UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO

LUCIANA ROSA DE SOUZA FLORESTA

# BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOCRISTAIS DE ÓXIDO DE ZINCO DOPADOS COM COBRE EM *Drosophila melanogaster*

Maceió
2023

LUCIANA ROSA DE SOUZA FLORESTA

# BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOCRISTAIS DE ÓXIDO DE ZINCO DOPADOS COM COBRE EM *Drosophila melanogaster*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Ciências Bacharelado em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Lucas Anhezini de Araujo
**Co-orientadora:** Dra. Jerusa Maria de Oliveira

Maceió
2023

**Catalogação na Fonte**
**Universidade Federal de Alagoas**
**Biblioteca Central**
**Divisão de Tratamento Técnico**
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

F634b Floresta, Luciana Rosa de Souza.
Biocompatibilidade de nanocristais de óxido de zinco dopados com cobre em *Drosophila melanogaster* / Luciana Rosa de Souza Floresta. – Maceió, 2023.
37 f. : il.

Orientador: Lucas Anhezini de Araujo.
Co-orientadora: Jerusa Maria de Oliveira.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 34-37.

1. Nanotoxicidade. 2. Mosca-das-frutas. 3. Biocompatibilidade. 4. *Drosophila*. I. Título.

CDU: 595.773.4

## AGRADECIMENTOS

Se cheguei até aqui foi porque acreditaram na minha capacidade de ir além. Se tive forças para tal, é porque em minhas veias corre o sangue de dona Rosa Maria, Expedita Maria e Silas Floresta. Obrigada, vó Rosa, por ter enfrentado o mundo por conta própria, permitindo que chegássemos até aqui. Obrigada, Expedita, minha mãe, por me fornecer meios de continuar nesse caminho, por ter sido base sólida, por todos os conselhos, amor e zelo por nossa educação. E obrigada Silas, meu irmão, por ser espelho de quem eu quero ser quando crescer; já cresci e continuarei me espelhando em você em busca de ser alguém melhor. Vocês são minha força motriz. Espero que a senhora esteja orgulhosa de mim daí, vó, pois sinto seu amor por mim daqui. Eu amo muito vocês!

Na graduação aprendi muito sobre amizade e amor. Não me senti sozinha um segundo sequer durante esses anos porque tive a sorte de encontrar pessoas maravilhosas pelo caminho. Quero agradecer a Aminye, Camila, Carla Britto, Carla Moura, Grazi, Isaelly, Talita, Thaila e Roberta por TANTO. Vocês não têm ideia do quanto foram importantes para que eu concluísse essa jornada. Obrigada por cada conselho, conversa, estímulo e empurrão que me deram; vocês foram a ponte para que eu conseguisse acreditar no meu potencial. Toda conquista dedico a vocês.

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Dr. Lucas Anhezini e Prof. Dr. Jerusa Maria por toda paciência, insistência e aprendizados. Obrigada, Prof. Lucas, por ter aberto as portas do LAVITOX e ter confiado tanto no meu trabalho. Obrigada, Prof. Jerusa, por todos os ensinamentos e puxões de orelha. Vocês tiveram e continuarão tendo grande impacto no meu jeito de fazer ciência. Mais uma vez, obrigada.

Aos integrantes do LAVITOX, agradeço por toda troca, companhia e risadas. Não se faz ciência sozinho e somos a prova viva disso.

À minha amiga Sarah Lyris, que sempre confiou em mim e no meu potencial. Obrigada por sempre me impulsionar e não ter me deixado desistir. Te ter na minha vida é uma dádiva. Sigo buscando o melhor para nós duas. Te amo!

Ao meu amor, Vitória, por me olhar com olhos que engrandecem. Você ter acreditado tanto em mim me fez não desistir de buscar pelo melhor. Obrigada por ser fonte de apoio, descanso e força. Você foi parte fundamental aqui.

Às minhas amigas, Cau e Élida, por sempre acreditarem tanto na minha capacidade de conquistar o mundo. Ter pessoas incríveis como vocês ao meu lado me faz gigante. Obrigada por tanto.

Às agências de fomento da pesquisa, CNPq e FAPEAL, sem as quais eu não teria tido condições de fazer ciência.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação como cientista: meu muito obrigada. O apoio de vocês foi importante para realizar este trabalho.

## RESUMO

As nanopartículas de óxido de zinco possuem ampla faixa de absorção de radiação, alta fotoestabilidade e estabilidade química, sendo consideradas excelentes bactericidas. O óxido de zinco (ZnO) é um aditivo alimentar considerado seguro em baixas concentrações, no entanto a substância pura pode levar à citotoxicidade por meio da liberação de íons $Zn^{2+}$. A dopagem de nanopartículas (NPs) traz vantagens ao diminuir possíveis efeitos negativos, pois modificam a estrutura das NPs, com o intuito de melhorar seu desempenho. No presente estudo, a nanopartícula de óxido de zinco foi dopada com o metal de transição cobre. Assim, objetivou-se investigar a biocompatibilidade das NPs de ZnO dopadas com 0,4% de cobre, utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo *in vivo*. Os animais foram expostos às concentrações finais de 0,00 a 2,00 mg/mL de NPs de ZnO puras ou dopadas com 0,4% de cobre. Os índices de mortalidade, citotoxicidade e longevidade foram avaliados após a exposição dos animais às substâncias via oral. Foi observado que moscas expostas ao ZnO puro sofreram com alto índice de morte larval, baixo número de pupas formadas e animais que chegaram até a fase adulta, completando o ciclo de desenvolvimento. Tais impactos negativos foram significativamente diminuídos com a dopagem das NPs com o cobre. Portanto, a presença de cobre nas amostras de NPs de ZnO contribuiu significativamente para a melhora da biocompatibilidade dessas NPs, aumentando o índice de sobrevivência dos animais e diminuindo a citotoxicidade observada. Os dados obtidos no presente trabalho contribuirão para a compreensão do perfil toxicológico das NPs de óxido de zinco, e também poderão fundamentar estudos posteriores relacionados à toxicidade das substâncias aqui testadas.



**Palavras-chave:** nanotoxicidade, mosca-da-fruta, biocompatível, *Drosophila.*

**ABSTRACT**

Zinc oxide nanoparticles have a wide range of radiation absorption, high photostability and chemical stability, being considered excellent bactericides. Zinc oxide (ZnO) is a food additive considered safe in low concentrations, however the pure substance can lead to cytotoxicity through the release of $Zn^{2+}$ ions. The doping of nanoparticles (NPs) brings advantages by reducing possible negative effects as they modify the structure of NPs, in order to improve their performance. In the present study, the zinc oxide nanoparticle was doped with the copper transition metal. Thus, the aim was to investigate the biocompatibility of ZnO NPs doped with 0.4% copper, using *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model. The animals were exposed to final concentrations of 0.00 to 2.00 mg/mL of pure ZnO NPs or doped with 0.4% copper. Mortality, cytotoxicity and longevity rates were evaluated after exposing the animals to substances orally. It was observed that flies exposed to pure ZnO suffered from a high rate of larval death, a low number of formed pupae and animals that reached the adult stage, completing the development cycle. Such negative impacts were significantly reduced with the doping of NPs with copper. Therefore, the presence of copper in the samples of ZnO NPs contributed significantly to the improvement of the biocompatibility of these NPs, increasing the survival rate of the animals and decreasing the observed cytotoxicity. The data obtained in the present work will contribute to the understanding of the toxicological profile of zinc oxide NPs, and may also support further studies related to the toxicity of the substances tested here.

**Keywords:** nanotoxicity, fruit fly, biocompatible, *Drosophila*.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação esquemática da internalização celular das nanopartículas através de mecanismos de endocitose. 14
**Figura 2.** Principais vias de toxicidade das nanopartículas. 15
**Figura 3.** Homologia organizacional da *Drosophila melanogaster* e seres humanos. 17
**Figura 4.** Caracterização das NPs de ZnO puras e após dopagem com o cobre. 23
**Figura 5.** Taxas de pupas formadas por dia por animais expostos às NPs de ZnO puro. 25
**Figura 6.** Comparação dos impactos causados pelas NPs de óxido de zinco puro ou dopado com 0,4% em animais em desenvolvimento no meio contendo as substâncias. 27
**Figura 7.** Avaliação do tempo total de vida (lifespan) de animais tratados com as NPs em relação ao grupo controle. 28
**Figura 8.** Avaliação da citotoxicidade das NPs de ZnO puro utilizando o método de exclusão do corante azul de tripano. 29
**Figura 9.** Porcentagem de intestinos corados após teste de citotoxicidade em animais expostos a NPs de ZnO com 0,4% de cobre. 31

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância Unidirecional

ANPs – Nanopartículas antropogênicas

AT – Azul de Tripano

COVID-19 - Doença do coronavírus

Cu – Cobre

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FDA – Food and Drug Administration

IMZ – Imazetapir

LAVITOX – Laboratório de Análise *in vivo* da Toxicidade

NPs – Nanopartículas

PBS (*phosphate buffered saline*) – Tampão fosfato salino

pH – Potencial hidrogeniônico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

$TiO_2$ – Dióxido de titânio

UV – Ultravioleta

ZnO – Óxido de zinco

**SUMÁRIO**


1. INTRODUÇÃO 10
2. REVISÃO DA LITERATURA 12
   2.1 Nanopartículas: história, aplicabilidades e impactos 12
   2.2 Nanotoxicologia 13
   2.3 Nanopartículas de óxido de zinco dopadas com cobre 16
   2.4 *Drosophila melanogaster* 17
3. HIPÓTESE 19
4. OBJETIVOS 19
   4.1 Objetivo geral 19
   4.2 Objetivos específicos 19
5. MATERIAL E MÉTODOS 20
   5.1 Síntese e caracterização das nanopartículas 20
   5.2 Acondicionamento dos animais 20
   5.3 Exposição às nanopartículas 20
   5.4 Avaliação dos impactos sobre o ciclo de vida da *Drosophila* 21
   5.5 *Lifespan* 21
   5.6 Ensaio de toxicidade 22
   5.7 Análises estatísticas 22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 23
   6.1 Caracterização das nanopartículas 23
   6.2 Avaliação dos impactos sobre o ciclo de vida da *Drosophila* 24
   6.3 Análise dos níveis de citotoxicidade 29
7. CONCLUSÃO 33
8. REFERÊNCIAS 34

# 1. INTRODUÇÃO

Quando uma partícula é reduzida à escala nanométrica <100 nanômetros, uma partícula pode adquirir propriedades não existentes na partícula de tamanho normal. O tamanho em nanoescala aumenta a razão superfície/volume das nanopartículas (NPs), tornando-as mais reativas, já que haverá um número maior de átomos expostos em sua superfície (ESLAHIAN et al., 2014). Essa característica também permite o ajuste químico das nanopartículas, tornando-as mais termicamente e quimicamente estáveis (SILVA et al., 2021). Desse modo, a nanotecnologia é uma área em constante expansão, pois o uso das NPs pode ser incorporado a diversos setores, potencializando a qualidade de materiais e produtos. Na indústria biomédica, as NPs atuam como biocarreadores de medicamentos e em terapias menos invasivas contra o câncer, por exemplo (AWASTHI et al., 2018; HASSANIEN; HUSEIN; AL-HAKKANI, 2018; MAHATO, K. et al., 2019).

As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) possuem ampla faixa de absorção de radiação, altas fotoestabilidade e estabilidade química, sendo consideradas excelentes bactericidas. O ZnO é um aditivo alimentar considerado seguro em baixas concentrações pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (ESPITIA et al., 2012) e também é utilizado em embalagens alimentícias para evitar a proliferação de biofilmes (MAHAMUNI-BADIGER et al., 2020). Graças às propriedades supracitadas, as nanopartículas de óxido de zinco são amplamente utilizadas na indústria biomédica na composição de protetores solares e cremes (RADZIMSKA; JESIONOWSKI, 2014). Para além disso, já foi constatado seu uso no tratamento de águas residuais, complementado com desinfecção por UV (ELMI et al., 2014).

O método de dopagem de nanopartículas consiste em inserir outras substâncias em sua rede cristalina com o intuito de melhorar seu desempenho (BHATTACHARYA; NEOGI, 2019). No presente trabalho, a nanopartícula de óxido de zinco foi dopada com o metal de transição cobre. Estudos apontam que a dopagem com o cobre potencializou a atividade fotocatalítica das NPs de óxido de zinco (SINGHAL et al., 2012). Essa propriedade incrementada após a dopagem permitiu a aplicabilidade dessas nanopartículas em sensores de umidade, por exemplo, que são muito importantes na fabricação de alimentos e de produtos médicos e farmacêuticos (THIWAWONG; ONLAOR; TUNHOO, 2013).

Sabe-se que as principais rotas de exposição dos organismos vivos às nanopartículas são a ingestão, a inalação o ou contato direto com a pele. E que as nanopartículas, por terem sido estruturalmente modificadas, podem ser mais tóxicas que as partículas em tamanho

comum. Após sua eliminação, essas substâncias podem impactar o meio ambiente por meio do processo de lixiviação. Uma vez no solo, o pH (potencial hidrogeniônico) presente no ambiente pode degradar as nanopartículas de óxido de zinco, liberando íons de $Zn^{2+}$ (RAJPUT et al., 2018). Estudos apontam que a incorporação das NPs de ZnO pode se dar pela entrada de íons livres de $ZnO^{2+}$ na célula, sendo uma possível via de toxicidade (DENG et al., 2009). O estudo *in vitro* em células alveolares realizado por Mihai et al. (2015) constatou citotoxicidade causada pelo acúmulo de íons $Zn^{2+}$ nos endossomos e lisossomos. Danos aos lisossomos são apontados como a principal causa de perturbação da homeostase celular, o que leva à citoxicidade (CHO et al., 2011). Esses dados são extremamente significativos, pois uma das principais vias de exposição às nanopartículas é justamente a inalação.

Como animal modelo, a mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster* é bem estabelecida na área da nanotoxicologia em virtude das suas características promissoras. A *Drosophila* possui um ciclo de vida curto e com fases bem marcadas, o que possibilita a realização de um maior número de experimentos em um curto espaço de tempo. Adicionalmente, é possível acompanhar o efeito de substâncias em todos os estágios de vida do animal, com a possibilidade de assistir mais de uma geração. Apesar de ser um animal com a organização corporal bem simples, há homologia com o sistema organizacional do corpo humano. Cerca de 70% dos genes relacionados a doenças humanas permanecem conservados em *Drosophila*, tornando o animal uma excelente ferramenta para o estudo de diversos tipos de patologias, o que pode contribuir significativamente com o progresso científico e beneficiar diretamente a sociedade (ONG et al., 2015). O emprego da *Drosophila* como ferramenta do estudo de NPs possibilita a obtenção de resultados em um tempo reduzido, o que facilita o entendimento da toxicidade e viabiliza a disponibilidade de trabalhos sobre essas substâncias emergentes, favorecendo a elaboração de usos seguros dessas substâncias nas indústrias médicas e alimentícias, por exemplo.

# 2. REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 Nanopartículas: história, aplicabilidades e impactos

O conceito de manipular a matéria em nível atômico e molecular, atrelado à nanotecnologia, foi introduzido no ano de 1959 pelo ganhador do Prêmio Nobel Richard Feynman (BAYDA et al., 2020). Apesar de ser um conceito moderno, o uso dessa tecnologia é datado do século 17 em vitrais que são, hoje, mundialmente famosos. Artesãos da época atingiam o efeito colorístico característico desses vitrais graças à presença recém-descoberta de nanopartículas de ouro e prata na composição dos vidros, que refletiam as cores observadas (CHAN, 2008).

As nanopartículas podem ocorrer de forma natural no meio ambiente e são geradas a partir de processos físicos, químicos ou biológicos. Por meio da foto-oxidação ou da fragmentação física, por exemplo, as NPs participam do ciclo biogeoquímico da Terra. Nas grandes cidades, a combustão do combustível está diretamente associada à liberação de NPs na atmosfera (EVELYN; MANNICK; SERMON, 2003). No meio ambiente, as NPs que ocorrem naturalmente podem vir a coexistir com NPs sintetizadas artificialmente, classificadas por Lespes, Faucher e Slaveykova (2020) como “nanopartículas antropogênicas” (ANPs). As ANPs são nanopartículas sintetizadas a partir de processos que envolvam a atividade humana e podem ser geradas propositalmente para um uso específico ou de forma desproposital, com a geração de lixo e resíduos (LESPES; FAUCHER; SLAVEYKOVA, 2020).

A nanociência estuda estruturas e moléculas que possuem entre 1 e 100 nanômetros – o equivalente a um bilionésimo do metro. O tamanho em nanoescala permite compreender as características físicas e químicas em uma escala menor, explorando novas e promissoras propriedades (YATTINAHALLI; KAPATKAR; MATHAD, 2016) que são aproveitadas pela nanotecnologia com o processamento, a síntese e a aplicação dos nanomateriais. Assim, as NPs são caracterizadas como substâncias particuladas que possuem ao menos uma de suas dimensões menores que 100 nanômetros. Graças ao tamanho em nanoescala, as NPs possuem uma maior área de superfície. Desse modo, há um maior número de átomos expostos, tornando-as mais reativas (NEL et al., 2006). Além disso, essas substâncias apresentam melhores propriedades térmicas, mecânicas e de resistência quando comparadas a substâncias em tamanho natural (KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

Embalagens alimentícias já contam com os benefícios da incorporação de NPs em sua composição. A presença das NPs garante o prolongamento da vida útil dos alimentos, pois proporcionam excelente atividade antibacteriana e antifúngica (MUÑOZ-HERNÁNDEZ et al., 2018). Para além da conservação de alimentos, as NPs são cada vez mais utilizadas para aprimorar o tratamento de diversas doenças, além de garantir um rápido diagnóstico por meio de direcionamento para células específicas (MITCHELL et al., 2021). Em relação aos tratamentos quimioterápicos convencionais, as NPs possuem melhor biodistribuição, especificidade – atuam apenas e diretamente nas células cancerígenas – e permitem contornar a resistência medicamentosa, já que se acumulam nas células sem ser reconhecidas pelos principais mediadores de resistência a medicamentos (CHO et al., 2008).

## 2.2 Nanotoxicologia

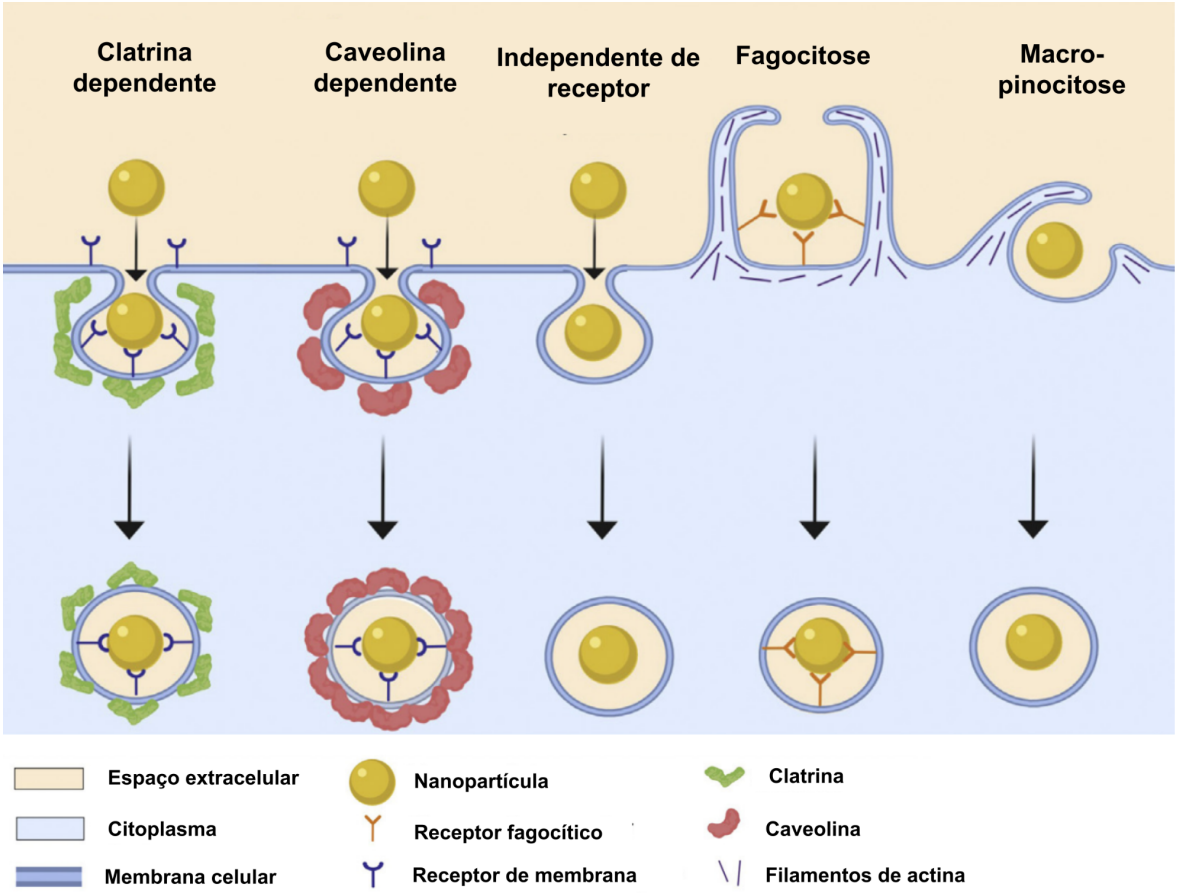
É inerente à nanociência a preocupação com a toxicidade das NPs, pois as propriedades que impulsionam seu uso são as mesmas que podem vir a prejudicar organismos vivos e o meio ambiente. O tamanho em nanoescala, a facilidade em transferir elétrons e o aumento da biodisponibilidade são propriedades de alto interesse na nanomedicina; porém, a facilidade de penetração das NPs em células vivas pode estar associada com altos níveis de toxicidade (MARANO et al., 2016).

Os impactos toxicológicos das NPs estão relacionados às suas características físico-químicas e a suas interações com os organismos vivos ou o meio no qual a substância está depositada. Em ambiente aquático – provavelmente o destino final do descarte de NPs (DAUGHTON, 2004) –, a soma das características de determinada NP com fatores ambientais como pH, temperatura e outros compostos dispersos no meio pode influenciar em menor ou maior escala a toxicidade da substância (WALTERS; POOL; SOMERSET, 2016). O pH, por exemplo, afeta diretamente as cargas superficiais das NPs, influenciando no seu nível de agregação (GILBERT; LU; KIM, 2007). Os organismos vivos ali presentes podem internalizar as NPs através de absorção direta ou através de epitélios respiratórios, como é o caso das brânquias.

A importância do estudo da toxicidade dessas substâncias se deve ao fato de, por serem relativamente novas, existirem poucos materiais disponíveis (OSTROWSKI et al., 2009). Em consequência, apesar de alguns organismos vivos já possuírem um sistema de defesa contra compostos orgânicos (xenobióticos) ou produtos de origem de combustão

natural (cinzas vulcânicas), os mesmos não desenvolveram nenhum sistema capaz de inibir diretamente a toxicidade das NPs. As NPs entram nas células através de processos de endocitose e podem partir para a circulação sistêmica, impactando todo o organismo (Figura 1). Em peixes, o órgão-alvo das NPs é o fígado, de onde as substâncias partem para as células hepáticas. A partir desse ponto, as NPs podem impactar negativamente a cadeia trófica, chegando a atingir a saúde humana (MOORE, 2006).

**Figura 1.** Representação esquemática da internalização celular das nanopartículas através de mecanismos de endocitose.




Os mecanismos de endocitose por meio dos quais as NPs podem entrar na célula são variados e interdependentes. Cada mecanismo é controlado através de moléculas específicas (lípidios, proteínas de transporte etc.). Adaptado de Donahue, Acar e Wilhelm (2019).

A inalação é a rota mais comum de exposição dos organismos vivos às NPs. Quando inaladas, a primeira barreira que encontram é a nasofaríngea – os cílios presentes na narina garantem o aprisionamento das NPs. Caso não haja a total contenção e as NPs acabem no pulmão, será papel dos macrófagos alveolares controlar o agente prejudicial. Qualquer

comprometimento das vias de defesa pode levar a doenças pulmonares sérias como bronquite crônica, enfisema pulmonar e câncer (NEL et al., 2006).

Outras vias de exposição são a absorção dérmica, a ingestão e a injeção, relacionadas com o uso mais recente das nanopartículas (Figura 2). Em relação à via oral, já é possível encontrar as substâncias na fabricação de alimentos, atuando como aditivos alimentares ou na fabricação de embalagens que aumentem a vida útil dos alimentos. A via intravenosa está relacionada com o avanço científico percebido no uso das NPs na fabricação de vacinas, inclusive contra o COVID-19 (GUERRINI et al., 2022). A exposição dérmica envolve o contato direto da pele com as NPs, já que as mesmas estão presentes nos ingredientes de cremes e protetores solares, por exemplo (RAMOS et al., 2017).

**Figura 2.** Principais vias de toxicidade das nanopartículas.

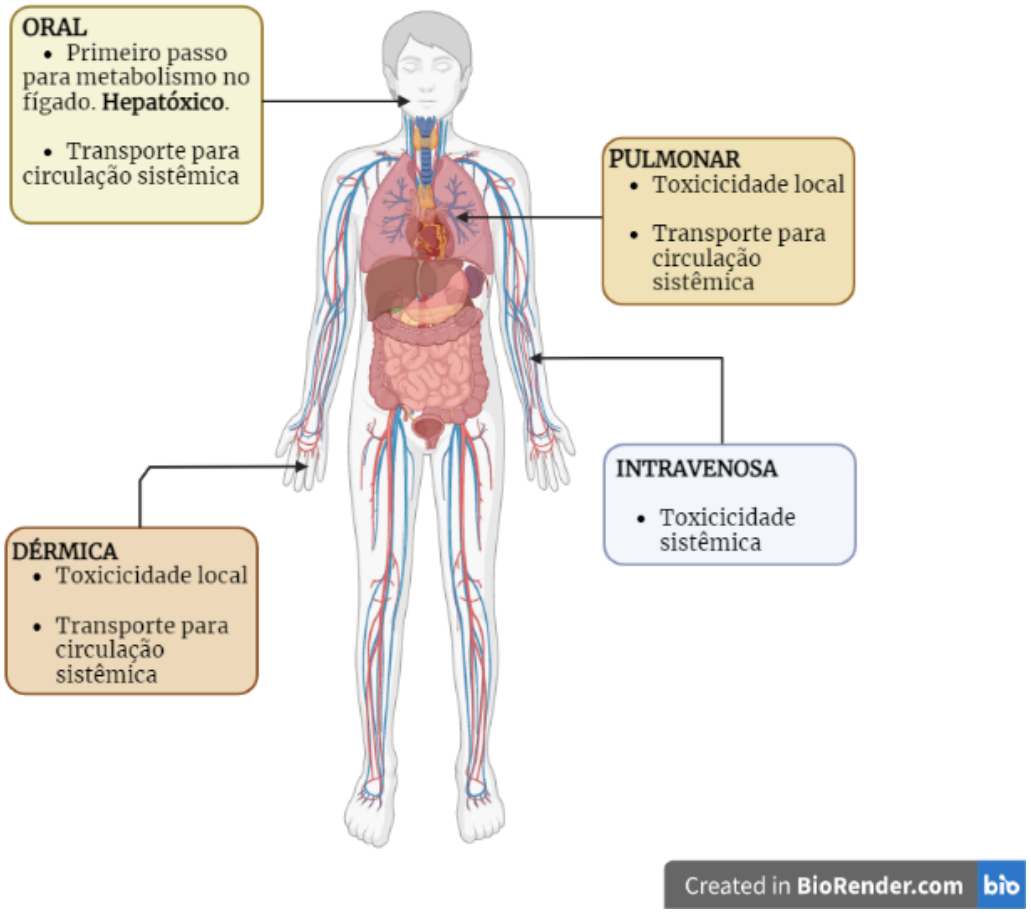



Figura representativa das principais vias de exposição das nanopartículas em seres humanos e as rotas de toxicidade das substâncias uma vez alojadas no organismo. Adaptado de Yildirimer et al. (2011).

## 2.3 Nanopartículas de óxido de zinco dopadas com cobre

Para incrementar propriedades já existentes ou trazer melhorias às NPs, é utilizado o método de dopagem. Por meio desse método, são incorporados outros compostos na rede cristalina das NPs, ocasionando mudanças nas suas configurações eletrônicas, físicas e químicas (SIRELKHATIM et al., 2015). Nesse cenário, a estabilidade química das NPs de ZnO em meio aquoso foi significativamente melhorada por meio da dopagem com o metal de transição ferro (GEORGE et al., 2010).

Os íons de cobre e zinco desempenham papéis essenciais na homeostase celular. Esses íons são elementos-chave para diversas enzimas, pois atuam na ativação, potencialização e na estrutura enzimática. A presença de cobre e sua homeostase está diretamente relacionada aos mecanismos de neurotransmissão. Ambos estão envolvidos na homeostase redox, então é necessário garantir o equilíbrio entre aquisição, distribuição e uso desses íons para evitar o distúrbio da homeostase celular (NAVARRO; SCHNEUWLY, 2017).

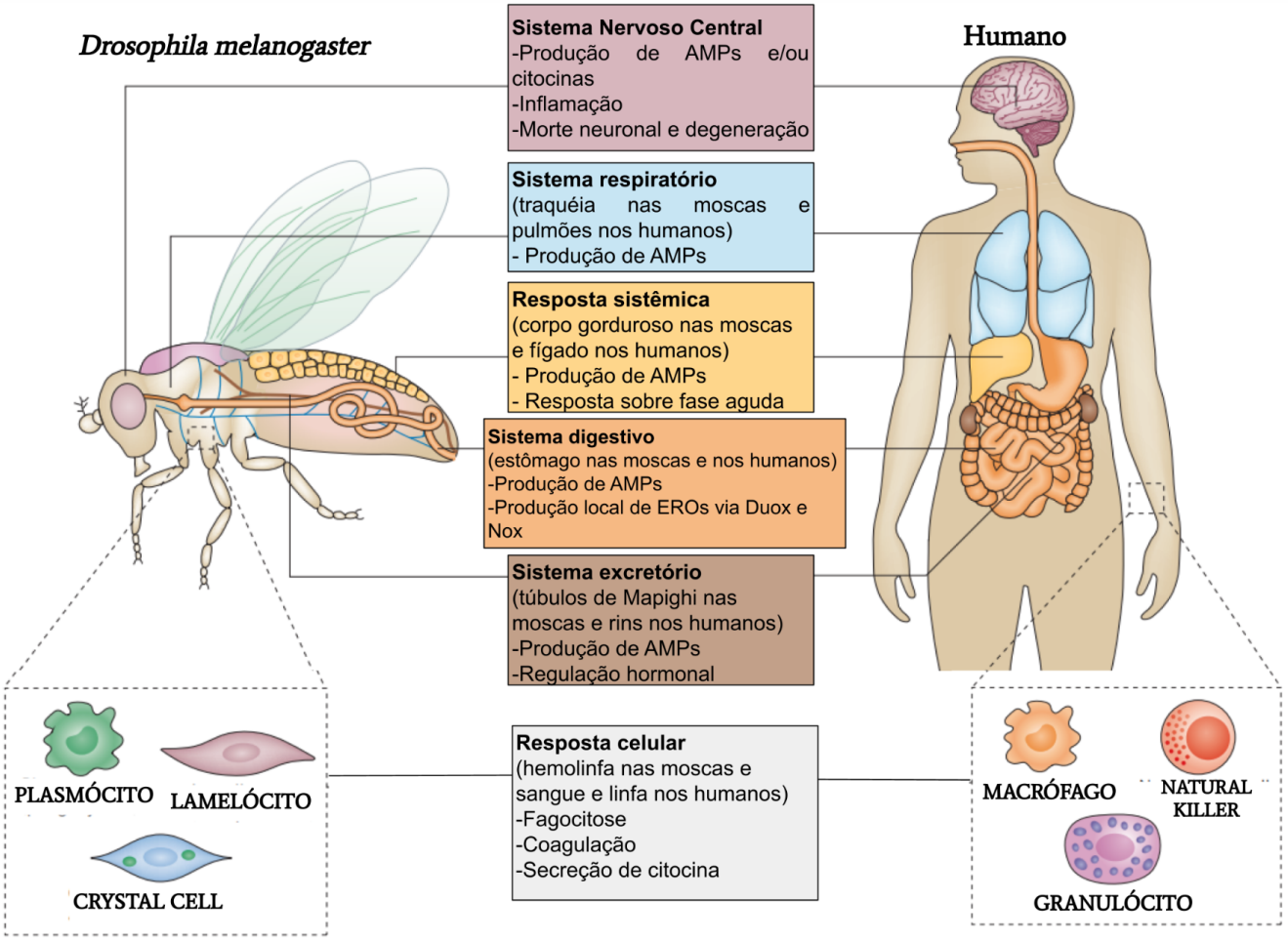
Além de participarem de processos metabólicos vitais para todos os organismos vivos (HARISHCHANDRA et al., 2020; MIRZAEI; DARROUDI, 2017), o óxido de zinco e o cobre, quando em nanoescala, possuem grande atividade bactericida. Um dos mecanismos sugeridos, envolvidos na atividade bactericida observada, é a capacidade de ambas as substâncias produzirem espécies reativas de oxigênio (EROs). As NPs liberam íons metálicos que levam ao acúmulo de agentes oxidantes, e esse acúmulo danifica as estruturas internas das bactérias (TANG; ZHENG, 2018; BHAGAT et al., 2021; SIRELKHATIM et al., 2015), eliminando-as. A dopagem de NPs de ZnO com cobre aumentou a atividade antibacteriana do ZnO, contribuindo positivamente para o tratamento de doenças causadas por bactérias multirresistentes (HASSAN et al., 2017).

A abordagem promissora da dopagem das NPs de ZnO com cobre no tratamento contra o câncer elucida novas vias para o tratamento da doença. O grupo de pesquisa de Li et al. (2019) realizou diversos trabalhos envolvendo o uso de NPs e o tratamento contra o câncer. Além de inibirem a proliferação de células cancerígenas pela geração de ROS, a dopagem de NPs de ZnO com cobre garantiu a diminuição do câncer pancreático por meio da indução de autofagia celular, *in vivo* e *in vitro*.

## 2.4 *Drosophila melanogaster*

Estudos de toxicidade visam compreender os perfis toxicológicos de substâncias para garantir o uso seguro das mesmas e podem ser realizados por meio de análises *in vitro* e *in vivo*. As análises *in vitro* consistem em compreender os impactos da substância em nível celular investigando, por exemplo, viabilidade celular – medindo a morte celular provocada pela substância – e danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA). Já os estudos *in vivo* são realizados em organismos modelo, onde se busca compreender os impactos que a substância pode ter sobre processos fisiológicos ou comportamentais de organismos vivos (FISCHER; CHAN, 2007). Assim, a seleção do organismo modelo a ser utilizado nos testes toxicológicos *in vivo* vai depender do objetivo central do estudo.

**Figura 3.** Homologia organizacional da *Drosophila melanogaster* e seres humanos.




Representação da organização corporal da *Drosophila melanogaster* e similaridade organizacional e funcional com os seres humanos, o que impulsiona o uso da mosca para estudos *in vivo* na área da nanotoxicidade. Adaptado de Buchon, Silverman e Cherry (2014).

A escolha da *Drosophila melanogaster* se deve principalmente ao fato de a mosca ser um modelo já bem estabelecido na área da nanotoxicologia em virtude de suas características biológicas. O ciclo de vida normal da *Drosophila* totaliza 10 dias e possui 4 estágios de desenvolvimento bem marcados: ovo, 3 estágios larvais (L1, L2 e L3), pupa e adulto (JENNINGS, 2011). O reduzido ciclo de vida da mosca permite que em um curto espaço de tempo sejam feitas diferentes análises. Além do mais, é possível acompanhar os efeitos das substâncias testadas em todos os estágios de vida do animal. A organização corporal da *Drosophila* é relativamente simples em comparação aos vertebrados, porém o animal oferece sistemas fisiologicamente relevantes, muito semelhantes aos dos seres humanos (Figura 3).

Com as ferramentas oferecidas por esse organismo modelo, é possível prever como a toxicidade das NPs afetaria organismos não alvo – abelhas, animais marinhos, plantas – e também indivíduos que façam uso diário de produtos contendo as substâncias, como é o caso dos seres humanos. Como exemplo, podemos destacar um estudo sobre o impacto de nanopartículas de dióxido de titânio ($TiO_2$) adicionadas a um corante alimentar muito presente em doces. Foi observado que as moscas expostas às doses diárias consumidas por seres humanos apresentaram baixa fecundidade, e a interferência negativa do corante foi observada em mais de uma geração (JOVANOVIĆ et al., 2018).

## 3. HIPÓTESE

A dopagem das NPs de ZnO puro com cobre melhora a biocompatibilidade dessas NPs, diminuindo a toxicidade observada.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Investigar a toxicidade *in vivo* de nanocristais de óxido de zinco dopados com cobre, utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo animal.

### 4.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos das nanopartículas sobre o ciclo de vida da *Drosophila;*
- Avaliar, por meio de ensaios *in vivo*, a biocompatibilidade da dopagem dos nanocristais de óxido de zinco com o metal de transição cobre;
- Avaliar a citotoxicidade causada pelos nanocristais de óxido de zinco puro e dopados com cobre.

# 5. MATERIAL E MÉTODOS

## 5.1 Síntese e caracterização das nanopartículas

Os nanocompósitos foram sintetizados e caracterizados pela Profa. Dra. Anielle Christine no Laboratório de Novos Materiais Nanoestruturados e Funcionais (LNMNF), localizado no Instituto de Física (IF), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). O método de síntese utilizado foi o de coprecipitação, o qual possui o número de patente BR1020180077.

A caracterização das propriedades estruturais e ópticas dos NCs foram investigadas pelas técnicas de difração de Raios-X (DRX). As medidas de DRX foram realizadas no Laboratório de Multiusuário do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas.

## 5.2 Acondicionamento dos animais

Os animais utilizados para os fins deste estudo eram oriundos do biotério do Laboratório de Análise *in vivo* da Toxicidade (LAVITOX), localizado no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas. As moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, da linhagem *Canton S*, permaneciam armazenadas em garrafas plásticas contendo aproximadamente 25 mL de meio padrão da *Drosophila* (fubá, açúcares, levedo de cerveja e antifúngicos) sob uma temperatura de 25 ºC.

## 5.3 Exposição às nanopartículas

Para as análises realizadas, o método de exposição selecionado foi o via oral. Foram feitas soluções estoque na concentração de 33 mg/mL de nanopartículas de óxido de zinco puro ou dopado com 0,4% de cobre. Cada solução foi sonicada por trinta minutos para melhor dissolução da substância. Posteriormente, foi adicionado ao meio de cultura padrão da *Drosphila* o volume correspondente às concentrações finais: 0,00; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg/mL em 4,0 mL de meio padrão. Larvas de primeiro estágio de desenvolvimento (L1) ficaram expostas à comida contendo a substância pelo tempo estabelecido em cada experimento.

### 5.4 Avaliação dos impactos sobre o ciclo de vida da *Drosophila*

Os impactos das NPs sobre o ciclo de desenvolvimento foram avaliados inserindo larvas L1 (N = 35/replicata) em frascos de vidro (vials) contendo volume final de 4 mL de meio padrão acrescidos da quantidade de substância correspondente às concentrações supracitadas. Foram realizadas 6 replicatas por concentração de cada grupo testado (grupo controle, NPs de ZnO puro e NPs de ZnO dopadas com 0,4% de cobre). A avaliação consistiu em acompanhar diariamente o desenvolvimento dos animais em meio contendo as NPs, comparando-o com o grupo controle, que se desenvolveu apenas em meio padrão.

Passados cinco dias de experimento, as primeiras pupas do grupo controle começaram a surgir; com isso, passou-se a contabilizar quantas pupas eram formadas por dia em todos os tratamentos e no grupo controle. O mesmo acompanhamento foi feito com os animais adultos após eclosão, separando-os em machos ou fêmeas, de acordo com o tratamento analisado. Esses mesmos animais foram utilizados no ensaio de *lifespan*, onde foi avaliado se as NPs teriam algum impacto sobre o tempo total de vida da *Drosophila*.

### 5.5 *Lifespan*

O experimento de *lifespan* tem por objetivo verificar se a substância de estudo terá algum impacto sobre a longevidade dos animais. O tempo total de vida da *Drosophila*, em condições normais, é de uma média de cinquenta dias (LINFORD et al., 2013). Assim, pretende-se comparar animais desenvolvidos em meio contendo as substâncias com o grupo controle, desenvolvido apenas em meio padrão.

Para realizá-lo, os animais emergentes no experimento do item 4.4 são separados por sexo, de acordo com a concentração e tipo de substância (dopada ou pura) ou grupo controle. Esses animais são transferidos para vials contendo 4 mL de meio padrão. É feita uma troca de vial a cada três dias, para evitar o crescimento de fungos na comida. A cada troca são contabilizados os indivíduos mortos, atribuindo “1” para quando houver morte e “0” para quando não houver.

## 5.6 Ensaio de toxicidade

Sendo a via oral escolhida como via de exposição às NPs, optou-se por um ensaio onde fosse possível medir a toxicidade das substâncias após a ingestão. O corante comercial azul de tripano (AT) possui seletividade por células que sofreram algum dano na membrana. No método de exclusão do corante utilizando AT, o órgão-alvo é o intestino, tecido que entra em contato direto com as NPs por causa da via de exposição escolhida. Assim, em células que sofreram algum dano pela ingestão de NPs, a membrana torna-se permeável ao corante.

Para a análise, larvas L1 (N=20) foram expostas as NPs em frascos de vidro contendo 4 mL de meio padrão acrescido da quantidade de substância correspondente às concentrações em estudo. Os animais do grupo de controle positivo foram expostos ao herbicida Imazetapir (IMZ) na concentração comercial de 10 mg/mL, pois a citotoxicidade do herbicida foi comprovada em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa. O grupo controle permaneceu em desenvolvimento apenas em meio padrão.

As larvas ficaram expostas por três dias e, no quarto dia, o ensaio de exclusão foi realizado. A exposição foi feita inserindo cinco larvas/concentração em placa de Petri preparada com agarose 0,8% contendo 10% de AT e 5% de sacarose, onde permaneceram por trinta minutos. Passado esse período, as larvas foram lavadas em PBS (*phosphate buffered saline*, sigla em inglês para tampão fosfato salino) 1X, colocadas em microtubos previamente identificados e foram anestesiadas durante cinco minutos em freezer. A análise foi feita em microscópio estereoscópio, onde foram tiradas fotos dos animais inteiros e também dos intestinos após dissecação. A porcentagem final/concentração de intestinos que apresentaram a coloração azul (positivo para morte/dano celular) indicou quão tóxica a concentração da substância se apresentou aos animais.

## 5.7 Análises estatísticas

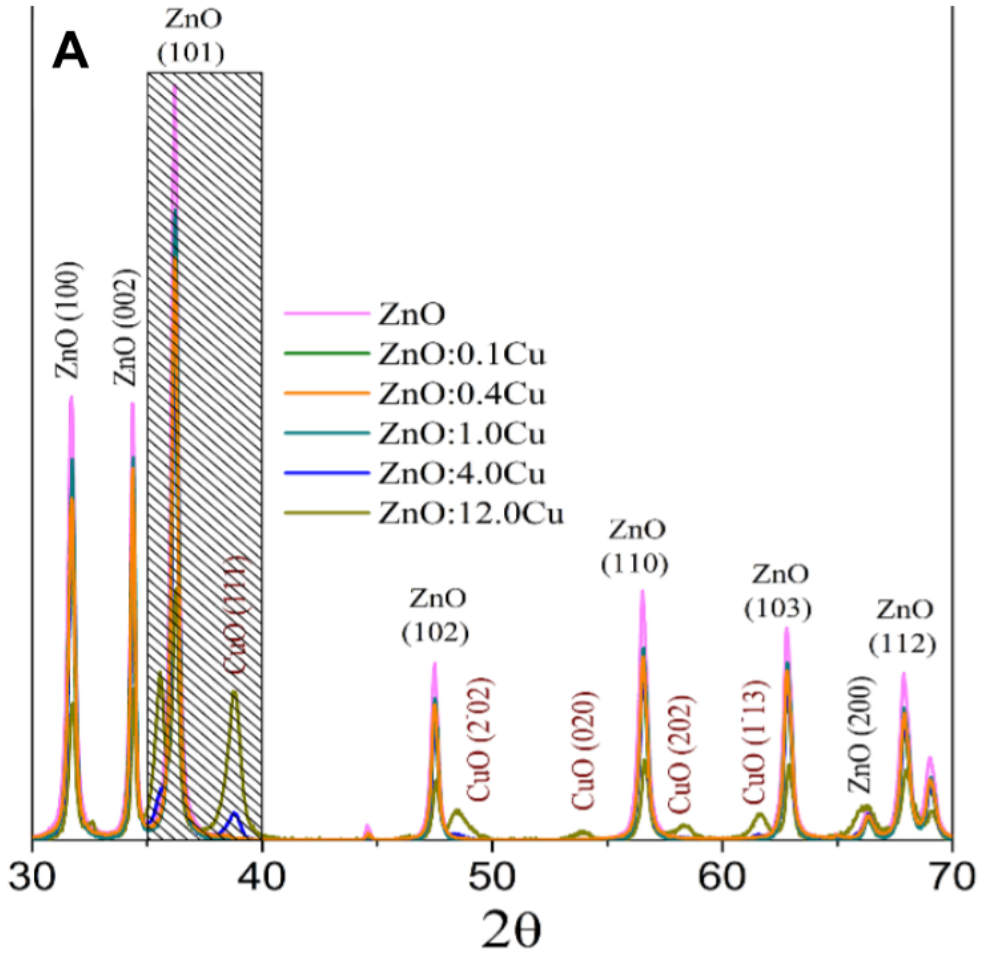
A análise de dados foi realizada usando o Graphpad Prism software (version 8.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A diferença entre os grupos testados foi abordada através de Análise de Variância Unidirecional (ANOVA), onde o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Para múltiplas comparações, foi utilizado o teste Bonferroni.

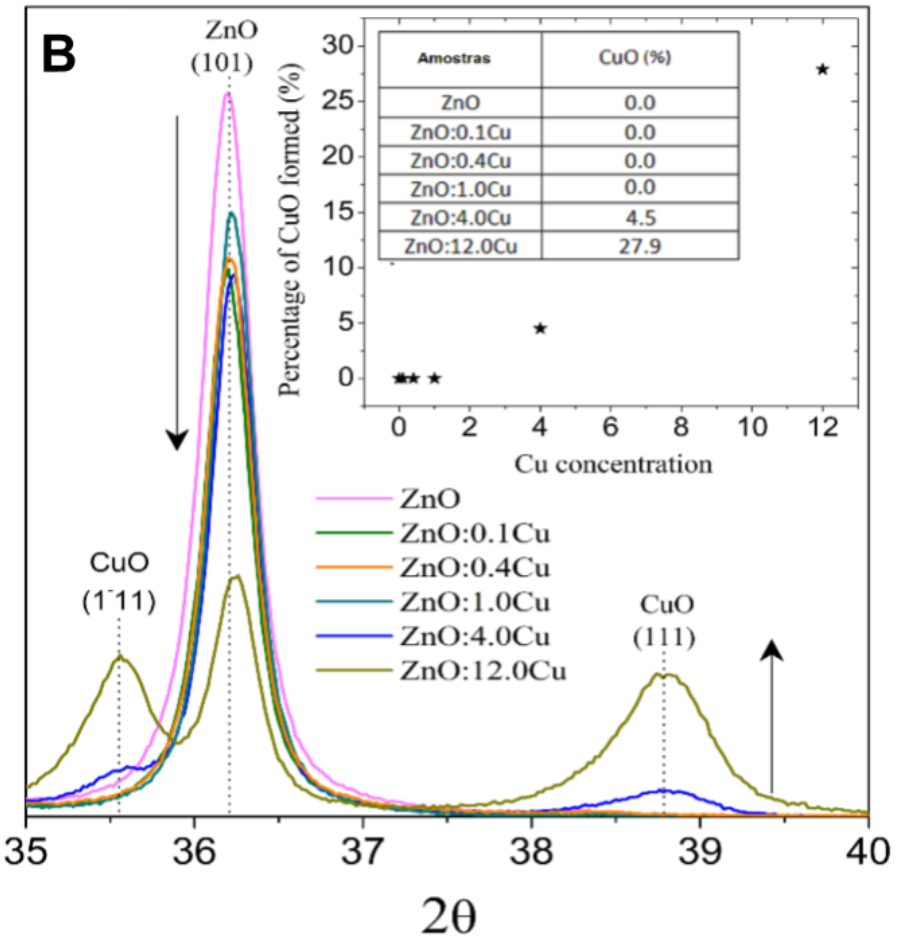
# 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 6.1 Caracterização das nanopartículas

Com a técnica de DRX são avaliadas as propriedades estruturais dos materiais (MOURDIKOUDIS, S.; PALLARES, R.; THANH, N., 2018). Após o material ser submetido ao processo de DRX, é gerado um difratograma contendo as características estruturais do material testado. Nos difratogramas obtidos, é possível identificar a formação de picos característicos de difração de ZnO com estrutura cristalina hexagonal (Figura 4 A).

**Figura 4.** Caracterização das NPs de ZnO puras e após dopagem com o cobre.






Caracterização dos nanocristais de óxido de zinco puros e dopados com íons de cobre. (A) e (B) Difratogramas de Raios-X dos nanocristais de óxido de zinco puros e dopados cobre, mostrando a formação de picos característicos de ZnO e a incorporação de íons de cobre na amostra.

Com o aumento da concentração de cobre, observa-se picos adicionais característicos a nanocristais de CuO formados. A porcentagem de fase de CuO foi calculada e é mostrada no inset da Figura 4 B, em que observa-se formação de nanocristais de CuO apenas para concentrações maiores que 4wt%. Os resultados obtidos confirmam a incorporação dos íons de cobre na amostra de ZnO.

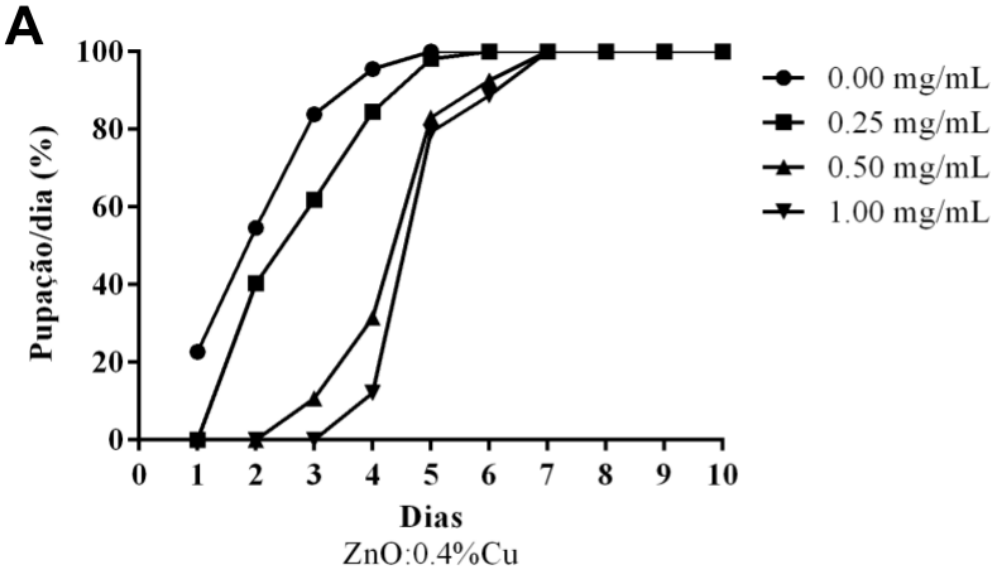
### 6.2 Avaliação dos impactos sobre o ciclo de vida da *Drosophila*

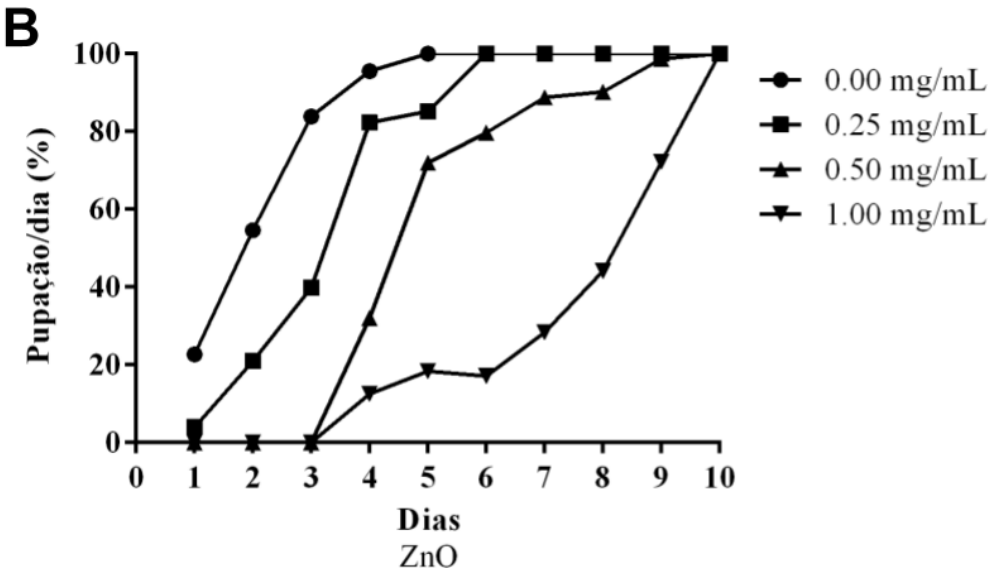
Foram observados impactos negativos sobre o ciclo de vida dos animais em ambas as substâncias, iniciando-se no estágio larval. Tanto nos animais expostos às NPs de ZnO puro quanto nas dopadas com cobre, foi observado atraso no desenvolvimento larval, onde as larvas levaram mais tempo para avançar no ciclo de desenvolvimento em comparação ao

grupo controle. Em relação a esse grupo, foi observado que as larvas levaram de um a três dias a mais para atingir o estágio pupal quando expostas a ZnO dopado e puro, respectivamente (Figura 5). O atraso no desenvolvimento de larvas expostas às NPs de óxido de zinco foi constatado por estudos anteriores, que apontaram que a toxicidade se comportou de maneira concentração-dependente (NG et al., 2017). Assim, quanto maior a concentração à qual os animais foram expostos, maior foi a quantidade de dias de atraso.

Durante a fase larval, os animais precisam consumir comida suficiente para armazenar energia para o estágio de pupa, um estágio inativo durante o qual os animais não se alimentam (AGUILA et al., 2007). O fato de os animais ingerirem mais comida nessa fase (SABAT et al., 2016) pode estar diretamente relacionado ao atraso observado, já que as larvas expostas às substâncias, nesse caso, consumiriam mais NPs. A maior ingestão de substâncias na fase larval foi observada no trabalho de Jovanović et al. (2018), onde as larvas apresentaram um acúmulo corporal de NPs de dióxido de titânio de 9-10X mais que nos adultos. Apesar de estar positivamente associado a processos metabólicos essenciais ao organismo, a dissolução do óxido de zinco em íons livres Zn+ está diretamente vinculada à toxicidade da substância (NG et al., 2017); o estudo *in vitro* em células alveolares realizado por Mihai et al. (2015) constatou citotoxicidade causada pelo acúmulo de íons $Zn^{2+}$ nos endossomos e lisossomos, levando ao estresse oxidativo. Danos aos lisossomos são apontados como a principal causa de perturbação da homeostase celular, o que leva à citoxicidade (KAO et al., 2012).

**Figura 5.** Taxas de pupas formadas por dia por animais expostos às NPs de ZnO puro.



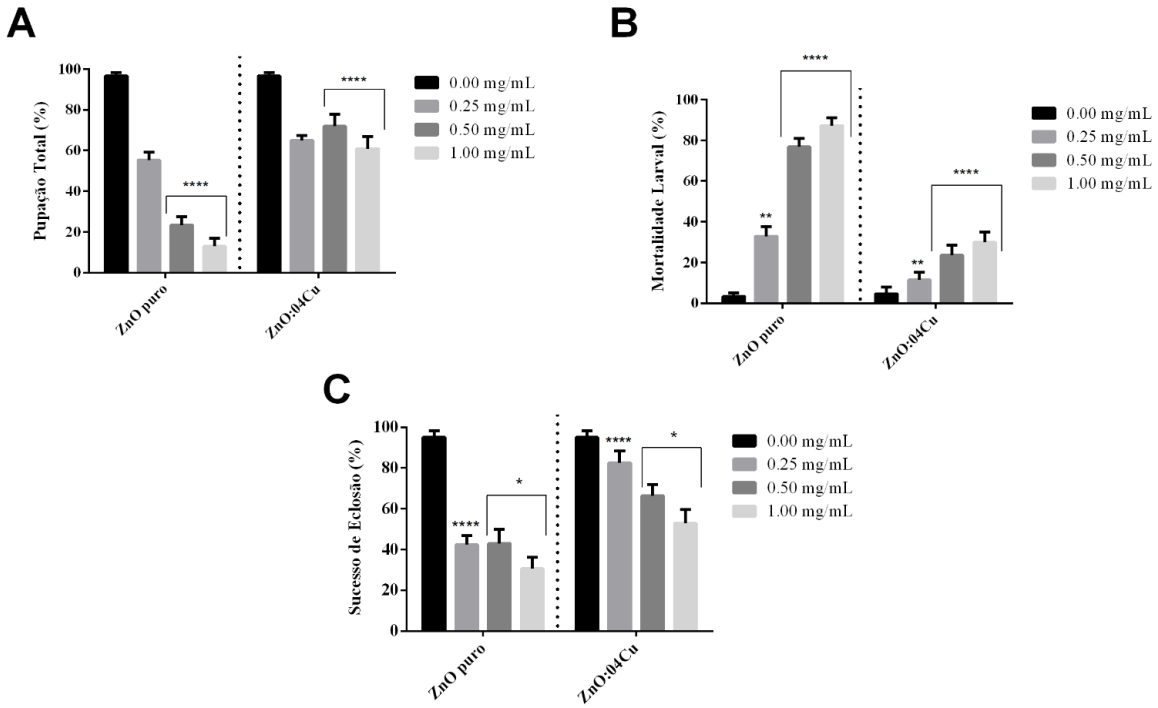



Número de pupas formadas por dia em animais expostos às NPs de ZnO (A) dopado com 0,4% de cobre e (B) puro, em relação ao grupo controle. A taxa de pupas formadas foi calculada com base no número total de pupas contabilizadas ao final do experimento em cada repetição. Os dados evidenciam a biocompatibilidade do cobre, pois a quantidade de pupas formadas por dia foi maior nos animais expostos à substância dopada do que aqueles expostos à substância pura (ANOVA, $p < 0,05$).

Tendo em vista o número de pupas formadas por dia, foi possível verificar que os animais tratados com as NPs de ZnO dopadas com o cobre (Figura 5 A) formaram mais pupas; tanto na concentração mais baixa quanto na mais alta, os indivíduos que consumiram a comida acrescida da substância pura formaram menos pupas por dia. Assim, mesmo com o atraso larval observado, os animais expostos à substância dopada tiveram melhores índices de sobrevivência.

Os animais que consumiram o meio acrescido das NPs ZnO:0.4Cu apresentaram maior formação de pupas (Figura 6 A), diminuição da mortalidade larval e maior número de indivíduos que eclodiram (Figura 6 C) e conseguiram concluir as fases de desenvolvimento. Na maior concentração testada, os animais do tratamento onde houve a dopagem atingiram até 50% de eclosão. Tal fato pode estar associado à hipótese apontada por Jovanović et al. (2018) de que os indivíduos adultos têm mais facilidade em eliminar as substâncias potencialmente tóxicas do organismo, diminuindo, assim, possíveis efeitos deletérios.

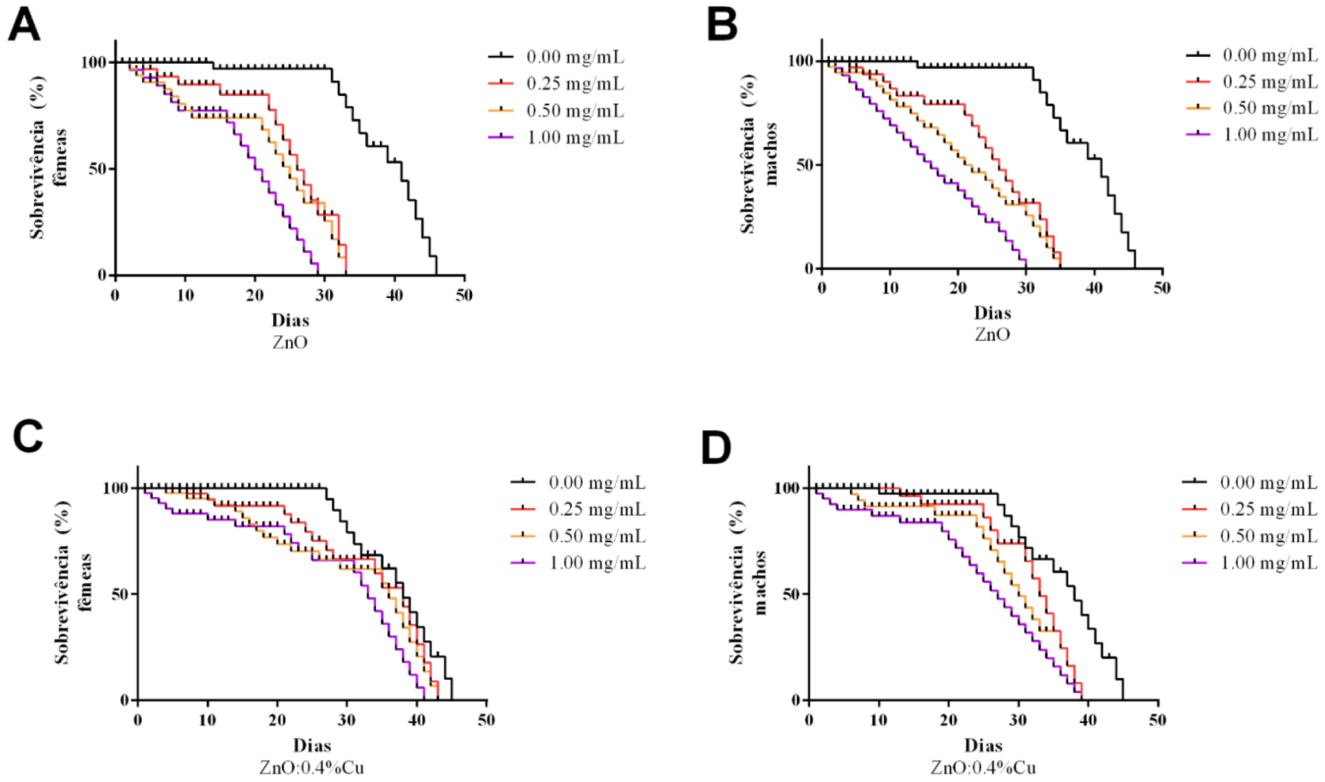
**Figura 6.** Comparação dos impactos causados pelas NPs de óxido de zinco puro ou dopado com 0,4% em animais em desenvolvimento no meio contendo as substâncias.




Índices totais de pupação, mortalidade larval e sucesso de eclosão de animais que se desenvolveram em meio contendo NPs de ZnO puro ou dopadas com 0,4% de cobre, em relação ao grupo controle, que consumiu apenas meio padrão. Após acompanhar o desenvolvimento dos animais, foi visto que o número de pupas totais formadas (A) foi maior nos animais que ingeriram a substância dopada com cobre. O reflexo do dado de pupação total é visto nos dados referentes à mortalidade larval registrada (B). Em relação ao número de animais que concluíram o ciclo de desenvolvimento e chegaram a fase adulta (C), mais uma vez a presença do cobre foi significativa para a melhora da biocompatibilidade da substância, uma vez que o número de indivíduos que eclodiram das pupas foi maior nos animais que ingeriram o meio contendo as NPs de óxido de zinco dopadas com 0,4% de cobre. **** e * indicam diferença estatística, $p < 0,05$, ANOVA e comparação de médias através de Bonferroni.

Para verificar os impactos das NPs a longo prazo, o *lifespan* dos animais expostos às NPs de ZnO puro e dopado com 0,4% de cobre foi realizado. Levando em conta que o tempo de vida em condições normais é de, em média, cinquenta dias (LINFORD et al., 2013), foi comparado o tempo de vida total dos animais tratados com o grupo controle, que só consumiu meio padrão. Os animais tratados com as NPs de ZnO puro apresentaram uma redução média de vinte dias na sobrevivência em comparação aos animais controle (Figura 7 A e B). Estudos indicaram que a exposição prolongada às NPs de ZnO podem levar a efeitos negativos; Anand et al. (2017) observaram que, após exposição às NPs de ZnO, os fenótipos aberrantes observados nas moscas adultas foram repassados para mais de uma geração.

**Figura 7.** Avaliação do tempo total de vida (*lifespan*) de animais tratados com as NPs em relação ao grupo controle.




*Lifespan* de animais após a exposição às NPs de ZnO puras (A e B) ou dopadas com cobre (C e D). Foi observada redução na expectativa de vida dos animais expostos à substância pura de, em média, 20 dias em relação ao grupo controle. O efeito negativo observado não foi identificado nos animais que foram expostos às NPs de ZnO dopadas com o cobre, evidenciando a capacidade da presença do cobre de melhorar a biocompatibilidade do ZnO puro. Teste log-rank, $p < 0,05$.

O efeito negativo das NPs de ZnO dopadas com o cobre sobre a longevidade dos animais foi reduzido (C e D), já que os animais não apresentaram uma redução tão drástica nos tempos de sobrevivência. O *lifespan* dos animais machos se comportou de maneira esperada, pois, como visto por Linford et al. (2013), o tempo de vida dos machos é mais reduzido em relação às fêmeas. Nesse sentido, a sobrevivência dos animais expostos às substâncias dopada com o cobre se mostrou de maneira semelhante à observada no grupo controle.

Ao acompanhar o desenvolvimento dos animais expostos às NPs de óxido de zinco puro e dopado com cobre foi possível observar que o consumo da substância dopada diminuiu de forma significativa os efeitos negativos observados, aumentando o índice de sobrevivência dos animais. Os dados obtidos refletem a importância da dopagem dos nanomateriais no

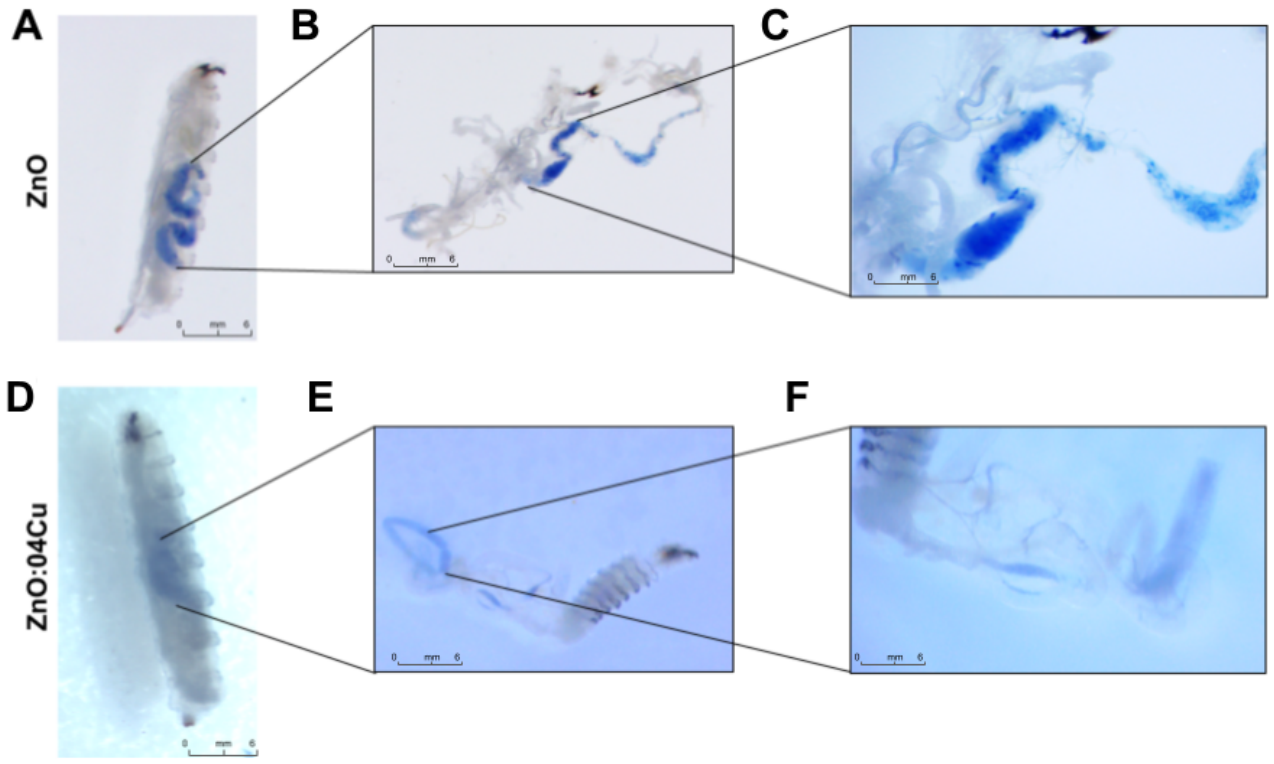
sentido de melhorar o uso dos mesmos, principalmente em relação à diminuição dos efeitos deletérios que as partículas viriam a ter na forma pura.

### 6.3 Análise dos níveis de citotoxicidade

Diante principalmente do tamanho em nanoescala, a entrada das NPs de ZnO nas células ocorre de forma facilitada. O pH do meio celular facilita a dissolução do ZnO em íons livres $Zn^{2+}$. A presença desses íons livres compromete a homeostase de zinco na célula, o que pode levar a danos celulares e até mesmo a morte celular (OSMOND; MCCALL, 2010).

Tendo em vista a presença das NPs de ZnO em produtos alimentícios e sendo a via oral uma importante via de exposição, ao realizar o ensaio com o corante azul de tripano foi possível identificar os danos celulares causados pela ingestão da substância. O AT tem seletividade por células que sofreram morte celular, corando essas células de azul; assim, após expor larvas às NPs de ZnO puro e ZnO dopadas com 0,4% de cobre foi possível medir o dano causado pela ingestão das substâncias. Na figura 8 A é possível observar o intestino com a coloração azul bem forte, indicando a morte celular ocasionada pela ingestão da comida acrescida de NPs de ZnO puro (Figura 8 A, B e C).

**Figura 8.** Avaliação da citotoxicidade das NPs de ZnO puro utilizando o método de exclusão do corante azul de tripano.

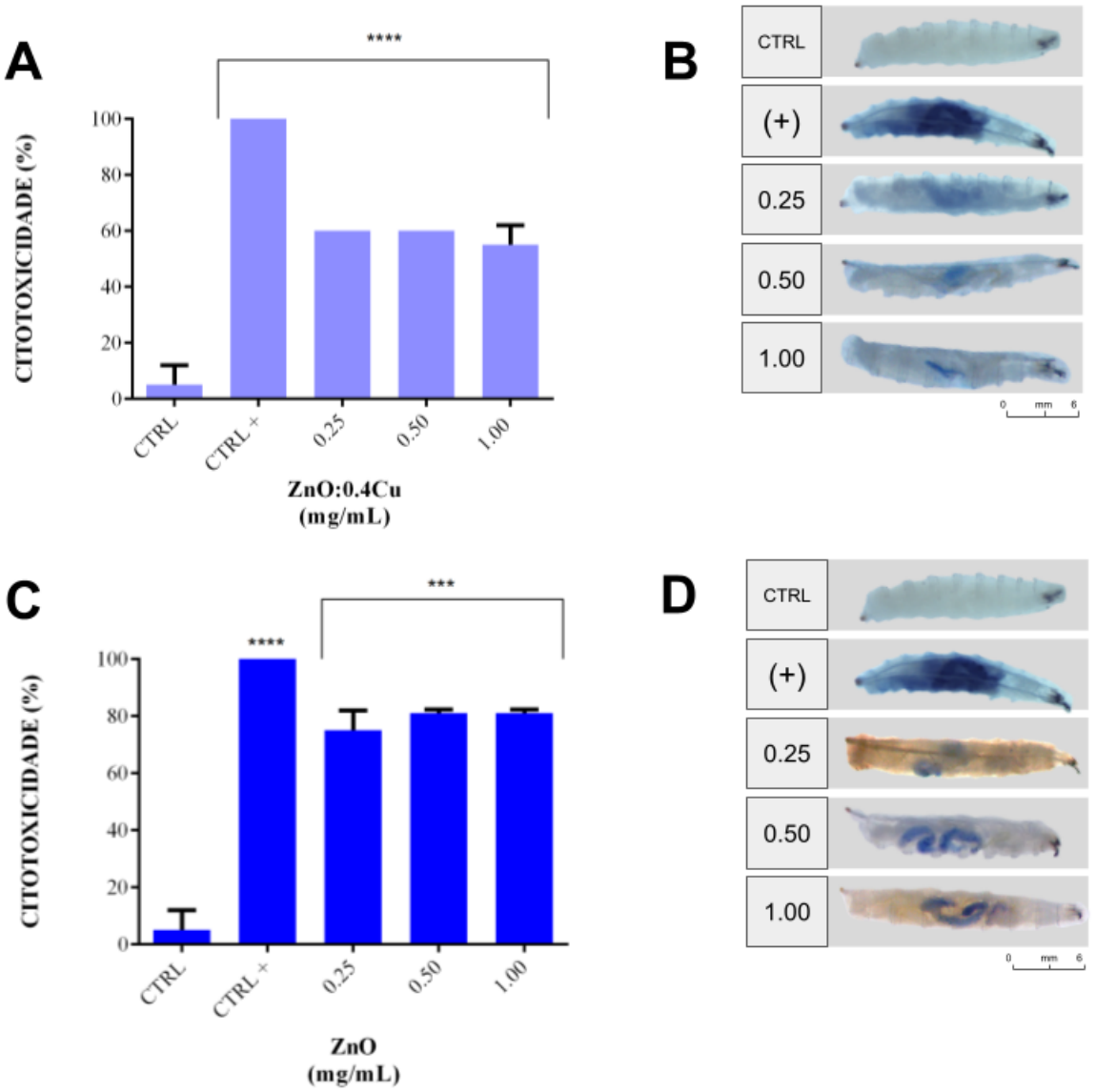


Larvas de terceiro estágio (L3) expostas a 0,50 mg/mL de NPs de ZnO puro ou dopado com 0,4% de cobre. (A) e (D) Fotos de corpos larvais vistos sob aumento de 15X em microscópio estereoscópio após teste de exclusão do corante, onde é possível identificar a coloração no intestino afetado pela citotoxicidade da substância. (B) e (E) Intestinos larvais dissecados, observados sob amplitude de 15X em microscópio estereoscópio. (C) e (F) Porção do intestino larval, observada sob amplitude de 45X em microscópio estereoscópio. É possível identificar a coloração em azul de aglomerados de células intestinais. Fonte: Autora, 2023.

Após realizar o mesmo experimento com as NPs de ZnO dopadas com 0,4% de cobre, foi observada uma diferença na coloração das células intestinais (Figura 8 D, E e F). A coloração apresentada, nesse caso, foi mais fraca, o que pode indicar que um número menor de células sofreu morte celular. Sugere-se que a dopagem com cobre pode aumentar a biocompatibilidade da substância, isso porque os animais apresentaram coloração azul fraca no intestino e menor taxa de mortalidade.

Sabe-se que a citotoxicidade pode afetar toda a homeostase do organismo (KAO et al., 2012). Nesse caso, após atravessar a barreira intestinal, a substância está livre para atingir todas as outras estruturas internas. Uma vez que tal estresse seja causado, é possível que haja atraso no desenvolvimento e morte em diversos estágios de desenvolvimento do animal (PAPPUS; MISHRA, 2018). A significativa melhora no índice de mortalidade larval (Figura 6 B) pode estar relacionada à presença do cobre na amostra, reforçada pela diminuição da porcentagem de células intestinais coradas em azul (Figura 9 F).

**Figura 9.** Porcentagem de intestinos corados após teste de citotoxicidade em animais expostos a NPs de ZnO com 0,4% de cobre.




Índice de citotoxicidade de animais expostos às NPs de óxido de zinco dopadas com cobre e na forma pura. A citotoxicidade foi medida com base no número de intestinos que apresentaram coloração azul através do método de exclusão do corante, característica de morte celular. (A) e (C) mostram o índice de citotoxicidade após a exposição às NPs de ZnO dopadas com cobre e puras, respectivamente. Em (B) e (D) é possível visualizar imagens representativas de larvas expostas às substâncias após serem submetidas ao método de exclusão do corante, observadas em microscópio estereoscópio sob aumento de 15X. Como o índice de citotoxicidade mostrou-se mais baixo em (A), foi possível associar que a presença do cobre foi importante para a diminuição da citotoxicidade observada na substância pura, o que é reforçado pela coloração mais clara dos intestinos observada na figura (D). **** e *** indicam diferença estatística, $p < 0,05$. ANOVA e comparação de médias através de Bonferroni.

A presença do cobre na amostra diminuiu de forma significativa a citotoxicidade observada nos animais expostos às NPs de ZnO puras (Figura 9). Estudos de viabilidade celular constataram que a citotoxicidade está atrelada à quantidade de NPs na amostra (BAHADAR et al., 2016). Nos estudos aqui realizados, foi possível observar que tanto na

forma pura quanto na forma dopada, animais expostos a 1,00 mg/mL apresentaram coloração azul no intestino; tal apontamento pode indicar que um número maior de células sofreu morte celular no local, confirmando que quanto maior a concentração de NPs, maior a citotoxicidade observada. Apesar de os animais expostos à substância dopada terem apresentado coloração azul no intestino, ainda assim as larvas expostas à substância pura apresentaram uma coloração mais escura (Figura 9 D), indicando maior citotoxicidade no local.

Após acompanhar todos os estágios de desenvolvimento dos animais expostos às substâncias e também medir a citotoxicidade causada pela ingestão das mesmas, foi possível verificar que a presença do cobre diminui os efeitos negativos apresentados pela substância pura. Desta forma, os resultados aqui obtidos são de extrema importância enquanto base para o estudo da biocompatibilidade das NPs de ZnO, principalmente dopadas com outros materiais. Tais resultados podem servir como ponto de partida para a testagem mais aprofundada da biocompatibilidade das substâncias.

## 7. CONCLUSÃO

Os testes *in vivo* comparando a substância pura e dopada com 0,4% de cobre mostraram que a presença do cobre melhora a biocompatibilidade das NPs de ZnO, diminuindo a mortalidade nos primeiros estágios de vida, bem como o índice de citotoxicidade, e melhoram a longevidade dos animais em relação à substância pura.

Com isso, pode-se concluir a interferência positiva da presença de cobre nas amostras. Os resultados obtidos com a conclusão deste trabalho servirão como ponto de partida para compreender o comportamento toxicológico das NPs, bem como apontar a significância do método de dopagem dessas substâncias para o uso seguro nas indústrias biomédica e alimentícia.

Para melhor compreender os efeitos endógenos envolvidos na diminuição da toxicidade, pretende-se continuar o estudo e realizar ensaios de medição do estresse oxidativo.

## 8. REFERÊNCIAS


AGUILA, J. et al. The Role of Larval Fat Cells in Adult *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, n.6, p. 956-963, dez. 2007.

ANAND, A. et al. Chronic Exposure of Zinc Oxide Nanoparticles Causes Deviant Phenotype in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 327, p. 180-186, abr. 2017.

AWASTHI, R. et al. Nanoparticles in Cancer Treatment: Opportunities and Obstacles. **Current Drug Targets**, vol. 19, n. 14, p. 1696-1709, 2018.

BAHADAR, H. et al. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. **Iranian Biomedical Journal**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2016.

BAYDA, S. et al. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 112, 2020.

BHAGAT, M. et al. Review—Multifunctional Copper Nanoparticles: Synthesis and Applications. **Journal of Solid State Science and Technology**, v. 10, n. 6, 2021.

BHATTACHARYA, P.; NEOGI, S. Antibacterial Properties of Doped Nanoparticles. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 35, n. 7, p. 861-876, 2019.

BUCHON, N.; SILVERMAN, N.; CHERRY, S. Immunity in *Drosophila melanogaster*—From Microbial Recognition to Whole-Organism Physiology. **Nature reviews Immunology**, v. 14. n. 12, p. 796-810, dez. 2014.

CHAN, C. From Nanotech to Nanoscience. **Science History Institute**, 22 jun. 2008. Disponível em: https://www.sciencehistory.org/distillations/from-nanotech-to-nanoscience. Acesso em: 5 mar. 2023.

CHO, K. et al. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1310-1316, mar. 2008.

CHO, W.-S. et al. Progressive Severe Lung Injury by Zinc Oxide Nanoparticles; the Role of Zn2+ Dissolution Inside Lysosomes. **Particle and fibre toxicology**, v. 8, n. 27, set. 2011.

DAUGHTON, C. Non-regulated Water Contaminants: Emerging Research. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 24, n. 7-8, p. 711-732, 2004.

DENG, X. et al. Nanosized Zinc Oxide Particles Induce Neural Stem Cell Apoptosis. **Nanotechnology**, v. 20, n. 11, mar. 2009.

DONAHUE, N.; ACAR, H.; WILHELM, S. Concepts of Nanoparticle Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Kinetics in Nanomedicine. **Advanced drug delivery reviews**, v. 14, p. 68-96, mar. 2019.

ELMI, F. et al. The Use of Antibacterial Activity of ZnO Nanoparticles in the Treatment of Municipal Wastewater. **Water Science & Technology**, v. 70, n. 5, 763-770, set. 2014.

ESLAHIAN, K. et al. Characterization of Nanoparticles Under Physiological Conditions. *In:* Wegener, J. (ed.). **Measuring Biological Impacts of Nanomaterials**. **Bioanalytical Reviews**, vol 5, 2014.

ESPITIA et al. Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1447-1464, fev. 2012.

EVELYN, A.; MANNICK, S.; SERMON, P. Unusual Carbon-Based Nanofibers and Chains among Diesel-Emitted Particles. **Nano Letters**, v. 3, n. 1, p. 63-64, dez. 2003.

FISCHER, H.; CHAN, W. Nanotoxicity: the Growing Need for *in vivo* Study. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 565-571, 2007.

GEORGE, S. et al. Use of a Rapid Cytotoxicity Screening Approach to Engineer a Safer Zinc Oxide Nanoparticle through Iron Doping. **ACS Nano**, v. 4, n. 1, p. 15-29, dez. 2010.

GILBERT, B.; LU, G.; KIM, S. Stable Cluster Formation in Aqueous Suspensions of Iron Oxyhydroxide Nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, n. 1, p. 152-159, 2007.

GUERRINI, G. et al. Characterization of nanoparticles-based vaccines for COVID-19. **Nature Nanotechnology**, v. 17, p. 570–576, 2022.

HARISHCHANDRA, B. et al. Copper Nanoparticles: A Review on Synthesis, Characterization and Applications. **Asian Pacific Journal of Cancer Biology**, v. 5, n. 4, p. 201-210, dez. 2020.

HASSAN, I. et al. Antimicrobial Properties of Copper-Doped ZnO Coatings under Darkness and White Light Illumination. **ACS Omega**, v. 2, n. 8, p. 4556-562, ago. 2017.

HASSANIEN, R.; HUSEIN, D.; AL-HAKKANI, M. Biosynthesis of Copper Nanoparticles Using Aqueous Tilia Extract: Antimicrobial and Anticancer Activities. **Heliyon**, v. 4, n. 12, dez. 2018.

JENNINGS, B. Drosophila – a Versatile Model in Biology & Medicine. **Materials Today**, v. 14, n. 5, p. 190-195, 2011.

JOVANOVIĆ, B. et al. The Effects of a Human Food Additive, Titanium Dioxide Nanoparticles E171, on *Drosophila melanogaster* – a 20 Generation Dietary Exposure Experiment. **Scientific Reports**, v. 8, 2018.

KAO, Y. et al. Zinc Oxide Nanoparticles Interfere With Zinc Ion Homeostasis to Cause Cytotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 125, n. 2, p. 462-472, fev. 2012.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019.

LESPES, G.; FAUCHER, S.; SLAVEYKOVA, V. Natural Nanoparticles, Anthropogenic Nanoparticles, Where Is the Frontier? **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, 2020.

LI, X. et al. Zinc-Doped Copper Oxide Nanocomposites Inhibit the Growth of Pancreatic Cancer by Inducing Autophagy Through AMPK/mTOR Pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.

LINFORD, N. et al. Measurement of lifespan in Drosophila melanogaster. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 71, 2013.

MAHAMUNI-BADIGER, P. et al. Biofilm Formation to Inhibition: Role of Zinc Oxide-Based Nanoparticles. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 108, 2020.

MAHATO, K. et al. Gold Nanoparticle Surface Engineering Strategies and Their Applications in Biomedicine And Diagnostics. **3 Biotech**, v. 9, n. 2, p. 57, 2019.

MARANO, F. et al. Cellular Mechanisms of Nanoparticle Toxicity. **Encyclopedia of Nanotechnology**, p. 498-505, 2016.

MIHAI, C. et al. Intracellular Accumulation Dynamics and Fate of Zinc Ions in Alveolar Epithelial Cells Exposed to Airborne ZNO Nanoparticles at the Air-Liquid Interface. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 1, p. 9-22, dez. 2015.

MIRZAEI, H.; DARROUDI, M. Zinc Oxide Nanoparticles: Biological Synthesis and Biomedical Applications. **Ceramics International**, v. 43, n. 1, p. 907-914, 2017.

MITCHELL, M. et al. Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 101-124, 2021.

MOORE, M. Do Nanoparticles Present Ecotoxicological Risks for the Health of the Aquatic Environment? **Environment International**, v. 32, n. 8, p. 967-976, dez. 2006.

MUÑOZ-HERNÁNDEZ, P. et al. Nanotechnology in Food Packaging. *In:* RUBIO, A. L.; ROVIRA, M. J. F. (eds.). **Nanomaterials for Food Applications**. 1. ed. Elsevier, p. 205-232, 2018.

NAVARRO, J.; SCHNEUWLY, S. Copper and Zinc Homeostasis: Lessons from *Drosophila melanogaster*. **Frontiers in Genetics**, v. 8, 2017.

NEL, A. et al. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, fev. 2006.

NG, C. et al. Zinc Oxide Nanoparticles Exhibit Cytotoxicity and Genotoxicity Through Oxidative Stress Responses in Human Lung Fibroblasts and *Drosophila melanogaster*. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 1621-1637, 2017.

ONG, C. et al. *Drosophila melanogaster* as a Model Organism to Study Nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 3, p. 396-403, fev. 2015.

OSMOND, M; MCCALL, M. Zinc Oxide Nanoparticles in Modern Sunscreens: An Analysis of Potential Exposure and Hazard. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 1, p. 15-41, 2010.

OSTROWSKI, A. et al. Nanotoxicology: Characterizing the Scientific Literature, 2000-2007. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, p. 251-257, 2009.

PAPPUS, S.; MISHRA, M. A *Drosophila* Model to Decipher the Toxicity of Nanoparticles Taken Through Oral Routes. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1048, p. 311-322, 2018.

RADZIMSKA, A.; JESIONOWSKI, T. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. **Materials**, v. 7, n. 4, 2014.

RAJPUT, V. et al. Effects of Zinc-Oxide Nanoparticles on Soil, Plants, Animals and Soil Organisms: A Review. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 9, p. 76-84, 2018.

RAMOS, A. et al. Biomedical applications of nanotechnology. **Biophysical reviews**, v. 9, n. 2, p. 79-89, 2017.

SABAT, D. et al. Investigation of Titania Nanoparticles on Behaviour and Mechanosensory Organ of *Drosophila melanogaster*. **Physiology & Behavior**, v. 167, p. 76-85, 2016.

SILVA, L. et al. Nanoparticles and Interfaces With Toxic Elements in Fluvial Suspended Sediment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 168, n. 112405, 2021.

SINGHAL, S. et al. Cu-doped ZnO Nanoparticles: Synthesis, Structural and Electrical Properties. **Physica B: Condensed Matter**, v. 407, n. 8, p. 1223-1226, abr. 2012.

SIRELKHATIM, A. et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. **Nano-Micro Letters**, v. 7, p. 219-242, 2015.

TANG, S.; ZHENG, J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 13, p. 2192-2640, 2018.

THIWAWONG, T.; ONLAOR, K.; TUNHOO, B. A Humidity Sensor Based on Silver Nanoparticles Thin Film Prepared by Electrostatic Spray Deposition Process. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2013, 2013.

WALTERS, C.; POOL, E.; SOMERSET, V. Nanotoxicology: A Review. *In:* SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. (eds.). **Toxicology – New Aspects to This Scientific Conundrum**. Intechopen, 2016.

YATTINAHALLI, S.; KAPATKAR, S.; MATHAD, S. Review of Nanoscience Materials and its applications. **Research Journal of Engineering and Technology**, v. 7, n. 3, p. 121-127, 2016.

YILDIRIMER, L. et al. Toxicology and Clinical Potential of Nanoparticles. **Nanotoday**, v. 6, n. 6, p. 585-607, 2011.