

ECOTOX - BRASIL

Ecotoxicol. Environ. Contam., v. 8, n. 1, 2013, 13-19
doi: 10.5132/eec.2013.01.002

EEC

Efeito Mutagênico do Edetato de Cobre ($[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$) Livre e Nanoencapsulado em Camundongos e Peixes

A.C. JACOBOWSKI^{1*}, N.N. ZOBIOLE¹, P.M. PADILHA², S.E. MORENO¹ & E.J. ARRUDA³

¹ PPG/Biotecnologia, UCDB, Campo Grande, MS, Brasil.

² Instituto de BioCiências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

³ Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia/Química, UFGD, Dourados, MS, Brasil.

(Received July 07, 2010; Accept July 29, 2011)

Resumo

Estudos recentes demonstram que o cobre complexado com o ácido etilenodiaminotetracético, ($[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$), apresenta letalidade sobre larvas de *Aedes aegypti*. Este composto pode ter uma liberação lenta e gradativa quando complexado em nanocápsulas de goma/gelatina/quitosana, o que pode limitar sua toxicidade para o ambiente. No entanto, a genotoxicidade do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ ainda não está totalmente elucidada. Para avaliar o potencial mutagênico do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$, analisamos a frequência de micronúcleos no sangue periférico de camundongos e peixes submetidos a $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ livre e nanoencapsulado. A carcaça dos peixes foi avaliada por espectrometria de massa para quantificar o cobre tecidual. Em camundongos a frequência de micronúcleos nos animais expostos ao $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ na forma livre foi significativamente maior em relação aos animais submetidos à forma nanoencapsulada. Em peixes, somente o $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ livre foi capaz de induzir aumento na frequência de micronúcleos. A análise espectrométrica demonstrou acúmulo de íons cobre no fígado nos grupos de peixes estudados, com diferença significativa em relação ao grupo controle. Nas brânquias dos peixes não foram observadas diferenças na concentração de cobre entre os grupos e ainda, o conteúdo de cobre foi significativamente menor em relação ao encontrado no fígado. Os resultados sugerem que o $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ livre pode induzir efeitos mutagênicos em mamíferos, porém o nanoencapsulamento parece conferir maior segurança ao produto devido a sua liberação mais lenta.

Palavras-chave: Camundongos; Edetato de Cobre; Mutagenicidade; Nanocápsulas; Peixes; Teste do Micronúcleo.

The mutagenic effect of the free and nanoencapsulated Cooper edetate in mice and fish

Abstract

Recent studies show that copper complexes with ethylenediaminetetraacetic acid ($[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$), is lethal for *Aedes aegypti* larvae. This compound may have a controlled release when nanocapsules complex in gum/gelatin/chitosan, which may limit their toxicity to the environment. However, the genotoxicity of $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ is not fully elucidated. To assess the mutagenic potential of $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$, we analyzed the frequency of micronuclei in peripheral blood of mice and fish subjected to free and nanoencapsulated $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$. The carcass of the fish was assessed by mass spectrometry to measure tissue copper. In mice, the frequency of micronuclei in animals exposed to free $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ was significantly higher in the animals submitted to the nanoencapsulated form. In fish, only the free $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ was able to induce increased frequency of micronuclei. Mass spectrometric analysis showed copper accumulation in the fish's liver studied, with significant difference in the control. In the gills of fish were not observed differences in copper concentration between the groups and the copper content was significantly lower than that found in the liver. The results suggest that free $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ can induce mutagenic effects in mammals, but the nanoencapsulated seems to give more security to the product due to its slower release.

Keywords: Copper edetate; Fish; Micronucleus Test; Mouse; Mutagenicity; Nanocapsules.

*Corresponding author: Ana Cristina Jacobowski, e-mail: anacristinaj@gmail.com

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é uma condição biológica de desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e pré-oxidantes prevalecendo a ação deletéria de espécies reativas de oxigênio (ERO) tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o oxigênio singlete (O_2), que podem causar danos à estrutura de biomoléculas como DNA, lipídios, carboidratos e proteínas. Metais de transição como os íons Cu^{+2} atuam em ciclo redox produzindo espécies reativas de oxigênio (Stohs & Bagchi, 1995). Esses metais em altas concentrações no solo ou meio aquático constituem um grave problema ambiental, devido aos seus efeitos deletérios, como alta toxicidade, capacidade de bioacumulação e potencialidade de induzir danos ao material genético (genotoxicidade e mutagenicidade) (Prá *et al.*, 2006; Sánchez-Chardi *et al.*, 2008).

Assim como outros animais, insetos aquáticos ou de fase larval aquática e seus ovos são sensíveis a metais de transição, pois estes alteram a embriogênese, o desenvolvimento larval e a pupação, causando alterações na dinâmica da eclosão, locomoção, postura e acasalamento (Hare, 1992). Rayms-Keller *et al.* (1998) demonstraram que a concentração letal (CL90) para larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti* é de 64 $mg L^{-1}$ após 24 horas de exposição aos íons cobre, Cu^{+2} . Estudos recentes demonstraram que o íon cobre, quando complexado com o ácido etilendiaminotetracético (EDTA) para formar o íon complexo $[Cu(EDTA)]^{2-}$, apresenta letalidade sobre larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti*, cuja CL90, é de 127,5 $mg L^{-1}$ (concentração de íon cobre equivalente a 12,8 $mg L^{-1}$) (Arruda *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de formulações que permitam a liberação controlada de substâncias químicas em sítios específicos, visando maior eficácia e diminuição de efeitos tóxicos, tem recebido grande atenção nos últimos anos. Nesse sentido, a nanotecnologia oferece recursos para ampla aplicação tecnológica principalmente na indústria farmacêutica e na indústria de nanomateriais. As nanocápsulas são partículas coloidais poliméricas com tamanho inferior a 1 μm , utilizadas como carreadores de substâncias químicas e que utilizam membranas biodegradáveis, inertes e estáveis, como quitosana e gelatina (Middleton & Tripton, 1998). A principal vantagem das nanocápsulas é a capacidade de modificar a penetração nas células das substâncias a elas associadas. Um fator que parece favorecer o processo de internalização é a carga de superfície da quitosana que compõe a nanocápsula. Harush-Frenkel *et al.* (2007) mostraram que a carga positiva de um encapsulante é responsável por conferir maior absorção do produto por uma via mediada pela proteína clatrina.

Sendo o $[Cu(EDTA)]^{2-}$ um candidato potencial para o controle de insetos vetores, é necessário que se conheça o potencial efeito genotóxico frente a animais que possam entrar em contato com o produto. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito mutagênico induzido em células do sangue periférico de peixes e camundongos após exposição a diferentes concentrações de $[Cu(EDTA)]^{2-}$ na forma livre e nanoencapsulada por meio do teste de micronúcleos. Um

ensaio complementar de espectrometria de massa atômica foi realizado nos órgãos dos peixes para quantificar a deposição do cobre em diferentes tecidos biológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos com camundongos e peixes foram realizados de acordo com as práticas internacionais para uso e cuidado com animais e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UCDB (protocolo n.º 019/2008).

Animais Experimentais

Camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* pesando entre 24 e 33 g, com idade entre 7 e 9 semanas, foram obtidos do biotério da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande, MS. Antes dos testes, os camundongos foram aclimatados por 7 dias em condições controladas ($22 \pm 2^\circ C$, $60 \pm 10\%$ de umidade e fotoperíodo de 12 h claro/escuro), recebendo ração e água *ad libitum*. Após o período de aclimação, foram agrupados randomicamente e identificados como grupos controle e teste.

Foram utilizados peixes da espécie *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), obtidos comercialmente, com idade aproximada de 3 semanas, peso corporal médio de $69,5 \pm 8g$ e comprimento médio de $17,2 \pm 1,1cm$. Os animais foram aclimatados por 6 dias em aquários com água natural desclorificada com temperatura controlada de $23 \pm 1^\circ C$, aeração constante e pH $6,93 \pm 0,13$. Durante este período foram alimentados a cada 48 horas com ração comercial peletizada, sendo esta suspensa 24 horas antes do início do experimento. Após aclimação, os peixes foram divididos em três aquários ($7g$ peixe L^{-1}), mantidos com água natural constantemente aerada, desclorificada, em temperatura controlada de $23 \pm 1^\circ C$ e pH $6,98 \pm 0,11$, determinado duas vezes ao dia em analisador de pH de bancada QUIMIS.

Síntese do $[Cu(EDTA)]^{2-}$

O íon complexo $[Cu(EDTA)]^{2-}$ foi obtido a partir de reação de complexação do sulfato de cobre pentahidratado, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Vetec Química Fina, RJ, Brasil) e sal tetrassódio de EDTA Na_4EDTA (Trilon B, BASF) na relação molar de 1:1 com ajuste da solução para pH 6,5, onde 100 $mg L^{-1}$ de $[Cu(EDTA)]^{2-}$ contem 10 $mg L^{-1}$ de íon Cu^{2+} . O $[Cu(EDTA)]^{2-}$ livre foi disponibilizado na forma de pó.

Síntese das nanocápsulas com $[Cu(EDTA)]^{2-}$

Foram utilizadas nanocápsulas revestidas com goma/gelatina/quitosana. O processo de um íon metálico complexado com uma molécula carreadora (nanoencapsulamento) é uma metodologia inovadora. O processo de encapsulamento para obtenção das nanocápsulas com o íon complexo $[Cu(EDTA)]^{2-}$ encontra-se sob solicitação do processo de patente e foi realizado em cooperação com a empresa Mikron Microcapsules Ltda., São Paulo, Brasil. As cápsulas foram elaboradas de forma a conter

50% m/m de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ incluso e 50% m/m dos polímeros utilizados. Vale ressaltar que 375 mg L^{-1} de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ em nanocápsulas corresponde a 10 mg L^{-1} de íon Cu^{+2} . As nanocápsulas foram disponibilizadas em veículo gelatinoso. As nanocápsulas de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ apresentam diâmetro entre 240 e 250 nm, são instáveis e se coalescem devido ao movimento browniano para formação de agregados, pois não foram reticuladas para não afetar os experimentos, uma vez que o agente reticulante é o aldeído. A distribuição de tamanho das partículas foi determinada por difração a laser (Laser Scattering Spectrometer Mastersizer S, modelo MAM 5005 - Malvern Instruments Ltd., U.K), em água com ultrassom acoplado ao equipamento para aumentar a dispersibilidade da amostra. As leituras das amostras foram obtidas a temperatura de $20 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ no intervalo de 0,05 a 900 micra. O espectro de curva gaussiana polidispersa no intervalo de 0,1 a 20 micra foi obtido para nanocápsulas recém preparadas. Após 180 dias uma nova leitura mostrou distribuição no intervalo de 10 a 900 micra.

Delineamento Experimental

As concentrações do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre e nanoencapsulado empregadas nos ensaios foram baseadas no trabalho de Arruda *et al.* (2010), que demonstraram que $127,5 \text{ mg L}^{-1}$ de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre apresenta efeito letal (CL_{90}) sobre larvas de *A. aegypti*. Determinamos então 100 mg L^{-1} de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre como a menor dose a ser testada em nossos ensaios. Para determinação das concentrações do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ nanoencapsulado, levamos em consideração a quantidade de íons Cu^{+2} presentes nos compostos. Considerando que 100 mg L^{-1} do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre contem 10 mg L^{-1} de íon Cu^{+2} e que 375 mg L^{-1} de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ nanoencapsulado apresenta a mesma quantidade desse íon, essas concentrações foram adotadas no trabalho, fornecendo aos animais experimentais a mesma quantidade de Cu^{+2} . Visando avaliar o efeito de concentrações acima daquelas indicadas no controle de vetores, foram empregadas doses 10 vezes maiores de cada composto nos ensaios com camundongos.

Dez grupos de cinco camundongos foram usados nos experimentos. Quatro grupos foram submetidos ao tratamento por gavagem ($0,1 \text{ mL } 10 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal) com administração única de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre (100 e 1000 mg L^{-1}) e $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ em nanocápsulas (375 e 3750 mg L^{-1}) ambos diluídos em água. Após 72 horas da administração dos compostos foi realizada a avaliação da frequência de micronúcleos.

Outros quatro grupos foram expostos aos mesmos compostos, nas mesmas concentrações, os quais foram colocados nos bebedouros e fornecidos à vontade (*ad libitum*) aos animais durante 72 horas. O grupo controle positivo recebeu ciclofosfamida (CP; 50 mg Kg^{-1} i.p) diluída em água destilada, 72 horas antes da avaliação da frequência de micronúcleos, enquanto o controle negativo recebeu apenas água. Para os ensaios, $10 \mu\text{L}$ de sangue foram coletados da veia caudal dos camundongos de todos os grupos, para confecção dos esfregaços e análise da frequência de micronúcleos.

Para os experimentos em peixes, três aquários, com seis animais em cada um, receberam respectivamente: solução aquosa de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre (100 mg L^{-1}), solução aquosa de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ nanoencapsulado (375 mg L^{-1}) e apenas água (controle negativo) em ambiente estático por 72 horas. Durante o experimento, os peixes permaneceram em jejum. Após esse período, os peixes foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e imediatamente se fez a coleta de amostra de sangue por meio de punção cardíaca. Em seguida, a medula espinhal foi seccionada e realizada a retirada de brânquias e fígado, os quais, juntamente com o restante da carcaça foram imediatamente pesados, identificados e congelados em ultra-freezer (-80°C) e depois em nitrogênio líquido para o processo de liofilização e quantificação do conteúdo de cobre por espectrometria de absorção atômica.

Teste do micronúcleo

O teste de micronúcleos foi realizado em sangue periférico de acordo com Schmid, 1973 e Heddle, 1973. Os esfregaços, tanto de camundongos quanto de peixes, foram fixados em etanol 80% por 10 minutos e corados com Giemsa 10%. Duas lâminas foram preparadas para cada animal e codificadas para análise às cegas. Quatro mil eritrócitos policromáticos foram contados para cada exemplar. As lâminas foram analisadas em aumento de 1.000 x com óleo de imersão em microscópio ótico (Nikon Eclipse-200). Os dados foram expressos como frequência de micronúcleos por 1.000 células.

Determinação de Cu^{+2} na água, órgãos e carcaças dos peixes

Depois de congeladas, as amostras de fígado, brânquias e carcaças (cabeça, músculos, demais vísceras e ossos) dos peixes foram colocadas em câmara de liofilização para sublimação da água por 48 horas. A cada 8 horas, as amostras foram pesadas e recongeladas em nitrogênio líquido até obtenção de massa constante e então foram acondicionadas em frascos de vidro lacrados para análise espectrofotométrica de absorção atômica. Amostras em triplicatas de águas dos aquários (30 mL) foram recolhidas após 24, 48 e 72 horas do experimento e também passaram pelo mesmo processo de liofilização antes de serem encaminhadas para espectrometria, segundo Vandhoe *et al.*, 1989.

Após o término da liofilização, as amostras foram levadas à placa quente a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ em capela para a digestão ácida com adição 2 mL de HNO_3 ultrapuro e concentrado e 2 mL de água oxigenada a 30% e aquecidas até a clarificação. O material digerido foi filtrado em papel de filtro quantitativo e avolumado com água deionizada até o volume final de 25 mL. A concentração dos metais foi determinada por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) e forno de grafite (GFAAS). As quantificações por absorção atômica foram obtidos no equipamento SHIMADZU, modelo AA 6800 do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu-SP. As medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra e soluções padrão. Os cálculos do conteúdo dos metais nas

amostras liofilizadas foram baseados na reta de calibração obtida a partir das soluções padrão.

Análise estatística

As análises estatísticas foram executadas pelo programa GraphPad Prism 5.0. Os valores estão expressos como média \pm desvio-padrão. Os dados foram comparados entre os efeitos dos produtos com concentrações diferentes e as diferentes formas de exposição pelo teste Anova de uma via e pós teste de Bonferroni. Para as análises foi considerado um erro de tipo I de 0,05 ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

A avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos de camundongos expostos ao $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre e nanoencapsulado foi realizado 24, 48 e 72 horas após os tratamentos. Nossos resultados demonstram que, após 24 horas dos tratamentos, a frequência de micronúcleos foi maior nos grupos tratados em relação aos animais controle, com aumento após 48 h e mantendo-se constante após 72 h. Em todos os tempos analisados a frequência de micronúcleos apresentou padrão similar, onde os grupos tratados com $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre e nanoencapsulado apresentaram maior número de micronúcleos em relação ao grupo não tratado. Do mesmo modo, em todos os tempos, o $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre foi capaz de induzir maior frequência de micronúcleos em relação ao composto nanoencapsulado (dados não mostrados). Diante desses resultados, os demais experimentos foram conduzidos após 72 horas do tratamento com o $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre e nanoencapsulado.

Nossos resultados demonstram que a frequência de micronúcleos em camundongos, avaliada após 72 horas de exposição aos compostos, foi maior nos grupos tratados com $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ em relação ao grupo controle (Fig. 1), porém apenas no grupo tratado com $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre administrado por gavagem foi observado efeito mutagênico dose-dependente ($p < 0,025$). A frequência média de micronúcleos encontrados no grupo controle positivo foi de $5,0 \pm 0,87$ para cada 1000 eritrócitos analisados. Estes valores mostram a validação dos experimentos.

A forma encapsulada do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ apresentou menor efeito mutagênico que a forma livre, em todos os grupos tratados. Não foram observadas diferenças entre os grupos de animais tratados com a forma nanoencapsulada, ao contrário do que se observou nas formas livres, onde 100 mg L^{-1} de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ por gavagem induziu menor frequência de micronúcleos que 100 mg L^{-1} *ad libitum* e menor que 1000 mg L^{-1} por gavagem e *ad libitum* (Figura 1).

Quando avaliamos o consumo de água dos grupos, observamos que o grupo dos animais controle, que recebeu apenas água, ingeriu um volume médio de $26,1 \pm 1,8 \text{ mL}$ de água dia^{-1} ($5,22 \text{ mL animal}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Esse volume foi similar à média da ingestão do grupo que recebeu as diferentes formulações de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ por meio da água dos bebedouros ($24,6 \pm 1,4 \text{ mL dia}^{-1}$ ou cerca de $4,92 \text{ mL animal}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), demonstrando que não houve diferença estatisticamente significativa no consumo de água durante o período avaliado entre os grupos.

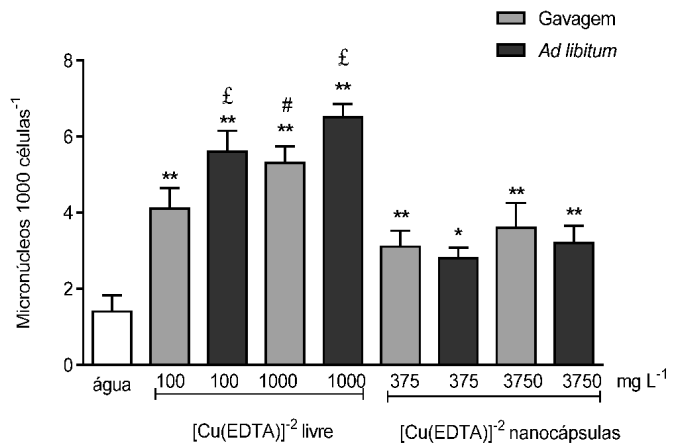


Figura 1 – Frequência de micronúcleos em hemácias de camundongos após tratamento com $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre e nanoencapsulado. O grupo gavagem foi exposto a uma única administração 72 horas antes da coleta das amostras. O grupo *ad libitum* foi exposto continuamente aos compostos durante 72 horas. Dados expressos como média \pm desvio padrão. N= 5 camundongos. ** $p < 0,001$ em relação à água; * $p < 0,01$ em relação à água; £ $p < 0,001$ em relação a 100 mg L^{-1} $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre por gavagem; # $p < 0,01$ em relação a 100 mg L^{-1} $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre por gavagem. ANOVA com pós-teste comparativo de Bonferroni.

Os animais expostos aos compostos *ad libitum*, devido à oferta constante (72 horas) dos compostos, ingeriram cerca de 65 vezes mais cobre que aqueles que foram tratados por gavagem em administração única (Fig. 2).

Apesar da diferença significativa na ingestão de íons cobre entre os grupos, não foram observadas diferenças

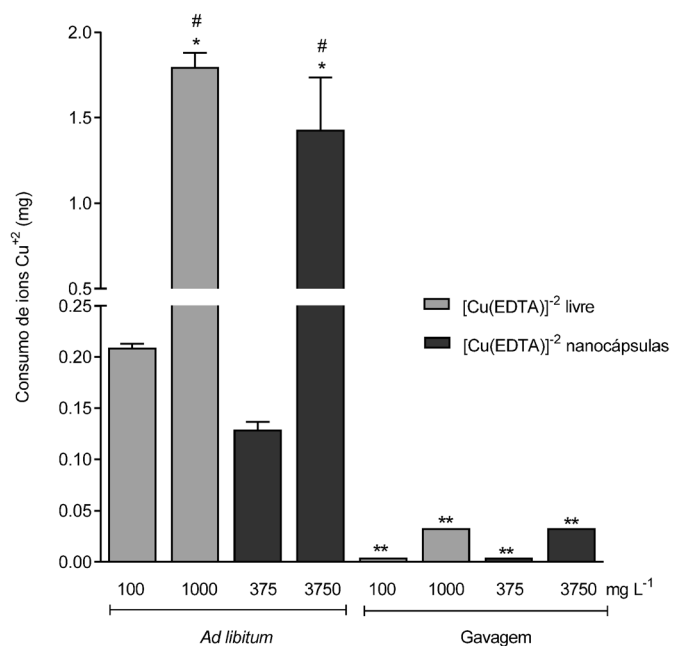


Figura 2 – Consumo total de íons Cu^{2+} nos grupos de camundongos tratados com $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre e nanoencapsulado pelas vias de administração *ad libitum* e por gavagem durante o experimento. Dados expressos como média \pm desvio padrão. N= 5 camundongos. * $p < 0,001$ em relação a 100 mg L^{-1} $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ *ad libitum*; # $p < 0,001$ em relação a 375 mg L^{-1} de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ *ad libitum*; ** $p < 0,001$ em relação a 100 e 375 mg L^{-1} $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ *ad libitum*. ANOVA com pós-teste comparativo de Bonferroni.

estatisticamente significativas na frequência de micronúcleos entre os grupos que receberam $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ nanoencapsulado por gavagem e *ad libitum*, conforme demonstrado na Figura 1.

Quando avaliamos a frequência de micronúcleos em peixes (*Prochilodus lineatus*) (Fig. 3), observamos que os peixes expostos ao $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ na forma livre apresentaram aumento significativo ($p < 0,001$) no número de micronúcleos em relação àqueles do grupo controle e expostos ao $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ nanoencapsulado, sugerindo que o nanoencapsulamento é capaz de limitar o efeito mutagênico em peixes.

Com o intuito de avaliar se houve absorção do cobre a partir da formulação nanoencapsulada, foi realizada a espectrometria de massa atômica, que demonstrou uma maior concentração de íons cobre nos tecidos hepáticos em relação a brânquias e carcaças (Fig. 4). No fígado, o grupo tratado com $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ nanoencapsulado apresentou maior concentração de cobre em relação ao grupo $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre ($p < 0,001$). Tanto nas brânquias quanto nas carcaças não ocorreram diferenças na concentração de cobre entre os grupos.

A disponibilidade do cobre nos aquários foi mantida homogênea por meio da movimentação dos peixes e a oxigenação constante, que permitiam a redispersão do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ e a continuidade da liberação dos produtos no meio. A concentração de cobre na água dos aquários refere-se a cobre total, na forma de complexo metálico com EDTA (Fig. 5). A maior concentração de íons cobre na água foi obtida no aquário com $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre ($p < 0,0001$) nos três tempos analisados. Não foram observadas, entretanto, diferenças nos grupos em relação ao tempo. Tanto as formas encapsuladas como livres diferem significativamente do grupo água ($p < 0,0001$) e entre si ($p < 0,001$) em todos os tempos.

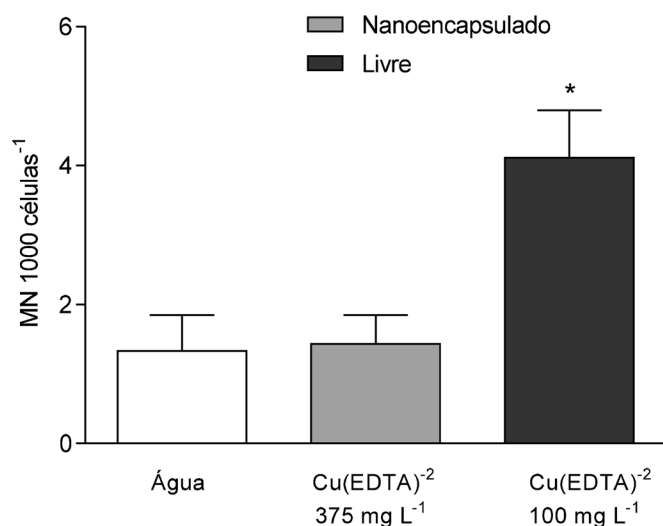


Figura 3 – Frequência de micronúcleos em hemácias de *Prochilodus lineatus* após 72 horas de exposição a $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre e nanoencapsulado. Dados expressos como média \pm desvio padrão. N= 6 peixes. * $p < 0,001$ em relação aos demais grupos. ANOVA com pós-teste comparativo de Bonferroni.

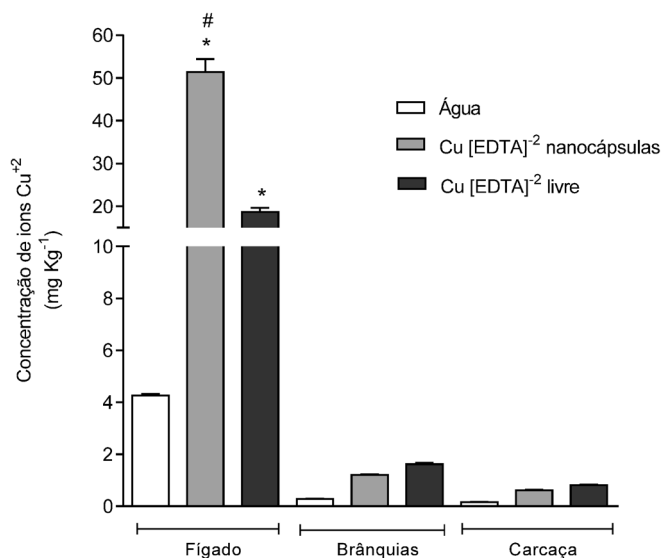


Figura 4 – Concentração de íons Cu^{2+} em fígados, brânquias e carcaças de *Prochilodus lineatus* após 72 horas de exposição a $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre e nanoencapsulado. Dados expressos como média \pm desvio padrão. N= 6 peixes. * $p < 0,001$ em relação a água; # $p < 0,001$ em relação a $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre. ANOVA com pós-teste comparativo de Bonferroni.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram efeito mutagênico do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ livre sobre células de sangue periférico de camundongos e peixes. A forma

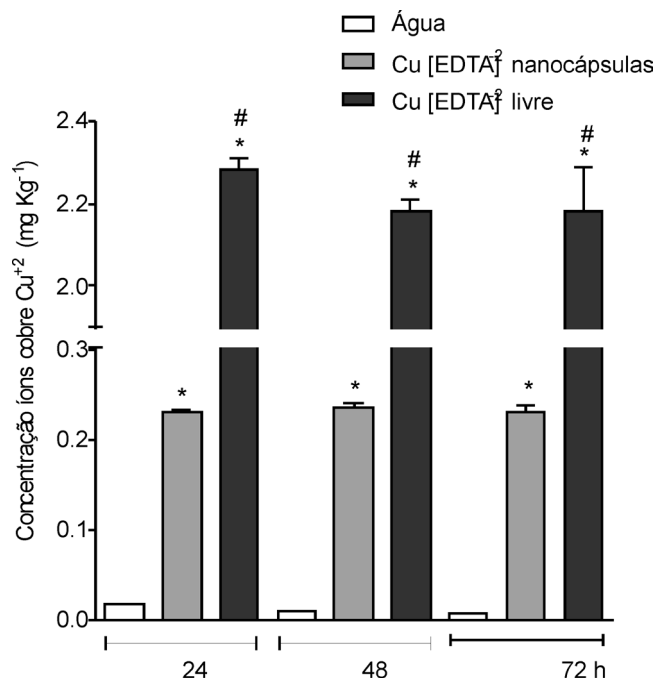


Figura 5 – Concentração de íons Cu^{2+} na água dos aquários de cada grupo experimental após 24, 48 e 72 horas do experimento. Dados expressos como média \pm desvio padrão. N= 3 amostras. * $p < 0,001$ em relação à água nos respectivos tempos; # $p < 0,001$ em relação a $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ nanoencapsulado nos respectivos tempos. ANOVA com pós-teste comparativo de Bonferroni.

nanoencapsulada, nas condições experimentais empregadas, não demonstra efeitos mutagênicos sobre células de peixes, mas foi mutagênica para as células de camundongos.

Embora estudos demonstrem que a carga positiva da quitosana aumenta a absorção dos compostos encapsulados (Harush-Frenkel *et al.*, 2007), o nanoencapsulamento parece limitar a biodisponibilidade do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ nos tecidos, uma vez que a dinâmica de liberação do cobre está mais lenta, o que poderia justificar os menores efeitos genotóxicos quando comparado à forma livre. De acordo com os resultados encontrados no teste de micronúcleos, os compostos nanoencapsulados demonstraram menor efeito mutagênico que a forma livre, sugerindo que o encapsulamento comporta-se como uma barreira para a disponibilidade do íon. O ensaio da espectrometria de massa atômica, como uma análise de íons em amostras gasosas, detectou a presença de íons cobre no grupo dos encapsulados em maior quantidade no fígado dos peixes que em outros tecidos. Esses íons cobre encontrados no tecido hepático não necessariamente estavam livres no fígado e sim encapsulados. O encapsulamento com quitosana permite maior e melhor absorção pelos tecidos, mas não disponibilidade do íon interiorizado. A técnica de preparo do material para a espectrometria solubiliza o encapsulante e expõe os íons. Portanto, o fato de o fígado apresentar maior quantidade de nanoencapsulados não significa a biodisponibilidade dos íons cobre no tecido, apenas indica a eficiência da absorção das nanocápsulas pelos tecidos biológicos. Os autores propõem um estudo com tempo de exposição prolongado para a demonstração de potencial toxicidade hepática das cápsulas devido a essa qualidade de maior absorção tecidual.

O efeito mutagênico do cobre pode ser atribuído à indução de ERO, via reação do tipo Fenton, que pode causar danos em componentes celulares como DNA e proteínas (Stohs & Bagchi, 1995). A toxicidade de metais e de seus compostos depende largamente da sua biodisponibilidade, ou seja, dos mecanismos de captação através de membranas celulares, distribuição intracelular e ligações a macromoléculas celulares. Os metais tendem a perder elétrons facilmente formando íons com cargas positivas, solúveis em fluidos biológicos. É na forma catiônica que os metais desempenham suas principais funções biológicas (van Eldik, 2007). Enquanto íons metálicos apresentam-se deficientes de elétrons, biomoléculas como proteínas e DNA são ricas em elétrons e a atração entre estas cargas opostas garante a interação entre íons metálicos e moléculas biológicas. Os efeitos tóxicos causados por metais são geralmente resultado da ligação destes com bionucleófilos (aminoácidos, polipeptídios, proteínas e enzimas) (van Eldik, 2005).

Os resultados obtidos quanto à concentração de cobre determinada por meio da espectrometria de massa atômica nos órgãos dos peixes, demonstraram a internalização mais efetiva do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ nanoencapsulado em comparação com o $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ livre, sugerindo que a nanocápsula pode limitar a toxicidade do cobre. Encontramos maior acúmulo de metal cobre nos tecidos hepáticos dos peixes expostos ao $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ nanoencapsulado, demonstrando

que o encapsulamento é eficaz no transporte do íon até o tecido hepático, com liberação lenta e gradativa, embora a conduta físico-química dos nanomateriais ainda não esteja completamente esclarecida (Unfried *et al.*, 2007). Harush-Frenkel *et al.*, 2007 demonstraram que nas nanocápsulas o revestimento de quitosana aumenta a barreira de contenção dos complexos e isto dificulta a difusão dos ativos e consequentemente pode dificultar sua liberação e esta ocorrer mais lentamente, apesar de conferir maior absorção.

Mazon *et al.* (2002) demonstraram que brânquias de *Prochilodus scrofa* expostos ao cobre são particularmente sensíveis a alterações físico-químicas no ambiente aquático, tornando-se o principal alvo dos poluentes tóxicos que se encontram no meio. Cavas *et al.* (2005) também demonstraram o potencial mutagênico de $0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ CuSO}_4$ em *Cyprinus carpio* após 21 dias de exposição, cujos danos foram maiores nas brânquias. Por outro lado, o fígado desempenha um papel central no metabolismo e na excreção de substâncias tóxicas (Bernet *et al.*, 1999), constituindo-se o principal órgão de desintoxicação. Em nossos resultados com $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$, foi verificado um comportamento diferente do íon cobre, cujo acúmulo se deu no fígado e não nas brânquias, sugerindo uma menor toxicidade e rápido metabolismo e excreção do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ em ambas as formas analisadas.

Por meio das concentrações de íons cobre encontrados na água dos aquários, pode-se sugerir que as formas encapsuladas são mais efetivamente captadas pelas células em relação as formas livres, uma vez que o $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ nanoencapsulado foi encontrado em menor concentração na água quando comparado aos aquários que receberam a forma livre do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ (Fig. 5).

A técnica de encapsulamento com goma/gelatina/quitosana demonstrou ser viável para o $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$. O encapsulamento permite que o núcleo interiorizado seja isolado do ambiente externo. A liberação local e adequada são propriedades de extrema importância nos processos de encapsulação, que pode melhorar a efetividade, reduzir as doses requeridas para atividade e ampliar o espectro de aplicações de compostos de interesse (Corona-Rivera *et al.*, 2007).

Em resumo, pode-se concluir que o edetato de cobre livre, nas concentrações testadas, apresenta genotoxicidade sobre células de sangue periférico de camundongos e peixes, mas que sua forma nanoencapsulada em goma/gelatina/quitosana apresenta menores efeitos mutagênicos sob as mesmas condições. Com a intenção de utilização do edetato de cobre para controle de agentes vetores como *Aedes aegypti*, pode-se propor, a partir dos resultados obtidos com o presente trabalho, que a forma nanoencapsulada em goma/gelatina/quitosana seja recomendada para pesquisas com larvas de agentes vetores, uma vez que apresenta menores efeitos mutagênicos a animais não alvo expostos a este produto, em relação à forma livre do $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$. No entanto, os autores não desprezam a necessidade de se efetuar estudos de comparação das duas formulações de $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{-2}$ frente a larvas de insetos vetores.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro do CNPq, o suporte técnico de Brunna Mary Okubo e Rafael Ricci Azevedo, o auxílio no manuscrito da Prof.^a Dr^a Ana Lúcia Alves Arruda e ao Projeto Pacu/ Campo Grande - MS.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, E.J., ROSSI, A.P.L., PORTO, K.R.A., OLIVEIRA, L.C.S., ARAKAKI, A.H., SCHEIDT, G.N. & SOCCOL, C.R., 2010, Evaluation of toxic effects with transition metal ions, EDTA, SBTI and acrylic polymers on *Aedes aegypti* (L., 1762) (Diptera: Culicidae) and *Artemia salina* (artemidae). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 53:335-341. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000200012>.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P. & WAHLI, T., 1999, Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, 22:25-34. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134>.
- CAVAS, T., GARANKO, N.N. & ARKHIPCHUK, V.V., 2005, Induction of micronuclei and binuclei in blood, gills and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food Chem. Toxicol.*, 43:569-574. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2004.12.014>.
- CORONA-RIVERA, A., URBINO-CANO, P., BOBADILHA-MORALES, L., VARGAS-LARES, J.J., RAMÍREZ-HERRERA, M.A., MENDOZA-MAGANA, M.L., TROYO-SANROMÁN, R., DÍAZ-ESQUIVEL, P. & CORONA-RIVERA, J.R., 2007, Protective in vivo effect of curcumin on copper genotoxicity evaluated by comet and micronucleus assays. *J. Appl. Genet.*, 48:389-396. PMID: 17998598
- HARE, L., 1992, Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22: 327-369. <http://dx.doi.org/10.3109/10408449209146312>.
- HARUSH-FRENKEL, O., DEBOTTON, N., BENITA, S. & ALTSCHULER, Y., 2007, Targeting of nanoparticles to the clathrin - mediated endocytic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353:26-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.135>.
- HEDDLE, J.A., 1973, A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutat. Res.*, 18:187-190. PMID: 4351282
- MAZON, A.F., CERQUEIRA, C.C. & FERNANDES, M.N., 2002, Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res.*, 88:52-63. <http://dx.doi.org/10.1006/enrs.2001.4315>.
- MIDDLETON, J.C. & TRIPTON, A.J., 1998, Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices. *Medical Plastics and Biomaterials*. Disponível em <<http://www.mddionline.com/article/synthetic-biodegradable-polymers-medical-devices>> (Acesso em Julho, 2010).
- PRÁ, D., GUECHEVA, T., FRANKE, S.I.R., KNAKIEVICZ, T., ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J.A.P., 2006, Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 1:171-175. <http://dx.doi.org/10.5132>
- PRÁ, D., FRANKE, S.I.R., GIULIAN, R., YONEAMA, M.L., DIAS, J.F., ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J.A.P., 2008, Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. *Biomaterials*, 21:289-297. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-007-9118-3>.
- RAYMS-KELLER, A., OLSON, K.E., MCGRAW, M., ORAY, C., CARLSON, J.O. & BEATY, B.J., 1998, Effect of heavy metals on *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) Larvae. *Ecotox. Environ. Safe.*, 39:41-47. <http://dx.doi.org/10.1006/eesa.1997.1605>.
- SÁNCHEZ-CHARDI, A., MARQUES, C.C., GABRIEL, S.L., CAPELA-SILVA, F., CABRITA, A.S., LÓPES-FUSTER, M.J., NADAL, J. & MATHIAS, M.L., 2008, Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. *Environ. Pollut.*, 156:1332-1339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.02.026>.
- SCHMID, W., 1973, Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells. *Agents act.*, 3:77/85. PMID: 4125456
- STOHS, S.J. & BAGCHI, D., 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.*, 18: 321-336. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H).
- UNFRIED, K., ALBRECHT, C., KLOTZ, L.O., VON MIKECZ, A. GREYER-BECKS, S. & SCHINS, R.P.F., 2007, Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. *Nanotoxicol.*, 1:52-71. <http://dx.doi.org/10.1080/00222930701314932>.
- VAN ELDIK, R., 2005, Introduction: inorganic and bioinorganic mechanisms. *Chem. Rev.*, 105: 1917-1921. <http://dx.doi.org/10.1021/CR050571f>.
- VAN ELDIK, R., 2007, Fascinating inorganic/ bioinorganic reaction mechanisms. *Coord. Chem. Rev.*, 251: 1649-1662. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2007.02.004>.
- VANHOE, H., VANDECASTEELE, C. VERSIECK, J. & DAMS, R., 1989, Determination of iron, cobalt, copper, zinc, rubidium, molybdenum and cesium in human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 61:1851-1857. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00192a014>.