigado aos demais professores, colegas e amigos que já contribuíram nos meus caminhos pelas Ciências e foram fundamentais na minha formação como ser humano. Seguimos!

RESUMO

PESCKE, I.K. **Micropoluentes emergentes: potencial genotóxico de nanopartículas de óxidos metálicos**. 2022. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022.

As nanopartículas óxido-metálicas (NPs) estão sendo cada vez mais aplicadas em diferentes atividades industriais e em produtos de uso cotidiano por suas propriedades químicas e físicas. Essas distintas aplicações fazem das NPs produtos inerentes ao depósito no ambiente e que apresentam uma possível via de interação com a biota e os seres humanos, sendo classificadas como Micropoluentes Emergentes (MEs). Em virtude de seu tamanho nanométrico, esses MEs têm alta propensão de penetrar as células e interagir com macromoléculas de organismos da biota aquática ou terrestre por diferentes vias de exposição (inalação, ingestão, absorção dérmica e via branquial) podendo causar estresse oxidativo, citotoxicidade, genotoxicidade e carcinogênese. Apesar disto, os riscos à saúde e ao ambiente ainda estão sendo investigados por meio de estudos nanoecotoxicológicos. Compreender o efeito das NPs explorando sua ação sobre os organismos e sistemas biológicos é fundamental, visto que não há regulamentações específicas para estes nanomateriais. Frente a essas evidências, o presente estudo analisou a citotoxicidade e mutagênese de NPs de óxido de níquel (NiO-NP) e óxido de zinco (ZnO-NP) através do ensaio *Salmonella*/microsoma modificado. Foram empregadas linhagens de *Salmonella enterica* sorovar *Typhi*, auxotróficas para histidina, que medem erros no quadro de leitura (TA97a e TA98) e substituição de pares de bases do DNA (TA100 e TA102). Os resultados indicaram atividade mutagênica para ambas NPs nas condições analisadas, exceto para TA102 em ausência de metabolização. Em pH neutro, NiO-NP e ZnO-NP induziram respostas com mecanismos mutagênicos similares, com maior indução indireta através da geração de metabólitos (TA97a+S9; TA98+S9; TA100±S9; e TA102+S9). Em pH ácido, ambas NPs induziram respostas diretas e indiretas do tipo substituição de pares de bases (TA100±S9 e TA102+S9). No entanto, para NiO-NP foi observada mutagênese por erro no quadro de leitura, direta e indireta (TA97a±S9 e em

TA98+S9), enquanto ZnO-NP induziu somente mutagênese direta (TA97a-S9 e TA98-S9). Foi possível evidenciar, no conjunto de dados, maior presença de dano direto frente a linhagem TA97a, sensível a metais, sendo que em pH neutro a mutagênese foi mais significativa do que na condição acidificada. Ainda assim, as linhagens que medem substituição de pares de bases mostraram respostas mais elevadas, diretas e indiretas frente a linhagem TA100, ou somente ativadas por mecanismos de metabolização para a linhagem sensível a estresse oxidativo (TA102). Os resultados obtidos neste estudo indicam a atividade citotóxica e mutagênica de NPs de óxidos metálicos sobre as linhagens *Salmonella* e sugerem diferentes modos de ação dessas NPs sobre o material genético e celular.

Palavras-chave: Teste de Ames; Nanoecotoxicologia; Genética Toxicológica; Biomarcadores de Genotoxicidade; Ecologia da Poluição.

ABSTRACT

PESCKE, I.K. **Emerging micropollutants: genotoxic potential of metal oxide nanoparticles.** 2022. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022.

Metal oxide nanoparticles (NPs) are being increasingly applied in different industrial activities and in products for everyday use, because of their chemical and physical properties. Due to these different applications, NPs are products inherent to deposition in the environment, and they present a possible route of interaction with the biota and human beings. They are classified as Emerging Micropollutants (EMs). Because of their nanometric size, these EMs have a high propensity to penetrate cells and interact with the macromolecules of aquatic or terrestrial biota organisms by different routes of exposure (inhalation, ingestion, and dermal absorption), causing oxidative stress, cytotoxicity, genotoxicity, and carcinogenesis. Despite this, risks to health and the environment are still being investigated through nanoecotoxicological studies. It is essential to understand the effects of the NPs, exploring their action on the organisms and biological systems, since there are no specific regulations for these nanomaterials. In face of this evidence, the present study analyzed the cytotoxicity and mutagenesis of Nickel Oxide (NiO-NP) and Zinc Oxide (ZnO-NP) NPs using a modified *Salmonella*/microsome assay. Strains of *Salmonella enterica* sorovar *Typhi* were used, auxotrophic for histidine, that measure frameshift errors (TA97a and TA98) and base pair substitution of DNA (TA100 and TA102). The results indicated mutagenic activity for both NPs under the conditions analyzed, except for TA102, in the absence of metabolization. In a neutral pH, NiO-NP and ZnO-NP induced responses with similar mutagenic mechanisms, with a greater indirect induction by the generation of metabolites (TA97a-S9; TA98+S9; TA100±S9; and TA102+S9). In acid pH, both NPs induced responses of the base pair substitution type, depending or not on metabolization (TA100±S9 and TA102+S9). Nevertheless, for NiO-NP mutagenesis by direct and indirect frameshift error was observed (TA97a±S9 and in TA98+S9), while ZnO-NP induced only direct mutagenesis (TA97a-S9 and TA98-S9). In the ensemble of data, it was possible to show evidence of a greater presence of

direct damage in the face of the TA97a strain, sensitive to metals, and in neutral pH the mutagenesis was more significant than under the acidified condition. All the same, the strains that measure base pair substitution showed higher responses, direct and indirect, in the face of strain TA100, or only activated by metabolization mechanisms for the strain that was sensitive to oxidative stress (TA102). The results obtained in this study indicate cytotoxic and mutagenic activity of NPs of metal oxides on the *Salmonella* strains and suggest different modes of action of these NPs on the genetic and cellular material.

Keywords: Ames Test; Nanoecotoxicology; Genetic Toxicology; Genotoxicity biomarkers; Pollution Ecology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação de uma escala nanométrica relacionando componentes biológicos com alguns nanomateriais fabricados 18
- Figura 2.** Número de produtos com nanomateriais no mercado catalogados na base de dados Nanodatabase (<https://nanodb.dk>) entre 2012 e 2021 19
- Figura 3.** Possíveis rotas de exposição das nanopartículas ao ambiente e seres humanos, considerando o processo produtivo, uso e descarte de produtos, e as modificações que podem ocorrer com os nanomateriais no ambiente 20
- Figura 4.** Propriedades físico-químicas dos materiais nanoestruturados que podem ser relacionadas à sua toxicidade 22
- Figura 5.** Percentual de exposição e de perigo aos seres humanos e ao meio ambiente referente aos produtos listados em Nanodatabase (2022). (a) percentual de exposição dos produtos ao ambiente; (b) percentual de exposição dos produtos ao consumidor final; (c) percentual de exposição dos produtos para os profissionais (ocupacional); (d) via de exposição dos produtos aos seres humanos; (e) potencial de perigo aos seres humanos; (f) potencial de perigo para o ambiente 23
- Figura 6.** Número de produtos com nanomateriais disponíveis no mercado e catalogados na base de dados Nanodatabase (<https://nanodb.dk>) na última década 36
- Figura 7.** Esquema do ensaio *Salmonella*/microsossoma método de microsuspensão modificado 39
- Figura 8.** Comparativo da soma dos efeitos de atividade mutagênica nas diferentes condições de ensaio. (a) soma dos efeitos de atividade mutagênica (revertentes/ μ g) em ensaios de mutagênese direta (-S9) e indireta (+S9); (b) soma dos efeitos de atividade mutagênica (revertentes/ μ g) em ensaios com linhagens que detectam erros no quadro de leitura (TA97 e TA98) e troca de pares de bases (TA100 e TA102) na ausência e presença de metabolização (-S9 e +S9); A, pH 5; N, pH 7.5 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos resultados (médias de colônias revertentes \pm SD) obtidos no ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma após exposição a soluções de NiO-NP e ZnO-NP frente às diferentes linhagens na ausência e presença de ativação metabólica (S9)	42
--	----

LISTA DE ABREVIACES

2AF - 2-Aminofluoreno

4NQO - 1-xido de 4-nitroquinolina

ANA - Agência Nacional de guas

ANOVA - Anlise de Varincia

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry

AZS - Azida Sódica

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de So Paulo

C.M.E - Concentrao Mutagênica Efetiva

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DMSO - Dimetilsulfóxido

ETE - Estao de Tratamento de Esgoto

IARC - International Agency for Research on Cancer

INCA - Instituto Nacional de Cncer

IZA - International Zinc Association

NiO - xido de Níquel

NP/NPs - Nanopartícula / Nanopartículas

OECD - Organization for the Economic Cooperation and Development

OMS - Organizao Mundial da Saúde

ONU - Organizao das Naes Unidas

SALANAL - *Software Salmonella Assay Analysis*

S9 - Frao de Metabolizao

USEPA - Agência de Proteo Ambiental dos Estados Unidos

WHO - World Health Organization

ZnO - xido de Zinco

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Lista De Figuras.....	vii
Lista De Tabelas.....	viii
Lista De Abreviações.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	17
1.1. Nanotecnologia.....	17
1.2. Nanopartículas no ambiente e riscos associados aos organismos.....	20
1.3. Metais e nanopartículas óxido-metálicas.....	24
1.3.1. Níquel.....	25
1.3.2. Zinco.....	26
1.4. Nanoecotoxicologia e os biomarcadores.....	27
1.4.1. Ensaio Salmonella/microsoma.....	29
2. OBJETIVOS.....	31
CAPÍTULO I.....	32
AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS ÓXIDO-METÁLICAS PELO ENSAIO SALMONELLA/MICROSSOMA.....	32
Potencial tóxico e mutagênico de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e óxido de níquel (NiO) pelo ensaio Salmonella/microsoma.....	33
Resumo.....	34
Graphical abstract.....	34
Introdução.....	35
Material e métodos.....	37
Síntese e caracterização de nanopartículas.....	37
Preparo de concentrações.....	38
Ensaio de genotoxicidade.....	38
Análise dos dados.....	40
Resultados.....	40

Discussão	44
Conclusões	48
Agradecimentos	49
Referências	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	60
REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO	63



1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Nanotecnologia

Pode-se afirmar que a utilização de materiais nanoestruturados não é uma novidade: os romanos já trabalhavam com impregnação de ouro e prata de escalas nanométricas em ornamentações no século IV. No entanto, o avanço dessa tecnologia foi acontecendo concomitante à produção de microscópios eletrônicos mais potentes e que pudessem distinguir materiais em escala nanométrica, como o microscópio eletrônico de varredura (MEV) e o de transmissão (MET). Assim, com o progresso da humanidade e das ciências, a produção de materiais cada vez menores foi possível pela pesquisa científica no campo da nanotecnologia aliado às inovações tecnológicas (Barhoum et al., 2022).

Essas inovações permitem uma gama crescente de possibilidades em relação à manipulação de estruturas em níveis atômico e molecular, resultando em materiais de dimensões nanométricas. A nanotecnologia por si pode ser entendida como a “caracterização, produção e aplicação de estruturas e sistemas, controlando a forma e o tamanho de materiais em escala nanométrica” (Donaldson et al., 2004; Royal Society, 2004). Por sua vez, o comitê técnico da Organização Internacional de Normalização (ISO - 229) busca padronizar mais que somente a nomenclatura, como também os materiais de referência, as metodologias de teste para pesquisas de saúde, biossegurança e meio ambiente baseada nesta ciência. Para a ISO (2005), o campo da Nanotecnologia inclui:

1. Compreensão e controle de matéria e processos em nanoescala, geralmente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros em uma ou mais dimensões, no qual o aparecimento de fenômenos dependentes de tamanho geralmente permite novas aplicações.

2. Utilização das propriedades de materiais em nanoescala que diferem das propriedades de átomos individuais, moléculas e da matéria em escala maior, para produzir materiais, dispositivos e sistemas aprimorados que exploram essas novas propriedades (International Organization for Standardization, 2005, *on-line*, tradução do autor).

Dessa maneira, através da nanotecnologia os seres humanos são capazes de produzir, controlar e manipular objetos menores do que algumas células eucariontes e organismos unicelulares (Fig. 1). O campo da nanotecnologia se desenvolve rapidamente em virtude das tecnologias modernas, sendo uma das áreas em maior expansão no mundo. A fabricação de produtos destinados ao mercado e toda a cadeia produtiva abre novas possibilidades econômicas, além de somar investimentos em inovação industrial e em pesquisas de desenvolvimento.

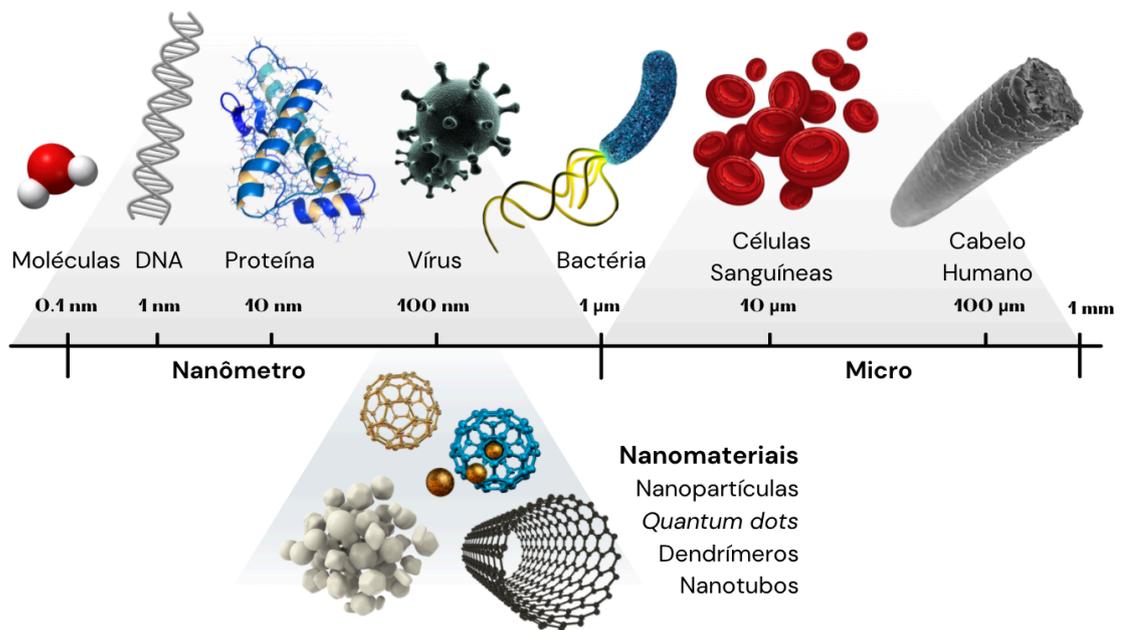


Figura 1. Representação de uma escala nanométrica relacionando componentes biológicos com alguns nanomateriais fabricados. Fonte: Elaboração própria.

A redução no intervalo de tamanho está associada a modificações nas atividades química, física e biológicas dos materiais, resultando em aumento relativo da área superficial e promoção do efeito *quantum*, efeito de forças de atração. Os nanomateriais apresentam propriedades ópticas, magnéticas, elétricas, dentre outras bem estabelecidas, por isso são úteis para a aplicação em uma variedade de produtos cotidianos da sociedade moderna (Royal Society, 2004). Ao realizar um comparativo entre os anos de 2012 e 2021, constata-se um grande aumento no número de produtos comercializados que contêm nanomateriais em sua composição (Fig. 2).

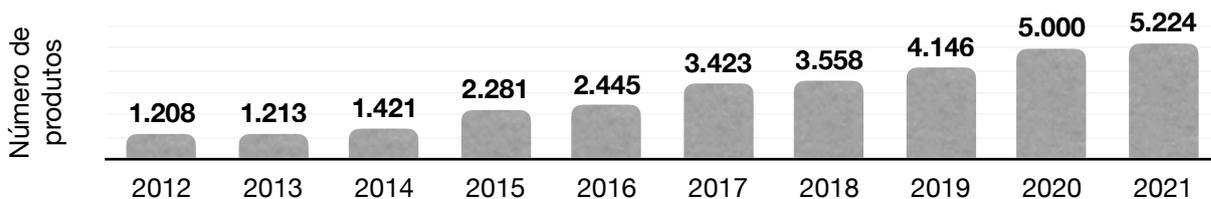


Figura 2. Número de produtos com nanomateriais no mercado catalogados na base de dados Nanodatabase (<https://nanodb.dk>) entre 2012 e 2021. Fonte: Elaboração própria a partir dos dados de The Nanodatabase (2022).

De maneira geral, dentre algumas aplicações das NPs, podem ser mencionadas:

- Nas ciências ambientais, em biorremediação, na agricultura, como biocida, carreador de agroquímicos e defensivos, como estimulantes para o desenvolvimento de culturas vegetais, induzindo germinação de sementes e outros processos do ciclo de vida das plantas (Aslani et al., 2014; Stark et al 2015; Faizan et al., 2020);
- Aplicações na medicina e na indústria farmacêutica, em tratamentos e no diagnóstico de doenças, em sistemas de distribuição direcionada e liberação controlada de medicamentos ou drogas terapêuticas (Choi & Choy, 2014; Khan et al., 2017);
- Em cosméticos, produtos de higiene e cuidado pessoal, especialmente ZnO e TiO₂ em protetores-solar em razão da capacidade de absorção e reflexão da luz UV; em pomadas, géis, aerossóis, fornecendo propriedades bactericidas (Stark et al., 2015; Subramaniam et al., 2018; Khan et al., 2017; Fytianos et al., 2020; Ferraris et al., 2021);
- No ramo de eletroeletrônicos, agregam em componentes e circuitos, em laser e material óptico, baterias, entre outros (Parihar et al., 2018; Khan et al., 2017);
- Na indústria têxtil, se aplicadas entre camadas de tecidos podem auxiliar na elasticidade e propriedades térmicas, são capazes de fornecer resistência à água, produzir tecidos “respiráveis” (que permitem que vapores sejam liberados sem superaquecer o corpo), controlar a porosidade e fornecer proteção UV (ZnO) (Becheri et al., 2008; Wigger et al., 2015; Moloi et al., 2021; Nizam et al., 2021);
- Em tintas e revestimentos de superfície são capazes de criar resistência, aumentar os efeitos ópticos, fornecer capacidade bactericida e biocida ao eliminar microorganismos e impedir o seu crescimento nas superfícies, como é utilizado em tintas anti-incrustantes em cascos de navio (Moloi et al., 2021; Nizam et al., 2021).

1.2. Nanopartículas no ambiente e riscos associados aos organismos

O volume crescente das NPs em produtos cotidianos faz com que o ambiente receba gradualmente mais resíduos destes micropoluentes. A exposição ambiental pode acontecer por diferentes rotas, como liberação acidental, liberação direta por meio da adição de nanomateriais para fins de remediação e de produtos ou processos industriais, bem como de produtos comerciais durante os usos pretendidos (Fig. 3) (Royal Society, 2004; Aslani et al., 2014; Park et al., 2016; EUON, 2017; Nowack, 2017).

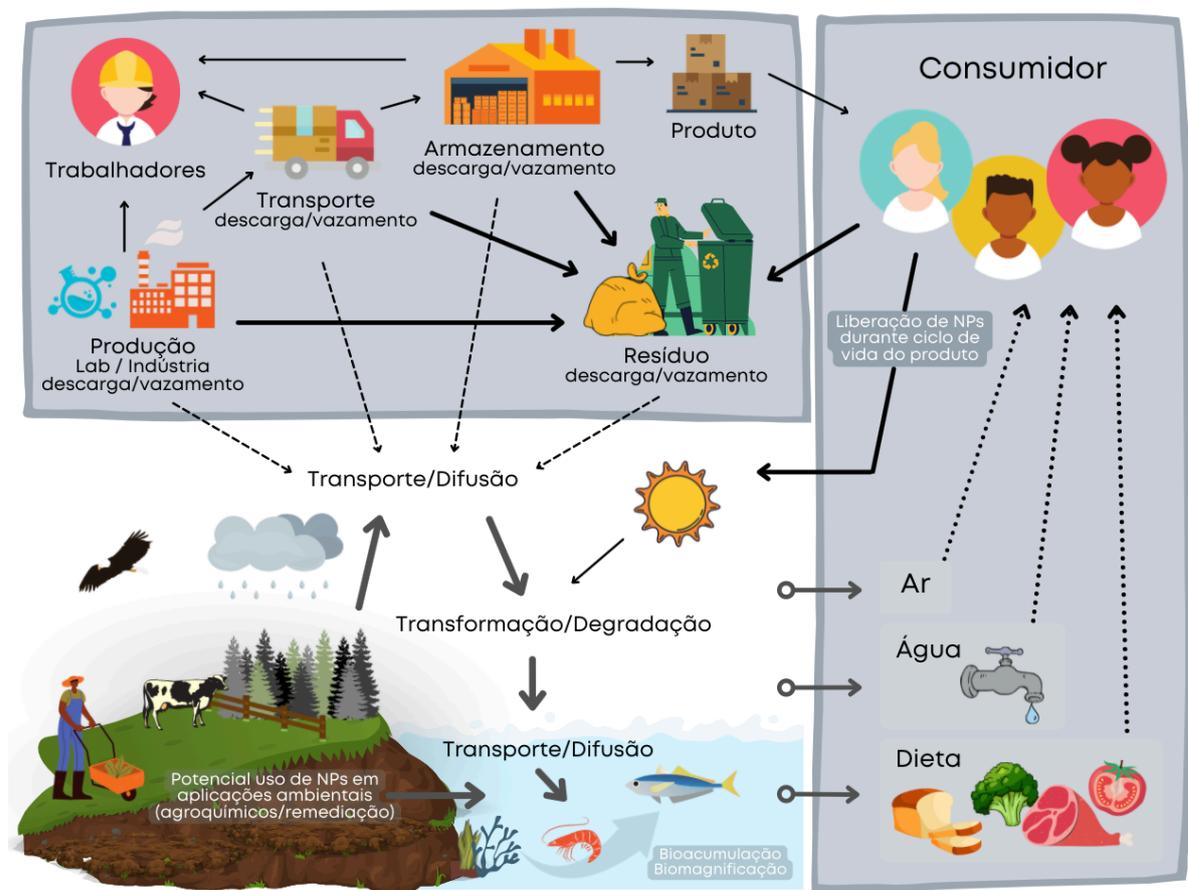


Figura 3. Possíveis rotas de exposição das nanopartículas ao ambiente e seres humanos, considerando o processo produtivo, uso e descarte de produtos, e as modificações que podem ocorrer com os nanomateriais no ambiente. Fonte: Adaptado de Royal Society (2004).

O risco ambiental depende da toxicidade do material que constitui a NP e às quantidades em que elas são descartadas. Ainda assim, são esperados diferentes padrões para emissão das NPs, uma vez que essas são aplicadas de maneiras distintas e em diferentes produtos comerciais (Keller et al., 2013). Diversos estudos buscam estimar a quantidade de

NPs no ambiente, seus processos de transformação e seu destino (Boxall et al., 2007; Gottschalk et al., 2009; 2015; Piccinno et al., 2012; Sun et al., 2014; Dumont et al., 2015; Wigger et al., 2015; Markus et al., 2016; Mahaye et al., 2017; Nowack, 2017; Zheng et al., 2019; Suhendra et al., 2020; Xiao et al., 2021). Os nanomateriais em geral estão classificados como Micropoluentes Emergentes (MEs), como são conhecidos os compostos que mesmo em concentrações traço são detectados no ambiente aquático e podem ocasionar alterações ambientais (Tijani et al., 2016).

O destino das NPs no ambiente não é explícito, uma vez que se comportam de modo distinto em contato com diferentes meios (Powers et al., 2009). Ainda assim, o ambiente aquático é o destino predominante, onde as NPs podem ser transformadas ou se dissociarem, interagindo com fatores abióticos e bióticos (óxidos, fosfatos, silicatos, matéria orgânica, microrganismos) além de outros poluentes no ambiente (Liu et al., 2014). Nesse sentido, as NPs podem se dissolver ou se combinar a outros compostos, serem depositadas no sedimento ou dispersas de modo geral no ecossistema (EUON, 2017).

No compartimento aquático, efluentes pós tratamento de esgoto carregam uma quantidade de resíduos de NPs que persistiram ao tratamento, incluindo NPs de fármacos, que são excretadas em maior quantidade do que biodegradadas (Royal Society, 2004). Os efluentes formam misturas com diferentes classes de substâncias orgânicas e inorgânicas, como resíduos de agrotóxicos, fármacos, aditivos alimentares, corantes têxteis, metais pesados, NPs, dentre outros compostos persistentes (Tröger et al., 2018; Crini et al., 2019; Lee et al., 2022). Além disso, por vezes, o lodo das Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) é recolocado no solo e carrega os contaminantes para este compartimento (Keller et al., 2013; Mazzeo et al., 2016; OECD, 2016; Kacprzak et al., 2017).

As NPs apresentam alta capacidade de agregação em virtude da carga superficial, que está associada com a adsorção de íons e biomoléculas, fato que pode potencializar a estabilidade desses contaminantes e prolongar a ação tóxica sobre os organismos. Além disso, a energia de superfície modifica o comportamento de agregação, dissolução e bioacumulação pelo aumento da interação destes nanomateriais com outras substâncias. Ainda assim, o tamanho e a morfologia das NPs têm efeito pronunciado na sua toxicidade sobre os seres vivos (Fig. 4) (Grassian, 2008; Powers et al., 2009; Balasubramanyam et al., 2010; Kwon et al., 2014; Sadiq et al., 2014; Peretyazhko et al., 2014; Barhoum et al., 2022).



Figura 4. Propriedades físico-químicas dos materiais nanoestruturados que podem ser relacionadas à sua toxicidade. Fonte: Elaboração própria.

O tamanho nanométrico potencializa a habilidade de penetração celular, além de influenciar na capacidade de dispersão (trânsito) no interior do organismo, definindo o destino e deposição das NPs em células, tecidos ou órgãos (Donaldson et al., 2004; Royal Society, 2004; Powers et al., 2009; NIH, 2020; Barhoum et al., 2022). A título de exemplo, as NPs menores que 50 nanômetros podem entrar facilmente nas células, enquanto que abaixo de 20 nanômetros são capazes de se mover para fora dos vasos sanguíneos à medida que circulam pelo corpo humano (NIH, 2020). A dimensão nanométrica das NPs é um ponto significativo no estudo de sua toxicidade. Para tal, Donaldson et al. (2004) propuseram uma área temática a fim de elucidar a compreensão das implicações decorrentes da exposição aos nanomateriais, denominada “nanotoxicologia”.

Neste campo de estudo, diversas pesquisas têm indicado alterações celulares e moleculares provocadas pela exposição às NPs que podem implicar na manutenção das atividades vitais dos organismos, como desenvolvimento, reprodução e comportamento (Skjolding et al., 2014; Nilsen et al., 2018; Czyżowska; Barbasz, 2020; Barhoum et al., 2022). Há indícios de que as NPs participem ativamente em reações de oxidação e redução (Powers et al., 2009; Barhoum et al., 2022). A nível celular, o principal mecanismo de ação direta das NPs metálicas é a desestabilização da membrana, enquanto que os danos secundários (indiretos) acontecem pela liberação de íons tóxicos. Tal fato induz a produção de radicais livres (EROS) desencadeando estresse oxidativo, resposta inflamatória e citotoxicidade (apoptose) (Spence et al., 2016; Parihar et al., 2018; Singh, 2018; Subramaniam et al., 2018; Czyżowska; Barbasz, 2020; Barhoum et al., 2022).

A figura 5 exibe informações sobre a toxicidade de NPs atualmente comercializadas na composição de produtos cotidianos. Verifica-se que há alto perigo potencial ao ambiente, consumidores e trabalhadores para a maior parte dos produtos comercializados (Fig. 5a, 5b e 5c, respectivamente), sendo que o contato dérmico é a principal rota de exposição aos seres humanos (Fig. 5d). A pele é o maior órgão do corpo humano e está exposta ao ambiente e à aplicação tópica de produtos contendo NPs (como protetores-solar). Lesões podem facilitar a penetração de NPs. Geralmente, produtos cosméticos são propostos para uso na pele não danificada (sem feridas) e os testes toxicológicos de penetração em epiderme consideram esse aspecto (EUON, 2017). Além disso, se desconhece o perigo potencial da maior parte dos nanomateriais utilizados (Fig. 5e e 5f).

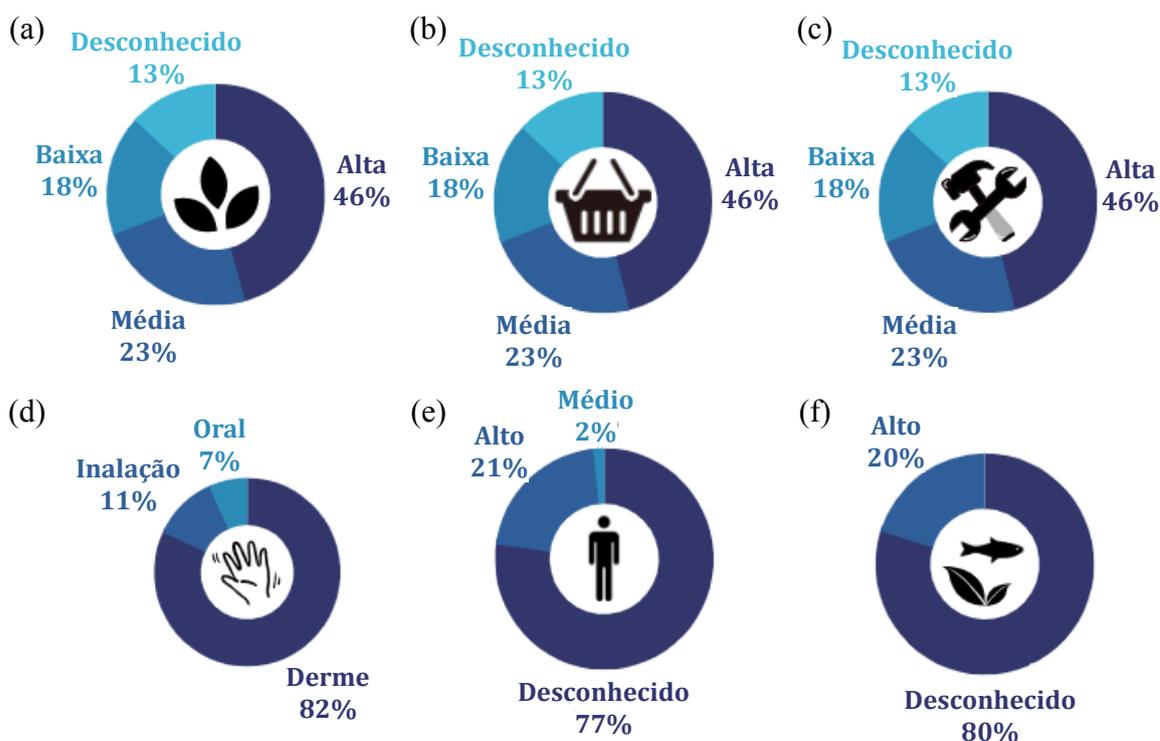


Figura 5. Percentual de exposição e de perigo aos seres humanos e ao meio ambiente referente aos produtos listados em Nanodatabase (2022). (a) percentual de exposição dos produtos ao ambiente; (b) percentual de exposição dos produtos ao consumidor final; (c) percentual de exposição dos produtos para os profissionais (ocupacional); (d) via de exposição dos produtos aos seres humanos; (e) potencial de perigo aos seres humanos; (f) potencial de perigo para o ambiente. Fonte: Elaboração própria a partir dos dados de The Nanodatabase (2022).

A exposição comumente acontece por via inalatória e oral. Em suspensão na porção inalável, a toxicidade das partículas é atribuída à presença de metais de transição na

superfície, cujo contato com os tecidos do corpo humano provoca a liberação de radicais livres. Pesquisas sobre NPs associadas à poluição atmosférica indicam toxicidade dose-dependente, provocando doenças respiratórias (asma, bronquite, enfisema, câncer de pulmão) e cardiovasculares (angina, doença arterial coronariana). Trabalhadores estão muito sujeitos à exposição ocupacional (Royal Society, 2004; EUON, 2017; Briffa et al., 2020; INCA, 2021). A toxicidade e a concentração do material são os fatores de risco para a rota de ingestão e via branquial, sendo que a poluição aquática e a contaminação dos alimentos propiciam esta exposição (Aslani et al., 2014; EUON, 2017; Czyżowska; Barbasz, 2020; INCA, 2021).

1.3. Metais e nanopartículas óxido-metálicas

Metais são elementos inorgânicos que ocorrem de forma natural no ambiente, sendo distribuídos pelos ciclos biogeoquímicos. Parte deles têm importância para o funcionamento dos organismos, como cobalto, cobre, ferro, manganês, molibdênio e o zinco, sendo classificados como *essenciais*. No entanto, outros não possuem função biológica conhecida e são considerados, portanto, como *não-essenciais*, como o alumínio, níquel, chumbo e mercúrio. A deficiência dos metais essenciais impossibilita funções biológicas, mas concentrações que excedem a homeostase natural provocam efeitos tóxicos. Já aqueles classificados como não-essenciais são reconhecidamente tóxicos mesmo em baixas dosagens (Briffa et al., 2020; INCA, 2021).

O principal aporte dos metais no ambiente se dá por fontes antrópicas, o que propicia um aumento das concentrações naturais e conseqüentemente os riscos associados à exposição a esses elementos. Neste caso, passam a ser chamados de metais pesados (IARC, 2012; Walker et al., 2012; ATSDR, 2017; Briffa et al., 2020; Barhoum et al., 2022). As características particulares destes compostos induzem respostas diferentes frente aos componentes biológicos: se o metal é lipossolúvel penetra facilmente na membrana celular; quando ligado à proteína ingressa na célula por endocitose ou difusão; já metais livres têm afinidade por certos processos bioquímicos e membranas celulares. Essa interação normalmente é responsável pelos efeitos tóxicos observados (INCA, 2021).

Se há preocupação acerca da emissão de metais tóxicos em seu estado comum, em dimensões nanométricas esses elementos podem ser ainda mais perigosos, considerando que

seus efeitos sobre sistemas biológicos não estão completamente elucidados e ainda são investigados pela comunidade científica. As NPs têm alta capacidade de se deslocarem no organismo através do sistema respiratório, trato gastro-intestinal ou pela pele, sendo translocadas para o sistema circulatório e linfático possibilitando o acesso a tecidos e órgãos (IARC, 2017; EUON, 2017; NIH, 2020; Barhoum et al., 2022).

As NPs de óxidos metálicos estão entre os nanomateriais mais empregados na composição de produtos do mercado consumidor e sua presença no ambiente é inevitável. Entre os metais mais utilizados estão o zinco e o níquel (Vance et al., 2015). A investigação de carcinogênese destas NPs em modelos animais está avançando e pesquisas epidemiológicas com seres humanos estão em andamento, por isso a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) recomenda prioridade nos estudos para os nanomateriais em geral (IARC, 2017; IARC, 2022).

1.3.1. Níquel

O Níquel é classificado como metal não-essencial. O metal e seus compostos têm ocorrência natural nas plantas, animais, solo e atmosfera. Sua função biológica está mais relacionada às plantas e microorganismos do que aos mamíferos, mas a sua deficiência já foi relacionada à diminuição na absorção de ferro em ratos. A população em geral está exposta a baixos níveis no ambiente, ar, alimentos, água e tabaco. A concentração deste metal no corpo humano varia entre 0.004-0.8 mM, mas fontes antropogênicas contribuem para elevar a presença destes elementos. O níquel compete com o sítio ligante do cobre na molécula da albumina e, uma vez ligado a ela, é transportado pela corrente sanguínea, sendo captado no fígado através dos canais de cálcio dos hepatócitos e geralmente excretado pela urina, pelos, pele, suor e leite materno, não sendo bioacumulativo (Valko et al., 2005; IARC, 2012; Angelé-Martínez et al., 2014; Briffa et al., 2020).

O metal está associado à produção de radicais livres implicando no processo de carcinogênese (Valko et al., 2005; Briffa et al., 2020). De acordo com a IARC, já se tem evidências do potencial carcinogênico do níquel e alguns compostos derivados, classificando-o como carcinogênico para seres humanos (Grupo 1) (IARC, 2012). A exposição ocupacional é a mais significativa e eleva os agravos na saúde, incluindo o risco carcinogênico. Em

estudos experimentais, percebeu-se formação de tumores em todos os sítios em que o metal foi aplicado/administrado (intramuscular, inalação, intraperitonal, infra-renal, intratesticular, intraocular e subcutâneo) (Valko et al., 2005; IARC, 2012). O níquel foi mais correlacionado a danos ao DNA e carcinogênese do que os outros íons metálicos avaliados na revisão de Angelé-Martínez et al. (2014). Ainda assim, são necessárias avaliações para as variações nanométricas deste metal e seus compostos.

O óxido de Níquel (NiO) é formado a partir da reação do pó de níquel com oxigênio. Por ser ótimo semicondutor, no ramo da nanotecnologia é muito aplicado na fotocatalise, em pilhas e baterias, sensores de gás e eletrocromicos; empregado em pigmentos, produtos agrícolas e cosméticos (Barakat et al., 2008; Danjumma et al., 2019; Pérez-Hernández et al., 2021). Os níveis de níquel no ambiente estão mais associados à ação antropogênica do que a fatores naturais. Compostos deste metal tendem a ser solúveis à medida em que o pH diminui, sendo que chuvas ácidas elevam sua mobilidade e dissolução (Mitrano et al., 2015).

1.3.2. Zinco

Como metal essencial, o zinco está presente no organismo associado a mais de 300 enzimas. O elemento participa da catálise e estabilização estrutural de metaloenzimas, está envolvido na síntese de RNA e DNA, na regulação dos mecanismos de reparo genético e proliferação celular (Valko et al., 2005; Angelé-Martínez et al., 2014; Briffa et al., 2020). No pâncreas, a ação do zinco é fundamental para a sinalização dos hormônios insulina e glucagônio e ativação de enzimas digestivas; já no sistema nervoso regula a transmissão sináptica, essencial para a nocicepção, a regulação de emoções, aprendizado e memória (Valko et al., 2005; Mielcarz-Skalska; Smolińska, 2017). Aproximadamente 90% do zinco no corpo humano é encontrado nos músculos esqueléticos e ossos, mas também está presente em órgãos como o fígado, rins, cérebro, pulmões, pele e outros (Valko et al., 2005).

No organismo, a deficiência de zinco pode gerar estresse oxidativo, sem envolver produção de EROS (Angelé-Martínez et al., 2014). Já concentrações extracelulares de Zn^{2+} que excedam a homeostase provocam influxo elevado e morte celular por necrose (Briffa et al., 2020). O zinco não é acumulado, mas o excesso se deposita nos rins e fígado e bloqueia a absorção de elementos como fósforo e cálcio podendo levar à carcinogênese (Mielcarz-

Skalska; Smolińska, 2017). Pela IARC, a classificação do metal é de possivelmente não carcinogênico para humanos e outros animais (Grupo 4) (Briffa et al., 2020).

A característica de espalhamento da luz UV do óxido de zinco (ZnO) garante ampla aplicação em produtos cosméticos e de higiene pessoal (principalmente protetores-solar) e em tintas e pigmentos; mas também é aplicado em plásticos e embalagens de alimentos, fertilizantes e biocidas, em baterias e eletrônicos, em retardante de chamas e na indústria têxtil (Dufour et al., 2006; Baek & An, 2011; Kwon et al., 2014; Parihar et al., 2018; Subramaniam et al., 2018; Solano et al., 2021; IZA, 2022).

Estima-se que a produção anual de ZnO-NP esteja entre 1.000 a 36.000 toneladas, sendo um dos materiais mais comuns em produtos de cuidado pessoal (Faizan et al., 2020; Sharifan, 2020; Moloi et al., 2021), por isto foi listado como nanomaterial representativo em OECD (2008). Boxall et al. (2007) calculam que as concentrações desse material em água superficial seja entre 76-760 µg/L, no solo de 3.1 a 31 µg/Kg, e alcança o valor de 21.722 mg/Kg para lodo de esgoto. Apesar disto, concentrações de até 10 µg/L estão associadas ao branqueamento de recifes de corais no Golfo Pérsico, provocando impactos em microorganismos, plantas e animais (Sharifan, 2020).

1.4. Nanoecotoxicologia e os biomarcadores

A introdução das NPs no mercado consumidor e seu rápido crescimento estabelecem novos paradigmas de precaução toxicológicos e ambientais. A falta de regulamentações para o desenvolvimento desses produtos faz das NPs um perigo em potencial (Walker et al., 2012; EUON, 2017; Granjeiro & Rossi, 2021). Recentemente, com um viés ambiental, elencou-se a nanoecotoxicologia como um campo de estudo emergente a partir da década de 2010 (Kahru & Dubourguier, 2010). Uma revisão da literatura indicou que a cada mil artigos com a palavra-chave “nanomaterial”, cerca de dez informavam os efeitos toxicológicos e apenas um pautava foco na questão ecotoxicológica (Kahru & Ivask, 2013).

Isto posto, é evidente a importância de estudos ecotoxicológicos para avaliar os efeitos decorrentes da exposição às NPs, a fim de elucidar os riscos que as populações humanas e naturais estão expostas. Dessa maneira, as análises sustentarão regulações imediatas, bem como metodologias e protocolos de avaliação nanoecotoxicológica destes materiais (Royal

Society, 2004; Kahru & Dubourguier, 2010; Granjeiro & Rossi, 2021; Invernizzi & Foladori, 2021).

Atualmente, inúmeros estudos ecotoxicológicos têm avaliado a exposição às NPs em espécies modelo, como bactérias, algas, crustáceos, peixes, anfíbios, entre outros, expostas em um único meio ou misturas (água, ar, sedimento, meio de cultura, matéria orgânica, ácidos) com o intuito de alertar possíveis danos das NPs aos sistemas biológicos. Sendo assim, os biomarcadores servem como um alerta precoce para efeitos que podem ser percebidos tardiamente (Walker et al., 2012).

A aplicação de ensaios com biomarcadores de genotoxicidade é apropriada para análise de risco relativo no ambiente, sendo que vários estudos relacionam danos ao material genético com subseqüente alterações a nível molecular, celular e tecidual nos organismos (Vargas et al., 2021). Mutações genéticas, ou seja, alterações de bases nitrogenadas e modificações numéricas ou estruturais nos cromossomos, são um dos fatores evolutivos que possibilitam a variabilidade genética. Porém, o acúmulo destas em células somáticas ou germinativas pode causar redução de populações naturais ocasionando riscos para a sobrevivência de indivíduos e a perda da biodiversidade de espécies (Futuyma, 2002).

Dentre as metodologias empregadas na nanotoxicologia, estão os ensaios *in vitro*, os quais apresentam vantagens como: (1) as células apresentam características-chave de todos os seres vivos (código genético), o que facilita a compreensão de mecanismos únicos e comuns de toxicidade, possibilitando a comparação entre espécies a nível celular; (2) as células podem ser mantidas em ambiente controlado e isolado dos sistemas fisiológicos, assim os mecanismos tóxicos a nível molecular e celular podem ser melhor avaliados; (3) a análise da toxicidade é mais rápida e econômica, sendo que muitos produtos químicos podem ser estudados simultaneamente (Castanõ et al., 2003).

Na revisão de Mahaye et al. (2017) são elencados alguns ensaios que investigam a ação genotóxica de NPs metálicas. Dentre algumas metodologias empregadas nestas pesquisas estão as análises citogenéticas com culturas celulares (ensaio cometa, micronúcleo, aberrações cromossômicas) e o ensaio *Salmonella*/microssoma (teste de Ames).

1.4.1. Ensaio *Salmonella*/microssoma

A análise através de biomarcadores permite detectar precocemente substâncias que podem causar efeitos negativos e deletérios para a biota e os seres humanos. Como um biomarcador de genotoxicidade, o ensaio de reversão com linhagens de *Salmonella* foi desenvolvido por Bruce Ames (1971), revisado por Maron & Ames (1983) e modificado por Kado et al. (1983) e outros pesquisadores.

O Teste de Ames, como é comumente denominado, se baseia na indução de mutação reversa no *operon* responsável pela síntese do aminoácido histidina (his). Este ensaio é amplamente utilizado na toxicologia e em estudos ambientais, empregado como triagem inicial na determinação do potencial mutagênico de novos produtos químicos na indústria e como ferramenta para análise de amostras ambientais complexas na academia (Mortelmans & Zeiger, 2000; Föllmann, 2013; Roubicek et al., 2021; Vargas et al., 2021). Por ser padronizado, os dados servem como resposta na avaliação de segurança química exigida por agências reguladoras para registro ou liberação de produtos químicos, medicamentos, pesticidas, aditivos alimentares, dentre outros (OECD, 2020).

As linhagens *Salmonella typhimurium* amplamente utilizadas nos ensaios têm grande sensibilidade na detecção de substâncias mutagênicas, pois foram construídas com modificações, tais como mutação no gene *rfa*, deleção no gene *uvrB*, presença de plasmídeos e mutações no *operon* da histidina. Assim, há marcadores como maior permeabilidade celular e de difusão de moléculas grandes para o meio intracelular, eliminação do sistema de reparo por excisão de DNA, resistência a antibióticos e auxotrofia para histidina (Maron & Ames, 1983; Kado et al., 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000; Umbuzeiro & Vargas, 2003).

A ação de algum composto induz mutações reversas que restauram a função do gene possibilitando que as células retomem a capacidade de síntese de histidina, cresçam e formem colônias. As linhagens respondem a interações com diferentes classes de compostos, porque possuem as mutações his⁻ em sequências específicas no seu código genético, sendo revertidas por erros no quadro de leitura e por substituição de pares de bases do DNA. O plasmídeo pKM101, presente nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102, eleva os valores de mutagênese espontânea e induzida por otimizar os mecanismos de reparo. Para TA102, adicionalmente, o plasmídeo multicópia pAQ1 amplia o número de sítios alvo no par de bases

AT, que pode ser revertida por todas as seis possibilidades de trocas de pares de bases (transversão/transição). Além disso, o gene *uvrB* nesta linhagem não foi deletado e por isto o sistema de reparo genético está intacto aumentando a habilidade na detecção de agentes indutores de danos, incluindo oxidativos (Maron & Ames, 1983; Kado et al., 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000; Umbuzeiro & Vargas, 2003).

Algumas substâncias necessitam passar por metabolização para induzirem atividade mutagênica ou o contrário, no caso de substâncias mutagênicas em seu estado natural que geram metabólitos não mutagênicos. Assim, de maneira complementar, no ensaio é incluído um sistema de ativação metabólica com células hepáticas e enzimas (*S9 mix*) que mimetiza a função de metabolização de mamíferos e pode converter os compostos permitindo a identificação de metabólitos gerados pelo sistema p450 de mamíferos *in vitro* (Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000; Roubicek et al., 2021).

Diversos trabalhos analisaram a potencialidade de NPs óxido-metálicas em induzir danos genéticos pelo ensaio *Salmonella*/microsossoma (Balasubramanyam et al., 2010; Landsiedel et al., 2010; Pan et al., 2010; Kumar et al., 2011; Doak et al., 2012; Jomini et al., 2012; Li et al., 2012; Lopes et al., 2012; Kwon et al., 2014; Sadiq et al., 2014; Akyil et al., 2015; Butler et al., 2015; Du et al., 2019; Demir et al., 2020; Zhang et al., 2022). Estes estudos têm mostrado respostas não conclusivas, motivando que modificações na metodologia do ensaio sejam aplicadas para aprimorar a detecção de resultados positivos frente à NPs, como um maior tempo de agitação em períodos anteriores e durante a exposição.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a toxicidade e atividade mutagênica de nanopartículas de óxido de níquel (NiO) e óxido de zinco (ZnO) por meio de biomarcadores de genotoxicidade.

Os seguintes **objetivos específicos** foram estabelecidos:

- Verificar o potencial mutagênico de nanopartículas de NiO e de ZnO em solução aquosa sob condições de pH neutro e levemente ácido, submetidas ao ensaio *Salmonella*/microsoma modificado;
- Revisar as propriedades físico-químicas relevantes para a interação das nanopartículas no ambiente aquático, com foco na biota e na saúde humana;
- Compreender os riscos associados à exposição destas nanopartículas aos organismos aquáticos e à saúde humana.

O presente estudo integra o projeto “Biomarcadores de genotoxicidade e o impacto de novos estressores ambientais nos ecossistemas e na saúde humana”, que conta com apoio financeiro do CNPq (Processo 307518/2019).

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS ÓXIDO-METÁLICAS PELO ENSAIO *SALMONELLA*/MICROSSOMA

É preciso analisar o comportamento das NPs em soluções aquosas associado à observação das respostas celulares após sua exposição no intuito de elucidar a dimensão dos efeitos tóxicos das NPs para os organismos. Este capítulo aborda o trabalho desenvolvido na investigação do efeito citotóxico e mutagênico das nanopartículas de óxido de níquel (NiO) e de zinco (ZnO) em solução aquosa submetidas ao ensaio de genotoxicidade *Salmonella*/microsoma. O estudo foi desenvolvido com o intuito de (i) definir a metodologia do ensaios, (ii) revisar as características físico-químicas das NPs que possam influenciar na resposta mutagênica, (iii) avaliar atividade mutagênica de NiO-NP e ZnO-NP pelo ensaio *Salmonella*/microsoma, e (iv) analisar as potencialidades e os desafios do ensaio em virtude dos resultados obtidos.

Abaixo encontra-se uma versão do manuscrito em português. Este trabalho será submetido à revista *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis (MRGTEM)* (<https://www.sciencedirect.com/journal/mutation-research-genetic-toxicology-and-environmental-mutagenesis>).

Potencial tóxico e mutagênico de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e óxido de níquel (NiO) pelo ensaio *Salmonella*/microsossoma

Ismael Krüger Pescke ^{a,b} ; Livia Rozino ^b; Karoline Zenato ^b; Tatiane Cardozo ^c; Wladimir Flores ^c; Vera Maria Ferrão Vargas ^{a,b} *

^a Programa de pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, Brasil

^b Laboratório de Mutagênese Ambiental (Centro de Ecologia - UFRGS)

^c Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Rio Grande do Sul, Brasil

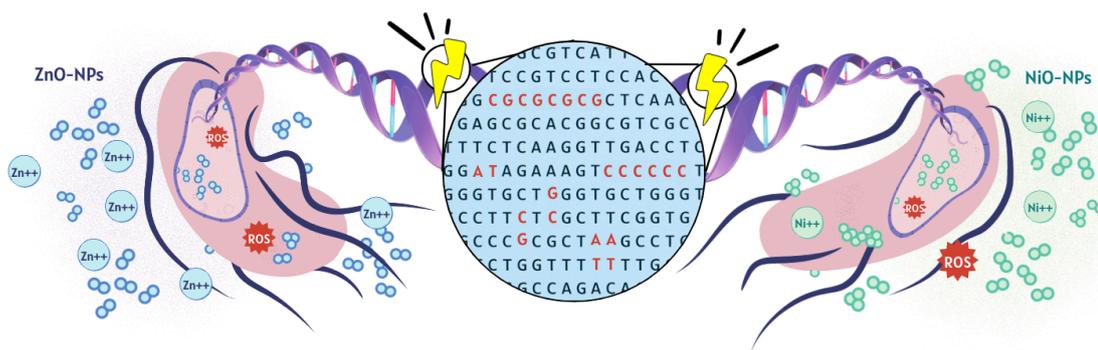
* Correspondência Profa. Vera Maria Ferrão Vargas, Programa de pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, Brasil. Laboratório de Mutagênese Ambiental (Centro de Ecologia - UFRGS). E-mail: verafvargas@gmail.com

Resumo

A grande aplicação das nanopartículas (NPs) em produtos cotidianos implica preocupações a respeito da sua toxicidade sobre o conteúdo genético e celular dos organismos. Por isso, este estudo objetivou investigar o potencial citotóxico e genotóxico de NPs de óxido de níquel (NiO-NP) e óxido de zinco (ZnO-NP) suspensas em meio aquoso (água destilada em pH 7.5; água destilada acidificada em pH 5) frente ao ensaio *Salmonella*/microsossoma, metodologia de microssuspensão modificada, em presença e ausência de ativação metabólica (S9). As linhagens (TA97a, TA98, TA100, TA102) foram expostas a diferentes concentrações de NPs variando de 10-1280 µg/placa. Como resultados, houve indução de efeitos genotóxicos para todas as amostras frente às diferentes linhagens de *S. typhimurium-his-* analisadas. As condições extrínsecas à NP alteram sua atividade mutagênica. Em pH neutro, NiO-NP e ZnO-NP induziram respostas com mecanismos mutagênicos similares; enquanto o pH ácido provocou maior solubilização e diferentes respostas para as NPs frente a TA97a e TA98. Em geral, foram verificados maiores danos do tipo substituição de pares de bases do DNA (TA100 e TA102), o que sugere diferentes mecanismos de ação de NiO-NP e ZnO-NP sobre o material genético e celular. A ativação metabólica elevou a atividade mutagênica (TA98, TA100 e TA102) de modo que levanta alerta da bioatividade das NPs frente aos metabólitos gerados pelo sistema p450 de mamíferos *in vitro*. As modificações na metodologia do ensaio *Salmonella* facilitaram a desaglomeração das partículas e elevaram o tempo de exposição das células. As respostas observadas recomendam este ensaio modificado como uma das metodologias de escolha para a avaliação nanoecotoxicológica.

Keywords: Genotoxicity biomarkers; Ames test; NiO nanoparticles; ZnO nanoparticles.

Graphical abstract



Introdução

Metais e óxidos metálicos são os materiais mais empregados na produção das nanopartículas (NPs), cujas propriedades físico-químicas, mecânicas, térmicas, ópticas e elétricas notáveis sustentam sua aplicação em diversos produtos cotidianos (Yang et al., 2009; Kwon et al., 2014; Vance et al., 2015; Subramaniam et al., 2018; Avramescu et al., 2020; Solano et al., 2021). Tais propriedades desses materiais na escala nanométrica (100nm em uma de suas dimensões) causam maior capacidade de penetração celular e interação com biomoléculas, o que intensifica a toxicidade direta ou indireta das NPs sobre os sistemas biológicos (Grassian, 2008; Yang et al., 2009; Doak et al., 2012; Choi et al., 2016; Spence et al., 2016; Parihar et al., 2018; Singh, 2018; Subramaniam et al., 2018; Avramescu et al., 2020).

Características do óxido de zinco (ZnO-NP) garantem ampla aplicação em produtos cosméticos e de higiene pessoal (principalmente protetores-solar), em tintas e pigmentos, em plásticos e embalagens, fertilizantes e biocidas, em baterias e eletrônicos, em retardante de chamas e na indústria têxtil (Dufour et al., 2006; Baek & An, 2011; Kwon et al., 2014; Parihar et al., 2018; Subramaniam et al., 2018; Solano et al., 2021). Por sua vez, óxido de níquel (NiO-NP) é extensivamente utilizado em cátodos de baterias, catalisadores, em materiais eletrônicos e magnéticos e películas eletrocromáticas (Barakat et al., 2008; Subramaniam et al., 2018; Danjumma et al., 2019; Pérez-Hernández et al., 2021). No entanto, pesquisas nanotoxicológicas realizadas com estas NPs têm relatado potencial citotóxico e mutagênico em ensaios *in vitro* usando cultura de células, ou mesmo em bioensaios com vegetais e animais (Dufour et al., 2006; Ahamed et al., 2013; Manna & Bandyopadhyay, 2017; de Carli et al., 2018; Singh, 2018; Subramaniam et al., 2018; Cardozo et al., 2019; Faizan et al., 2020; Keerthana & Kumar, 2020; Sibiya et al., 2022).

Devido ao grande mercado, houve um aumento significativo no número de itens contendo nanomateriais comercializados na última década (Fig. 6). Embora as NPs sejam uma ferramenta eficiente e inovadora, a introdução delas no mercado consumidor e sua expansão nos últimos anos estabelece novos paradigmas de precaução toxicológicos e ambientais. O volume crescente destes nanomateriais tem como destino o ambiente, principalmente o ecossistema aquático (Keller et al., 2013; Liu et al., 2014). A cadeia produtiva e o alto consumo estão associados à poluição aquática que atinge níveis históricos (Adejumoke et al.,

2018). As NPs estão associadas à exposição ocupacional e ambiental resultante de contato dérmico, ingestão e inalação durante o processo produtivo ou pelo ciclo de uso e descarte de produtos (Barber et al., 2009; Choi et al., 2016; Nowack, 2017; Parihar et al., 2018; Singh, 2018; Avramescu et al., 2020).

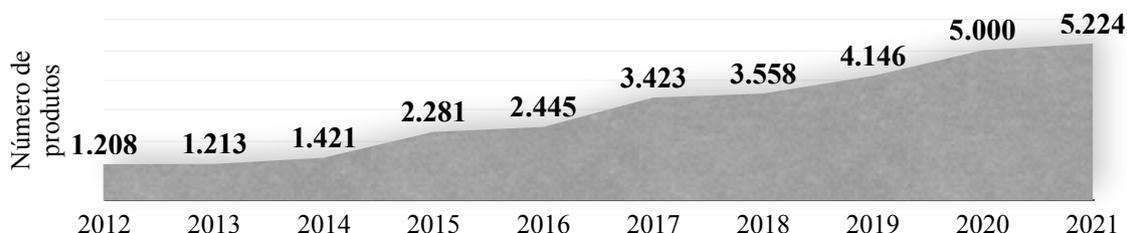


Figura 6. Número de produtos com nanomateriais disponíveis no mercado e catalogados na base de dados Nanodatabase (<https://nanodb.dk>) na última década. Fonte: Elaboração própria a partir dos dados de The Nanodatabase (2022).

A análise do efeito ecotoxicológico deve sustentar a adoção de protocolos de avaliação de biossegurança e regulamentações imediatas para a produção e descarte desses materiais (Royal Society, 2004; Granjeiro & Rossi, 2021; Invernizzi & Foladori, 2021). Dentre as metodologias empregadas na análise de risco das NPs, os ensaios toxicológicos *in vitro* reduzem o tempo de resposta e estão de acordo com os princípios dos 3Rs (Reduction, Refinement, and Replacement) (Magdolenova et al., 2014). Dentre eles, o ensaio *Salmonella*/microsoma é amplamente empregado na avaliação de substâncias mutagênicas, cujos resultados podem refletir os efeitos observados em células eucarióticas (Ames et al., 1973; Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000; Roubicek et al., 2021).

A nanoecotoxicologia é uma ciência emergente e há certas lacunas do conhecimento que precisam ser preenchidas (Kahru & Dubourguier, 2010). Para isso é necessário avaliar os efeitos biológicos em consequência da exposição às NPs. Sendo assim, a escolha por NiO-NP e ZnO-NP e das metodologias empregadas nesta pesquisa se justificam pelas seguintes razões: (i) essas NPs são amplamente utilizadas em diversos produtos cotidianos sem regulação para o descarte no ambiente, necessitando avaliação; (ii) ZnO-NP está listado como nanomaterial representativo em OECD (2008); (iii) níquel está considerado carcinogênico (Grupo 1) pela IARC com ênfase na exposição ocupacional, restando avaliações para a versão nanométrica de NiO; (iv) *Salmonella*/microsoma, um ensaio amplamente utilizado na triagem de agentes mutagênicos e carcinogênicos, não apresentava respostas conclusivas frente à NPs; (v) a

literatura mostra respostas não definitivas quanto a sensibilidade de ensaios utilizando outras células procarióticas no potencial tóxico e mutagênico de NPs; (vi) investigar a interferência do pH na dissolução das NPs e seus efeitos no potencial tóxico e mutagênico. Frente a essas justificativas, foi pressuposto que as NPs induziriam reações nas linhagens de *Salmonella* e que a redução do pH poderia alterar a atividade mutagênica associada à dissolução das NPs. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial tóxico e genotóxico de NiO-NP e ZnO-NP suspensas em meio aquoso em diferentes pH pelo ensaio *Salmonella*/microsoma, metodologia de microsuspenção modificada, em presença e ausência de ativação metabólica (S9).

Material e métodos

Síntese e caracterização de nanopartículas

As nanopartículas de NiO e ZnO foram sintetizadas no Laboratório de Magnetismo e Materiais Nanoestruturados da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Bagé (RS-Brasil) seguindo a metodologia descrita em Meneses et al. (2007). O método sol-gel foi utilizado no preparo das NPs, cuja rota de síntese é a partir da dissolução de grãos de gelatina (2,5 g) em água destilada (40 mL) sob agitação constante (20 min a 40 °C). Após a solubilização completa da gelatina, foi adicionado cloreto de níquel hexahidratado (1 g, para NiO-NP) ou nitrato de zinco (1 g, $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, para ZnO-NP) sob agitação a 60 °C durante 10 min. O gel formado foi seco a 80 °C por 36h à pressão atmosférica e resultou em uma resina amorfa e quebradiça (xerogel), que foi incinerada a 250 °C e moída. Por fim, este pó foi incinerado novamente a 550 °C durante 6h para obter as nanoestruturas. A caracterização estrutural desses nanomateriais foi realizada por difração de raios-x (DRX) em difratômetro Rigaku (Modelo Ultima IV) configurado em geometria Bragg-Brentano e radiação Cu-K (1.54 Å) em potência 40 kV e 25 mA. Os dados foram coletados com um passo de 0,02° no intervalo angular (2θ) de 35° a 85° em tempo de integração de 5 segundos (Meneses et al., 2007; Etcheverry et al., 2018).

Preparo de concentrações

As NPs em pó foram pesadas em balança digital analítica Shimadzu AUW220D e posteriormente diluídas em duas soluções com pH distintos: um grupo foi diluído em água destilada estéril (pH 7.5) e outro em solução levemente ácida (pH 5). Para o preparo desta solução, acrescentou-se 570 µL de ácido acético p.a. (CAS 64-9-7) e 6,4 mL de hidróxido de sódio 1 M p.a. (CAS 1310-73-2) ao volume final de 100 mL de água destilada estéril. Considerou-se este valor de pH por ser relacionado à chuvas ácidas (Mitrano et al., 2015). A curva de concentrações preparada foi de 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 e 1.280 µg/mL. A definição dessas concentrações foi baseada em trabalhos prévios da literatura (Landsiedel et al., 2010; Lopes et al., 2012; Sadiq et al., 2014; Du et al., 2019). As soluções estoque foram armazenadas em temperatura ambiente (22°C±2).

Ensaio de genotoxicidade

A atividade citotóxica e mutagênica de NiO-NPs e ZnO-NPs foi avaliada pelo ensaio *Salmonella*/microsossoma método de microssuspensão modificado, em presença e ausência de ativação metabólica. As linhagens utilizadas nos ensaios detectam danos do tipo erros no quadro de leitura (TA98 e TA97a, esta sensível à metais) e substituição de pares de bases do DNA (TA100 e TA102, esta eficiente para medir estresse oxidativo). Erros no quadro de leitura são induzidos em uma sequência repetitiva de oito pares -GC- para TA98, enquanto para TA97a é em uma sequência de seis citosinas e em um segundo *hot spot* no par -GC- próximo. As mutações de reversão por trocas de pares de bases são visualizadas em TA100 pela troca em um nucleotídeo do par C-G; e em TA102 é uma região rica em -AT-. Ainda, para TA102, o sistema de reparo genético está intacto (Maron & Ames, 1983; Kado et al., 1983; OECD, 2020). As linhagens são mantidas no Laboratório de Mutagênese Ambiental (CENECO-UFRGS) e avaliadas periodicamente quanto às suas características genéticas.

No intuito de aprimorar a metodologia, a solução estoque foi mantida em mesa agitadora orbital (shaker) durante 13,5 horas antes dos ensaios (37 °C, 100 rpm) e em seguida passaram por vórtex (60 segundos). Além disso, o ensaio foi realizado frente à solução teste em pH neutro e acidificado. De cada solução estoque, 100 µL foram adicionados aos tubos contendo 100 µL de cultura bacteriana ($1-2 \times 10^9$ cels/mL) e 100 µL de *S9 mix* ou tampão

fosfato 0.1M, com posterior agitação em vórtex (30 segundos). A pré-incubação ocorreu em shaker durante 90 minutos (37°C e 100 rpm). Na sequência, 2 mL de ágar (0.6% ágar, 0.5% NaCl, 50 µM de histidina e 50 µM de biotina, em pH 7.4 a 38 °C) foram adicionados aos tubos e agitados em vórtex (30 segundos), sendo o conteúdo imediatamente vertido em placas de cultura com meio mínimo (Fig. 7).

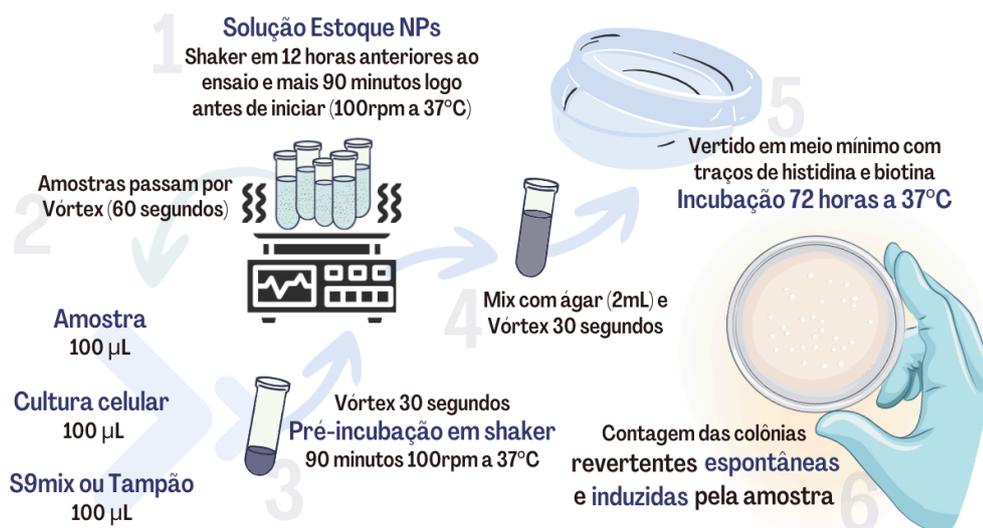


Figura 7. Esquema do ensaio *Salmonella*/microsossoma método de microssuspensão modificado. Fonte: Elaboração própria.

Foram utilizados controles negativos (água destilada, pH 7.5; ou solução ácida, pH 5) e controles positivos (Azida sódica, AZS, CASRN. 26628-22-8, Merck do Brasil; 4-nitroquinoleína-1-óxido, 4NQO, CASRN. 56-57-5, Sigma Chemical Company; 2-aminofluorene, 2AF, CASRN. 153-78-6, Sigma Chemical Company; 2-nitrofluorene, 2NF, CASRN. 607-57-8, Merck do Brasil) de acordo com cada ensaio. A fração de metabolização (*S9 mix*) (MOLTOX Inc.) foi preparada a partir de homogenatos de células de fígado de ratos Sprague-Dawley tratadas com Aroclor 1254, na qual são adicionadas coenzimas Glicose-6-Fosfato (G-6-P) (Sigma Chemical Company) e Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) (Sigma Chemical Company) no momento do ensaio.

Os ensaios foram realizados em triplicata. As placas de cultura foram incubadas em estufa climatizada a 37°C durante 72 horas e posterior contagem do número de colônias revertentes. A citotoxicidade foi avaliada pela curva de sobrevivência do organismo frente às diferentes concentrações (10-1.280 µg/mL) após 72 horas de incubação, considerando a

linhagem TA98 na ausência e presença de S9. Neste ensaio a amostra é considerada citotóxica quando o crescimento de colônias for menor que 60% em relação ao controle negativo (Vargas et al., 1993).

Análise dos dados

A mutagênese foi avaliada na porção linear não tóxica da curva dose-resposta pelo *software* SALANAL (*Salmonella* Assay Analysis, Version 1.0, Research Triangle Institute, North Carolina, USA), optando por modelos de regressão linear ou Bernstein (1982), que consiste em remover da análise doses que sobressaiam o modelo linear. Neste ensaio a amostra é considerada mutagênica quando a análise de variância (ANOVA) é significativa entre as médias das diferentes concentrações de NPs ($p < 0.05$) e a curva dose-resposta apresenta significância positiva ($p < 0.05$). Os valores foram expressos em número de colônias revertentes por micrograma de NPs (rev/ μ g).

Resultados

A caracterização das NPs identifica as propriedades morfológicas, estruturais e superficiais que elas dispõem no momento do ensaio e que definem a ação e os efeitos tóxicos das NPs (Doak et al., 2012; Ma et al., 2013; Sabella et al., 2014; Choi et al., 2016; Oberdörster & Kuhlbusch, 2017; Zhang et al., 2022). Análises realizadas em estudos prévios com as mesmas NPs mostram que NiO-NPs em água destilada apresentam formatos poligonais compreendendo o intervalo de 50 a 500 nm no tamanho das partículas (De Carli et al., 2018). Da mesma maneira, imagens de microscopia eletrônica para ZnO-NPs diluídas em água destilada exibiram partículas com bordas arredondadas e intervalo de tamanho de 30 a 200 nm (Cardozo et al., 2019).

Em um primeiro momento foi analisada a citotoxicidade das soluções de NPs frente à linhagem TA98. A concentração de 1.280 μ g/mL se mostrou citotóxica. Em razão disto, os ensaios de genotoxicidade foram realizados com concentrações abaixo desta, em uma curva que compreendeu cinco concentrações (40, 80, 160, 320 e 640 μ g/mL).

De modo geral, foi observada genotoxicidade em ao menos uma condição de ensaio, exceto para TA102 em ausência de metabolização. As soluções de NiO-NP e ZnO-NP em pH neutro induziram respostas com mecanismos mutagênicos similares, sendo maior indução indireta (+S9) e em linhagens que medem substituição de pares de bases. Verificou-se alteração da atividade mutagênica associada aos metabólitos, sendo que houve elevação da mutagênese em TA98, TA100 e TA102 e diminuição para TA97a. A tabela 1 compila os resultados obtidos para as linhagens em ensaios na ausência e presença de S9 e as quatro soluções de NPs.

Todas as soluções de NPs induziram respostas mutagênicas nas linhagens que medem substituição de pares de bases, sendo que as respostas mutagênicas indiretas foram mais elevadas. Para TA100, ZnO-NP induziu mutagênese direta e indireta, mas foi mais elevada em ensaios com metabolização tanto em pH ácido ($1,227 \pm 0,138$ rev/ μ g) quanto neutro ($1,095 \pm 0,074$ rev/ μ g). Por sua vez, NiO-NP em pH ácido, para TA100, obteve valores aproximados para revertentes em ensaios direto e indireto ($1,163 \pm 0,308$ rev/ μ g e $1,165 \pm 0,155$ rev/ μ g, respectivamente). Foi observada somente mutagênese indireta para a linhagem sensível a estresse oxidativo (TA102) para ambas NPs, sobretudo nas condições de pH neutro. ZnO-NP induziu o maior valor de colônias revertentes em relação às outras condições ($2,637 \pm 0,297$ rev/ μ g) seguida por NiO-NP ($1,772 \pm 0,269$ rev/ μ g).

As linhagens que medem erros no quadro de leitura apresentaram atividade mutagênica mais branda. Foi observada resposta mutagênica direta (-S9) para pH ácido e neutro na linhagem TA97a, sensível a metais, especialmente na condição de pH neutro para NiO-NP ($1,691 \pm 0,345$ rev/ μ g) e ZnO-NP ($1,480 \pm 0,070$ rev/ μ g). Por outro lado, foi identificada baixa atividade mutagênica nas condições de amostras frente a linhagem TA98.

Tabela 1. Resumo dos resultados (média de colônias revertentes \pm desvio padrão) obtidos no ensaio Salmonella/microsoma após exposição às soluções acidificadas (A) e neutras (N) de NiO-NP e ZnO-NP nas diferentes linhagens em ausência e presença de ativação metabólica (-S9 e +S9, respectivamente).

Amostra	Conc. $\mu\text{g/mL}$	TA97a		TA98		TA100		TA102	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
NiO A	0	128 \pm 5	161 \pm 10	21 \pm 3	27 \pm 3	313 \pm 48	147 \pm 15	321 \pm 34	313 \pm 6
	40	159 \pm 6*	166 \pm 8	29 \pm 3	31 \pm 4	480 \pm 40*	227 \pm 4**	360 \pm 11	486 \pm 8**
	80	161 \pm 9*	161 \pm 7	24 \pm 4	31 \pm 8	498 \pm 55*	231 \pm 8**	291 \pm 27	413 \pm 41*
	160	218 \pm 9**	174 \pm 5	24 \pm 8	43 \pm 4*	497 \pm 42*	237 \pm 13**	327 \pm 30	288 \pm 77
	320	240 \pm 4**	181 \pm 2	24 \pm 4	35 \pm 3	516 \pm 48*	235 \pm 15**	350 \pm 6	389 \pm 12**
	640	192 \pm 6**	248 \pm 14**	34 \pm 8	55 \pm 8*	550 \pm 142	270 \pm 19**	582 \pm 12**	520 \pm 108
	Rev/ μg	0,528 \pm 0,034	0,066 \pm 0,019	ns	0,032 \pm 0,008	1,163 \pm 0,308	1,165 \pm 0,155	ns	1,361 \pm 0,565
NiO N	0	194 \pm 8	150 \pm 6	25 \pm 4	19 \pm 2	187 \pm 6	454 \pm 23	325 \pm 7	359 \pm 36
	40	279 \pm 18**	128 \pm 8	21 \pm 1	22 \pm 3	204 \pm 18	368 \pm 79	416 \pm 58	452 \pm 32
	80	328 \pm 1**	138 \pm 13	21 \pm 2	30 \pm 7	216 \pm 8*	418 \pm 36	404 \pm 38	618 \pm 98*
	160	327 \pm 20**	143 \pm 12	25 \pm 5	19 \pm 3	201 \pm 11	596 \pm 81	342 \pm 71	596 \pm 16**
	320	357 \pm 22**	139 \pm 9	21 \pm 4	21 \pm 3	200 \pm 6	630 \pm 41*	288 \pm 82	504 \pm 34*
	640	457 \pm 67**	139 \pm 15	20 \pm 6	31 \pm 3*	232 \pm 20	608 \pm 74	376 \pm 76	568 \pm 30**
	Rev/ μg	1,691 \pm 0,345	ns	ns	0,133 \pm 0,041	0,047 \pm 0,014	0,794 \pm 0,152	ns	1,772 \pm 0,269
ZnO A	0	128 \pm 5	161 \pm 10	20 \pm 5	19 \pm 2	313 \pm 48	147 \pm 15	321 \pm 34	313 \pm 6
	40	169 \pm 2**	161 \pm 15	22 \pm 2	18 \pm 4	466 \pm 71	216 \pm 12*	343 \pm 16	383 \pm 56
	80	165 \pm 16	156 \pm 10	29 \pm 8	25 \pm 3	388 \pm 64	239 \pm 12**	308 \pm 24	400 \pm 52
	160	160 \pm 13*	144 \pm 7	33 \pm 5	23 \pm 3	400 \pm 39	237 \pm 11**	302 \pm 7	392 \pm 19**
	320	171 \pm 13*	166 \pm 10	37 \pm 4*	17 \pm 3	468 \pm 30*	237 \pm 7**	311 \pm 28	377 \pm 22*
	640	153 \pm 8*	159 \pm 22	33 \pm 5	23 \pm 4	498 \pm 68*	221 \pm 8*	328 \pm 6	456 \pm 33*
	Rev/ μg	0,480 \pm 0,108	ns	0,021 \pm 0,006	ns	0,236 \pm 0,063	1,227 \pm 0,138	ns	0,154 \pm 0,046
ZnO N	0	194 \pm 8	150 \pm 6	25 \pm 4	19 \pm 2	187 \pm 6	454 \pm 23	324 \pm 4	359 \pm 36
	40	292 \pm 15**	145 \pm 4	15 \pm 3	18 \pm 1	230 \pm 5**	489 \pm 18	227 \pm 10	466 \pm 35
	80	382 \pm 8**	155 \pm 6	17 \pm 3	20 \pm 1	217 \pm 16	568 \pm 32*	235 \pm 117	570 \pm 27**
	160	417 \pm 7**	128 \pm 7	16 \pm 6	28 \pm 6	214 \pm 3**	674 \pm 25**	290 \pm 160	571 \pm 16**
	320	257 \pm 10	146 \pm 15	23 \pm 3	31 \pm 1	236 \pm 13*	786 \pm 49**	321 \pm 22	481 \pm 6*
	640	-	-	19 \pm 2	26 \pm 6	222 \pm 17	596 \pm 21	394 \pm 12**	558 \pm 39*
	Rev/ μg	1,480 \pm 0,070	ns	ns	0,044 \pm 0,008	0,398 \pm 0,112	1,095 \pm 0,074	ns	2,637 \pm 0,297

Atividade mutagênica dos ensaios está representada como número de colônias revertentes por micrograma de amostra (rev/ μg), sendo que a coloração mais escura indica respostas mais elevadas. Controle Positivo (rev/placa \pm desvio padrão): (-S9) 4NQO (0,05 $\mu\text{g/placa}$) TA97a 1.090 \pm 35 (A) 834 \pm 62 (N), TA98 120 \pm 14 (A) 254 \pm 20 (N); AZS (0,5 $\mu\text{g/placa}$) TA100 901 \pm 51 (A) 596 \pm 41 (N); irradiação por UV (2') TA102 2494 \pm 7 (A) 1566 \pm 57 (N); (+S9) 2AF (1 $\mu\text{g/placa}$) TA97a 197 \pm 4 (A) 205 \pm 7 (N), TA98 50 \pm 7 (A) 215 \pm 26 (N), TA100 633 \pm 104 (A) 612 \pm 141 (N), TA102 589 \pm 11 (A) 587 \pm 15 (N). ns: respostas não significativas; ** significância a 1%; * significância a 5%.

A figura 8 resume as diferentes respostas encontradas e indica a soma da atividade mutagênica de NiO-NP e ZnO-NP sobre as diferentes linhagens e condições de ensaios. Nesta, é possível identificar a maior resposta para ensaios indiretos (+S9), o que destaca a genotoxicidade de metabólitos em ensaios com a fração S9 para as quatro soluções de NPs. Houve uma variação maior para ZnO-NP entre o pH ácido e neutro, enquanto as soluções de NiO-NP obtiveram valores equivalentes nas duas condições de pH (Fig. 8a). Ainda, observam-se os diferentes efeitos das NPs pelos dois tipos de eventos moleculares (Fig. 8b). A soma da atividade mutagênica induzida nas linhagens que medem substituição de pares de bases foi mais elevada, alcançando o valor de 4 rev/μg, sendo visualizada forte indução de mutagênese por metabólitos (+S9). Por outro lado, a sensibilidade da linhagem TA97a tem destaque na investigação da ação direta de NiO-NP e ZnO-NP.

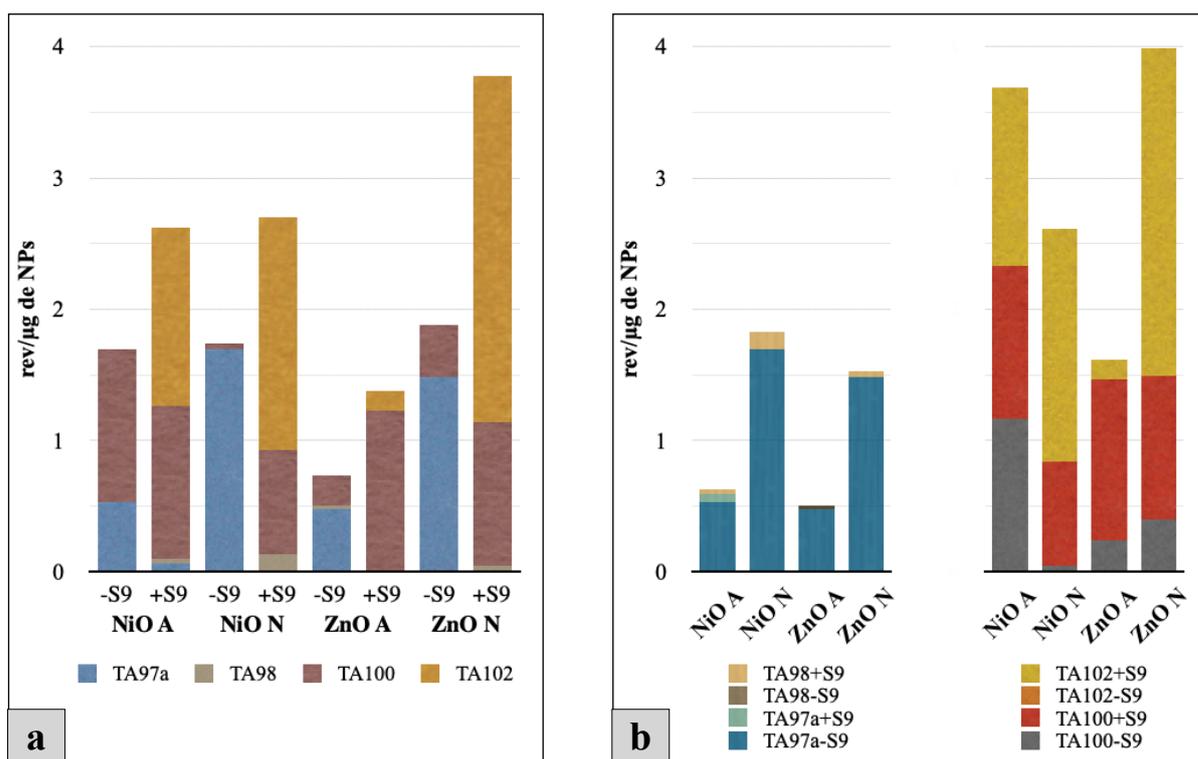


Figura 8. Comparativo da soma dos efeitos de atividade mutagênica nas diferentes condições de ensaio. (a) soma dos efeitos de atividade mutagênica (revertentes/μg) em ensaios de mutagênese direta (-S9) e indireta (+S9); (b) soma dos efeitos de atividade mutagênica (revertentes/μg) em ensaios com linhagens que detectam erros no quadro de leitura (TA97 e TA98) e troca de pares de bases (TA100 e TA102) na ausência e presença de metabolização (-S9 e +S9); A, pH 5; N, pH 7.5.

Discussão

A avaliação da toxicidade de NPs não é uma análise fácil, visto que há muitas nuances e cuidados associados aos ensaios (Choi et al., 2016). O ensaio *Salmonella*/microsoma é uma das metodologias de análise com biomarcadores mais empregada na busca de compostos carcinogênicos (Mortelmans & Zeiger, 2000; Roubicek et al., 2021). Autores têm evidenciado através de microscopia eletrônica o trânsito de NPs pela membrana de bactérias gram-negativas (Sondi & Salopek-Sondi, 2004; Brayner et al., 2006; Butler et al., 2015) e sua presença no citoplasma celular associada à respostas de genotoxicidade pelo Teste de Ames (Kumar et al., 2011; Clift et al., 2013). Neste ensaio, as linhagens empregadas são resultado de engenharia genética e apresentam alterações moleculares e outras modificações, que permitem identificar danos ao DNA do tipo substituição de pares de bases ou erro no quadro de leitura (Ames et al., 1973; Maron e Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000; Roubicek et al., 2021). A soma da atividade mutagênica observada frente às diferentes linhagens evidenciam essa diversidade de respostas (Fig. 8a).

Naturalmente, NPs óxido-metálicas tendem à agregação, o que potencializa sua estabilidade e dificulta o acesso ao citoplasma celular pela perda do tamanho nanométrico (Bai et al., 2010; Balasubramanyam et al., 2010; Miao et al., 2010; Baek & An, 2011; Kwon et al., 2014; Peretyazhko et al., 2014; Qiang et al., 2017; Sadiq et al., 2014; Sizochenko et al., 2017). Os poros da parede das linhagens de *Salmonella* medem em torno de 30 nm, logo soluções de NPs bem dispersas são capazes de penetrar nas células (Cho et al., 2012; Doak et al., 2012; Drasler et al., 2017). Segundo trabalhos na literatura (Miao et al., 2010; Pan et al., 2010; Doak et al., 2012; Jomini et al., 2012, Sadiq et al., 2014), modificações na técnica do ensaio buscam evitar aglomeração e promover absorção de NPs pelas células bacterianas. Neste sentido, além da agitação habitual durante o ensaio *Salmonella*/microsoma, as amostras passaram por um preparo em shaker e vórtex antes do ensaio. Além disso, foi elevado o tempo de agitação em vórtex junto com as células na etapa de pré-incubação (30 segundos antes e depois da pré-incubação) (Fig. 7). O tempo de agitação promove a dispersão das NPs e viabiliza aumento na frequência de colisões com as células (Handy et al., 2012). O período de agitação objetivou desagregar o material antes e após a pré-incubação e propiciar interação com componentes celulares.

Ainda assim, NPs óxido-metálicas podem induzir genotoxicidade pela produção de efeitos secundários sem acessarem o citoplasma celular das linhagens *S. typhimurium* (Jomini et al., 2012; Clift et al., 2013; Butler et al., 2015). Assim como observado em outros estudos, as respostas mutagênicas detectadas para NiO-NP e ZnO-NP podem ter sido induzidas não apenas pela interação das NPs sobre as células, como também pela liberação de íons e produção de radicais químicos (Cho et al., 2012; Doak et al., 2012; Clift et al., 2013; Ma et al., 2013; Spence et al., 2016; Parihar et al., 2018; Singh, 2018; Subramaniam et al., 2018). A toxicidade das NPs é geralmente atribuída a fatores inerentes, como composição química, tamanho, forma, carga superficial, solubilidade. No entanto, as condições do meio aquoso (pH, condutividade, temperatura, presença de biomoléculas, entre outros) onde estão as NP podem alterar a toxicidade observada (Doak et al., 2012; Ma et al., 2013; Sabella et al., 2014; Choi et al., 2016; Oberdörster & Kuhlbusch, 2017; Zhang et al., 2022).

Neste sentido, uma das condições extrínsecas mais importantes é o pH do meio, pois a acidificação tende a degradar o envoltório das NPs metálicas e elevar a taxa de dissolução, o que aumenta o potencial tóxico como efeito da liberação de íons (Grassian, 2008; Miao et al., 2010; Baek & An, 2011; Bian et al. 2011; Cho et al., 2012; Doak et al., 2012; Jomini et al., 2012; Mudunkotuwa et al., 2012; Peretyazhko et al., 2014; Oberdörster & Kuhlbusch, 2017; Avramescu et al., 2020). Assim, a solubilidade é um fator importante, visto que trabalhos com respostas positivas em *Salmonella*/microssoma costumam evidenciar partículas solúveis (Sizochenko et al., 2019). Na metodologia seguida por Jomini et al. (2012), uma pré exposição da amostra a uma solução de com pH acidificado pode levar a respostas significativas. No entanto, em seu trabalho, os autores empregaram o método de flutuação do ensaio *Salmonella* avaliando o potencial mutagênico de nanopartículas de TiO₂ com as mesmas linhagens do presente estudo. Nas circunstâncias analisadas neste trabalho, observou-se que o pH levemente ácido provocou maior solubilização para as duas NPs durante o preparo das soluções, principalmente para ZnO, corroborando estudos verificados na literatura (Franklin et al. 2007; Miao et al. 2010; Sizochenko et al., 2017). Muitos compostos de níquel são relativamente solúveis em pH menores do que 6.5 (IARC, 2012). Embora tenha sido possível verificar que apenas NiO-NP tenha induzido danos mais elevados em pH ácido (Fig. 8b). Ainda assim, respostas mutagênicas foram induzidas tanto nas condições acidificadas, quanto nas de pH neutro frente às amostras de NPs óxido-metálicas.

Os resultados observados neste estudo estão de acordo com trabalhos prévios que indicam genotoxicidade para NPs óxido-metálicas como efeito das propriedades intrínsecas dos metais (Baek & An, 2011; Magdolenova et al., 2014; Sadiq et al., 2014; Zhang et al., 2022). Zhang et al. (2022) relataram mutagênese direta e indireta pela linhagem TA100 (NPs de prata, 2nm, ≥ 0.05 $\mu\text{g/placa}$), enquanto Sadiq et al. (2014) indicaram que as propriedades do Cobre levaram à indução de mutagênese dose-dependente para TA98 e TA100 em ensaios na presença e ausência da fração de metabolização (NPs de cobre, $55\pm 5\text{nm}$, ≥ 400 $\mu\text{g/placa}$). De maneira semelhante, no presente trabalho foi verificado que as linhagens que medem substituição de pares de bases mostram respostas mais elevadas, sendo que a fração S9 elevou a mutagênese (Tabela 1; Fig. 8).

Níquel e Zinco, como metais de transição, liberam íons capazes de converter metabólitos do oxigênio molecular (O_2), como H_2O_2 e ânions superóxido, a radicais hidroxila (-OH), sendo que a formação desses radicais ocasiona a produção de EROS e danos oxidativos (Singh et al., 2009; Yang et al., 2009; Ma et al., 2013). A interação com o conteúdo da fração *S9mix* pode facilitar a geração de radicais e induzir maior atividade mutagênica para NiO-NP e ZnO-NP observadas frente a linhagem sensível ao estresse oxidativo (TA102), na qual se identificou indução de mutagênese em ensaios indiretos (Fig. 8). Outros estudos sugerem que as proteínas presentes na fração de metabolização podem revestir a superfície das NPs e facilitarem seu acesso ao citoplasma celular (Kumar et al., 2011; Jomini et al., 2012; Elespuru et al., 2018). No estudo de Kumar et al. (2011), os autores observaram potência mutagênica na linhagem TA98 apenas em ensaios na presença da fração de metabolização para NPs de ZnO e de TiO_2 . Além disso, biomoléculas, proteínas e aminoácidos presentes em meios de cultura celular interagem com as NPs e modificam suas características físico-químicas. Essa interação propicia formação de complexos iônicos com os óxidos metálicos gerando novas espécies químicas, mas também aglomeração das NPs (Berg et al., 2009; Doorley & Payne, 2011; Sadiq et al., 2014; Oberdörster & Kuhlbusch, 2017; Avramescu et al., 2020).

Os resultados encontrados para atividade mutagênica em ensaios com metabolização levantam alerta da bioatividade das NPs frente aos metabólitos gerados pelo sistema p450 de mamíferos *in vitro*. Houve elevação da atividade mutagênica associada aos metabólitos para TA98, TA100 e TA102 (Tabela 1, Fig. 8). Ao considerar as possíveis rotas de exposição em

meio aquoso sobre os organismos, principalmente aquáticos, as NPs têm alta capacidade de se deslocarem pelo sistema circulatório e linfático e acessarem tecidos e órgãos. Assim, a maior parte destes compostos podem passar pelo fígado, sendo que estudos prévios já identificaram que este é comumente um dos órgãos-alvo dos nanomateriais (Choi & Choy , 2014; Barhoum et al., 2022).

Respostas genotóxicas para ZnO-NP estão muito associadas à liberação de íons Zn^{2+} que elevam os níveis de EROS intracelular e induzem peroxidação lipídica, danos a membranas e estresse oxidativo em outros bioensaios (Ali et al., 2012; Cho et al., 2012; Choi & Choy , 2014; Magdolenova et al., 2014; Sizochenko et al., 2017; Cardozo et al., 2019). A solução de ZnO-NP em pH neutro induziu o maior valor de mutagênese observado nos ensaios, seguido por NiO-NP no mesmo pH, sendo na linhagem TA102 (Tabela 1; Fig. 8b). De Carli et al. (2018) apontam atividade mutagênica em células V79 para as mesmas NPs de níquel utilizados neste trabalho (125-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sizochenko et al. (2017) relatam que NiO-NP provoca toxicidade em *Escherichia coli* ao substituir o metal em metaloproteínas. Já Pan et al. (2010) verificaram atividade mutagênica indireta (+S9) para NPs óxido-metálicas, sendo que ZnO-NP causou ainda mais reversão em linhagem de *E. coli* sensível a estresse oxidativo (Pan et al., 2010). Outros autores também relacionam o estresse oxidativo com mutagênese pelo Teste de Ames (Jomini et al., 2012; Charles et al., 2018; Zhang et al., 2022).

Há poucos indícios de que todas as linhagens de teste agem de maneira semelhante frente a um composto, pois cada uma delas possui sequências-alvo específicas no seu código genético e respondem à diferentes interações no DNA (Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000; Lopes et al., 2012; Elespuru, et al., 2018). A diversidade de respostas verificadas neste trabalho são esperadas e evidenciam os diferentes modos de ação e vias metabólicas envolvidas na toxicidade das NPs de NiO-NP e ZnO-NP (Fig. 8). O Teste de Ames é fundamental para revelar os diferentes mecanismos de ação das NPs entre células eucarióticas e procarióticas em estudos *in vitro* (Sizochenko et al., 2019). Cabe ponderar que, uma vez no ambiente, as NPs se comportam de diferentes maneiras, interagem com as mais diversas características abióticas que ocorrem no meio natural e que afetam sua toxicidade sobre a biota. A matéria orgânica e ácidos orgânicos dissolvidos, por exemplo, podem atenuar a produção de agentes oxidativos gerados pelas NPs (Yang et al., 2016) e já foi relatado aumento na expressão de genes antioxidantes em ensaios com NPs na presença de sedimento

(Zhu et al., 2009). Outro fator importante é a ocorrência de chuvas ácidas, visto que a diminuição do pH tende a dissolver NPs que revestem superfícies de materiais como tintas e revestimentos ao longo do tempo (Mitrano et al., 2015). Esses fatores demonstram a complexidade na busca de respostas no campo da nanoecotoxicologia. No entanto, os resultados observados permitiram evidenciar a sensibilidade da metodologia empregada. A preparação prévia das amostras, evitando a aglomeração das partículas e elevando o tempo de exposição, permitiu observar efeitos mutagênicos diretos e indiretos frente as diferentes linhagens empregadas.

Conclusões

No cenário atual, a nanoecotoxicologia se consolida como um campo de estudo fundamental na busca por respostas acerca dos efeitos das NPs sobre o ambiente e os organismos. Há necessidade de compreender a ação das NPs frente à células, tecidos e órgãos, de modo a prever a citotoxicidade e mutagênese. Os resultados do ensaio *Salmonella*/microsoma obtidos neste estudo servem como alerta para a mutagenicidade das NPs de óxido de níquel e de zinco em solução aquosa neutra e acidificada. Tais respostas mostram a capacidade das linhagens *S. typhimurium* Ames de indicar mutagênese. Modificações na metodologia do ensaio propiciaram a solubilidade das NPs e possibilitaram interação com as células nas diferentes etapas do ensaio. A atividade mutagênica detectada nas diferentes condições indicam maiores danos do tipo substituição de pares de bases do DNA. A ativação metabólica estabeleceu mecanismos significativos para mutagênese observada ao elevar a indução de respostas (TA98, TA100 e TA102) ou reduzi-las (TA97a). Desta forma as respostas observadas recomendam este ensaio modificado como uma das metodologias de escolha na avaliação de NPs, dentro dos objetivos da nanoecotoxicologia. É importante considerar que o ensaio *Salmonella*/microsoma é um biomarcador potente para avaliar a potencialidade de substâncias genotóxicas e carcinogênicas, mas não é uma resposta definitiva para organismos superiores. Adicionalmente, a continuidade da pesquisa empregando ensaios *in vivo* com organismos de diferentes níveis tróficos permitirão somar informações essenciais para compreender os mecanismos de ação das NPs na biota, a nível de metabolismo de organismos e respostas em populações e comunidades.

Agradecimentos

This work was supported by the Conselho Nacional para Desenvolvimento da Ciência e Tecnologia (CNPq), project grant number 307518/2019, and for the master's CNPq scholarship granted to I. K. Pescke, grant number 132045/2020-6.

Referências

- Adams, L.K.; Lyon, D.Y.; McIntosh, A.; Alvarez, P.J.J. (2006). Comparative toxicity of nano-scale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspensions. *Water Science & Technology*, 54(11), 327–. doi:10.2166/wst.2006.891. Acesso 1 fev. 2022.
- Adejumoke, A.; Babatunde, O. A.; Abimbola, P.O.; Tabitha, A.; Adewumi, O; Toyin, A. (2018). Water pollution: effects, prevention, and climatic impact. *Water Chall. Urban. World*, 33, pp. 33-47
- ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profiles. [Atlanta]: ATSDR, 2017. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>. Acesso 5 mar. 2022.
- Ahamed, M., Ali, D., Alhadlaq, H. A., & Akhtar, M. J. (2013). Nickel oxide nanoparticles exert cytotoxicity via oxidative stress and induce apoptotic response in human liver cells (HepG2). *Chemosphere*, 93(10), 2514–2522. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.09.047.
- Akyil, D.; Eren, Y.; Konuk, M.; Tepekozcan, A.; Sa lam, E. (2015). Determination of mutagenicity and genotoxicity of indium tin oxide nanoparticle using the Ames test and micronucleus assay. *Toxicology and Industrial Health*, 0748233715579804–. doi:10.1177/0748233715579804. Acesso em 16 mar. 2022.
- Ali, Daoud; Alarifi, Saud; Kumar, Sudhir; Ahamed, Maqsood; Siddiqui, Maqsood (2012). Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L.. , 124-125(none), –. doi:10.1016/j.aquatox.2012.07.012. Acesso 15 jan. 2022.
- Ames, B.; Lee, Frank; Durston, William. (1973). An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* Vol.

- 70, No. 3, pp. 782-786. <https://www.pnas.org/content/pnas/70/3/782.full.pdf>. Acesso 11 jan. 2022.
- Avramescu, ML., Chénier, M., Palaniyandi, S. *et al.* Dissolution behavior of metal oxide nanomaterials in cell culture medium versus distilled water. *J Nanopart Res* **22**, 222 (2020). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11051-020-04949-w>. Acesso em 27 dez. 2021.
- Baek, Yong-Wook; An, Youn-Joo. (2011). Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. , 409(8), 1603–1608. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.01.014.
- Balasubramanyam, A.; Sailaja, N.; Mahboob, M.; Rahman, M.F.; Hussain, S.; Grover, P. (2010). In vitro mutagenicity assessment of aluminium oxide nanomaterials using the *Salmonella/microsome* assay. , 24(6), 0–1876. doi:10.1016/j.tiv.2010.07.004.
- Barakat, N.; Omran, A.M.; Aryal, S.; Sheikh, F.A.; Kang, H.; Kim, H. (2008). Production of beads like hollow nickel oxide nanoparticles using colloidal-gelelectrospinning methodology. , 43(3), 860–864. doi:10.1007/s10853-007-2190-9.
- Barber D.; Denslow, N.D; Griffitt, J.; Martyniuk, C. Sources, Fate and Effects of Engineered Nanomaterials in the Aquatic Environment (Chapter 12) In: SAHU, Saura and CASCIANO, Daniel (org). *Nanotoxicity: From In Vivo and In Vitro Models to Health Risks*. United Kingdom: John Wiley and Sons Ltd., 2009. p. 227-246. ISBN: 978-0-470-74779-7.
- Bai, Wei; Zhang, Zhiyong; Tian, Wenjing; He, Xiao; Ma, Yuhui; Zhao, Yuliang; Chai, Zhifang (2010). Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. , 12(5), 1645–1654. doi:10.1007/s11051-009-9740-9. Acesso 28 jan. 2022.
- Berg, J. M., Romoser, A., Banerjee, N., Zebda, R., and Sayes, C. M. (2009). The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. *Nanotoxicology* 3, 276–283.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J. & Pike, M.C. 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutation Research*, 97: 267-281. 10.1016/0165-1161(82)90026-7. Acesso em 19 mar. 2022.

- Bian, Shao-Wei; Mudunkotuwa, Imali A.; Rupasinghe, Thilini; Grassian, Vicki H. (2011). Aggregation and Dissolution of 4 nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environments: Influence of pH, Ionic Strength, Size, and Adsorption of Humic Acid. , 27(10), 6059–6068. doi:10.1021/la200570n. Acesso 10 jan 2022.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf. Acesso 10 jan 2022.
- Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F., & Fiévet, F. (2006). Toxicological Impact Studies Based on *Escherichia coli* Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. *Nano Letters*, 6(4), 866–870. doi:10.1021/nl052326h
- Butler, K. S.; Peeler, D. J.; Casey, B. J.; Dair, B. J.; Elespuru, R. K. (2015). Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis*, 30(4), 577–591. doi:10.1093/mutage/gev020.
- Cardozo, Tatiane R.; De Carli, Raíne F.; Seeber, Allan; Flores, Wladimir H.; da Rosa, Jordana A. N.; Kotzal, Queila S. G.; Lehmann, Mauricio; da Silva, Fernanda R.; Dihl, Rafael R. (2019). Genotoxicity of zinc oxide nanoparticles: an *in vivo* and *in silico* study. *Toxicology Research*, doi:10.1039/C8TX00255J
- Cho, W.-S.; Duffin, R.; Thielbeer, F.; Bradley, M.; Megson, I. L.; MacNee, W.; Poland, C. A.; Tran, C. L.; Donaldson, K. (2012). Zeta Potential and Solubility to Toxic Ions as Mechanisms of Lung Inflammation Caused by Metal/Metal Oxide Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 126(2), 469–477. doi:10.1093/toxsci/kfs006.
- Choi, J. S.; Kim, R.-O.; Yoon, S. & Kim, W.-K. (2016). Developmental Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles to Zebrafish (*Danio rerio*): A Transcriptomic Analysis. *PLOS ONE*, 11(8), e0160763. doi:10.1371/journal.pone.01607. Acesso 1 fev. 2022.
- Choi, S.J.; Choy, J.H. (2014). Biokinetics of zinc oxide nanoparticles: toxicokinetics, biological fates, and protein interaction. *International Journal of Nanomedicine*, 2014:9 (Suppl 2), 261–269. doi: 10.2147/IJN.S57920.

- Clift, Martin J. D.; Raemy, David O.; Endes, Carola; Ali, Zulqurnain; Lehmann, Andrea D.; Brandenberger, Christina; Petri-Fink, Alke; Wick, Peter; Parak, Wolfgang J.; Gehr, Peter; Schins, Roel P. F.; Rothen-Rutishauser, Barbara (2013). *Can the Ames test provide an insight into nano-object mutagenicity? Investigating the interaction between nano-objects and bacteria. Nanotoxicology*, 7(8), 1373–1385. doi:10.3109/17435390.2012.741725. Acesso 3 jun. 2022.
- Danjumma, S.G.; Abubakar, Y.; Suleiman, S. 2019. Nickel Oxide (NiO) Devices and Applications: A Review. *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*, v. 8, issue 4. 2019. doi: 10.17577/IJERTV8IS040281.
- De Carli, Raíne F.; Chaves, Débora dos S.; Cardozo, Tatiane R.; de Souza, Ana Paula; Seeber, Allan; Flores, Wladimir H.; Honatel, Karol F.; Lehmann, Mauricio; Dihl, Rafael R. (2018). *Evaluation of the genotoxic properties of nickel oxide nanoparticles in vitro and in vivo. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, (), S1383571817302358–. doi:10.1016/j.mrgentox.2018.06.003. Acesso 3 jun. 2022.
- Doak, S.H.; Manshian, B.; Jenkins, G.J.S.; Singh, N. (2012). In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutation Research* 745, p. 104–111, 0–111. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.09.013. Acesso 10 jan 2022.
- Doorley, G. W., and Payne, C. K. (2011). Cellular binding of nanoparticles in the presence of serum proteins. *Chem. Commun. (Camb.)* 47, 466–468.
- Drasler, Barbara; Sayre, Phil; Steinhäuser, Klaus Günter; Petri-Fink, Alke; Rothen-Rutishauser, Barbara (2017). *In vitro approaches to assess the hazard of nanomaterials. NanoImpact*, S2452074817300459–. doi:10.1016/j.impact.2017.08.002. Acesso 10 jan 2022.
- Du, Xiuming; Gao, Shunxiang; Hong, Liling; Zheng, Xin; Zhou, Qingyun; Wu, Jihong (2019). Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the mouse lymphoma assay and the Ames test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 838(), 22–27. doi:10.1016/j.mrgentox.2018.11.015. Acesso 8 jan 2022.

- Dufour, E.; Kumaravel, T.; Nohynek, G.; Kirkland, D.; Toutain, H. (2006). Clastogenicity, photo-clastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: Genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells. , 607(2), 0–224. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.04.015
- Etcheverry, Louise; Flores, Wladimir Hernandez; Silva, Douglas Langie da; Moreira, Eduardo Ceretta (2018). *Annealing Effects on the Structural and Optical Properties of ZnO Nanostructures*. *Materials Research*, 21(2), –. doi:10.1590/1980-5373-mr-2017-0936.
- Faizan, M., Hayat, S., Pichtel, J. (2020). Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Crop Plants: A Perspective Analysis. In: Hayat, S., Pichtel, J., Faizan, M., Fariduddin, Q. (eds) *Sustainable Agriculture Reviews 41*. *Sustainable Agriculture Reviews*, vol 41. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-33996-8_4.
- Franklin, Natasha M.; Rogers, Nicola J.; Apte, Simon C.; Batley, Graeme E.; Gadd, Gerald E.; Casey, Philip S. (2007). Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. *Environmental Science & Technology*, 41(24), 8484–8490. doi:10.1021/es071445r
- Grassian, V.H. (2008). When Size Really Matters: Size-Dependent Properties and Surface Chemistry of Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Gas and Liquid Phase Environments. *J. Phys. Chem.*, v. 112, n. 47, p. 18303–18313. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jp806073t>
- Handy, Richard; Cornelis, Geert; Fernandes, Teresa; Tsyusko, Olga; Decho, Alan; Sabo-Attwood, Tara; Metcalfe, Chris; Steevens, Jeffery; Klaine, Stephen; Koelmans, Albert; Horne, Nina (2012). *Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: Practical experiences and recommendations from the bench*. 31(1), 15–31. doi:10.1002/etc.706. Acesso 27 jan. 2022.
- Jomini, Stéphane; Labille, Jérôme; Bauda, Pascale; Pagnout, Christophe (2012). Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO₂ nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO₂-based nanocomposite. *Toxicology Letters*, 215(1), 54–61. doi:10.1016/j.toxlet.2012.09.012. Acesso 10 jan. 2022.

- Kahru, Anne; Dubourguier, Henri-Charles (2010). From ecotoxicology to nanoecotoxicology, 269 (2-3), p. 105–119. doi:10.1016/j.tox.2009.08.016.
- Keller, Arturo; McFerran, Suzanne; Lazareva, Anastasiya. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials . , 15(6), 1692–. doi:10.1007/s11051-013-1692-4. Acesso em 23 jan. 2022.
- Keerthana, S.; Kumar, A. (2020). Potential risks and benefits of zinc oxide nanoparticles: a systematic review. *Critical Reviews in Toxicology*, (), 1–25. doi:10.1080/10408444.2020.1726282
- Kumar, Ashutosh; Pandey, Alok K.; Singh, Shashi; Shanker, Rishi; Dhawan, Alok (2011). Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. , 83(8), 1124–1132. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.025. Acesso 8 jan 2022.
- Kwon, Jee Young; Lee, Seung Young; Koedrith, Preeyaporn; Lee, Jong Yun; Kim, Kyoung-Min; Oh, Jae-Min; Yang, Sung Ik; Kim, Meyoung-Kon; Lee, Jong Kwon; Jeong, Jayoung; Maeng, Eun Ho; Lee, Beam Jun; Seo, Young Rok (2014). *Lack of genotoxic potential of ZnO nanoparticles in in vitro and in vivo tests. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 761(), 1–9. doi:10.1016/j.mrgentox.2014.01.005. Acesso 12 jan. 2022.
- Landsiedel, Robert; Ma-Hock, Lan; Van Ravenzwaay, Ben; Schulz, Markus; Wiench, Karin; Champ, Samantha; Schulte, Stefan; Wohlleben, Wendel; Oesch, Franz (2010). *Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations. Nanotoxicology*, 4(4), 364–381. doi:10.3109/17435390.2010.506694
- Li, Yan; David H. Chen; Jian Yan; Ying Chen; Roberta A. Mittelstaedt; Yongbin Zhang; Alexandru S. Biris; Robert H. Heflich; Tao Chen (2012). *Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. , 745(1-2), 0–10.* doi:10.1016/j.mrgentox.2011.11.010. Acesso 10 jan 2022.
- Liu, Haoyang Haven; Cohen, Yoram (2014). Multimedia Environmental Distribution of Engineered Nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 48(6), 3281–3292. doi:10.1021/es405132z. Acesso 10 jan. 2022.

- Lopes, I.; Ribeiro, R.; Antunes, E.; Rocha-Santos, T.P.; Rasteiro, M.G.; Soares, A.M.; Gonçalves, F.; Pereira, R. (2012). Toxicity and genotoxicity of organic and inorganic nanoparticles to the bacteria *Vibrio fischeri* and *Salmonella typhimurium*. , 21(3), 637–648. doi:10.1007/s10646-011-0808-9. Acesso 10 jun 2022.
- Magdolenova, Zuzana; Collins, Andrew; Kumar, Ashutosh; Dhawan, Alok; Stone, Vicki; Dusinska, Maria (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3), 233–278. Disponível em doi:10.3109/17435390.2013.773464. Acesso 8 jan 2022.
- Mahaye, N.; Thwala, M.; Cowan, D.A.; Musee, N. (2017). Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, (), S1383574216301569–. doi:10.1016/j.mrrev.2017.05.004
- Maron, Dorothy; Ames, Bruce. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. 113(3-4), 173–215. doi:10.1016/0165-1161(83)90010-9.
- Manna, Indrani; Bandyopadhyay, Maumita (2017). Engineered Nickel Oxide Nanoparticle Causes Substantial Physicochemical Perturbation in Plants. *Frontiers in Chemistry*, 5(), 92–. doi:10.3389/fchem.2017.00092
- Meneses, Cristiano T.; Flores, Wladimir H.; Sasaki, José M. (2007). Direct Observation of the Formation of Nanoparticles by in situ Time-Resolved X-ray Absorption Spectroscopy. *Chemistry of Materials*, 19(5), 1024–1027. doi:10.1021/cm0621996
- Miao, Ai-Jun; Zhang, Xue-Yin; Luo, Zhiping; Chen, Chi-Shuo; Chin, Wei-Chun; Santschi, Peter; Quigg, Antonietta (2010). *Zinc oxide-engineered nanoparticles: Dissolution and toxicity to marine phytoplankton*. , 29(12), 2814–2822. doi:10.1002/etc.340. Acesso 1 fev. 2022.
- Mortelmans, Kristien; Zeiger, Errol. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. , 455(1-2), 29–60. doi:10.1016/s0027-5107(00)00064-6. Acesso 5 jan 2022.
- Mudunkotuwa, Imali A.; Rupasinghe, Thilini; Wu, Chia-Ming; Grassian, Vicki H. (2012). Dissolution of ZnO Nanoparticles at Circumneutral pH: A Study of Size Effects in the Presence and Absence of Citric Acid. , 28(1), 396–403. doi:10.1021/la203542x. Acesso em 24 dez. 2021.

- Nilsen, Elena; Smalling, Kelly L.; Ahrens, Lutz; Gros, Meritxell; Miglioranza, Karina S.B.; Pico, Yolanda; Schoenfuss, Heiko L. (2018). GRAND CHALLENGES IN ASSESSING THE ADVERSE EFFECTS OF CONTAMINANTS OF EMERGING CONCERN ON AQUATIC FOOD WEBS. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (), -. doi:10.1002/etc.4290. Acesso fev. 2022.
- Oberdörster, Günter; Kuhlbusch, Thomas A.J. (2017). In vivo effects: Methodologies and biokinetics of inhaled nanomaterials. *NanoImpact*, (), S2452074817300629-. doi:10.1016/j.impact.2017.10.007.
- OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. ENV/JM/MONO(2008)13/REV. 2008. Disponível em: [https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO\(2008\)13/REV/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO(2008)13/REV/en/pdf). Acesso 22 jun 2022.
- OECD (2020), Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.
- Pan, Xiaoping; Redding, James; Wiley, Patricia; Wen, Lisa; McConnell, Scott; Zhang, Baohong. (2010). Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay. , 79(1), 113–116. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.12.056. Acesso 10 jan. 2022.
- Parihar, Vandana; Raja, Mohan.; Paulose, Rini. 2018. A brief review of structural, electrical and electrochemical properties of zinc oxide nanoparticles. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, v. 53, 119-130.
- Peretyazhko, Tanya S.; Zhang, Qingbo; Colvin, Vicki L. (2014). Size-Controlled Dissolution of Silver Nanoparticles at Neutral and Acidic pH Conditions: Kinetics and Size Changes. *Environmental Science & Technology*, 48(20), 11954–11961. doi:10.1021/es5023202. Acesso 24 dez. 2021.
- Pérez-Hernández, H., Pérez-Moreno, A., Sarabia-Castillo, C.R. *et al.* Ecological Drawbacks of Nanomaterials Produced on an Industrial Scale: Collateral Effect on Human and Environmental Health. *Water Air Soil Pollut* **232**, 435 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05370-2>.

- Roubicek, D.A.; Bertoni, F.M.; Fernandes, A.S.; Lima, C.F.; Felzenszwalb, I. Teste de Ames. *In: Salvadori, D.M; Takahashi, CS; Grisolia, CK; Alves, RA. (Org.). Da Toxicogenética à Toxicogenômica. Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, 2021, ed. 1, p. 83-116.*
- Sabella, Stefania; Carney, Randy P.; Brunetti, Virgilio; Malvindi, Maria Ada; Al-Juffali, Noura; Vecchio, Giuseppe; Janes, Sam M.; Bakr, Osman M.; Cingolani, Roberto; Stellacci, Francesco; Pompa, Pier Paolo (2014). *A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. Nanoscale, 6(12), 7052–. doi:10.1039/C4NR01234H. Acesso 15 jan. 2022.*
- Sadiq, Rakhshinda; Khan, Qaiser Mahmood; Mobeen, Ameena; Hashmat, Amer Jamal (2014). *In vitro* toxicological assessment of iron oxide, aluminium oxide and copper nanoparticles in prokaryotic and eukaryotic cell types. *Drug and Chemical Toxicology, ()*, 1–10. doi:10.3109/01480545.2014.919584
- Schiavo, S.; Oliviero, M.; Miglietta, M.; Rametta, G.; Manzo, S. (2016). Genotoxic and cytotoxic effects of ZnO nanoparticles for *Dunaliella tertiolecta* and comparison with SiO₂ and TiO₂ effects at population growth inhibition levels. *Science of The Total Environment, 550()*, 619–627. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.135. Acesso 1 fev. 2022.
- Sibiya, A., Jeyavani, J., Santhanam, P., Preetham, E., Freitas, R., & Vaseeharan, B. (2022). Comparative evaluation on the toxic effect of silver (Ag) and zinc oxide (ZnO) nanoparticles on different trophic levels in aquatic ecosystems: A review. *Journal of Applied Toxicology*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/jat.4310>
- Singh, Sanjiv (2018). Zinc Oxide Nanoparticles Impacts: Cytotoxicity, Genotoxicity, Developmental toxicity, and Neurotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods, ()*, 0–37. doi:10.1080/15376516.2018.1553221.
- Sizochenko, Natalia; Mikolajczyk, Alicja; Jagiello, Karolina; Puzyn, Tomasz; Leszczynski, Jerzy; Rasulev, Bakhtiyor (2017). How toxicity of nanomaterials towards different species could be simultaneously evaluated: Novel multi-nano-read-across approach. *Nanoscale. Disponível em: doi:10.1039/C7NR05618D. Acesso 8 jan 2022.*
- Sizochenko, Natalia; Syzochenko, Michael; Fjodorova, Natalja; Rasulev, Bakhtiyor; Leszczynski, Jerzy (2019). Evaluating genotoxicity of metal oxide nanoparticles: Application of advanced supervised and unsupervised machine learning techniques.

- Ecotoxicology and Environmental Safety, 185(), 109733–. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109733. Acesso 8 jan 2022.
- Solano, Ricardo; Patiño-Ruiz, David; Tejeda-Benitez, Lesly; Herrera, Adriana; (2021). Metal- and metal/oxide-based engineered nanoparticles and nanostructures: review on the applications, nanotoxicological effects and risk control strategies. *Env Science and Pollution Research*.
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177–182. doi:10.1016/j.jcis.2004.02.012.
- Spence AR, Hopkins GR, Neuman-LEE LA, Smith GDS, Brodie JR. ED, French SS. 2016. Detrimental Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Amphibian Life Stages. *J. Exp. Zool.* 325A:415–424.
- Subramaniam, Vimala Devi; Prasad, Suhanya Veronica; Banerjee, Antara; Gopinath, Madhumala; Murugesan, Ramachandran; Marotta, Francesco; Sun, Xiao-Feng; Pathak, Surajit (2018). *Health hazards of nanoparticles: understanding the toxicity mechanism of nanosized ZnO in cosmetic products. Drug and Chemical Toxicology*, 1–10. doi:10.1080/01480545.2018.1491987.
- Vance, Marina E; Kuiken, Todd; Vejerano, Eric P; McGinnis, Sean P; Hochella, Michael F; Rejeski, David; Hull, Matthew S (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(), 1769–1780. doi:10.3762/bjnano.6.181. Acesso 25 jan. 2022.
- Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P. 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.* 319, 31-45.
- Wagner, A.J., Bleckmann, C.A., Murdock, R.C., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2007. Cellular interaction of different forms of aluminum nanoparticles in rat alveolar macrophages. *Journal of Physical Chemistry B* 111, 7353–7359
- Yang, Hui; Liu, Chao; Yang, Danfeng; Zhang, Huashan; Xi, Zhuge (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the

- role of particle size, shape and composition. , 29(1), 69–78. doi:10.1002/jat.1385. Acesso em 15 jan 2022.
- Yang, Li; Junfeng, Niu; Enxiang, Shang; John Charles, Crittenden (2016). Influence of Dissolved Organic Matter on Photogenerated Reactive Oxygen Species and Metal-Oxide Nanoparticle Toxicity. *Water Research*, (), S0043135416301750–. doi:10.1016/j.watres.2016.03.050. Acesso 31 jan. 2022.
- Yu, Lin-peng; Fang, Tao; Xiong, Dao-wen; Zhu, Wen-tao; Sima, Xiao-feng (2011). Comparative toxicity of nano-ZnO and bulk ZnO suspensions to zebrafish and the effects of sedimentation, $\cdot\text{OH}$ production and particle dissolution in distilled water. , 13(7), 1975–0. doi:10.1039/c1em10197h. Acesso 1 fev. 2022.
- Zhang, X.; Zhang, J.; Wang, Q.; Ghimire, S.; Mei, L.; Wu, C. Effects of Particle Size and Surface Charge on Mutagenicity and Chicken Embryonic Toxicity of New Silver Nanoclusters. *ACS Omega*. 2022. 18;7(21):17703-17712. doi: 10.1021/acsomega.2c00688.
- Zhu, Xiaoshan; Zhu, Lin; Duan, Zhenghua; Qi, Ruiqi; Li, Yan; Lang, Yupeng (2008). Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 43(3), 278–284. doi:10.1080/10934520701792779. Acesso 1 fev. 2022.
- Zhu, Xiaoshan; Wang, Jiangxin; Zhang, Xuezhi; Chang, Yung; Chen, Yongsheng (2009). The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Nanotechnology*, 20(19), 195103–. doi:10.1088/0957-4484/20/19/195103. Acesso 1 fev. 2022.
- Zou, Xiaoyan; Li, Penghui; Lou, Jie; Fu, Xiaoyan; Zhang, Hongwu (2017). Stability of single dispersed silver nanoparticles in natural and synthetic freshwaters: Effects of dissolved oxygen. *Environmental Pollution*, 230(), 674–682. doi:10.1016/j.envpol.2017.07.007. Acesso 1 fev. 2022.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este trabalho é parte integrante de um projeto inserido em uma problemática atual e relevante: análise do potencial tóxico e mutagênico de micropoluentes emergentes frente a biomarcadores. Esses ensaios ecotoxicológicos buscam elucidar os efeitos dos contaminantes ambientais a nível celular e os riscos associados às populações humanas e naturais. Uma vez que o ambiente exerce um papel fundamental na saúde dos organismos, a exposição aos diversos compostos químicos pode acarretar efeitos prejudiciais, como danos ao material genético (genotoxicidade) e indução de morte celular (citotoxicidade). Desta maneira, ao observar, identificar e compreender as alterações ocasionadas pela exposição aos contaminantes em processos biológicos básicos, os efeitos deletérios nos organismos são avaliados.

A crescente aplicação das NPs óxido-metálicas em produtos cotidianos levanta preocupações e esses MEs requerem atenção. A toxicidade e os danos moleculares das NPs são potencializados pelo seu tamanho, mas há outros fatores intrínsecos e extrínsecos a elas que afetam sua biodisponibilidade, bem como os efeitos primários e secundários sobre os constituintes celulares. Após uma busca na bibliografia, o presente estudou propôs uma metodologia modificada do ensaio *Salmonella*/microsoma a fim de investigar o potencial tóxico e genotóxico de NPs de óxido de níquel e óxido de zinco. As repostas apresentadas no Capítulo I indicam os diferentes mecanismos de ação dos quais as NPs induzem sobre o DNA e que podem levar a efeitos carcinogênicos em organismos superiores, visto que este é o propósito do Teste de Ames. Foram observadas repostas genotóxicas para NiO-NP e ZnO-NP em pH 5 e pH 7.5. Ainda, os resultados indicam maiores danos do tipo substituição de pares de bases nas linhagens de *S. typhimurium* e alteração das substâncias pelos metabólitos da fração S9 mix.

Em reflexos à proteção ambiental e do ecossistema, a avaliação da atividade tóxica e genotóxica dessas NPs é uma medida fundamental para a tomada de decisão e contribui com propostas de regulamentações. Em meados do final da década de 2000, Estados Unidos e alguns países da União Europeia intensificaram as discussões pela regulação dos micropoluentes. A International Organization for Standardization (ISO) criou um comitê

técnico no ano de 2005 (ISO/TC 229 - www.iso.org/committee/381983.html) direcionado para resolver questões específicas, como a padronização de metodologias para avaliação dos efeitos dos nanomateriais na saúde humana e no meio ambiente em um contexto regulatório. Esse comitê, de acordo com a instituição, vêm contribuindo com os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 da ONU, associados às atividades industriais, de inovação, produção e consumo responsável e de crescimento econômico, do mesmo modo que aos relativos à saúde e bem-estar, vida na água e combate às mudanças climáticas.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) sistematizou diretrizes para proteção contra riscos associados aos nanomateriais para segurança do trabalho (Lee et al., 2017). De acordo com a OMS, o mundo está mudando rapidamente, sendo que os novos problemas ambientais, climáticos e de saúde exigem identificação e repostas rápidas. É necessária a gestão dos micropoluentes de preocupação emergente (nanopartículas, microplásticos, disruptores endócrinos, entre outros) para melhorar a saúde e o bem-estar de forma sustentável (WHO, 2020). No Brasil, contudo, não há um acompanhamento das pesquisas em nanotoxicologia nem de análise de riscos de nanomateriais ou de produtos comercializados (Invernizzi & Foladori, 2021, p. 309). No país, também não há o devido monitoramento dos micropoluentes no ambiente aquático nem nos recursos hídricos destinados à população (BRASIL, 2021), sendo poucas iniciativas para a detecção e possibilidades de remoção desses produtos. Do mesmo modo, os nanomateriais não são mencionados como critérios avaliados nos padrões de qualidade do ar vigentes (BRASIL, 2018). Neste contexto, as NPs marcam um novo desafio sobre a necessidade de regulação.

Atualmente tramita no Congresso Nacional o Projeto de Lei (PL) nº 880 de 2019, que “institui o Marco Legal da Nanotecnologia e Materiais Avançados; dispõe sobre estímulos ao desenvolvimento científico, à pesquisa, à capacitação científica e tecnológica e à inovação nanotecnológica; e dá outras providências.”. Este PL busca assegurar recursos humanos e econômicos para o desenvolvimento nanotecnológico, com estímulos para a cooperação internacional e desenvolvimento regional, com vistas às questões ambientais, sanitárias e de segurança considerando as implicações éticas, legais e sociais da nanotecnologia (BRASIL, 2019). Ademais, no texto do PL há uma proposta de implementação do Programa Nacional de Nanosseguurança, cujo objetivo é criar um protocolo de avaliação para segurança ocupacional

e ambiental para nanomateriais e nanoprodutos (considerando todo o ciclo de vida dos produtos), ajustado à legislação global guiada pela OECD e alinhado com os ODS (BRASIL, 2019).

Considerando o crescimento da nanotecnologia e do mercado destes produtos, ainda há muito no que se trabalhar para a elucidação dos possíveis mecanismos e efeitos das NPs sobre o ambiente e aos organismos. O estudo da nanoecotoxicologia é recente e novas abordagens de análise tendem a ser propostas (Kahru & Dubourguier, 2010). Por fim, o trabalho desenvolvido nesta dissertação buscou alternativas metodológicas para a utilização do ensaio *Salmonella*/microsoma, método já adotado em legislações internacionais para definir dano mutagênico molecular, como uma alternativa de avaliação de nanopartículas. Ainda assim, são necessárias novas abordagens metodológicas articuladas com respostas frente a outros bioindicadores no campo da ecotoxicologia, a fim de desvendar alguns questionamentos referentes à segurança ecotoxicológica das nanopartículas.

REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO

- ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profiles. [Atlanta]: ATSDR, 2017. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>. Acesso 5 mar. 2022.
- Angelé-Martínez, Carlos; Goodman, Craig; Brumaghim, Julia (2014). Metal-mediated DNA damage and cell death: mechanisms, detection methods, and cellular consequences. *Metalomics*, 6(8), 1358–. doi:10.1039/C4MT00057A.
- Aslani, Farzad; Bagheri, Samira; Muhd Julkapli, Nurhidayatullaili; Juraimi, Abdul Shukor; Hashemi, Farahnaz Sadat Golestan; Baghdadi, Ali (2014). *Effects of Engineered Nanomaterials on Plants Growth: An Overview. The Scientific World Journal*, 2014(), 1–28. doi:10.1155/2014/641759.
- Balasubramanyam, A.; Sailaja, N.; Mahboob, M.; Rahman, M.F.; Hussain, S.; Grover, P. (2010). In vitro mutagenicity assessment of aluminium oxide nanomaterials using the *Salmonella/microsome* assay. , 24(6), 0–1876. doi:10.1016/j.tiv.2010.07.004.
- Barhoum, A.; García-Betancourt, M.L.; Jeevanandam, J.; Hussien, E.A.; Mekkawy, S.A.; Mostafa, M.; Omran, M.M.; S. Abdalla, M.; Bechelany, M. Review on Natural, Incidental, Bioinspired, and Engineered Nanomaterials: History, Definitions, Classifications, Synthesis, Properties, Market, Toxicities, Risks, and Regulations. *Nanomaterials* **2022**, 12, 177. <https://doi.org/10.3390/nano12020177>.
- Becheri, Alessio; Dürr, Maximilian; Lo Nostro, Pierandrea; Baglioni, Piero (2008). Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers. , 10(4), 679–689. doi:10.1007/s11051-007-9318-3.
- Bernstein, L.; Kaldor, J.; McCann, J.; Pike, M.C. 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutation Research*, 97: 267-281.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE RESOLUÇÃO No 430, DE 13 DE MAIO DE 2011 Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357,

de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Disponível em: https://www.adasa.df.gov.br/images/stories/anexos/8Legislacao/Res_CONAMA/Resolucao_CONAMA_430_2011.pdf. Acesso 5 fev. 2022.

BRASIL. CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 491, de 19 de novembro de 2018. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=21/11/2018&jornal=515&pagina=155&totalArquivos=178>. Acesso 15 jul. 2022.

BRASIL. Senado Federal. Projeto de Lei nº 880, de 2019. Institui o Marco Legal da Nanotecnologia e Materiais Avançados; dispõe sobre estímulos ao desenvolvimento científico, à pesquisa, à capacitação científica e tecnológica e à inovação nanotecnológica; altera as Leis nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004, e nº 8.666, de 21 de junho de 1993; e dá outras providências. Disponível em: <https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/135353>. Acesso 6 mar. 2022.

BRASIL. Diário Oficial da União. Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>. Acesso 5 fev. 2022.

Briffa, Jessica; Sinagra, Emmanuel; Blundell, Renald (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9), e04691–. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04691.

Boxall, Alistair BA; Tiede, Karen; Chaudhry, Qasim (2007). Engineered nanomaterials in soils and water: how do they behave and could they pose a risk to human health?. , 2(6), 919–927. doi:10.2217/17435889.2.6.919

Cardozo, Tatiane R.; De Carli, Raíne F.; Seeber, Allan; Flores, Wladimir H.; da Rosa, Jordana A. N.; Kotzal, Queila S. G.; Lehmann, Mauricio; da Silva, Fernanda R.; Dihl, Rafael R. (2019). Genotoxicity of zinc oxide nanoparticles: an *in vivo* and *in silico* study. *Toxicology Research*.

- Castaño, Argelia; Bols, Niels; Braunbeck, Thomas; Dierickx, Paul; Halder, Marlies; Isomaa, Boris; Kawahara, Kazumi; Lee, Lucy E. J.; Mothersill, Carmel; Pärt, Peter; Repetto, Guillermo; Sintes, Juan Riego; Rufli, Hans; Smith, Richard; Wood, Chris; Segner, Helmut (2003). *The use of Fish Cells in Ecotoxicology: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 47* [,]. *Alternatives to Laboratory Animals*, 31(3), 317–351. doi:10.1177/026119290303100314. Acesso 3 jan. 2022.
- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Fourth national Report on human exposure to environmental chemicals: updated tables. Atlanta, GA: CDC, 2018. v. 1. Disponível em: https://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport_UpdatedTables_Volume1_Mar2018.pdf. Acesso 5 mar. 2022.
- Crini, Gregório; Lichtfouse, Eric; Wilson, Lee; Morin-Crini, Nadia. 2019. Conventional and non-conventional adsorbents for wastewater treatment. *Environmental Chemistry Letters*, Springer Verlag, 2019, 17 (1), pp.195-213. Disponível em: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02082916/document>. Acesso em 20 fev. 2022.
- Czyżowska, Agnieszka; Barbasz, Anna. (2020): A review: zinc oxide nanoparticles – friends or enemies?, *International Journal of Environmental Health Research*, DOI: 10.1080/09603123.2020.1805415.
- Danjumma, S.G.; Abubakar, Y.; Suleiman, S. 2019. Nickel Oxide (NiO) Devices and Applications: A Review. *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*, v. 8, issue 4. 2019. doi: 10.17577/IJERTV8IS040281.
- De Carli, Raíne F.; Chaves, Débora dos S.; Cardozo, Tatiane R.; de Souza, Ana Paula; Seeber, Allan; Flores, Wladimir H.; Honatel, Karol F.; Lehmann, Mauricio; Dihl, Rafael R. (2018). *Evaluation of the genotoxic properties of nickel oxide nanoparticles in vitro and in vivo. Mutation Research*.
- Demir E, Qin T, Li Y, Zhang Y, Guo X, Ingle T, Yan J, Orza AI, Biris AS, Ghorai S, Zhou T, Chen T (2020) Cytotoxicity and genotoxicity of cadmium oxide nanoparticles evaluated using in vitro assays. *Mutat. Res.*, 850-851:503149.
- Doak, S.H.; B. Manshian; G.J.S. Jenkins; N. Singh (2012). In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. , 745(1-2), 0–111. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.09.013.

- Donaldson, K; Stone, V.; Tran, C.; Kreyling, W.; Born, P.J. (2004). Nanotoxicology. *Occupational and Environmental Medicine*, 61(9), 727–728. doi:10.1136/oem.2004.013243.
- Du, Xiuming; Gao, Shunxiang; Hong, Liling; Zheng, Xin; Zhou, Qingyun; Wu, Jihong (2019). Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the mouse lymphoma assay and the Ames test. *Mut. Res./Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 838(), 22–27. doi:10.1016/j.mrgentox.2018.11.015. Acesso 8 jan 2022.
- Dumont, Egon; Johnson, Andrew C.; Keller, Virginie D.J.; Williams, Richard J. (2015). Nano silver and nano zinc-oxide in surface waters – Exposure estimation for Europe at high spatial and temporal resolution. *Env. Pol.*, 196, 341–349. doi:10.1016/j.envpol.2014.10.022
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2018) Lodo de esgoto é ótimo componente de substratos para plantas. On-line. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/32485890/lodo-de-esgoto-e-otimo-componente-de-substratos-para-plantas>. Acesso 20 fev. 2022.
- EUON - European Union Observatory for Nanomaterials. Risk assessment of nanomaterials – further considerations. 2017. Disponível em: https://euon.echa.europa.eu/documents/2435000/3268584/nano_in_brief_en.pdf/295c5f46-0f1e-4ad5-72a5-81c44b45bdd5?t=1531477424187. Acesso 2 mar. 2022.
- Faizan, M., Hayat, S., Pichtel, J. (2020). Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Crop Plants: A Perspective Analysis. In: Hayat, S., Pichtel, J., Faizan, M., Fariduddin, Q. (eds) *Sustainable Agriculture Reviews 41*. Sustainable Agriculture Reviews, vol 41. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-33996-8_4.
- Ferraris, C.; Rimicci, C.; Garelli, S.; Ugazio, E.; Battaglia, L. Nanosystems in Cosmetic Products: A Brief Overview of Functional, Market, Regulatory and Safety Concerns. *Pharmaceutics* 2021, 13, 1408. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091408>. Acesso em 10 mai 2022.
- Föllmann, W. (2013). *Brenner's Encyclopedia of Genetics* || Ames Test. , (), 104–107. doi:10.1016/b978-0-12-374984-0.00048-6
- Futuyma, D. J. *Biologia Evolutiva*. São Paulo: Funpec, 2002, ed. 2. 632 p. ISBN 8587528181.

- Fytianos, G., Rahdar, A., & Kyzas, G. Z. (2020). Nanomaterials in Cosmetics: Recent Updates. *Nanomaterials*, 10(5), 979. doi:10.3390/nano10050979. Acesso em 13 mai 2022.
- Granjeiro, José Mauro; Rossi, Alexandre. Rede Nanotox. (Capítulo V), p. 123-130. In: Andrade, L.B (org.). *Pequeno não quer dizer seguro: nanotecnologias e macroinquietações*. São Paulo: Fundacentro, 424 p., 2021.
- Gottschalk, Fadri; Sonderer, Tobias; Scholz, Roland W.; Nowack, Bernd (2009). Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions., 43(24), 9216–9222. doi:10.1021/es9015553. Acesso 5 fev. 2022.
- Gottschalk, Fadri; Lassen, Carsten; Kjoelholm, Jesper; Christensen, Frans; Nowack, Bernd (2015). Modeling Flows and Concentrations of Nine Engineered Nanomaterials in the Danish Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(5), 5581–5602. doi:10.3390/ijerph120505581. Acesso 5 fev. 2022.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic risks to humans - Arsenic, metals, fibres, and dusts (volume 100C). A review of human carcinogens. 2012. <https://publications.iarc.fr/120>
- IARC - International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic risks to humans - Some nanomaterials and some fibres (Volume 111). 2017. <https://publications.iarc.fr/552>.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans - Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for the IARC Monographs during 2020–2024. 2022. Disponível em: https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/10/IARCMonographs-AGReport-Priorities_2020-2024.pdf. Acesso 5 jun. 2022.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios*. Rio de Janeiro: INCA, 290 p., 2021.
- Invernizzi, Noela; Foladori, Guillermo. A nanotecnologia na América Latina: qual o enfoque sobre os riscos? (Capítulo XI), p. 293-328. In: Andrade, L.B (org.). *Pequeno não quer dizer seguro: nanotecnologias e macroinquietações*. São Paulo : Fundacentro, 424 p., 2021.

- International Zinc Association (IZA). 2022. Disponível em zinc.org. Acesso 28 maio 2022.
- Kahru, Anne; Dubourguier, Henri-Charles (2010). From ecotoxicology to nanoecotoxicology, 269 (2-3), p. 105–119. doi:10.1016/j.tox.2009.08.016.
- Kahru, Anne; Ivask, Angela (2013). Mapping the Dawn of Nanoecotoxicological Research. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 823–833. doi:10.1021/ar3000212.
- Kacprzak, Małgorzata; Neczaj, Ewa; Fijałkowski, Krzysztof; Grobelak, Anna; Grosser, Anna; Worwag, Małgorzata; Rorat, Agnieszka; Brattebo, Helge; Almås, Åsgeir; Singh, Bal Ram (2017). Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. *Environmental Research*, 156(), 39–46. doi:10.1016/j.envres.2017.03.010. Acesso 20 fev. 2022.
- Kado, N.Y., Langley, D., Eisenstadt, E., 1983. A simple modification of *Salmonella* liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res.* 121, 25-32.
- Keller, Arturo; McFerran, Suzanne; Lazareva, Anastasiya. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials . , 15(6), 1692–. doi:10.1007/s11051-013-1692-4. Acesso em 23 jan. 2022.
- Khan, Ibrahim; Saeed, Khalid; Khan, Idrees (2017). Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, (), S1878535217300990–. doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011. Acesso em 20 jun 2022.
- Kwon, Jee Young; Lee, Seung Young; Koedrith, Preeyaporn; Lee, Jong Yun; Kim, Kyoung-Min; Oh, Jae-Min; Yang, Sung Ik; Kim, Meyoung-Kon; Lee, Jong Kwon; Jeong, Jayoung; Maeng, Eun Ho; Lee, Beam Jun; Seo, Young Rok (2014). *Lack of genotoxic potential of ZnO nanoparticles in in vitro and in vivo tests. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 761(), 1–9. doi:10.1016/j.mrgentox.2014.01.005. Acesso 12 jan. 2022.
- Landsiedel, Robert; Ma-Hock, Lan; Van Ravenzwaay, Ben; Schulz, Markus; Wiench, Karin; Champ, Samantha; Schulte, Stefan; Wohlleben, Wendel; Oesch, Franz (2010). *Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations. Nanotoxicology*, 4(4), 364–381. doi:10.3109/17435390.2010.506694.

- Lee N, Lim CH, Kim T, Son EK, Chung GS, Rho CJ et al. Which hazard category should specific nanomaterials or groups of nanomaterials be assigned to and how? Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Lee, X.; Ong, H.; Ooi, J.; Yu, K.; Tham, T.; Chen, W.; Ok, Y. Engineered macroalgal and microalgal adsorbents: synthesis routes and adsorptive performance on hazardous water contaminants. *Journal of Hazardous Materials*, v. 423, 2022.
- Li, Yan; David H. Chen; Jian Yan; Ying Chen; Roberta A. Mittelstaedt; Yongbin Zhang; Alexandru S. Biris; Robert H. Heflich; Tao Chen (2012). *Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay.* , 745(1-2), 0–10. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.11.010. Acesso 10 jan 2022.
- Liu, Haoyang Haven; Cohen, Yoram (2014). Multimedia Environmental Distribution of Engineered Nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 48(6), 3281–3292. doi:10.1021/es405132z. Acesso 10 jan. 2022.
- Magdolenova, Zuzana; Collins, Andrew; Kumar, Ashutosh; Dhawan, Alok; Stone, Vicki; Dusinska, Maria (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3), 233–278. Disponível em doi:10.3109/17435390.2013.773464. Acesso 8 jan 2022.
- Mahaye, N.; Thwala, M.; Cowan, D.A.; Musee, N. (2017). Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, (), S1383574216301569–. doi:10.1016/j.mrrev.2017.05.004.
- Markus, A.A.; Parsons, J.R.; Roex, E.W.M.; de Voogt, P.; Laane, R.W.P.M. (2016). Modelling the transport of engineered metallic nanoparticles in the river Rhine. *Water Research*, 91(), 214–224. doi:10.1016/j.watres.2016.01.003.
- Mazzeo, Dânia Elisa Christofolletti; Fernandes, Thaís Cristina Casimiro; Marin-Morales, Maria Aparecida (2016). Attesting the efficiency of monitored natural attenuation in the detoxification of sewage sludge by means of genotoxic and mutagenic bioassays. *Chemosphere*, 163(), 508–515. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.08.060. Acesso 22 fev. 2022.
- Mielcarz-Skalska, Lidia; Smolińska, Beata. (2017) Zinc and nano-ZnO – influence on living organisms. *Biotechnol Food Sci*, 81 (2), 93-102. 2017. <http://repozytorium.p.lodz.pl/>

- bitstream/handle/11652/1621/Zinc_nano_ZnOL_Mielcarz_Skalska_Smolinska_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso 2 jan. 2022.
- Mitrano, Denise M.; Motellier, Sylvie; Clavaguera, Simon; Nowack, Bernd (2015). Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products. *Environment International*, 77(), 132–147. doi:10.1016/j.envint.2015.01.013. Acesso 2 jun 2022.
- Moloi, M.S.; Lehutso, R.F.; Erasmus, M.; Oberholster, P.J.; Thwala, M. Aquatic Environment Exposure and Toxicity of Engineered Nanomaterials Released from Nano-Enabled Products: Current Status and Data Needs. *Nanomaterials*. 2021, 11, 2868. <https://doi.org/10.3390/nano11112868>. Acesso 15 mai. 2022.
- NIH - National Institutes of Health. Nanotechnology. 2022. Disponível em <https://www.nih.gov/sites/default/files/research-training/nanotechnology-brochure.pdf>. Acesso 16 fev. 2022.
- Nizam, N.U.M.; Hanafiah, M.M.; Woon, K.S. A Content Review of Life Cycle Assessment of Nanomaterials: Current Practices, Challenges, and Future Prospects. *Nanomaterials* 2021, 11, 3324. <https://doi.org/10.3390/nano11123324>. Acesso 15 mai 2022.
- Nowack, Bernd. 2017. Evaluation of environmental exposure models for engineered nanomaterials in a regulatory context. *NanoImpact*, v. 8, 38–47. 2017. doi:10.1016/j.impact.2017.06.005.
- OECD (2016), *Nanomaterials in Waste Streams: current knowledge on risks and impacts*, OECD Publishing, Paris. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264249752-en>. Acesso 3 mar. 2022.
- OECD (2020), *Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>. Acesso 3 mar. 2022.
- Parihar, Vandana; Raja, Mohan.; Paulose, Rini. 2018. A brief review of structural, electrical and electrochemical properties of zinc oxide nanoparticles. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, v. 53, 119-130.

- Park, Chang Min; Chu, Kyoung Hoon; Heo, Jiyong; Her, Namguk; Jang, Min; Son, Ahjeong; Yoon, Yeomin (2016). Environmental behavior of engineered nanomaterials in porous media: a review. *Journal of Hazardous Materials*, (), S0304389416300863–. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.02.006. Acesso 20 fev. 2022.
- Pérez-Hernández, H., Pérez-Moreno, A., Sarabia-Castillo, C.R. *et al.* Ecological Drawbacks of Nanomaterials Produced on an Industrial Scale: Collateral Effect on Human and Environmental Health. *Water Air Soil Pollut* **232**, 435 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05370-2>.
- Piccinno, F.; Gottschalk, F.; Seeger, S.; Nowack, B. (2012). Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. , 14(9), –. doi:10.1007/s11051-012-1109-9
- Powers, Kevin; Palazuelos, Maria; Brown, Scott; Roberts, Stephen. Characterization of nanomaterials for toxicological evaluation (Chapter 1). In: Sahu, Saura and Casciano, Daniel (org). *Nanotoxicity: From In Vivo and In Vitro Models to Health Risks*. United Kingdom: John Wiley and Sons Ltd., 2009. p. 1-28. ISBN: 978-0-470-74779-7.
- Roubicek, D.A.; Bertoni, F.M.; Fernandes, A.S.; Lima, C.F.; Felzenszwalb, I. Teste de Ames. *In: Salvadori, D.M; Takahashi, CS; Grisolia, CK; Alves, RA. (Org.). Da Toxicogenética à Toxicogenômica*. Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, 2021, ed. 1, p. 83-116.
- Royal Society. The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. *Nanoscience and Nanotechnology*. Londres: Latimer Trend Ltd, Plymouth, UK. 2004.
- Sayes, Christie; Warheit, David. Criteria and implementation of Physical and Chemical Characteristics of Nanomaterials for Human Health Effects and Ecological Toxicity Studies (Chapter 2). In: Sahu, Saura and Casciano, Daniel (org). *Nanotoxicity: From In Vivo and In Vitro Models to Health Risks*. United Kingdom: John Wiley and Sons Ltd., 2009. p. 29-39. ISBN: 978-0-470-74779-7.
- Singh, Sanjiv (2018). Zinc Oxide Nanoparticles Impacts: Cytotoxicity, Genotoxicity, Developmental toxicity, and Neurotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, (), 0–37. doi:10.1080/15376516.2018.1553221.

- Sharifan, Hamidreza (2020). Alarming the Impacts of the Organic and Inorganic UV blockers on Endangered Coral's Species in the Persian Gulf; A Scientific Concern for Coral Protection. *Sustainable Futures*, (), 100017–. doi:10.1016/j.sftr.2020.100017.
- Skjolding, L.M.; Winther-Nielsen, M.; Baun, A. (2014). Trophic transfer of differently functionalized zinc oxide nanoparticles from crustaceans (*Daphnia magna*) to zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 157(), 101–108. doi:10.1016/j.aquatox.2014.10.005.
- Solano, Ricardo; Patiño-Ruiz, David; Tejeda-Benitez, Lesly; Herrera, Adriana; (2021). Metal- and metal/oxide-based engineered nanoparticles and nanostructures: review on the applications, nanotoxicological effects and risk control strategies. *Env Science and Pollution Research*.
- Suhendra, Edward; Chang, Chih-Hua; Hou, Wen-Che; Hsieh, Yi-Chin (2020). A Review on the Environmental Fate Models for Predicting the Distribution of Engineered Nanomaterials in Surface Waters. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4554–. doi:10.3390/ijms21124554. Acesso 10 jun. 2022.
- Spence AR, Hopkins GR, Neuman-LEE LA, Smith GDS, Brodie JR. ED, French SS. 2016. Detrimental Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Amphibian Life Stages. *J. Exp. Zool.* 325A:415–424.
- Stark, W. J.; Stoessel, P. R.; Wohlleben, W.; Hafner, A. (2015). Industrial applications of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.*, (), 10.1039.C4CS00362D–. doi:10.1039/c4cs00362d
- Subramaniam, Vimala Devi; Prasad, Suhanya Veronica; Banerjee, Antara; Gopinath, Madhumala; Murugesan, Ramachandran; Marotta, Francesco; Sun, Xiao-Feng; Pathak, Surajit (2018). *Health hazards of nanoparticles: understanding the toxicity mechanism of nanosized ZnO in cosmetic products. Drug and Chemical Toxicology*, 1–10. doi:10.1080/01480545.2018.1491987.
- Sun, Tian Yin; Gottschalk, Fadri; Hungerbühler, Konrad; Nowack, Bernd (2014). Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental Pollution*, 185(), 69–76. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.004.
- Tijani, Jimoh O.; Fatoba, Ojo O.; Babajide, Omotola O.; Petrik, Leslie F. (2016). Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and

- perfluorinated pollutants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 14(1), 27–49. doi:10.1007/s10311-015-0537-z. Acesso em 5 abr 2022.
- Tröger, Rikard; Klöckner, Philipp; Ahrens, Lutz; Wiberg, Karin (2018). Micropollutants in drinking water from source to tap - Method development and application of a multiresidue screening method. *Science of The Total Environment*, 627(), 1404–1432. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.01.277. Acesso 4 mar 2022.
- Umbuzeiro, Gisela; Vargas, Vera Maria Ferrão. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. Organizadores Ribeiro, L. R. R., Salvadori, D. M. F., Marques, E. K.. In: Lucia Regina Ribeiro; Daisy M. F. Salvadori; Edmundo K. Marques. (Org.). *Mutagênese Ambiental*. 1ed. Canoas: ULBRA, 2003, v. 1, p. 81-112.
- Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208. doi:10.2174/0929867053764635. Acesso 4 mar. 2022.
- Vance, Marina E; Kuiken, Todd; Vejerano, Eric P; McGinnis, Sean P; Hochella, Michael F; Rejeski, David; Hull, Matthew S (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(), 1769–1780. doi:10.3762/bjnano.6.181. Acesso 25 jan. 2022.
- Vargas, V.M.F.; Coronas, M.V.; Gameiro, P.H.; Lemos, C.T.; Phoren, R.S. Biomonitoramento genético ambiental. In: Salvadori, D.M.; Takahashi, C.S.; Grisolia, C.K.; Alves, R.A. (Org.). *Da Toxicogenética à Toxicogenômica*. Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, 2021, ed. 1., 367 p.
- Walker, C.H.; Sibly, R.M.; Peakall, D.B. *Principles of Ecotoxicology*. Boca Raton: CRC Press, 2012. 386 p. ISBN: 9780429184222.
- WHO - World Health Organization
- WHO - World Health Organization. (2020) WHO global strategy on health, environment and climate change: the transformation needed to improve lives and wellbeing sustainably through healthy environments. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331959>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ii, 30 p., 2020.

- Wigger, Henning; Hackmann, Stephan; Zimmermann, Till; Köser, Jan; Thöming, Jorg; von Gleich, Arnim (2015). Influences of use activities and waste management on environmental releases of engineered nanomaterials. *Science of The Total Environment*, (), S0048969715001850-. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.02.042. Acesso 13 jun. 2022.
- Xiao, J.; Huang, J.; Wang, M.; Huang, M.; Wang Y. (2021). The fate and long-term toxic effects of NiO nanoparticles at environmental concentration in constructed wetland: Enzyme activity, microbial property, metabolic pathway and functional genes . *Journal of Hazardous Materials*, (), -. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.125295. Acesso 2 jun. 2022.
- Zheng, Yuanfang; Mutzner, Lena; Ort, Christoph; Kaegi, Ralf; Gottschalk, Fadri (2019). Modelling engineered nanomaterials in wet-weather discharges. *NanoImpact*, 16(), 100188-. doi:10.1016/j.impact.2019.100188. Acesso 14 jun 2022.

