



## ESTUDO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE NIÓBIO

Juliana Rafaela Escouto Al Khateeb<sup>1</sup>

Raíne Fogliati De Carli ScharDOSim<sup>2</sup>

Ana Paula de Souza<sup>2</sup>

Allan Seeber<sup>3</sup>

Wladimir Hernandez Flores<sup>3</sup>

Maurício Lehmann<sup>4</sup>

Rafael Rodrigues Dihil<sup>5</sup>

**Resumo:** O nióbio é um elemento metálico e possui aplicação em produtos comerciais. Assim, é importante compreender o impacto das nanopartículas (NPs) de óxido de nióbio (NbO). Considerando a escassez de pesquisas sobre a toxicidade genética das NPs de NbO, este estudo avaliou a ação mutagênica *in vitro* de NPs de Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Pentóxido de Nióbio) no teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1). Os resultados demonstraram que estas NPs não induziram aumentos significativos na frequência de MN no tratamento de 4h. No tratamento de 24h foi observado aumento significativo na concentração de 53 µg/mL. A mutagenicidade das NPs de NbO, está, provavelmente, associada a indução de estresse oxidativo.

**Palavras-chaves:** Nanotoxicologia, Teste de Micronúcleos, Mutagênese, Nióbio.

**Abstract:** Niobium is a metallic element and has application in commercial products. Thus, it is important to understand the impact of niobium oxide (NbO) nanoparticles (NPs). Considering the lack of research on the genetic toxicity of NbO NPs, this study assessed the *in vitro* mutagenic action of Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> NPs (Niobium Pentoxide) in the cytokinesis block micronucleus test in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1). The results showed that these NPs did not induce significant increases in the frequency of MN in the 4h treatment. In the 24h treatment, a significant increase in the concentration of 53 µg / mL was observed. The mutagenicity of NbO NPs is probably associated with the induction of oxidative stress.

**Keywords:** Nanotoxicology; Micronucleus test; Mutagenesis; Niobium.

---

<sup>1</sup> Acadêmica do curso de Ciências Biológicas/ULBRA - Bolsista PIBIC/CNPq

<sup>2</sup> Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – PPGBiosauúde/ULBRA

<sup>3</sup> Professor no Laboratório de Materiais Nanoestruturados – Departamento de Engenharia e Energias Renováveis da Universidade Federal dos Pampas, Campus Bagé – RS (UNIPAMPA)

<sup>4</sup> Professor do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária e do PPGBiosauúde/ULBRA

<sup>5</sup> Professor Orientador dos cursos de Ciências Biológicas, Biomedicina e Farmácia e do PPGBiosauúde e PPGOdonto (rafael.rodriques@ulbra.br)

## Introdução

Os avanços recentes na nanotecnologia, com uma crescente injeção de investimento na indústria, têm conduzido ao desenvolvimento de numerosas formulações de nanopartículas (NPs) projetadas e avaliadas nos últimos anos para o diagnóstico e aplicações terapêuticas, para a confecção dos plásticos em geral, roupas, cosméticos, eletrodomésticos, remédios, artigos esportivos, acessórios para automóveis e até mesmo em alimentos (YETISGIN et al., 2020; ALPHANDÉRY, 2020; SARAVANAN et al., 2021). As NPs possuem propriedades intrínsecas que influenciam na sua biodistribuição, eliminação e acumulação (LOURO et al., 2013; BAETKE et al., 2015).

O risco dessas NPs alcançarem os diferentes compartimentos ambientais (atmosfera, águas e solo) e se tornarem disponíveis é muito grande e deve ser considerado. Além disso, muitos nanoparticulados que estão atualmente em uso são produzidos com metais de transição, silício, carbono e óxidos metálicos, sendo altamente tóxicos. A preocupação com relação à toxicidade das NPs reside principalmente no fato de que elas nunca foram produzidas e utilizadas em produtos comerciais em tão larga escala. A tecnologia emergente pode produzir agentes que interferem de forma indesejável com a saúde humana (PASCHOALINO et al., 2010; FARIA et al., 2013).

Materiais contendo nióbio (Nb) ganharam destaque nas últimas décadas devido às suas especiais aplicações nas indústrias de alta tecnologia, especialmente nos setores aeroespaciais, com as superligas metálicas, e de eletroeletrônicos, em que são amplamente utilizados como microcapacitores. A utilização insubstituível desses materiais nos setores faz do Nb um elemento crucial para o desenvolvimento industrial nas próximas décadas, sendo definido oficialmente como matéria-prima para as indústrias da União Européia e dos Estados Unidos (LOPES et al. 2015). Os óxidos de Nb existem em diferentes estequiometrias, como, por exemplo, pentóxido de Nb ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ), dióxido de Nb ( $\text{NbO}_2$ ) e monóxido de Nb ( $\text{NbO}$ ) (LOPES et al. 2015). O pentóxido de Nb ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ) geralmente é utilizado para a produção de outros componentes tais como: cloreto de Nb ( $\text{NbCl}_5$ ), carboreto de Nb ( $\text{NbC}$ ), ou niobato de lítio ( $\text{LiNbO}_3$ ) (SILVA, 2001).

Estudos previamente publicados na literatura científica revelaram a citotoxicidade e a genotoxicidade de diferentes tipos e formas de NPs metálicas (JEEVANANDAM et al., 2019; CAMBRE et al., 2020; WANG et al., 2020; AHAMED et al., 2020). As NPs metálicas podem penetrar nas células e em certos casos nas membranas nucleares, tendo acesso potencial à cromatina em todos os estágios do ciclo celular. Adicionalmente, existe a possibilidade de danos diretos devido à interação com a molécula de DNA ou por vias indiretas, como, por exemplo, danos oxidativos (resposta celular à presença das NPs) ou por efeito secundário (inflamação induzida), levando à morte celular (apoptose e necrose) (COLLINS et al., 2017; TENG et al., 2017).

Dessa forma, considerando a escassez de pesquisas sobre a toxicidade

genética das NPs de NbO, este estudo avaliou a ação mutagênica *in vitro* de NPs de Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Pentóxido de Nióbio) no teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN) em linhagem não tumoral de ovário de hamster Chinês (CHO-K1). O ensaio CBMN tem sido frequentemente empregado, uma vez que apresenta algumas vantagens como a facilidade na identificação das células binucleadas portadoras de micronúcleos (MN), o que torna o teste mais sensível e acurado. A análise de micronúcleos é usada como padrão de mutações cromossômicas em organismos eucarióticos, sendo, portanto, utilizada na detecção de agentes aneugênicos e/ou clastogênicos (FENECH, 2007).

## **Metodologia**

### **Nanopartícula de Óxido de Nióbio (NbO)**

A síntese de NPs de NbO foi realizada usando matérias-primas de grau reagente sem qualquer purificação adicional, a metodologia foi realizada conforme Meneses et al. (2007). O colágeno (2,5 g) foi dissolvido em água (40 ml) (Milli-Q) em uma placa de aquecimento a 45°C com agitação vigorosa durante um período de 30 min. Niobato oxalato de amônio hidratado [NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>NbO (C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O] (1 g) foi adicionado gradualmente à solução e a mistura foi agitada durante 20 minutos. A solução foi seca a 60°C por 48h, recozida por 3h a 250°C e triturada. O pó foi recozido por 6h a 450°C e 550°C para obter as NPs cristalinas. A morfologia e a distribuição de tamanho das partículas das amostras foram estimadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando um JEOL JEM-1200 EXII, e as análises das imagens foram feitas por meio do software ImageJ 1.46r.

### **Cultivo celular e tratamento**

As células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> em meio DMEM, com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina em uma incubadora (ThermoFisher) com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para a realização dos experimentos as células foram transferidas para uma placa de cultivo celular com 24 poços. Em cada poço foram adicionadas aproximadamente 100.000 células, e após 24 horas, diferentes concentrações de NPs de NbO (6,5 – 53 µg/mL) foram adicionadas, da mesma forma que o controle positivo (Bleomicina - 3 µg/mL) e o controle negativo (água destilada). As concentrações de NPs de Nb foram definidas com base em ensaios de viabilidade celular (dados não mostrados), sendo que todas as concentrações utilizadas apresentaram viabilidade superior a 85%.

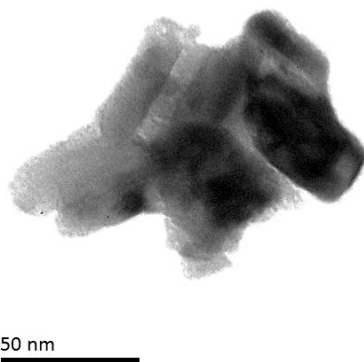
### **Teste de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese (CBMN)**

O teste CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2007) com poucas modificações. Para a avaliação da ação mutagênica das NPs de NbO foram realizados

dois experimentos independentes em duplicata, em dois tempos de tratamento, 4 e 24h. Após os períodos de exposição, as células foram lavadas e então foi adicionada citocalasina B (Cit-B), por mais 24h. Após este estágio, as células foram coletadas, coradas e analisadas em microscópio óptico com um aumento de 400x. A comparação estatística foi realizada por meio da análise da variância (one-way ANOVA) com teste post hoc de Dunnett com significância estatística  $P < 0,05$ . Foram analisadas 1000 células binucleadas por tratamento e verificadas com relação a presença de micronúcleos (MN).

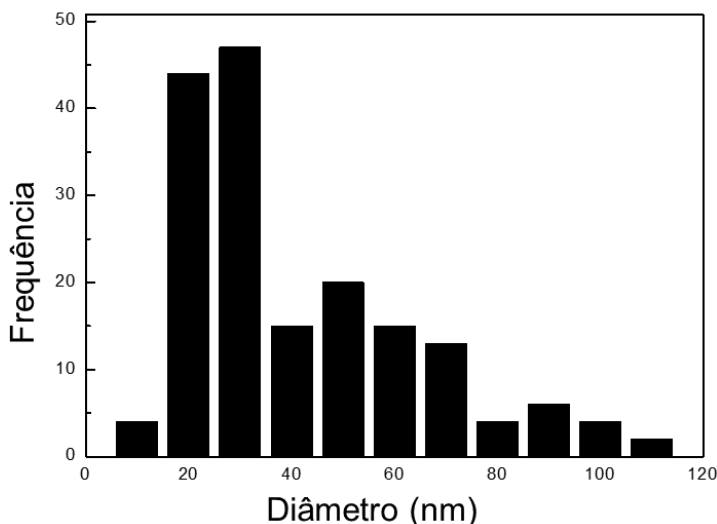
## Resultados e Discussão

As imagens MET da amostra mostram aglomerados de partículas densas e distribuição de tamanho de partícula para 174 partículas desenhadas aleatoriamente (Figura 1).



**Figura 1:** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) da NP de NbO.

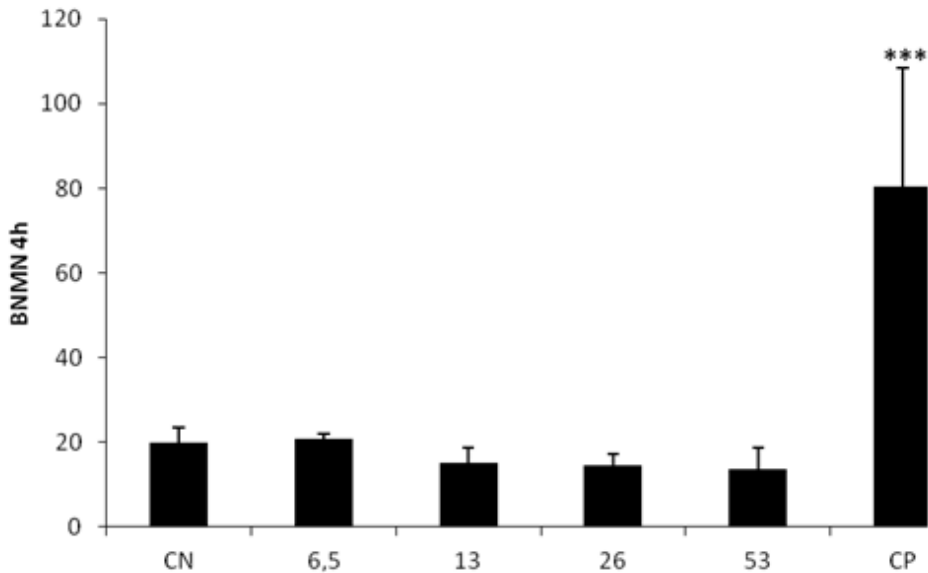
O diagrama mostra que o tamanho das partículas varia de 5 a 110 nm, predominando partículas entre 10 e 70 nm e tamanho médio de  $41,49 \pm 26,30$  nm (Figura 2).



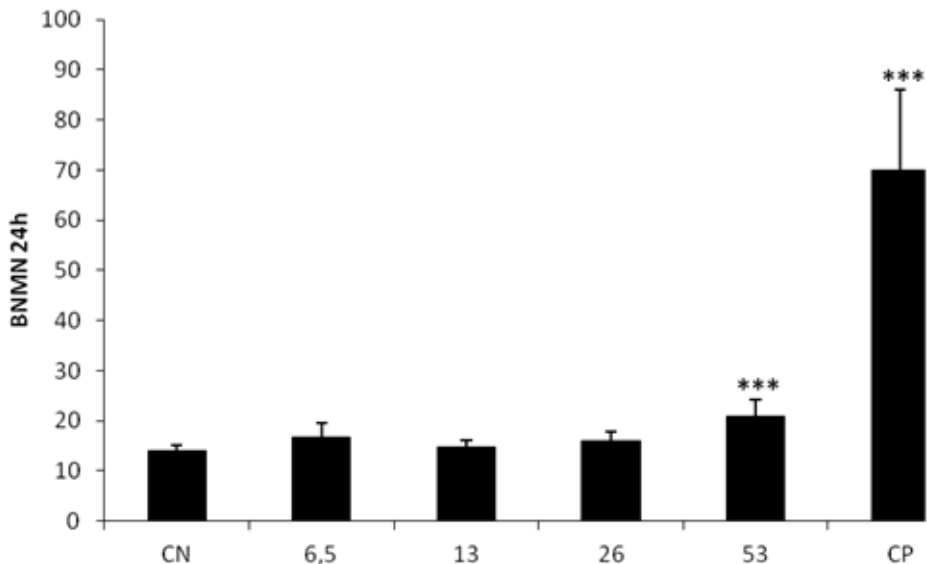
**Figura 2:** Histograma de distribuição de tamanho das partículas.

A atividade mutagênica das NPs de NbO foi avaliada no teste CBMN em células CHO-K1. As células CHO-K1 não têm a capacidade de metabolização, mas são de fácil crescimento e manipulação. Somado a isso, é uma linhagem celular amplamente utilizada e recomendada para a investigação da toxicidade genética de diferentes compostos (AARDEMA et al., 2006; OECD, 2016).

Os resultados do ensaio CBMN demonstraram que as NPs de NbO não induziram aumentos significativos na frequência de MN, no tratamento de 4 h (Figura 3). Por outro lado, no tratamento de 24 h foi observado um aumento significativo na frequência de MN nas células expostas à concentração de 53  $\mu\text{g/mL}$  de NP de NbO (Figura 4).



**Figura 3:** Frequência de MNs após tratamento (4 h) das células CHO-K1 com as NPs de NbO, fração cristalina (6,5 – 53 µg/mL). CN= Controle Negativo (água destilada). CP= Bleomicina (3 µg/mL). One-way ANOVA e teste post-hoc de Dunnett. \*\*\*P< 0,001.



**Figura 4:** Frequência de MNs após tratamento (24 h) das células CHO-K1 com as NPs de NbO, fração cristalina (6,5 – 53 µg/mL). CN= Controle Negativo (água destilada). CP= Bleomicina (3 µg/mL). One-way ANOVA e teste post-hoc de Dunnett. \*\*\*P< 0,001.

O único estudo realizado até o momento com NPs de NbO foi desenvolvido por Mestieri et al. (2017) que avaliaram a citotoxicidade de cimento à base de silicato de cálcio (Cimento Portland branco) associado com nanopartículas de óxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ) através do ensaio MTT e exclusão pelo azul de tripan em células da polpa dentária humana (hDPCs), células do folículo dentário humano (hDFCs), células osteoblásticas humanas (Saos-2) e células do ligamento periodontal de ratos (mPDL). Esse material, nos testes avaliados, não apresentou citotoxicidade e as linhagens celulares estudadas apresentaram resposta semelhante na avaliação da citotoxicidade. Entretanto, não foram identificados, na literatura científica, estudos direcionados à investigação da toxicidade genética das NPs de NbO.

Os resultados deste estudo indicaram que as NPs de NbO são mutagênicas *in vitro*, em altas concentrações, após 24 h de tratamento. Embora os mecanismos relacionados a ação biológica das NPs de NbO não tenham sido elucidados, a indução de estresse oxidativo, por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) parece ser o principal mecanismo responsável pela atividade mutagênica destas NPs. De fato, estudos com outras NPs metálicas, como NPs de níquel, demonstraram um aumento significativo dos níveis de EROs em células A549 (LATVALA et al., 2016; KARLSSON et al., 2014; CAPASSO et al., 2014; LU et al., 2015), assim como o aumento da expressão de genes relacionados ao estresse genotóxico (PIETRUSKA et al., 2011; HORIE et al., 2011).

A indução de EROs por NPs metálicas pode causar, direta ou indiretamente, alterações importantes em macromoléculas biológicas (HUSSAIN et al., 2005; GALLEGO et al., 2007). A produção de EROs está diretamente correlacionada com quebras de fitas do DNA, que poderia explicar a formação de MN no teste CBMN. De fato, MN é uma pequena massa nuclear, delimitada por uma membrana e separada do núcleo principal. É resultante de um efeito clastogênico (quebra cromossômica), quando há fragmentos de cromossomos acêntricos, que não são incorporados no núcleo das células-filhas ou por um efeito aneugênico (perda cromossômica), quando cromossomos inteiros são excluídos do núcleo principal das células-filhas por não completarem sua correta migração durante a divisão celular (FENECH, 2007).

## Conclusão

Ainda que a indução de MN tenha sido restrita à maior concentração das NPs de NbO, no tratamento de 24 h, os resultados apontam para a ação mutagênica destas NPs. Estudos adicionais com NPs de NbO, focados na avaliação de outros parâmetros genéticos, são fundamentais para a caracterização do perfil genotóxico destas NPs e para a avaliação do risco de exposição ao NbO no ambiente.

## Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

## Referências

AARDEMA M, et al. SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test: III. Using CHO cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 607, n. 1, p. 61-87, 2006.

AHAMED, et al. TiO<sub>2</sub> nanoparticles potentiated the cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis response of cadmium in two different human cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 10, p. 10425-10435, 2020.

ALPHANDÉRY, E. Natural metallic nanoparticles for application in nanoncology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4412, 2020.

BAETKE, SC; LAMMERS, T; KIESSLING, F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. **Brazilian Journal of Radiology**, v. 88, 20150207, 2015.

CAMBRE, MH. et al. Cytotoxicity of NiO and Ni(OH)<sub>2</sub> nanoparticles is mediated by oxidative stress-induced cell death and suppression of cell proliferation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2355, 2020.

CAPASSO, L; CAMATINI, M; GUALTIERI, M. Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. **Toxicology Letters**, v. 226, n. 1, p. 28-34, 2014.

COLLINS, A; EL YAMANI, N; DUSINSKA, M. Sensitive detection of DNA oxidation damage induced by nanomaterials. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, p. 69-76, 2017.

FARIA, ME. et al. Nanotecnologia e meio ambiente: uma análise sobre os riscos e benefícios dessa tecnologia em um contexto atual. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 9, p. 18-26, 2013.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**. 2007; 2: 1084-1104.

GALLEGO, A. et al. Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. **Chemosphere**, v. 68, n. 4, p. 647-661, 2007.

HORIE, M. et al. Evaluation of acute oxidative stress induced by NiO nanoparticles in vivo and in vitro. **Journal of Occupational Health**, p. 1101050162-1101050162, 2011.



HUSSAIN, SM. et al. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **Toxicology in vitro**, v. 19, n. 7, p. 975-983, 2005

JEEVANANDAM, J. et al. Cytotoxicity analysis of morphologically different sol-gel-synthesized MgO nanoparticles and their in vitro insulin resistance reversal ability in adipose cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 4, p. 1385-1410, 2020.

KARLSSON, H. et al. Mechanism-based genotoxicity screening of metal oxide nanoparticles using the ToxTracker panel of reporter cell lines. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2014.

LATVALA, S. et al. ROS generation and toxicity of Ni and NiO micro-and nanoparticles. **PloS One**, v. 11, n. 7, p. e0159684, 2016.

LIMA, JMG. Relatório Técnico 20–Perfil da Mineração do Nióbio. **Projeto de Assistência Técnica ao setor de Energia, Ministério de Minas e Energia–MME**, 2010

LOPES, OF. Óxidos de nióbio: uma visão sobre a síntese do Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e sua aplicação em fotocatalise heterogênea. **Química Nova**, v. 38, n. 1, p. 106-117, 2015.

LOURO, H; BORGES, T; SILVA MJ. Nanomateriais manufaturados: novos desafios para a saúde pública. **Revista Portuguesa de Saúde Publica**, v. 31, p. 188-200, 2013.

LU, S. et al. Comparison of cellular toxicity caused by ambient ultrafine particles and engineered metal oxide nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2015

MENESES, CT; FLORES, WH; SASAKI, JM. Direct observation of the formation of nanoparticles by in situ time-resolved X-ray absorption spectroscopy. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 5, p. 1024-1027, 2007.

MESTIERI, LB. et al. Cytotoxicity and bioactivity of calcium silicate cements combined with niobium oxide in different cell lines. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, n. 1, p. 65-71, 2017.

OECD. Guideline for the testing of chemicals: in vitro mammalian cell micronucleus test. 2016.

PASCHOALINO, MP; MARCONE, GPS; JARDIM, WF. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, p. 421-30, 2010.

PIETRUSKA, J. et al. Bioavailability, intracellular mobilization of nickel, and HIF-1 $\alpha$  activation in human lung epithelial cells exposed to metallic nickel and nickel oxide nanoparticles. **Toxicological Sciences**, v. 124, n. 1, p. 138-148, 2011.

SARAVANAN, A. et al. A review on biosynthesis of metal nanoparticles and its environmental applications. **Chemosphere**, p. 128580, 2020.

SILVA, CS. Nióbio. **Balanço Mineral Brasileiro**, 2001.

TENG, CT. 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, 2017.

WANG, C. et al. Study on cytotoxicity, cellular uptake and elimination of rare-earth-doped upconversion nanoparticles in human hepatocellular carcinoma cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, p. 110951, 2020

YETISGIN, AA. et al. Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2193, 2020.