UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS A. C. SIMÕES
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DHANDARA EVELYN DE LIMA SAMPAIO

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE SIMONKOLLEITE DOPADO COM OURO EM *Drosophila melanogaster*

Maceió
2025

DHANDARA EVELYN DE LIMA SAMPAIO

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE SIMONKOLLEITE DOPADO COM OURO EM *Drosophila melanogaster*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharelado/Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Anhezini de Araujo

Maceió

2025

Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Girlaine da Silva Santos – CRB-4 – 1127

S192a Sampaio, Dhandara Evelyn de Lima.
Avaliação da biocompatibilidade de simonkolleite dopado com ouro em drosophila melanogaster / Dhandara Evelyn de Lima Sampaio. – 2025.
41 f.: il.

Orientador: Lucas Anhezini de Araujo.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: Bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2025.

Bibliografia: f. 39- 41.

1. Drosophila melanogaster. 2. Nanopartículas. 3. Nanotoxicologia. I. Título.

CDU: 57: 597.77

Folha de Aprovação

DHANDARA EVELYN DE LIMA SAMPAIO

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE SIMONKOLLEITE DOPADO COM OURO EM *Drosophila melanogaster*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à banca examinadora do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 06 de Maio de 2025.

gov.br Documento assinado digitalmente
LUCAS ANHEZINI DE ARAUJO
Data: 29/05/2025 13:06:03-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

(Orientador(a) - Prof. Dr. Lucas Anhezini de Araujo, Universidade Federal de Alagoas)

Banca examinadora:

gov.br Documento assinado digitalmente
JERUSA MARIA DE OLIVEIRA AMORIM
Data: 29/05/2025 12:50:44-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

(Examinador(a) Externo(a) - Dr. Jerusa Maria de Oliveira, Universidade Federal de Alagoas)

gov.br Documento assinado digitalmente
IGOR SANTANA DE MELO
Data: 29/05/2025 08:42:45-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

(Examinador(a) Interno(a) - Prof. Dr. Igor Santana de Melo, Universidade Federal de Alagoas)

AGRADECIMENTOS

Tem uma passagem na bíblia que diz "Tudo que você fizer consagre ao Senhor, e os seus planos serão bem sucedidos" Provérbios 16:3. E isso fez parte da minha vida desde sempre, então antes de agradecer a quem me ajudou a chegar até aqui, eu preciso agradecer a quem fez tudo isso ser possível. Obrigada Deus, pois sem ti, eu nada seria. Agradeço também a minha mãe do céu, a quem eu me apeguei nas horas ruins, e me valeu em todos os momentos difíceis.

A minha mãe, Vera Lúcia, a quem me deu a luz prematuramente e passou meses no hospital ao meu lado sem largar a minha mão, sentindo minhas dores, chorando minhas lágrimas e rindo os meus risos. Eu sou carne da tua carne e a senhora me moldou, me ensinou, me educou e me amou, infinitamente. Ao meu pai, Anderson Sampaio, a quem eu devo toda minha personalidade, eu sou o que o senhor é, do fio do cabelo até o dedo do pé, o senhor sempre me protegeu, sempre me abençoou e sempre foi motivo de orgulho pra mim, me ensinou a ter coragem e nas minhas fragilidades. O amor que eu sinto por vocês é maior do que cabe em mim, obrigada.

Marcela Soares, André Luiz, Nicolly Ellen, Rhuan Derick e Arthur Luiz, a quem agradeço por entrarem na minha vida e tornarem ela mais alegre, que me acolheram e me amaram. Bianca Ribeiro, Lucila Vitória, e Mônica Lima, a quem eu devo minha amizade, que me ensinaram o que é ter família fora da sua família, e quem eu posso contar, em qualquer momento, em qualquer lugar do mundo. A minha família, a quem tem todo meu coração.

Agradeço imensamente aos meus amigos do Laboratório de Análise *in vivo* da Toxicidade e Doenças Neurodegenerativas (LAVITOX), ninguém faz ciência sozinho, agradeço o tempo passado juntos e o aprendizado, além dos churrascos. Que todos vocês tenham vidas e carreiras lindas. Principalmente ao Professor Lucas Anhezini, que me ensinou, me incentivou e me ajudou a chegar até aqui também. Agradeço também a professora Jerusa Oliveira por todo apoio.

Obrigada amigos de laboratório, amigos de sala e a todos que eu fiz durante o curso, ao clube das winx, que ouviram todas as minhas lamentações sobre as provas e atividade.

Sarah Oliveira, Letycia Manuela, Rebeca Leite, Ester Santos, Fernanda Correia e o Alef Barros.

E por fim, é claro que eu não poderia deixar de agradecer a mim, por não ter desistido, foi muito joelho no chão e oração.

RESUMO

Nanocristais de Simonkolleite (SM), resultantes da corrosão do zinco, têm sido amplamente investigados por suas aplicações tecnológicas, como em supercapacitores. No entanto, sua toxicidade permanece pouco elucidada. A dopagem de SM com ouro tem potencial para conferir propriedades antimicrobianas, o que acentua a necessidade de avaliação de sua segurança biológica. Neste contexto, *Drosophila melanogaster* foi empregada como modelo experimental com o objetivo de investigar os efeitos do SM dopado com ouro (1% e 5%) sobre o desenvolvimento, comportamento locomotor e parâmetros bioquímicos. Foram utilizadas larvas da linhagem *Canton S*, expostas por via oral a diferentes concentrações dos nanocristais incorporados ao meio de cultura (Controle; Controle positivo; 0,015; 0,030; 0,060 e 0,120 mg/mL), sendo controle positivo o herbicida imazapyr adicionado ao meio padrão na concentração de 0,15 mg/mL. Avaliaram-se a taxa de pupação, letalidade larval e o número diário de pupas. A motilidade larval foi analisada por meio da mensuração da distância percorrida e da velocidade média em um sistema padronizado de filmagem. Foram avaliadas também, as as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e tióis totais (T-SH), além da quantificação de malondialdeído (MDA), marcador de peroxidação lipídica. Foi realizado também um teste de motilidade adulta, onde moscas de 3-5 dias foram expostas aos nanocristais por 24 e 96 horas e submetidas a testes de geotaxia negativa. Os resultados indicaram que as concentrações testadas de SM, dopado ou não com ouro, não alteraram significativamente os parâmetros de desenvolvimento, exceto no controle positivo, que apresentou maior letalidade larval e menor taxa de pupação. Na motilidade larval, observou-se redução significativa da distância percorrida e da velocidade média nas larvas expostas ao SM dopado com 1% e 5% de ouro, na concentração de 0,120 mg/mL. Comportamentos anômalos, como movimentação circular, foram observados no controle positivo e na concentração de 0,015 mg/mL do grupo dopado a 5%. Em relação à atividade enzimática, não foram detectadas alterações na atividade da SOD e níveis de T-SH. No entanto, a atividade da catalase aumentou nos grupos tratados, e os níveis de MDA foram elevados apenas no grupo SM:5%Au na concentração de 0,120 mg/mL. Nos testes com adultos, apenas fêmeas expostas à concentração de 0,060 mg/mL SM:5%Au apresentaram redução significativa na geotaxia. Conclui-se que a dopagem dos nanocristais de Simonkolleite com 5% de ouro pode induzir efeitos tóxicos comportamentais e bioquímicos em *D. melanogaster*, especialmente em concentrações mais elevadas, sugerindo a necessidade de estudos adicionais para elucidar os mecanismos envolvidos e sua segurança em aplicações biomédicas e tecnológicas.

Palavras-chave: Nanopartículas, biologia redox, nanotoxicologia.

ABSTRACT

Simonkolleite Nanocrystals (SM), resulting from zinc corrosion, have been extensively investigated for their technological applications, such as in supercapacitors. However, their toxicity remains poorly understood. Doping SM with gold has the potential to confer antimicrobial properties, which further emphasizes the need to evaluate their biological safety. In this context, *Drosophila melanogaster* was employed as an experimental model to investigate the effects of gold-doped SM (1% and 5%) on development, locomotor behavior, and biochemical parameters. Canton S strain larvae were orally exposed to different concentrations of the nanocrystals incorporated into the culture medium (Control; Positive control; 0.015, 0.030, 0.060, and 0.120 mg/mL), with the positive control being the herbicide imazapyr added to the standard medium at 0.15 mg/mL. Pupation rate, larval lethality, and daily pupae count were assessed. Larval motility was analyzed by measuring the distance traveled and average speed using a standardized filming system. Additionally, the activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase, and total thiols (T-SH) were evaluated, along with the quantification of malondialdehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation. An adult motility test was also performed, in which 3–5-day-old flies were exposed to the nanocrystals for 24 and 96 hours and subjected to negative geotaxis assays. The results indicated that the tested concentrations of SM, whether doped with gold or not, did not significantly alter developmental parameters, except in the positive control group, which showed higher larval lethality and a lower pupation rate. In the larval motility assay, a significant reduction in the distance traveled and average speed was observed in larvae exposed to gold-doped SM at 1% and 5% at a concentration of 0.120 mg/mL. Abnormal behaviors, such as circular movement, were observed in the positive control and in the group doped with 5% gold at 0.015 mg/mL. Regarding enzymatic activity, no changes were detected in SOD activity or T-SH levels. However, catalase activity increased in the treated groups, and MDA levels were elevated only in the group SM:5%Au at 0.120 mg/mL. In the adult motility tests, only females exposed to the 0.060 mg/mL concentration (5% gold) showed a significant reduction in geotaxis. In conclusion, SM:5%Au may induce behavioral and biochemical toxic effects in *D. melanogaster*, particularly at higher concentrations, highlighting the need for further studies to elucidate the underlying mechanisms and ensure their safety for biomedical and technological applications.

Keywords: Nanoparticles, Redox Biology, Nanotoxicology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Tipos de exposição aos nanomateriais.....….	14
Figura 2	-	Diferentes tipos de sistema modelo e suas vantagens e desvantagens	15
Figura 3	-	Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* ……	18
Figura 4	-	Porcentagem da letalidade larval em *Drosophila melanogaster* expostas às nanopartículas de SM puro e dopado com Au (1% e 5%) por via oral……	25
Figura 5	-	Porcentagem de pupação em *Drosophila melanogaster* após exposição oral às nanopartículas …….	26
Figura 6	-	Porcentagem diária de pupação de *Drosophila melanogaster* exposta às nanopartículas……	26
Figura 7	-	Avaliação da toxicidade do SM puro e do SM dopado com 1% e 5% de ouro sobre a sobrevivência dos animais adultos…….	28
Figura 8	-	Avaliação da motilidade larval de *Drosophila melanogaster* expostas as nanopartículas de SM puro e dopado com Au 1% e 5%……	30
figura 9	-	Avaliação da toxicidade na motilidade adulta de *Drosophila melanogaster* expostas às nanopartículas de SM puro e dopado com ouro (1% e 5%) ……...	33
Figura 10	-	Avaliação da atividade enzimática em larvas de *Drosophila melanogaster* expostas às nanopartículas de SM puro e dopado com Au 1% e 5%).....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NPs	Nanopartículas
SM	Simonkolleite
ZnO	Óxido de Zinco
mm	Milímetro
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
mg/mL	Miligramas por mililitro
EROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
T-SH	Tióis totais
MDA	Malondialdeído
$ZnCl_2$	Cloreto de Zinco
Au	Ouro
mL	Mililitro
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
nm	Nanômetros
TBA	Ácido tiobarbitúrico
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato)
DMSO	Dimetilsulfóxido
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo)

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	11
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	13
2.1	Nanomateriais: conceito e aplicabilidade	13
2.2	Nanotoxicologia ……..	14
2.3	Estresse Oxidativo…….	15
2.4	Simonkolleite …….…….	15
2.5	Dopagem com Ouro ……..……..	16
2.6	Drosophila melanogaster como Organismo Modelo…….	17
3.0	**OBJETIVOS**…….	19
3.1	Objetivo geral ……	19
3.2	Objetivos específicos ……	19
4	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	20
4.1	Obtenção das nanopartículas ……	20
4.2	Manutenção dos animais ……..	20
4.3	Exposição às nanopartículas por via oral …….	20
4.4	Avaliação da exposição às nanopartículas no desenvolvimento larval por via oral ……..	21
4.5	Avaliação da exposição às nanopartículas no tempo de vida dos animais adultos……..	21
4.6	Avaliação da exposição às nanopartículas na motilidade larval……	21
4.7	Avaliação da exposição às nanopartículas na motilidade adulta …….	22
4.8	Avaliação da exposição às nanopartículas na atividade enzimática……..	22
4.8.1	Análises de balanço redox……	22
4.8.2	Quantificação……	23
4.9	Análises estatísticas ……..	24
5.0	**RESULTADOS E DISCUSSÃO ……**	25
5.1	Avaliação do desenvolvimento larval após exposição por via oral às nanopartículas de SM puro e dopado com Au (1% e 5%) ……..	25
5.2	Avaliação da exposição às nanopartículas no tempo de vida dos animais adultos……..……	28
5.3	Avaliação da exposição às nanopartículas de SM puro e dopado com 1% e	29

	5% de Au na motilidade larval…….	30
5.4	Avaliação da exposição às nanopartículas de SM puro e dopado com Au (1% e 5%) no motilidade adulta……	32
5.5	Análise enzimática de enzimas do sistema antioxidante após exposição às nanopartículas de SM puro e dopado com Au (1% e 5%)……	35
6.0	**CONCLUSÃO** …….	38
	REFERÊNCIAS …….	39

1. INTRODUÇÃO

Com o avanço da nanotecnologia, se tornou possível investigar quais os possíveis danos que nanomateriais podem causar à saúde humana. Apesar de seus enormes benefícios, como nas indústrias farmacêutica, biomédica e agricultura, é necessário saber como a exposição a essas substâncias impactará no metabolismo humano (Awashra, 2023). As propriedades dos nanomateriais que mais influenciam na sua toxicidade são tamanho, área de superfície, forma e proporção, assim como o seu revestimento, a sua citotoxicidade é resultado da interação entre a superfície do material e como ela vai se comportar com os componentes celulares. (Egbuna *et al*., 2021)

Os primeiros estudos toxicológicos sobre nanomateriais não levaram em consideração seu comportamento biológico e a caracterização das partículas, criando consequências sobre a dificuldade para a definição de parâmetros essenciais para medir os riscos dos nanomateriais (Boverhof; David, 2010). Para Esref Demir (2020), é necessário estudar o impacto biológico desses nanomateriais devido às suas variadas formas, tamanhos e composições, já que seu uso se faz presente em várias áreas como medicina, farmácia e indústria. Ainda assim, os dados sobre a sua segurança ainda são escassos, e esses estudos servem para medir essa biossegurança e prever possíveis efeitos tóxicos (Radaic et al., 2016).

O primeiro passo para o estudos com os nanomateriais é a sua síntese acompanhada de técnicas padronizadas. Em seguida da sua síntese é necessária a sua caracterização, e logo após, a experimentação, para avaliar a sua segurança, estabilidade e biocompatibilidade. (Singh *et al*., 2020). A produção e aplicação de nanomateriais levantam preocupações sobre riscos ambientais e à saúde, devido às suas características, que favorecem a dispersão e possível contaminação se for descartado incorretamente (Paschoalino, 2010).

Hidróxido de cloreto de zinco monohidratado (Simonkolleite) é um mineral secundário formado pelo produto da corrosão do Zinco na forma de cristais, possui propriedades fotocatalíticas e é usado com frequência em dispositivos como baterias devido às suas propriedades de capacitor. (Silva *et al.,* 2021). Nanopartículas (NPs) de Simonkolleite (SM), ainda não tiveram sua toxicidade investigada, mesmo sendo usadas com frequência em dispositivos, devido à sua capacidade de fotocapacitor. (Silva *et al.*, 2021).

Nanopartículas de ouro (Au) possuem propriedades ópticas, fluorescentes e magnéticas, sendo interessante fazer o seu uso em áreas da biomedicina, sendo usado como bactericida. (Silva *et al.,* 2021). Ainda assim, é necessário avaliar a toxicidade que essas nanopartículas podem trazer para organismos biológicos.

Devido ao avanço tecnológico na síntese de nanocompósitos, levando em consideração sua mudança na forma e composição quando tem seu tamanho reduzido, é necessário avaliar a sua biocompatibilidade.. Sendo assim, é necessário o uso de um organismo modelo, com o genoma amplamente conhecido, a fim de avaliar a toxicidade desses nanocompósitos.

Um dos organismos modelo mais utilizados em várias áreas da ciência, inclusive na nanotoxicologia, é a *Drosophila melanogaster*. A *Drosophila* é conhecida comumente como mosca da fruta. O seu uso vem sendo cada vez mais escolhido para estudos com genética, embriologia, fisiologia, na medicina, devido ao seu curto tempo de vida, baixo custo de manutenção e dimorfismo sexual. (Rocha *et al*., 2013). A facilidade do uso desse organismo modelo em estudos com toxicologia é referente a exposição que pode ser por via oral, fazendo a *D. melanogaster*, além de um ótimo modelo para a toxicologia, ser um exemplo como modelo *in vivo* (Alaraby *et al.*, 2015).

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a biocompatibilidade dos nanocristais de SM puro e dopado com Au no organismo modelo *Drosophila Melanogaster*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nanomateriais: Conceito e aplicabilidade

Aspectos funcionais da nanotecnologia começaram a ser questionados por físicos há décadas. O ganhador do prêmio Nobel de física de 1985, Richard Feynman, acreditava que havia muito mais coisas a se investigar quando observamos um objeto, mesmo ele sendo muito pequeno, sugerindo também que muitas descobertas poderiam ser feitas com o uso de equipamentos específicos (Sanfelice; Pavinatto; Corrêa, 2022). Isso se tornou ainda mais possível com a criação do microscópio de varredura e o microscópio de força atômica, que somariam na investigação e caracterização de nanoestruturas, dando respostas para perguntas sobre suas aplicabilidades. (Sanfelice; Pavinatto; Corrêa, 2022).

Atualmente, entram na escala de nanomateriais estruturas que possuem tamanho entre 1 e 100 nanômetros. Autores relatam que esta dimensão pode aumentar a estabilidade atômica, flexibilidade, resistência e condutibilidade (Boverhof; David, 2010). É notório quanto o ramo da nanociência cresceu através dos anos e isso se dá por meio de investimento, o qual boa parte se encontra inserido em pesquisa por países tanto desenvolvidos quanto subdesenvolvidos, alavancando o mercado mundial (Paschoalino; Marcone; Jardim, 2010).

De acordo com Allan Radaic (2016), cerca de 9400 artigos foram publicados na plataforma de pesquisa *Science Direct* relacionados à nanotoxicologia, o que vem gerando alerta nesse ramo, se fazendo necessária a identificação dos riscos que eles podem proporcionar a longo prazo. Muitos trabalhos estão sendo realizados para medir o impacto das nanopartículas quando em contato com organismos humanos e o meio ambiente, mas isso ainda não está claro, devido à diversidade de particularidades que cada nanopartícula possui e a forma como seu comportamento se altera quando suas propriedades físico-químicas são testadas (Durán., *et al.* 2018).

Nanopartículas são capazes de ultrapassar barreiras existentes nos sistemas biológicos devido ao seu tamanho pequeno, e isso pode causar danos maiores (Zoroddu *et al*. 2014). Existem diversas metodologias para analisar a toxicidade desses nanomateriais, que vão de acordo com a forma, função e propriedades (Paschoalino; Marcone; Jardim, 2010) mesmo que ainda não se tenha um consenso sobre qual metodologia é a melhor para analisar os efeitos

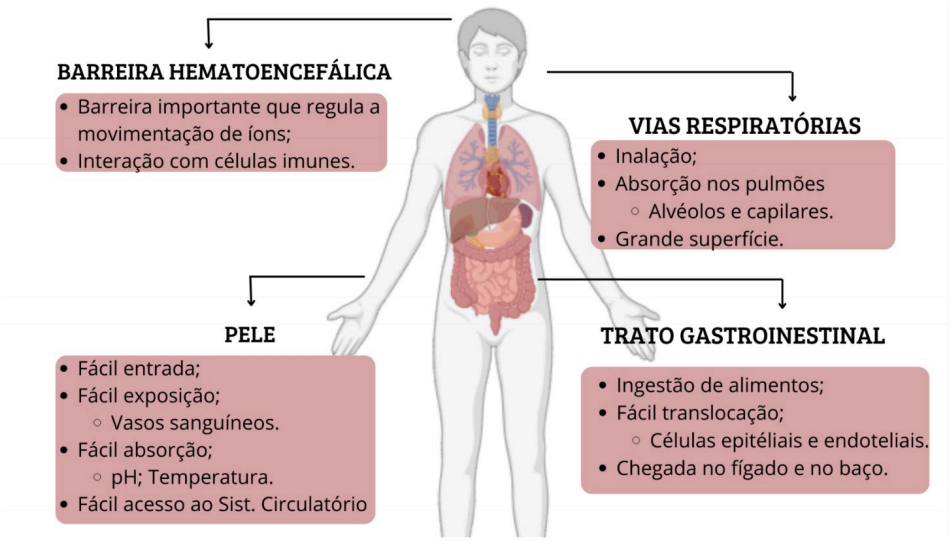
toxicológicos, sabe-se que são mais importantes aquelas que esclareça quais resultados foram encontrados (Harper *et al*. 2011).

2.2 Nanotoxicologia

A nanotoxicologia investiga os impactos negativos dos nanomateriais em organismos modelos como os *in vivo* e *in vitro*. Embora sejam vantajosas como nanomedicamentos e transportadores de fármacos, sua toxicidade pode variar conforme fatores como tamanho, forma e composição superficial. As nanopartículas sintetizadas quimicamente tendem a ser mais tóxicas devido à presença de substâncias artificiais, algumas biossintetizadas também podem ser prejudiciais por causa da sua degradação ou acúmulo. O campo da nanotoxicologia busca identificar esses riscos para garantir a segurança dos nanomateriais na medicina (Egbuna *et al*., 2021).

Nanopartículas menores têm maior área superficial, aumentando sua reatividade e toxicidade, mesmo com composição química similar. Foi comprovado também, que nanopartículas maiores têm alta taxa de toxicidade em camundongos, assim como o tamanho da partícula influencia em como ela vai ser liberada pelo organismo. Quando o tamanho da nanopartícula saiu de 30 para 3 nm, por exemplo, o número de suas moléculas na superfície aumentou, e isso elevou as suas reatividades bioquímicas (Egbuna *et al*., 2021).

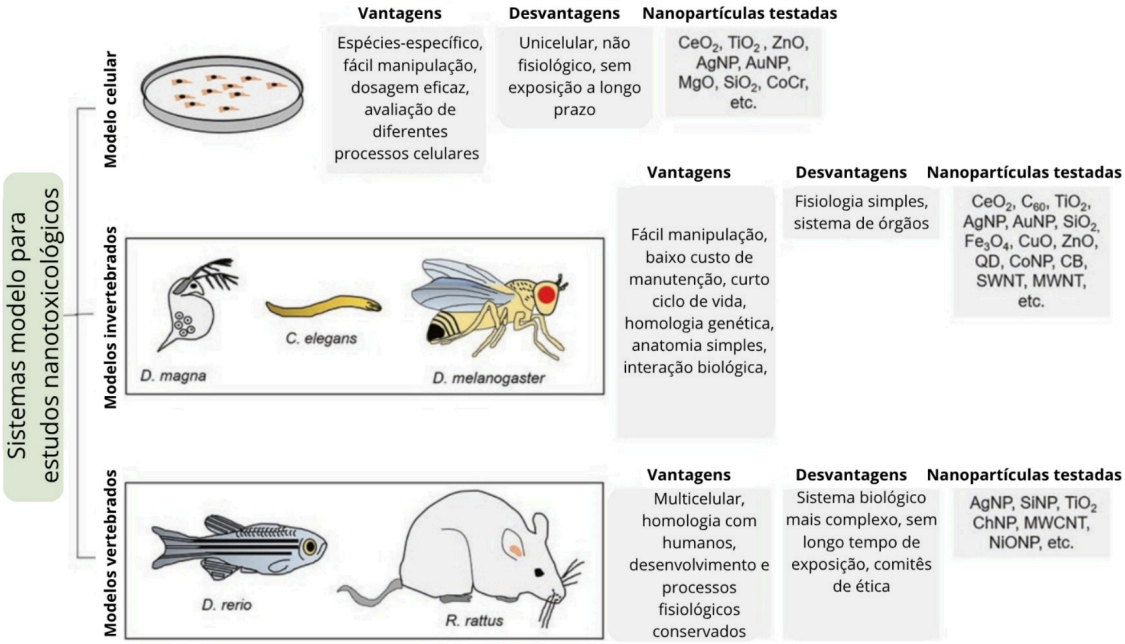
Figura 1 - Tipos de exposição aos nanomateriais.



Adaptada de Ganguly; Breen; Pillai, 2018.

Para analisar os vários tipos de mecanismos que a nanotoxicologia utiliza, existem vários tipos de estudo de toxicidade, como toxicidade aguda, utilizando doses da substância para determinar o dano da exposição, ou crônica, que administra uma dose por um determinado tempo, para avaliar sua evolução, ou ensaios *in vivo* e *in vitro*, utilizando organismos modelo para realizar tais estudos de toxicidade. (Ganguly; Breen; Pillai, 2021)

Figura 2 - Diferentes tipos de sistema modelo e suas vantagens e desvantagens



. Adaptado de Agrawal; Shah, 2020.

2.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo representa um dos principais caminhos pelos quais as NPs causam toxicidade, sendo geralmente associado à produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS). Essa produção pode ser desencadeada pela internalização das NPs pelas células, liberação de íons metálicos ou danos mitocondriais. Processos inflamatórios mediados por citocinas também podem gerar EROS de forma secundária *in vivo* (Horie; Tabei, 2021).

Pesquisas recentes demonstram que essa geração de EROS pode ser significativamente influenciada por modificações na estrutura de banda, especialmente quando diferentes dopagens são incorporadas aos nanomateriais. Por isso, nanopartículas dopadas vêm sendo amplamente investigadas em estudos atuais. (Bhattacharya; Neogi, 2019)

2.4 Simonkolleite

O hidróxido de cloreto de zinco ($Zn_5(OH)_8Cl_2 \cdot H_2O$), de nome popular Simonkolleite (SM), é um produto da corrosão do Zinco, que ocorre em regiões alemãs, e ganhou esse nome devido ao coletores de minerais que o encontraram, este nanomaterial é encontrado em forma de cristais hexagonais de até ~1 mm, com clivagem perfeita. O SM têm atraído atenção por suas propriedades estruturais e eletroquímicas, sendo promissores para sensores de gás e supercapacitores (Sithole *et al*., 2012).

Com o recozimento térmico, Silva *et al.,* (2021) demonstrou que foi possível, dependendo da temperatura do recozimento, que amostras de SM se transformassem em ZnO (Óxido de Zinco). Isso mostrou que, com diferentes tratamentos térmicos, amostras de SM podem se transformar em ZnO e o contrário também. O estudo mostrou que o recozimento térmico da amostra a 250 °C/1h, parte do SM se transformou em ZnO. Quando a temperatura foi aumentada para 1000 °C / 1h, SM se transformou em ZnO completamente.

O SM, por conter zinco, pode estimular a regeneração óssea ao liberar esse mineral de forma contínua no ambiente ósseo, fazendo seu uso como revestimento em implantes ou obturações ser significante. Além disso, ele pode ser precipitado a partir de uma solução de cloreto de zinco, permitindo que materiais com grupos básicos sejam imersos nessa solução para formar um revestimento sólido de SM de maneira simples e eficaz (Li *et al*., 2019). Apesar de sua atividade eletroquímica, sua baixa condutividade e tendência ao empilhamento reduzem a eficiência no armazenamento de energia. Por isso, pesquisadores tentam encontrar formas para melhorar a atividade de transporte de carga (Momodu *et al*., 2015).

2.5 Dopagem com Ouro

A dopagem é um método que envolve a introdução de novos elementos na estrutura da nanopartícula, permitindo a modificação das suas propriedades e das suas funcionalidades. Esse processo pode influenciar na estrutura física, química e eletrônica do material oferecendo vantagens como estabilidade, sendo uma alternativa para a utilização de vários nanomateriais (Kwon *et al*., 2016 *apud* Oliveira *et al*., 2016).

NPs que possuem metais como a principal composição também vêm chamando a atenção de pesquisadores, um exemplo disso é o ouro, que possui propriedades ópticas e magnéticas, além de serem estudadas como agentes antimicrobianos e na agricultura

(Oliveira, *et al*., 2024). Este mesmo estudo demonstrou que a dopagem com ouro em ZnO, em concentrações menores que 1 mg/mL, mostrou mais biocompatibilidade.

Neste trabalho, foram testados nanopartículas de SM puro e dopados com 1% e com 5% de Ouro, a fim de avaliar a sua biocompatibilidade.

2.6 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

A maioria dos estudos de nanotoxicidade usa modelos *in vitro*, que não são capazes de fornecer informações completas sobre como essas NPs serão distribuídas ou metabolizadas. Os estudos *in vivo* utilizam principalmente organismos aquáticos, mas a falta de padronização nos métodos dificulta a reprodutibilidade dos testes, então se tornou necessário a utilização de métodos padronizados e modelos experimentais nos quais fosse possível avaliar a citotoxicidade e biocompatibilidade das NPs (Chifiriuc *et al.,* 2016).

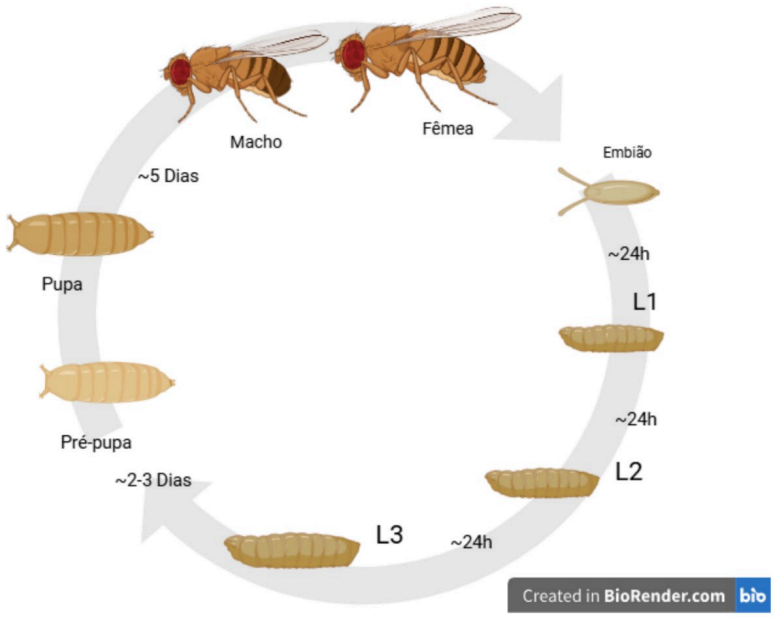
Estima-se que 75% dos genes homólogos a doenças humanas estão conservados na *Drosophila*, além de vários mecanismos biológicos. Mesmo que o número de genes presente no genoma da mosca seja menor quando comparado ao de seres humanos, este compartilhamento facilita no seu entendimento e na execução de vários estudos (Calap-Quintana *et al.,* 2017).

A *Drosophila* possui um ciclo de vida curto e com diferentes estágios, somado ao fato de ter um baixo custo de manutenção, isso a coloca na frente de outros organismos modelo. (Ong, 2016). Dentre essas vantagens estão, possuir genótipo semelhante a organismos superiores e permitir a análise de fenótipos associados a mutações genéticas. Esse modelo facilita a avaliação do seu desenvolvimento e comportamento, de vias moleculares, possibilitando observar de perto a toxicidade de nanomateriais (Chifiriuc *et al.,* 2016).

Estudos mostraram que a *Drosophila melanogaster* é um ótimo aliado em estudo de toxicologia, com nanopartículas como ZnO ou $ZnCl_2$ (Alaraby *et a*l., 2015). Assim como ZnO dopado com Au, onde a *Drosophila* ajudou a esclarecer a biocompatibilidade desses nanocompósitos. (Oliveira *et al*., 2024). Outro estudo mostrou que a *Drosophila* foi um ajudante para determinar que a forma e a composição química dos nanomateriais podem induzir toxicidade, com a exposição a nanopartículas de Dióxido de Titânio (Alaraby;

Hernández; Marcos, 2021). O desenvolvimento larval de *Drosophila melanogaster* contém estágios larvais, L1 sendo o primeiro estágio larval, L2 o segundo estágio larval e L3 o terceiro estágio larval, a formação da pré-pupa e pupa, até o animal adulto, em uma temperatura de 25°C.

Figura 3 - Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.



Criado pelo autor com auxílio do BioRender.

Diante dos fatos apresentados, faz-se necessário uma avaliação sobre a biocompatibilidade deste nanocristal, a fim de esclarecer até que ponto as nanopartículas de Simonkolleite dopadas com ouro induzem toxicidade em *Drosophila melanogaster,* tanto no seu desenvolvimento, quando no comportamento, e se causará alterações no sistema antioxidante dos animais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade *in vivo* de SM puro e dopado com Ouro, utilizando *Drosophila melanogaster* como organismo modelo.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da exposição oral de SM puro e dopado com ouro no ciclo de vida de *D. melanogaster*;
- Avaliar os efeitos da exposição às nanopartículas de SM sobre a motilidade larval e adulta de *D. melanogaster*;
- Mensurar os efeitos de SM na atividade de enzimas antioxidantes de larvas de *D. melanogaster.*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das nanopartículas

As nanopartículas foram sintetizadas pelo Laboratório de Materiais Estratégicos (LME), coordenado pela Prof.ª Dr.ª Anielle Christine, do Instituto de Física, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

4.2 Manutenção dos animais

Os animais utilizados neste estudo foram mantidos no biotério do Laboratório de Análise *in vivo* da Toxicidade e Doenças Neurodegenerativas (LAVITOX), localizado no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL. As moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, da linhagem selvagem *Canton S*, permaneceram armazenadas em garrafas de plástico sob uma temperatura de 25°C, contendo aproximadamente 25 mL de meio padrão para *Drosophila*, que é feito a base de fubá (8,54%), ágar (0,47%), açúcar (2,46%), dextrose (4,93%), levedo de cerveja (1,49%), uma mistura de ácidos contendo ácido propiônico e ácido fosfórico (0,47%) e nipagin (0,53%), misturados em água destilada (81,06%) para cozimento.

4.3 Exposição às nanopartículas por via oral

Para a exposição via oral dos animais às nanopartículas, soluções estoque foram preparadas. As nanopartículas de Simonkolleite puro e dopados com 1% e 5% de ouro foram pesadas e feita uma solução estoque de cada com concentração de 4 mg/mL. Cada solução foi colocada em um sonicador por 1 hora toda vez que foi utilizada. As concentrações testadas foram:0,0 (Controle) ; 0,015; 0,030; 0,060; 0,120 mg/mL. Foi incluído também um controle positivo, utilizando o Imazapyr na concentração de 0,15 mg/mL.

O Imazapyr é um herbicida utilizado para o controle de várias pragas na agricultura. Tem sido usado no combate a ervas daninhas que são capazes de acabar com plantações, pois elas podem inibir o fluxo de água (Dugdale, 2020). Foi estabelecido que altas doses de Imazapyr causa toxicidade em *Drosophila* (Santos, F. R. A em preparação). Por isso, foi estabelecida uma concentração letal de 0,2 mg/mL do imazapyr comercial. Para este trabalho, utilizamos a concentração de 0,15 mg/mL, pois ela está abaixo da CL50 estabelecida pelo grupo de pesquisa do LAVITOX.

4.4 Avaliação da exposição às nanopartículas no desenvolvimento larval por via oral

Para o ensaio de desenvolvimento, que tem o objetivo avaliar a exposição por via oral das nanopartículas nos animais no período pós embrionário, larvas em estágio L1 (primeiro estágio) foram inseridas em frascos de vidro contendo o meio padrão para *Drosophila* juntamente com as respectivas concentrações citadas acima, somando 4 mL. Foram inseridas 30 larvas em cada frasco, com 6 replicatas por concentração para cada substância. O desenvolvimento dos animais foi acompanhado diariamente, contabilizando as pupas formadas nos frascos de meio contendo as NPs, comparando com o grupo controle, que se desenvolveu apenas em meio padrão.

4.5 Avaliação da exposição às nanopartículas no tempo de vida dos animais adultos

O *lifespan* consiste em analisar os impactos das nanopartículas quando os animais se alimentam delas desde a exposição até a morte. Animais com 3-5 dias de vida que se desenvolveram em garrafas apenas com meio padrão foram separados em macho e fêmea e colocados em frascos de vidro contendo somente meio padrão, para controle, ou meio acrescentado as NPs para as demais concentrações. Os animais eram trocados a cada 4 dias para novos frascos com comida e as NPs e suas mortes eram contabilizadas, até que não restasse nenhum animal vivo.

4.6 Avaliação da exposição às nanopartículas na motilidade larval

O ensaio de motilidade larval consiste em analisar os impactos das nanopartículas na motilidade das larvas em estágio de L3. Foram inseridas 20 larvas de primeiro estágio em cada frasco de vidro contendo meio padrão e nanopartícula, em 4 replicatas, pois o número mínimo de larvas para este experimento é 18. Para este experimento, foram escolhidas as concentrações de 0,015 e 0,120 mg/mL, pois, nos experimentos de desenvolvimento, as concentrações medianas (0,030 e 0,060 mg/mL) não demonstraram diferenças quando comparadas ao grupo controle, então foram escolhidas a menor e maior concentração para as análises com as larvas. As larvas se desenvolveram até o estágio de L3 (terceiro estágio) e foram coletadas com o auxílio de uma pinça, lavadas em PBS 1% e colocadas 5 por vez em um placa de petri contendo um meio à base de ágar, açúcar e corante azul turquesa para servir de contraste com a larva, isso ajuda na identificação no *software*, e assim um vídeo de 1 minuto e 30 segundos ser gravado, para posterior avaliação do trajeto percorrido pelo animal.

Para a avaliação deste experimento, foi realizada a metodologia de acordo com Brooks (2016), na qual é utilizado o plug-in *wrMTrck* imageJ na versão 1.8, que já é conhecido por ajudar a otimizar experimentos com nematódeos.

4.7 Avaliação da exposição às nanopartículas na motilidade adulta

O teste de motilidade adulta avalia a capacidade de escalada dos animais, levando em consideração seu comportamento habitual de geotaxia negativa de escalar o ambiente em que se encontra. Ele é utilizado por ser rápido e pela alta precisão em avaliar a locomoção dos animais (Nichols; Becnel; Pandey (2012). Nesse caso, foi observado se os animais ainda teriam esse comportamento, mesmo expostos à nanopartícula.

No experimento, foi utilizado um aparato constituído por duas provetas de mesma altura interligadas, nas quais foi demarcada, com auxílio de uma régua, uma linha de referência a 9,5 cm da base. Para a obtenção das imagens, um dispositivo móvel foi posicionado a uma distância adequada para cobrir completamente o campo de visão das provetas. As moscas, separadas por sexo (fêmeas em uma proveta e machos em outra), foram introduzidas no sistema experimental e submetidas a um período de adaptação de 1 minuto. Em seguida, foi iniciada a gravação com duração de 30 segundos. Imediatamente antes do início da escalada, as provetas foram golpeadas contra uma superfície rígida seis vezes consecutivas, com o objetivo de uniformizar a posição inicial dos animais no fundo do recipiente. A análise do desempenho locomotor foi realizada com base na contagem dos indivíduos que ultrapassaram a marca de 9,5 cm em um intervalo de 10 segundos.

4.8 Avaliação da exposição às nanopartículas sobre a atividade enzimática

4.8.1 Análises de balanço redox

Larvas de *Drosophila melanogaster* no estágio L1 foram transferidas para frascos de vidro contendo meio padrão suplementado com nanopartículas, nas concentrações de 0,015 mg/mL e 0,120 mg/mL. Após o desenvolvimento, as larvas foram coletadas no estágio L3 e transferidas para microtubos de 2 mL, sendo em seguida submetidas à criopreservação em nitrogênio líquido, foram colocadas de 20 a 25 larvas de *Drosophila* por microtubo, pesando 0,05mg. A homogeneização das amostras foi realizada utilizando um homogeneizador modelo Dlab D-160, para isto, foi colocado 500 uL de tampão, oriundo de duas soluções, a solução 1 feito com fosfato de sódio monobásico e a solução 2 com fosfato de sódio dibásico, após isso,

foi feito o tampão com a junção das duas soluções, ficando com pH 7,4. Os homogenatos foram então centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi cuidadosamente coletado e armazenado em ultrafreezer a –80 °C para posterior análise bioquímica.

4.8.2 Quantificação

Superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada conforme descrito por Madesh e Balasubramanian (1998), com base na capacidade da enzima em catalisar a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços. Os principais reagentes utilizados são o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) e o Pirogalol, as amostras foram colocadas em duplicata logo após o branco e o padrão. Após colocar as amostras na placa, ela ficou na estufa a 37° por 5 minutos. Logo após, foi pipetado uma quantidade de 15ul de DMSO (dimetilsulfóxido) para seguir com a leitura da absorbância, efetuada a 570 nm. A atividade enzimática foi expressa em unidades por miligrama de tecido (U/mg de tecido), sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a taxa de oxidação do pirogalol.

Atividade de Catalase (CAT):

A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com o protocolo descrito por Hadwan e Abed (2016), o qual se baseia na reação entre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o molibdato de amônio, resultando na formação de um complexo de coloração amarelada. A curva foi feita em diluição seriada com tampão de sódio e potássio, e em seguida foram colocadas as amostras em duplicata. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas a 405 nm, e os resultados expressos como unidades por miligrama de proteína (KU/mg de tecido). A concentração enzimática foi quantificada por meio de curva padrão obtida com diluições seriadas de H_2O_2 em tampão fosfato de sódio e potássio.

Quantificação de malondialdeído (MDA):

A quantificação do malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica, foi realizada segundo o método descrito por Buege e Aust (1978). O método baseia-se na formação de um complexo colorido entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico (TBA), cuja

absorbância foi mensurada a 535 nm em leitor de microplacas. Os reagentes foram colocados junto com as amostras em microtubos para serem levados para o banho maria a 90°C por 40 minutos, após esfriar, foi acrescentado o N-Butanol e as amostras foram agitadas, logo após as amostras foram colocadas na centrífuga por 5 minutos e pipetadas na placa. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteína.

Quantificação de Grupos Sulfidrila Totais (T-SH):

A dosagem dos grupos sulfidrila totais (T-SH) foi realizada utilizando o reagente 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato) (DTNB), conforme descrito por Aksenov *et al.* (2001). O DTNB reage com os grupos sulfidrila livres formando um complexo de coloração amarela. As amostras, preparadas em duplicata, foram incubadas com DTNB por 30 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. A absorbância foi lida a 412 nm em leitor de microplacas, sendo os resultados expressos em µmol de T-SH por mg de proteína.

4.9 Análises estatísticas

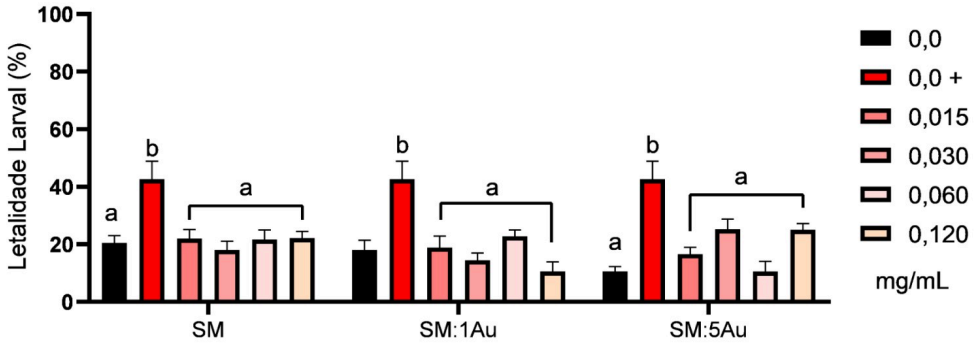
Para os resultados das taxas de letalidade larval, pupação, motilidade adulta e do estresse oxidativo, foi realizada uma análise de variância (TWO-WAY ANOVA), com o teste de Tukey para comparar as médias. As curvas sobre o percentual de sobrevivência foram geradas usando o teste de log-rank para avaliar a igualdade do grupo. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$, e os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas usando o *software* GraphPad Prism (versão 8.0, GraphPad Software).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do desenvolvimento larval após exposição por via oral às nanopartículas de SM puro e dopado com Au (1% e 5%)

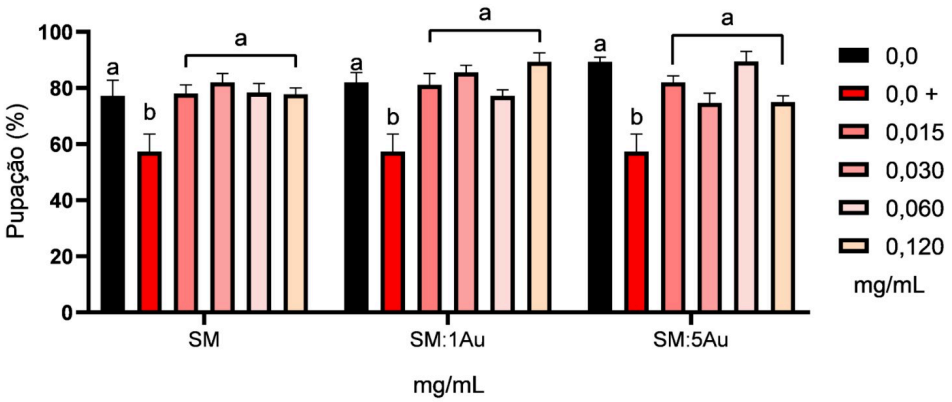
O desenvolvimento larval foi avaliado com base na porcentagem de larvas que atingiram o estágio de pupa ao final do período larval. As imagens apresentadas a seguir ilustram a porcentagem de letalidade larval (Figura 4), a taxa de pupação total (Figura 5) e a distribuição da pupação ao longo dos dias (Figura 6). As análises foram realizadas para diferentes grupos experimentais, incluindo larvas expostas a Simonkolleite puro e Simonkolleite dopado com ouro (Au) nas concentrações de 1% e 5%. Esta comparação entre os tratamentos foi mantida em todos os experimentos subsequentes, a fim de avaliar os efeitos do material e da dopagem com ouro sobre o desenvolvimento larval.

Figura 4 - Porcentagem de letalidade larval em *Drosophila melanogaster* exposta às nanopartículas de SM puro e dopado com Au (1% e 5%) por via oral.



O gráfico representa a proporção de larvas que não completaram o desenvolvimento após exposição às concentrações de 0,015; 0,030; 0,060 e 0,120 mg/mL das nanopartículas adicionadas ao meio padrão. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (meio padrão sem adição de nanopartículas). Em contrapartida, o grupo controle positivo, contendo imazapir adicionado ao meio padrão, apresentou toxicidade significativa, evidenciada por um aumento expressivo na letalidade larval. O símbolo (a) significa igualdade entre os grupos, enquanto (b) significa diferença.

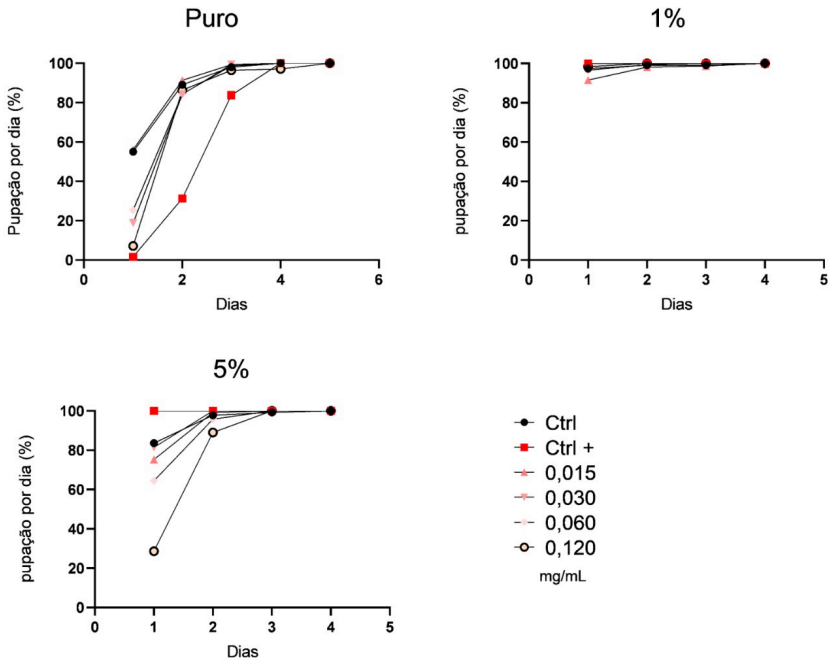
Figura 5 - Porcentagem de pupação em *Drosophila melanogaster* após exposição oral às nanopartículas de SM puro e dopado com Au (1% e 5%).



O gráfico apresenta a proporção de larvas que completaram a fase de pupação após exposição às nanopartículas nas concentrações de 0,015; 0,030; 0,060 e 0,120 mg/mL adicionadas ao meio padrão. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo controle negativo. O controle positivo, contendo imazapir, apresentou toxicidade significativa, evidenciada por uma redução acentuada na taxa de pupação. O símbolo (a) significa igualdade entre os grupos, enquanto (b) significa diferença.

Como mostrado nas figuras 4 e 5, apenas o controle positivo de imazapyr demonstrou toxicidade, demonstrando uma biocompatibilidade das nanopartículas nas concentrações testadas no desenvolvimento larval dos animais, pois, não se mostraram diferentes do grupo controle contendo apenas meio padrão. Os resultados obtidos estão em concordância com os dados de letalidade larval apresentados na Figura 4, uma vez que os parâmetros se complementam.

Figura 6 - Porcentagem diária de pupação de *Drosophila melanogaster* exposta às nanopartículas de SM puro e dopado com Au 1% e 5%.



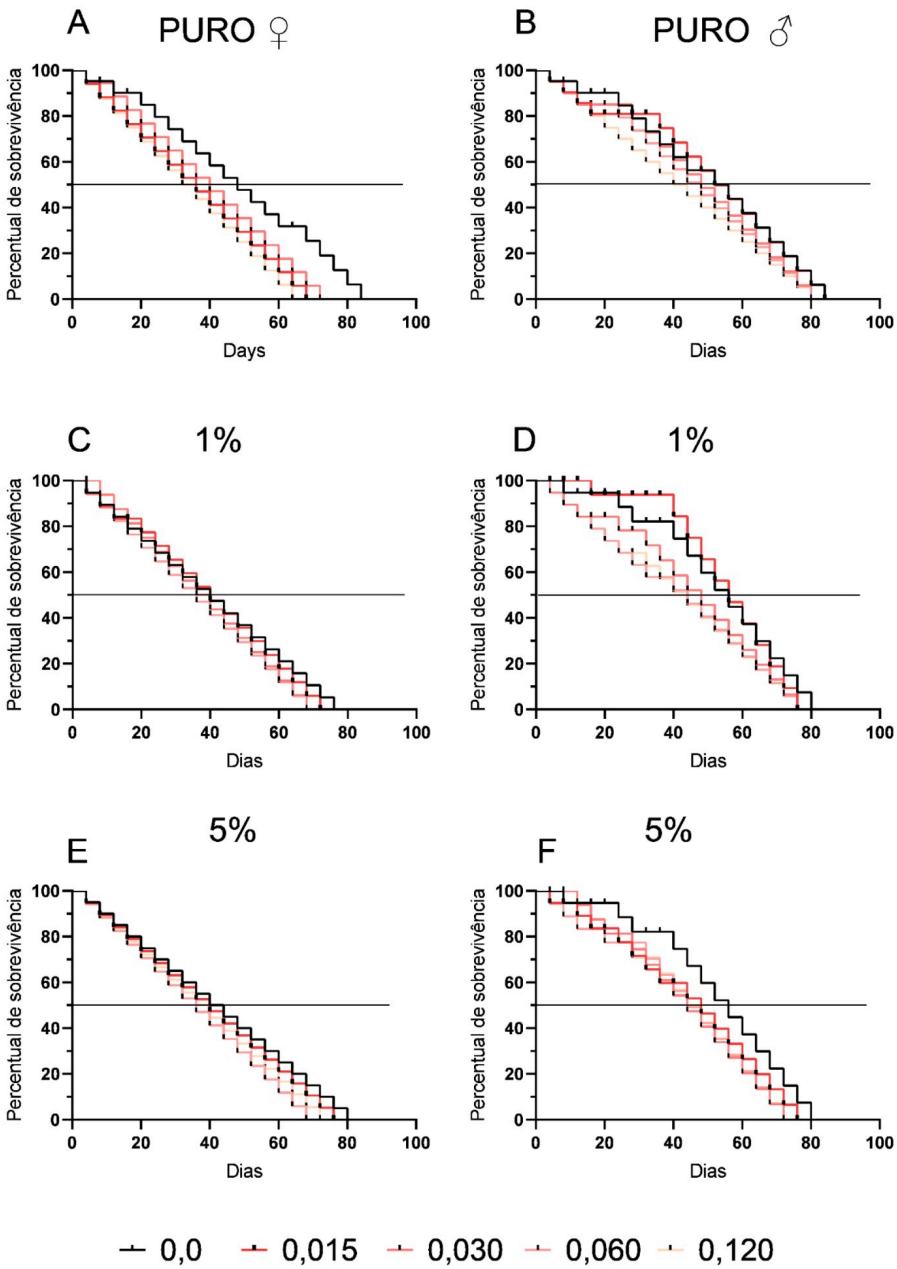
Os gráficos representam a distribuição percentual da pupação ao longo dos dias de desenvolvimento em resposta à exposição oral às nanopartículas de Simonkolleite (SM) em diferentes formulações: (A) SM puro, (B) SM dopado com 1% de ouro e (C) SM dopado com 5% de ouro. Na **figura A**, referente ao SM puro, a análise de regressão linear indicou uma diferença estatisticamente significativa na dinâmica de pupação ao longo dos dias ($P < 0,0001$). A **figura B** mostra os resultados para SM dopado com 1% de ouro. A regressão linear demonstrou significância estatística ($P < 0,0001$) nas concentrações de 0,0; 0,015; 0,030 e 0,060 mg/mL, bem como no controle positivo, indicando variações relevantes na taxa de pupação diária. Na **figura C**, que apresenta os dados referentes ao SM dopado com 5% de ouro, também foi observada significância estatística ($P < 0,0001$) entre os grupos experimentais, sugerindo que a concentração das nanopartículas impactou de forma expressiva o padrão temporal de pupação.

A distribuição da pupação por dia, apresentada na Figura 6, evidencia o comportamento temporal das larvas de *Drosophila melanogaster* frente à exposição às nanopartículas testadas. Na figura A, referente à exposição ao Simonkolleite puro, observa-se que todas as concentrações analisadas apresentaram formação de pupas já no primeiro dia de observação. Embora o número de pupas tenha variado entre os grupos, a ocorrência precoce do processo de pupação foi comum a todas as condições. A figura B, correspondente ao SM:1%Au, também demonstrou início da pupação no primeiro dia em todas as concentrações. Contudo, destaca-se a concentração de 0,030 mg/mL, que apresentou menor número de pupas formadas nesse período inicial, comparativamente às demais. Na figura C, relacionado ao material SM:5%Au, verifica-se um padrão distinto. A concentração de 0,120 mg/mL resultou em apenas 20% de pupas formadas no primeiro dia, enquanto as demais concentrações superaram 60% de pupação nesse mesmo intervalo. Oliveira *et al.*, 2025, em um estudo parecido com SM puro em diferentes tratamentos térmicos, mostrou que a concentração de 0,120 mg/mL mostrou um atraso nos primeiros dias na pupação geral dos animais. No nosso estudo, o SM não tem tratamento térmico, porém também mostrou um atraso nos primeiros dias da pupação de 0,120 mg/mL.

Apesar dessa diferença evidente, a análise estatística considerou apenas a porcentagem total de pupas formadas ao longo do período, o que impediu que essa variação influenciasse significativamente o resultado final.

5.2 Avaliação da exposição às nanopartículas no tempo de vida dos animais adultos

Figura 7 - Avaliação da toxicidade do SM puro e dopado com Au (1% e 5%) de ouro sobre a sobrevivência dos animais adultos



A exposição crônica dos animais às nanopartículas foi monitorada ao longo do tempo de vida, e a sobrevivência foi comparada entre os grupos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e as concentrações de SM nas concentrações de 0,015; 0,030; 0,060 e 0,120 mg/mL ($p > 0,05$).

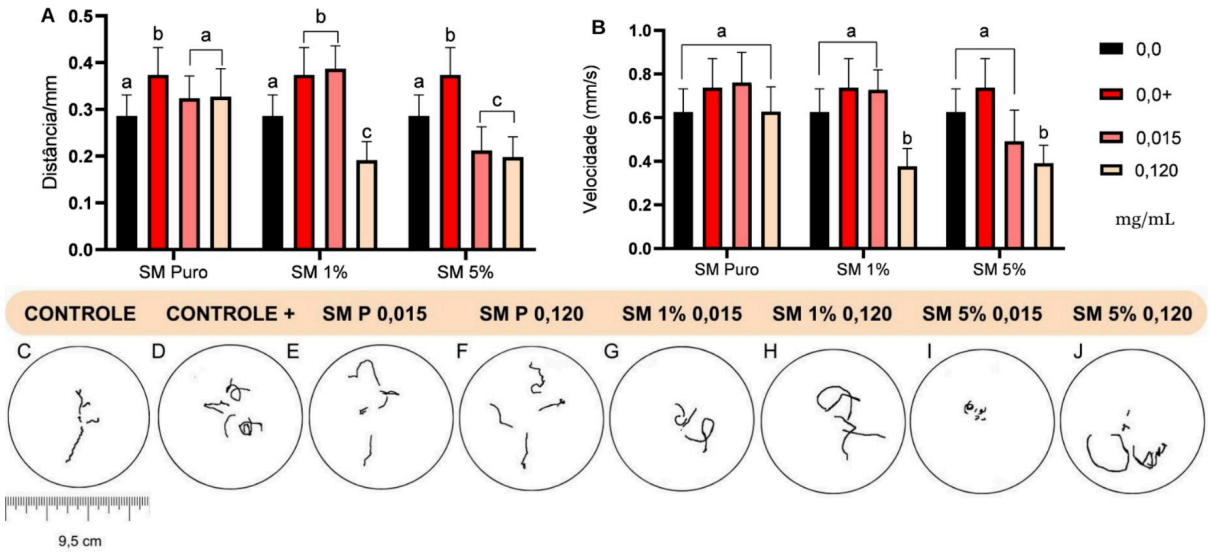
A análise do *lifespan* por exposição crônica foi realizada para avaliar o impacto da exposição prolongada aos nanomateriais sobre a sobrevivência dos animais adultos. Durante este experimento, foi possível monitorar a mortalidade dos animais ao longo do tempo. A exposição crônica ao SM puro (figura A e B) não resultou em diferenças na longevidade dos animais, quando comparados ao grupo controle, que foi mantido em meio padrão. Observou-se que a linha média, que representa o ponto de 50% de sobrevivência, foi similar em todas as concentrações avaliadas. De acordo com os gráficos apresentados (figura 7), os

animais em todas as condições experimentais, incluindo o grupo controle, apresentaram uma expectativa de vida variando entre 70 e 80 dias. A avaliação do *lifespan* por exposição crônica é uma ferramenta fundamental para a investigação dos efeitos a longo prazo de substâncias ou materiais em organismos vivos, especialmente no caso de nanopartículas, que podem ter interações complexas com organismos biológicos. Nesse contexto, a falta de diferença estatística entre o grupo controle e os grupos expostos ao SM puro sugere que a exposição crônica ao nanomaterial, nas condições testadas, não induziu alterações significativas na longevidade dos animais. Isso pode indicar que o SM puro, nas concentrações estudadas, não possui efeitos tóxicos agudos ou subcrônicos evidentes sobre a sobrevivência, pelo menos no intervalo de tempo avaliado. Além disso, o fato de a linha média de sobrevivência (50%) ter permanecido constante em todas as concentrações de SM sugere que a dose do nanomaterial não exerceu um efeito dependente de concentração sobre a mortalidade. Este comportamento poderia ser explicado pela ausência de toxicidade significativa nas doses administradas ou por mecanismos biológicos que não foram suficientemente estimulados pelas nanopartículas para afetar a sobrevivência de forma distinta. Vale ressaltar que a faixa de vida dos animais (70-80 dias) foi consistente entre o grupo controle e os grupos expostos, o que reforça a ideia de que a exposição crônica aos nanomateriais, nas condições experimentais, não comprometeu a saúde dos animais de maneira substancial. No entanto, para conclusões definitivas sobre os efeitos crônicos de SM, seria necessário estender a análise para avaliar possíveis efeitos subletais ou alterações em outros parâmetros fisiológicos e comportamentais dos animais ao longo do tempo.

5.3 Avaliação da exposição às nanopartículas de SM puro e dopado com 1% e 5% de Au na motilidade larval

O ensaio de motilidade larval tem como objetivo avaliar os efeitos da exposição a nanopartículas na motilidade das larvas de *Drosophila melanogaster*. A análise foi realizada utilizando o plug-in *wrMTrck* no software ImageJ, no qual vídeos das larvas são processados após a configuração dos parâmetros para reconhecimento das mesmas pelo programa, permitindo o rastreamento de seu trajeto. Embora existam outros métodos para monitorar o comportamento de rastejamento durante a fase larval de *Drosophila*, esses métodos podem ser demorados e laboriosos. O uso do *wrMTrck* facilita e torna o experimento mais eficiente (Brooks et al., 2017).

Figura 8 - Avaliação da motilidade larval de *Drosophila melanogaster* expostas as nanopartículas de SM puro e dopado com Au (1% e 5%).



A **figura A** representa a distância que os animais percorreram em mm, e a **figura B** representa a velocidade dos animais em mm/s. As figuras representadas em **C, D, E. F. G, H, I e J** mostram o trajeto percorrido pelos animais na placa que possui 9,5 cm de diâmetro. As letras na figura representam igualdade entre os grupos, (a) significa igualdade entre si, quando a barra está representada por (b) ou por (c), significa que elas são diferentes de a e diferentes entre si.

A figura 8 foi montada com os gráficos gerados pelo software GraphPad Prism (Figura A e B), com os trajetos das larvas que foram dados pelo software ImageJ (Figuras de C a J).

A figura A mostra a distância percorrida pelas larvas na placa de ágar. O controle positivo (Imazapyr) demonstrou uma distância percorrida maior em comparação ao controle, que consistia apenas no meio padrão. Observou-se uma diferença entre o controle com apenas meio padrão e o controle com Imazapyr na concentração de 0,015 mg/mL, onde as larvas do controle negativo mostraram um comportamento de rastejamento linear, realizando poucas curvas, como ilustrado na figura C. Em contraste, na figura D, as larvas do controle positivo apresentaram um comportamento anômalo, movendo-se em círculos, o que indica alterações na motilidade.

Nas concentrações de 0,015 mg/mL de nanopartículas de SM puro SM:1%Au, não foram observadas diferenças significativas quando comparadas ao grupo controle com meio padrão. No entanto, na mesma concentração de 0,015 mg/mL SM:5%Au, as larvas exibiram um comportamento similar ao observado no controle positivo, movendo-se em círculos

pequenos e em torno de seu próprio eixo, o que resultou em uma redução na distância percorrida. Na concentração de 0,120 mg/mL de SM puro, as larvas não apresentaram redução na distância percorrida, ao contrário das dos grupos com SM:1%Au e SM:5%Au, onde foi observada uma diminuição significativa na distância percorrida em relação ao controle.

Em relação à velocidade, a única concentração que causou uma redução foi a de 0,120 mg/mL, tanto para SM:1%Au e SM:5%Au, quando comparada ao grupo controle.

Os resultados indicam que, nas concentrações de 0,015 mg/mL de SM puro e SM dopado com SM:1%Au, a exposição não alterou a distância percorrida pelas larvas quando comparadas ao controle. Isso sugere que essas concentrações não induzem efeitos agudos na motilidade. No entanto, a dopagem de 5% de ouro no SM na mesma concentração provocou uma alteração comportamental, com as larvas mostrando movimentos circulares repetitivos, o que é uma indicação de disfunção motora. Esse comportamento é análogo ao observado com o controle positivo (Imazapyr), sugerindo que a maior concentração de ouro pode ter um efeito neurotóxico ou interferir de forma mais intensa no sistema nervoso das larvas.

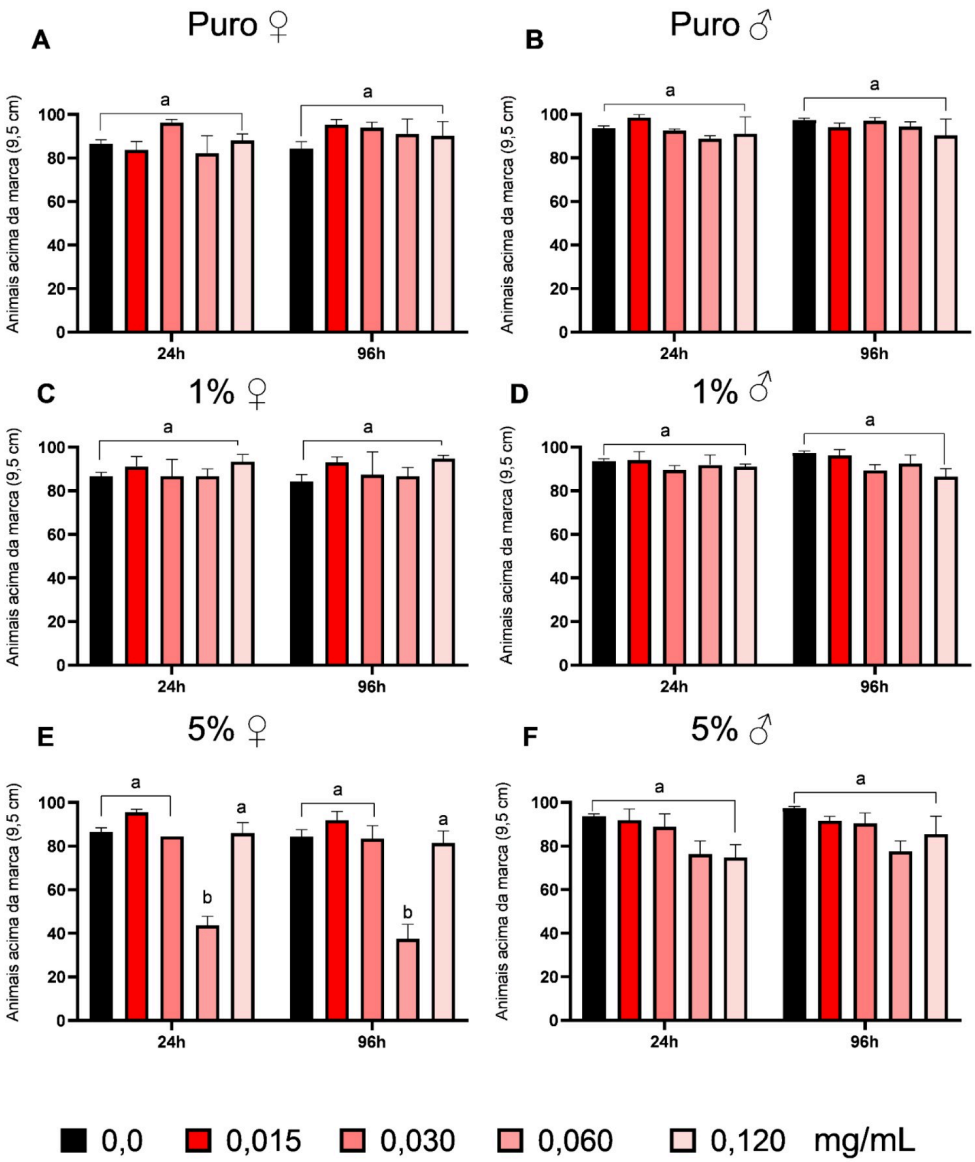
A análise da velocidade também revelou que SM:5%Au a concentração de 0,120 mg/mL foi capaz de reduzir a velocidade de locomoção das larvas, o que pode estar relacionado a uma resposta fisiológica ao estresse induzido pelas nanopartículas. A redução da distância percorrida nas concentrações mais altas de nanopartículas, especialmente em 5%, pode ser atribuída ao efeito disruptivo das partículas sobre o sistema neuromuscular das larvas, interferindo na coordenação motora e, consequentemente, no comportamento locomotor.

Esses achados sugerem que, embora algumas concentrações de SM dopado com ouro não apresentem efeitos notáveis sobre a motilidade das larvas, as nanopartículas com maior dopagem de ouro e concentrações mais altas podem induzir alterações motoras significativas. Esses resultados são importantes para entender os potenciais efeitos adversos de nanopartículas em organismos modelo, especialmente no que diz respeito a comportamentos locomotores que podem refletir disfunções neurológicas ou toxicológicas em níveis mais elevados de exposição.

5.4 Avaliação da exposição às nanopartículas de SM puro e dopado com Au (1% e 5%) no motilidade adulta

O experimento de motilidade adulta teve como objetivo avaliar o impacto da toxicidade das nanopartículas sobre a capacidade de escalada dos animais expostos. A geotaxia negativa em *Drosophila melanogaster* é amplamente estudada em modelos de distúrbios neurológicos, uma vez que doenças neurodegenerativas frequentemente afetam os neurônios responsáveis pela locomoção. Portanto, o ensaio de geotaxia negativa é uma ferramenta eficaz para avaliar como esses distúrbios afetam a motilidade dos animais (Cao et al., 2017).

Figura 9 - Avaliação da toxicidade na motilidade adulta de *Drosophila melanogaster* expostos às nanopartículas de SM puro e dopado com ouro (1% e 5%).



A motilidade foi quantificada com base na quantidade de animais que ultrapassaram a marca de 9,5 cm em 10 segundos. Nas **figuras (A) e (B)**, os dados de animais expostos a nanopartículas de SM puro indicam que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as exposições de 24h e 96h. Nas **figuras (C) e (D)**, referentes à exposição a SM dopado com 1% de Ouro, também não foram observadas diferenças estatísticas. Já nas **figuras (E) e (F),** com SM dopado com 5% de Ouro, observou-se que, no experimento realizado com fêmeas, a concentração de 0,015 mg/mL resultou em uma taxa de escalada significativamente menor em comparação com as demais concentrações e o controle. O símbolo (a) significa igualdade entre os grupos, e (b) significa os grupos que são diferentes de (a).

A análise foi baseada na capacidade dos animais de ultrapassarem uma linha demarcada a 9,5 cm. A figura 9 apresenta os resultados da geotaxia dos animais expostos a SM puro e SM dopado com ouro. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais, exceto no gráfico E, onde foi identificada uma redução na taxa de escalada das fêmeas expostas à concentração de 0,060 mg/mL, que foi inferior à observada nas demais concentrações.

Uma análise adicional foi realizada separando os grupos com base no tempo de exposição. Os resultados mostraram que as fêmeas expostas a SM:5%Au, na concentração de 0,060 mg/mL, apresentaram redução na capacidade de escalada, tanto após 24h quanto 96h de exposição, em comparação com as demais fêmeas do mesmo grupo.

O ensaio de geotaxia negativa realizado neste estudo oferece uma avaliação sensível dos efeitos da exposição crônica a nanopartículas sobre a motilidade de *Drosophila melanogaster*. A geotaxia negativa é uma resposta comportamental frequentemente associada a alterações no sistema nervoso, sendo uma ferramenta útil para investigar potenciais efeitos neurotóxicos. A incapacidade de detectar diferenças estatísticas significativas entre a maioria das concentrações de SM, tanto puro quanto dopado com ouro, sugere que, sob as condições experimentais utilizadas, essas nanopartículas não afetaram de maneira aguda a motilidade das larvas.

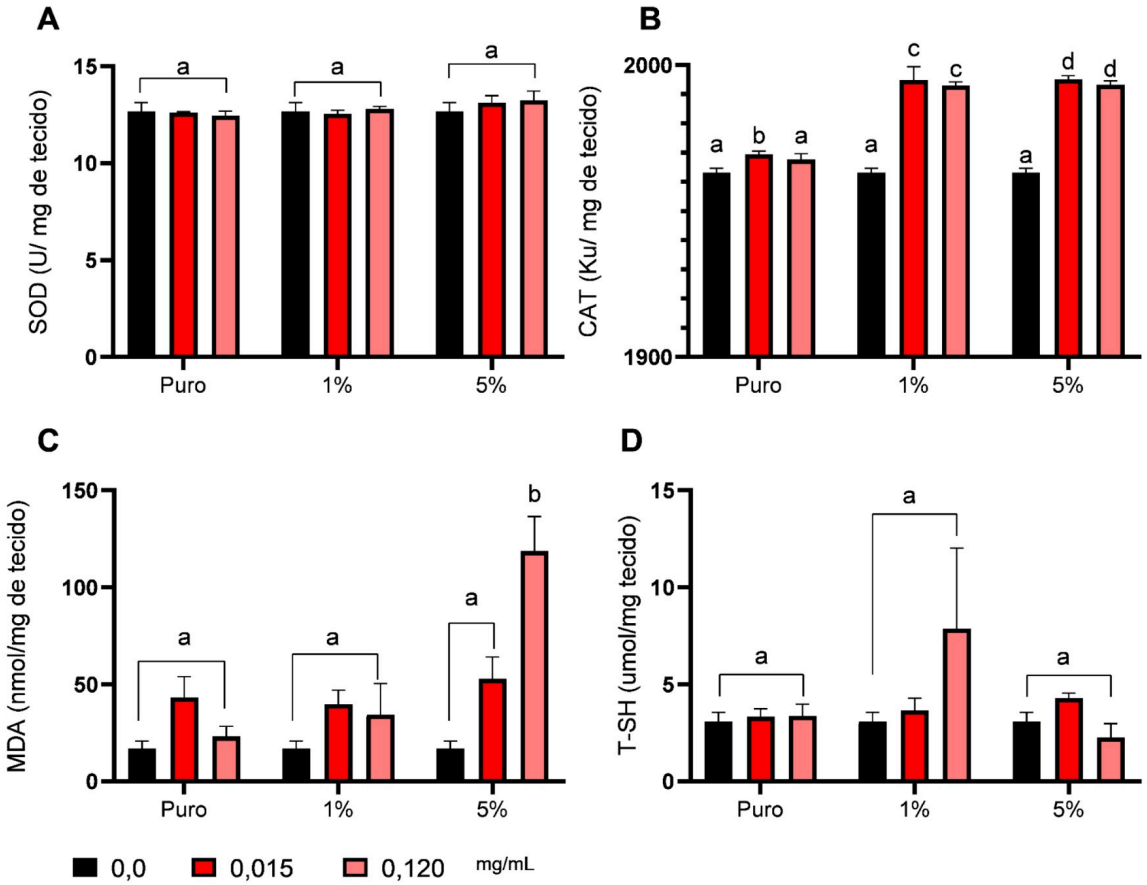
Entretanto, na figura E, foi observada uma redução na taxa de escalada das fêmeas expostas à concentração de 0,060 mg/mL, o que indica que, em determinadas condições de exposição, o SM pode interferir na capacidade locomotora. A redução observada pode refletir um efeito mais pronunciado das nanopartículas sobre os sistemas neuromusculares ou sobre a coordenação motora, embora outras explicações, como alterações fisiológicas específicas em resposta ao material, também possam ser relevantes.

Adicionalmente, a análise separada por tempo de exposição revelou uma diferença importante nas fêmeas expostas a SM:5%Au. Após 24h e 96h de exposição, essas fêmeas apresentaram redução na capacidade de escalada, particularmente na concentração de 0,060 mg/mL. Este achado sugere que o efeito das nanopartículas pode ser cumulativo e depender do tempo de exposição, com possíveis interações a nível celular e molecular que resultam em déficits motores observáveis em exposições prolongadas.

Esses resultados são importantes para entender o impacto das nanopartículas na função motora e, possivelmente, para o desenvolvimento de estratégias de avaliação e mitigação de riscos neurotóxicos relacionados ao uso de nanomateriais.

5.5 Análise enzimática de enzimas do sistema antioxidante após exposição às nanopartículas de SM puro e dopado com Au (1% e 5%)

Figura 10 -Avaliação da atividade enzimática em larvas de *Drosophila melanogaster* expostas às nanopartículas de SM puro e dopado com Au 1% e 5%).



Os gráficos apresentam as análises enzimáticas realizadas: a **figura A** mostra a quantificação da Superóxido Dismutase (SOD), a **figura B** representa a atividade da Catalase (CAT), a **figura C** ilustra os níveis de Malondialdeído (MDA) e a **figura D** exibe a quantificação dos tiois totais. O símbolo (a) significa igualdade entre os grupos, e (b) e (c) significam a diferença entre os grupos.

A figura A, é apresentada a quantificação de SOD, uma enzima crucial para a remoção do radical superóxido, um dos principais responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). Estas EROS são conhecidas por induzir danos celulares, e a SOD desempenha um papel vital na defesa contra esses danos (Fridovich *apud* Landis; Tower, 2005). No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle e as amostras expostas a SM puro ou dopado com 1% e 5% de ouro. Esses resultados sugerem que a SOD (figura A) não foi significativamente ativada nas condições experimentais testadas, indicando que não houve um aumento substancial na produção de superóxido ou uma resposta antioxidante significativa, pelo menos nas concentrações avaliadas.

Na figura B, é apresentado o comportamento de CAT, que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio, um subproduto da ação da SOD. Observou-se que na exposição a SM puro, a concentração de 0,015 mg/mL apresentou uma diferença significativa em relação ao controle, enquanto a concentração de 0,120 mg/mL não causou alterações significativas. Com a SM:1%Au, as concentrações de 0,015 mg/mL e 0,120 mg/mL também foram diferentes do controle, mas não diferiram entre si. O mesmo padrão foi observado nas amostras dopadas com 5% de ouro, com ambas as concentrações (0,015 mg/mL e 0,120 mg/mL) mostrando uma diferença significativa em relação ao controle.

As EROS são geradas como subprodutos de processos metabólicos normais, mas quando esses processos são desregulados, pode ocorrer estresse oxidativo. As enzimas antioxidantes, como a SOD e a catalase, são essenciais para defender as células contra os danos causados por EROS (Vitorovìc *et al*., 2021). O aumento da catalase nas concentrações de 0,015 e 0,0120 mg/mL sugere uma tentativa de neutralizar o peróxido de hidrogênio gerado pelo aumento das EROS. No entanto, a ausência de um aumento significativo na SOD (gráfico A) indica que essa resposta antioxidante pode ser mais limitada ou não suficientemente robusta para combater o estresse oxidativo de maneira eficaz.

A figura C mostra os dados sobre peroxidação lipídica, representada pelos níveis de malondialdeído (MDA), um subproduto da oxidação das membranas lipídicas induzida pelo estresse oxidativo. O aumento nos níveis de MDA está associado ao estresse oxidativo e pode indicar danos celulares. Observou-se que apenas a concentração de 0,120 mg/mL de SM:5%Au resultou em um aumento nos níveis de MDA em comparação aos outros grupos, sugerindo que essa concentração induziu maior estresse oxidativo, possivelmente devido à ativação de EROS ou à dificuldade na defesa antioxidante.

Na figura D, a quantificação dos tióis totais foi realizada, mas não foram observadas diferenças significativas entre as amostras e o controle. Isso sugere que, embora o estresse oxidativo tenha sido detectado nas amostras de SM:5%Au (como mostrado nos níveis de MDA), a quantidade de tióis totais não foi suficiente para indicar uma modulação importante dessa via antioxidante nas condições do experimento.

Os resultados obtidos revelam um quadro complexo de resposta antioxidante e estresse oxidativo nos animais expostos às nanopartículas de SM, tanto puro quanto dopado com ouro. A ausência de aumento significativo na atividade de SOD (figura A) sugere que

não houve um acúmulo substancial de superóxido, ou que o sistema antioxidante não foi suficientemente ativado nas concentrações e tempos de exposição avaliados. Em contrapartida, a catalase (CAT), que atua na degradação do peróxido de hidrogênio, apresentou um aumento significativo em algumas concentrações, especialmente nas amostras dopadas com 1% e 5% de ouro, o que pode indicar uma resposta compensatória a possíveis aumentos de peróxido de hidrogênio. Comparando esses resultados com um estudo de Silva *et al*., 2021, onde a dopagem com cobre em ZnO, foi capaz de diminuir a letalidade larval, e isso também teve efeito sobre o nível de enzimas antioxidantes, sugerindo que o metal de transição aumentou a biocompatibilidade de ZnO, quando comparado com ZnO puro. Isso não foi visto com SM, onde SM:5%Au não mostrou aumento na letalidade larval mas aumentou a presença de catalase na quantificação das enzimas antioxidantes, indicando que mesmo não causando letalidade, houve uma resposta aos níveis de peróxido de hidrogênio presente nas amostras.

O aumento do MDA nas amostras de SM:5%Au na concentração de 0,120 mg/mL (figura C) sugere que, apesar da atividade de CAT, os animais podem ter sofrido maior estresse oxidativo devido à geração de EROS, levando a danos nas membranas celulares. Esse estresse pode estar relacionado à capacidade limitada das enzimas antioxidantes em neutralizar completamente as espécies reativas, especialmente em condições de exposição prolongada às nanopartículas.

Finalmente, a quantificação de T-SH totais (figura D) não revelou diferenças significativas entre os grupos, o que pode indicar que, embora a peroxidação lipídica tenha ocorrido, a modulação do sistema de defesa antioxidante envolvendo T-SH não foi suficientemente alterada para ser detectada nas concentrações testadas.

Esses resultados reforçam a importância de considerar o equilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante do organismo, especialmente quando se trata de exposições a materiais nanométricos, que podem induzir estresse oxidativo e danos celulares, contribuindo para a toxicidade observada.

6.0 CONCLUSÃO

A exposição aos nanocristais de Simonkolleite, puros ou dopados com ouro, não afetou significativamente o desenvolvimento ou a longevidade de *Drosophila melanogaster*. No entanto, a dopagem com 5% de ouro, especialmente em concentrações mais altas, comprometeu a motilidade larval e adulta, sugerindo efeitos neurotóxicos. Alterações bioquímicas também foram observadas, com aumento da atividade de CAT e dos níveis de MDA, indicando estresse oxidativo. Esses resultados apontam que o SM dopado com ouro em concentrações mais elevadas pode causar toxicidade comportamental e bioquímica, exigindo estudos adicionais para avaliar sua segurança.

Perspectivas futuras:

- Avaliar os efeitos em exposições prolongadas, considerando outras vias de toxicidade e possíveis efeitos subletais.

- Explorar a interação entre o ouro e as células nervosas de *Drosophila melanogaster* para entender melhor os mecanismos moleculares que levam aos déficits motores observados.

- Testar diferentes modelos de exposição crônica para avaliar a toxicidade a longo prazo e a bioacumulação das nanopartículas no organismo.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, N.; SHAH, P. (EDS.). Toxicology of nanoparticles: Insights from *Drosophila*. 2020. ed. **Singapore, Singapore: Springer**, 2020.

ALARABY, M. *et al*. A comprehensive study of the harmful effects of ZnO nanoparticles using *Drosophila melanogaster* as an in vivo model. **Journal of hazardous materials**, v. 296, p. 166–174, 2015.

ALARABY, M.; HERNÁNDEZ, A.; MARCOS, R. Novel insights into biodegradation, interaction, internalization and impacts of high-aspect-ratio TiO2 nanomaterials: A systematic in vivo study using Drosophila melanogaster. **Journal of hazardous materials**, v. 409, n. 124474, p. 124474, 2021.

ASSIS, L M. *et al*. Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 99-109, 2012.

BAEG, GYEONG HUN *et al*. The use of *Drosophila melanogaster* as a model organism to study immune-nanotoxicity. 2018. **Nanotoxicology**, v 13, 2019.

BHATTACHARYA, P.; NEOGI, S. Antibacterialproperties of doped nanoparticles. **Reviews in chemical engineering**, v. 35, n. 7, p. 861–876, 2019.

BOVERHOF, D. R.; DAVID, R. M. Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 3, p. 953–961, 2010.

BROOKS, D. S. *et al*. Optimization of wrMTrck to monitor *Drosophila* larval locomotor activity. **Journal of insect physiology**, v. 93–94, p. 11–17, 2016.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In Methods in enzymology. **Academic press** v. 52, pp. 302-310, 1978.

CHIFIRIUC, M. C. *et al*. Drosophotoxicology: An emerging research area for assessing nanoparticles interaction with living organisms. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 2, p. 36, 2016.

DUGDALE, T. M. *et al*. Residues and dissipation of the herbicide imazapyr after operational use in irrigation water. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 7, p. 2421, 2020.

DURÁN, N. *et al*. NANOTOXICOLOGIA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA: TOXICIDADE EM ANIMAIS E HUMANOS. **Quimica nova**, v. 42, n. 2, p. 206–213, 2018.

EGBUNA, C. *et al*. Toxicity of nanoparticles in biomedical application: Nanotoxicology. **Journal of toxicology**, v. 2021, p. 9954443, 2021.

GANGULY, P.; BREEN, A.; PILLAI, S. C. Toxicity of nanomaterials: Exposure, pathways, assessment, and recent advances. **ACS biomaterials science & engineering**, v. 4, n. 7, p. 2237–2275, 2018.

HADWAN, Mahmoud Hussein; ABED, Hussein Najm. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. **Data in brief**, v. 6, p. 194-199, 2016.

HARPER, S. L. *et al*. Systematic evaluation of nanomaterial toxicity: Utility of standardized materials and rapid assays. **ACS nano**, v. 5, n. 6, p. 4688–4697, 2011.

HORIE, M.; TABEI, Y. Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. **Free radical research**, v. 55, n. 4, p. 331–342, 2021.

HUANG, Y.-W.; CAMBRE, M.; LEE, H.-J. The toxicity of nanoparticles depends on multiple molecular and physicochemical mechanisms. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 12, 2017.

LANDIS, G. N.; TOWER, J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. **Mechanisms of ageing and development**, v. 126, n. 3, p. 365–379, 2005.

LI, S. *et al*. Simonkolleite coating on poly(amino acids) to improve osteogenesis and suppress osteoclast formation in vitro. **Polymers**, v. 11, n. 9, p. 1505, 2019.

Madesh, M., & Balasubramanian, K. A. (1998). Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, *35*(3), 184-188.

MOMODU, D. Y. *et al*. Simonkolleite-graphene foam composites and their superior electrochemical performance. **Electrochimica acta**, v. 151, p. 591–598, 2015.

NG, C. T. *et al*. The use of *Drosophila melanogaster* a model organism to study immune-nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 13, n. 4, p. 429–446, 2019.

NICHOLS, C. D.; BECNEL, J.; PANDEY, U. B. Methods to assay *Drosophila* behavior. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 61, p. e3795, 2012.

ONG, C. et al. Drosophila melanogaster as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 3, p. 396–403, 2015.

OLIVEIRA, N. S.; SILVA, A. C. A.; TEBALDI, N. D. Simonkolleite nanoparticles for seed treatment and control of tomato bacterial spot caused by *Xanthomonas hortorum* pv. gardneri. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 47, p. e000623, 2023.

DE OLIVEIRA, J. M. *et al*. From nanocrystals and nanocomposites to microcrystals: The role of simonkolleite/ZnO in overcoming bacterial resistance and ensuring biocompatibility. **ACS omega**, 2025.

OLIVEIRA, J M *et al*. Tuning Biocompatibility and Bactericidal Efficacy as a Function of Doping of Gold in ZnO Nanocrystals. **ACS omega**, v. 9, n. 20, p. 21904–21916, 10 may2024.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Quimica nova**, v. 33, n. 2, p. 421–430, 2010.

RADAIC, A. *et al*. Como estudar interações entre nanopartículas e sistemas biológicos. **Quimica nova**, v. 39, n. 10, p. 1236–1244, 2016.

ROBERTS, D. B. *Drosophila melanogaster*: the model organism. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 121, n. 2, p. 93–103, 2006.

SANFELICE, R. C.; PAVINATTO, A.; CORRÊA, D. S. Introdução à Nanotecnologia. Em: **Nanotecnologia Aplicada a Polímeros**. [s.l.] Editora Blucher, 2022. p. 27–48.

SANTOS, F. R. A. *et al*. (em preparação). Sublethal Toxicity of the Herbicide Imazapyr: Impacts on Post-Embryonic Development and Redox Biology in *Drosophila melanogaster*.

SILVA, A. C. A. *et al.* Synergistic effect of simonkolleite with zinc oxide: Physico-chemical properties and cytotoxicity in breast cancer cells. **Materials chemistry and physics,** v. 266, n. 124548, p. 124548, 2021.

C.A. SILVA, A. *et al*. Transition metals doped nanocrystals: Synthesis, characterization, and applications. In: HAIDER, S.; HAIDER, A. (Eds.). **Transition Metal Compounds - Synthesis, Properties, and Application. London, England: IntechOpen**, 2021.

VITOROVIĆ, J. *et al*. Antioxidant activity of hemp (cannabis sativa L.) seed oil in *Drosophila melanogaster* larvae under non-stress and H2O2-induced oxidative stress conditions. **Antioxidants (Basel, Switzerland),** v. 10, n. 6, p. 830, 2021.

YENER, M. *et al*. Alterations in catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and malondialdehyde levels in serum and liver tissue under stress conditions. **İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi**, v. 0, n. 0, p. 0–0, 2024.