



EVIDÊNCIAS DE DANO OXIDATIVO INDUZIDO POR NANOCOMPOSTOS DE CARBONO (FULERENO) EM CARPA (*CYPRINUS CARPIO*, CYPRINIDAE)

Britto, R.S¹

Ferreira, J.L.R.^{1,2}; Barros, D.M.^{1,2}; Fillmann, G.¹; J.M. Monserrat^{1,2}

1 Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Carreiros, Av. Itália km 8 s/n, Rio Grande, RS, Brasil. 2 Programa de Pós Graduação em Fisiologia Animal Comparada-Fisiologia Animal Comparada, FURG
Email: socoowski@vetorial.net

INTRODUÇÃO

A produção mundial de nanocompostos tem aumentado exponencialmente nos últimos anos em função de suas variadas aplicações tecnológicas. Devido a sua grande relação superfície/volume, esses compostos vêm sendo empregados como catalisadores, como agentes liberadores de fármacos e como protetores solares e cosméticos. Os nanomateriais têm sido definidos como materiais que possuem pelo menos uma dimensão com medidas dentro da faixa de 1 a 100 nm (Oberdörster, 2004).

Porém, há uma extrema carência de informações dos possíveis efeitos tóxicos que possam exercer no meio ambiente, o que levou ao desenvolvimento da nanotoxicologia, um ramo do conhecimento científico que objetiva a análise de possíveis efeitos deletérios de nanomateriais em organismos vivos. (Oberdörster *et al.*, 005). De fato existem evidências indicando que nanocompostos com titânio, utilizadas na formulação de protetores solares, podem gerar espécies ativas de oxigênio (EAO) quando iluminadas (Colvin, 2003).

Por definição um organismo encontra - se em estresse oxidativo quando há um desequilíbrio entre a concentração de pró - oxidantes (substâncias geradoras de EAO) e antioxidantes (defesas enzimáticas e não enzimáticas) em favor dos primeiros, com possibilidade de induzir efeitos deletérios em macromoléculas (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O risco ambiental destes produtos pode existir como consequência do seu crescente uso e demanda, se os devidos cuidados não forem tomados com seu destino, a água é um ambiente onde muitas destas substâncias podem exercer efeitos deletérios. O fulereno (C60) é um nanocomposto orgânico que pode se associar em agregados coloidais e induzir efeitos tóxicos. Por exemplo, no trabalho de Oberdörster (2004) foi observado um aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica cerebral, indicando que compostos como o fulereno podem se acumular em tecidos ricos em lipídios como o cérebro e induzir estresse oxidativo.

OBJETIVOS

Avaliar a periculosidade do nanocomposto de carbono fulereno (C60) em diferentes extratos de tecido do peixe de água doce, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae).

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das soluções de fulereno

A preparação da solução aquosa de fulereno foi realizada de acordo ao protocolo de Zhu *et al.*, (2006). Uma solução de 200 mg de fulereno (SES Research; pureza: 99,9%) foi diluída em 1 l de água MilliQ e mantida sob agitação e iluminação constante durante 2 meses, promovendo a formação de agregados de fulereno de 10 a 200 nm, denominados nC60. Esta solução foi logo filtrada com filtros de 0,45 μ m e 0,20 μ m . As concentrações de fulereno foram determinadas a partir do conteúdo total de carbono, utilizando um analisador de carbono (TOC - V CPH, Shimadzu). Foram utilizadas frações da solução com três tamanhos de partícula: sem filtração; fração filtrada por membrana de 0,45 μ m e a fração filtrada em seqüência por membrana de 0,45 μ m e de 0,20 μ m.

Exposição in vitro ao fulereno

Carpas (*Cyprinus carpio* , Cyprinidae) adultas foram crioadestesiadas em gelo e mortas por secção da medula espinhal. As brânquias e cérebro imediatamente dissecados e homogeneizados em KCl 1,15%. Esses órgãos foram expostos durante 1, 2 e 4 h a 1 mg C60/L, de acordo com Oberdörster (2004). A cada tempo de exposição foram extraídas alíquotas para dosagem de dano oxidativo lipídico. Como controle positivo foi utilizada uma solução de Fe3+ em uma concentração final de 100 μ M.

Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação de lipídios foi determinada pelo método TBARS de acordo com Oakes e Van der Kraak (2003). Este método envolve a reação do malondialdeído (MDA), um produto de degradação de lipídios peroxidados, com o ácido

tiobarbitúrico (TBA) sob condições de alta temperatura e acidez, gerando um cromógeno quantificado por fluorometria (excitação: 515 nm; emissão: 553 nm). As alíquotas foram incubadas a 95^o C por 30 minutos com hidroxitolueno butilado (BHT) 35 μM, SDS 8,1%, ácido acético 20% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8%. Após ser adicionado o n - butanol, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 10 minutos à 15^oC. Como composto padrão foi utilizado tetrametoxipropano (ACROS Organics).

Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos nas diferentes dosagens foram comparados através do teste de ANOVA para amostras independentes, comparando - se as médias dos grupos amostrados, utilizando - se o teste de Newman - Keuls e/ou contrastes ortogonais. Foi utilizado um nível de significação de 5%.

RESULTADOS

As respostas encontradas em extratos de cérebro e brânquias em termos de peroxidação lipídica medida em termos de TBARS mostraram que no cérebro houve um aumento nos grupos expostos ao fulereno e o mesmo resultado foi registrado para os extratos de brânquias.

Tanto em cérebro quanto em brânquias, na segunda hora de exposição, houve uma diferença significativa entre o controle e o tratamento com fulereno ($p < 0,05$). Porém na primeira hora e na quarta não foram constatadas diferenças significativas de peroxidação lipídica entre os diferentes tratamentos ($p > 0,05$).

A possibilidade de nanocompostos como o fulereno, de se acumular e induzir estresse oxidativo no cérebro possui grandes implicações em termos de saúde pública. Este órgão é um dos mais suscetíveis a sofrer dano oxidativo devido a sua alta atividade metabólica, e pela grande quantidade de ácidos graxos poli - insaturados nas membranas celulares e que podem sofrer oxidação (Packer *et al.*, 1997; Cardozo - Pelaez *et al.*, 2000; Qiao *et al.*, 2004).

Trabalhos como o de Sayes *et al.*, (2005) claramente indicam que a citotoxicidade do fulereno é induzida por peroxidação lipídica em três tipos celulares (fibroblastos, hepatoma e astrócitos), sendo que este efeito foi revertido na presença de antioxidantes como ácido ascórbico.

CONCLUSÃO

O nanocomposto fulereno induz dano oxidativo por lipoperoxidação, podendo afetar significativamente órgãos como cérebro e brânquias da carpa (*Cyprinus carpio*, Cyprinidae), além de sugerir um potencial efeito ecotoxicológico desse composto.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica a R.S. Britto e apoio financeiro outorgado a G.Fillmann.

REFERÊNCIAS

- Colvin V.K. (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterial. *Nature Biotechnology* 21: 1166 - 1170.
- Halliwell B., Gutteridge J.M. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York.
- Oakes K.D., Van Der Kraak G.L. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63: 447 - 463.
- Oberdörster E. (2004). Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile *Environmental Health Perspectives* 112: 1058 - 1062.
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 113: 823 - 839.
- Packer L., Tritschler H.J., Wessel K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alfa - lipoic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 22: 359 - 378.
- Sayes C.M., Gobin A.M., Ausman K.D., Mendez J., West J.L., Colvin V.L. (2005). Nano - C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials* 26: 7587 - 7595.
- Zhu, S., Oberdörster E., Haasch M. (2006). Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow. *Mar. Environ. Res.*, 62: S5 - S9.