

Avaliação do Potencial Genotóxico da Benzofenona-3 em Peixes

Patrícia Sales Neves¹ (IC)*, Sthéfanne Rezende da Conceição¹ (IC), Hévelyn Yasmine Damaceno Sousa¹ (IC) e Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão¹ (PQ)

¹Curso de Graduação em Farmácia, Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, UEG, Anápolis, GO. (patriciasalesneves@gmail.com)

²Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, UEG, Anápolis, GO.

Resumo: A benzofenona-3, filtro solar orgânico muito utilizado em formulações de protetores solares, teve seu potencial genotóxico avaliado em peixes *Astyanax sp*, animais que, sabidamente, têm contato com essa substância protetora em seu habitat natural, devido a interferência do ser humano. Os espécimes foram expostos a três diferentes concentrações de benzofenona-3, 1000 ng/L, 100 ng/L e 10 ng/L, definidas como doses 1, 2 e 3, respectivamente. Um controle negativo foi utilizado. Posterior à exposição, amostras de sangue dos animais foram coletadas e distensões sanguíneas foram confeccionadas para análise da frequência de anormalidades nucleares. 1000 eritrócitos de 1 espécime de cada condição foram analisados e as alterações nucleares encontradas e suas respectivas frequências foram: 1 núcleo notched e 1 núcleo lobed no controle negativo; 3 micronúcleos e 1 núcleo lobed na dose 1; 4 micronúcleos, 2 núcleos lobed e 1 broken-eggs na dose 2; 4 micronúcleos, 3 núcleos lobed e 2 broken-eggs na dose 3. Mais baterias devem ser realizadas para confirmação ou rejeição da hipótese de que a exposição a benzofenona-3 aumenta a frequência de dano genético em peixes *Astyanax sp*.

Palavras-chave: anormalidades nucleares, *Astyanax sp*, genotoxicidade e micronúcleo.

Introdução

O espectro solar que atinge a superfície terrestre se constitui, predominantemente, por radiações ultravioletas (UV), visíveis e infravermelhas. As primeiras são sentidas pelos organismos através de reações fotoquímicas, as quais podem ser benéficas ou maléficas, e são divididas em três comprimentos de onda diferentes: UVA, UVB e UVC (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007). Associam-se à radiação UVA, os efeitos do envelhecimento precoce da pele. Danos ao DNA, geração de inflamação e carcinogênese são características relacionadas à radiação UVB. A radiação UVC é quase completamente absorvida pela camada de ozônio (BALOGH, 2011).

Os protetores solares contêm filtros que são moléculas ou complexos moleculares (BALOGH, 2011). Esses filtros podem ser orgânicos, os quais são formados por compostos aromáticos capazes de absorver a radiação UV (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007), ou inorgânicos, que possuem estruturas impermeáveis à radiação, refletindo-a em sua maior parte (MOURA, 1996). A classe das benzofenonas abrange diversos compostos com capacidade fotoprotetora, que atuam como filtros orgânicos e absorvem com muita eficiência a radiação UVA. Pertencente à essa classe, a benzofenona-3 é uma substância lipofílica que apresenta grande estabilidade, sendo um dos compostos filtrantes mais utilizados na formulação de protetores solares (BALOGH, 2011).

Um denominador comum entre as substâncias protetoras é que todas são submetidas a estudos que comprovem a segurança de seu uso em humanos. No entanto, ainda é obscuro e está sendo investigado o impacto desses compostos em ambientes aquáticos, ecossistemas que sabidamente recebem contaminação direta ou indireta dessas substâncias. A forma direta é aquela que envolve a remoção dessas substâncias da pele humana durante atividades recreativas no ambiente aquático, como natação. A forma indireta envolve o lançamento dessas substâncias via estações de tratamento de águas residuais, por meio de processos como lavagem de roupas ou banho doméstico (KIM; CHOI, 2014).

Já foi observada experimentalmente a absorção de benzofenona-3 por uma espécie de peixe de água doce, bem como alterações hormonais causadas por essa substância (KIM et al., 2014). Já o potencial genotóxico da benzofenona-3 em peixes ainda não foi investigado. Estudos de avaliação dos riscos ecológicos para espécies aquáticas são importantes para dimensionar o problema do lançamento de substâncias neste ecossistema e evitar a utilização de certas substâncias ou limitar as dosagens que podem ser utilizadas, com a intenção de preservar as espécies presentes nesse ecossistema.

Material e Métodos

Aclimação dos peixes em ambiente laboratorial

Antes da aquisição dos peixes, foi realizada a estabilização do sistema onde os mesmos seriam aclimatados. Posteriormente, peixes *Astyanax sp* foram adquiridos e mantidos nesse ambiente por 10 dias, sob condições de temperatura e pH controlados ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, pH entre 6,8 e 7,2). Durante o período de adaptação, os

animais foram alimentados com ração, 1 vez ao dia. Transcorridos os 10 dias, os peixes foram transferidos para 8 aquários com 20 L de água (em condições análogas à água do tanque) equipados, cada um, com 1 filtro (capacidade filtrante 250 L/h) e 1 termostato. Os espécimes foram mantidos nessa condição por 4 dias para adaptação, fotoperíodo de 12 h diárias, sendo alimentados 1 vez ao dia. Posteriormente, foram utilizados nos experimentos.

Exposição aguda dos peixes à benzofenona-3

Os peixes foram expostos a três diferentes concentrações não letais da benzofenona-3, denominadas doses 1, 2 e 3 (1000 ng/L, 100 ng/L e 10 ng/L, respectivamente). Um aquário sem a substância foi usado como controle negativo. A exposição ocorreu em ambiente controlado, sob as mesmas condições do período de adaptação. Os animais foram expostos por 72 h à substância testada, para a determinação de possíveis efeitos causados pela mesma.

Confecção e análise das lâminas

Após 72 h de exposição controlada a benzofenona-3, foi realizada a coleta de sangue de cada espécime testado, com seringa heparinizada. Para o preparo das lâminas, a primeira gota de sangue da seringa foi descartada, com o intuito de evitar a contaminação do sangue com o líquido corporal e muco. Lâminas foram confeccionadas, pela técnica de esfregaço (extensões sanguíneas), para cada espécime. O material foi corado pelo método panótico rápido. Um total de 1000 eritrócitos foram analisados por espécime. Essa análise foi realizada em microscópio óptico, sob objetiva de imersão (100x). A frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares foi calculada.

Resultados e Discussão

A análise das lâminas confeccionadas a partir de amostras de sangue dos espécimes expostos a benzofenona-3, bem como o controle negativo, permitiu a visualização de diversas anormalidades nucleares, como evidenciado na Figura 1.

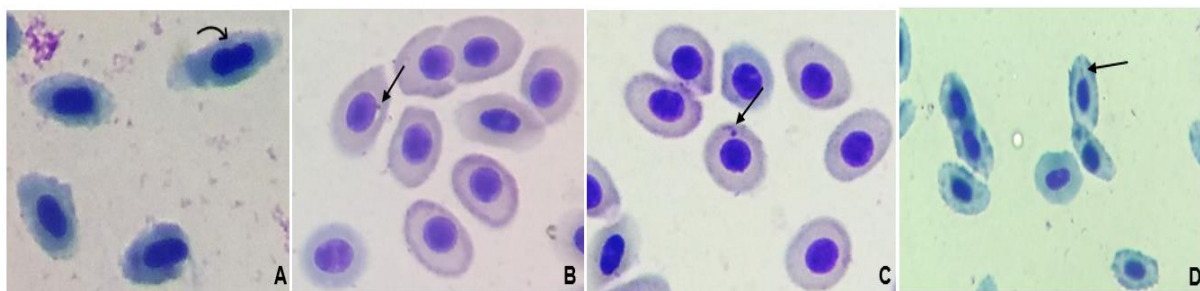


Figura 1 – Microscopia óptica (aumento de 1000x) de distensões sanguíneas de amostras de sangue de peixes *Astyanax sp.*, expostos a diversas concentrações de benzofenona-3. As setas evidenciam anormalidades nucleares. (A) núcleo notched. (B) núcleo lobed. (C) micronúcleo. (D) broken-eggs.

Diversos danos genéticos foram qualificados e quantificados. A Tabela 1 lista anormalidades nucleares e a frequência com que foram encontradas nas diferentes concentrações e controle negativo analisados.

Tabela 1 – Frequência de anormalidades nucleares encontradas em distensões sanguíneas de amostras de espécimes expostos a diferentes concentrações de benzofenona-3 e controle negativo.

Concentrações de Benzofenona-3	Anormalidades Nucleares (em 1000 eritrócitos)			
	Núcleo Notched	Núcleo Lobed	Micronúcleo	Broken-Eggs
1000 ng/L	-	1	3	-
100 ng/L	-	2	4	1
10 ng/L	-	3	4	2
Controle Negativo	1	1	-	-

A genotoxicidade de substâncias da classe das benzofenonas em espécies aquáticas tem sido descrita em trabalhos científicos. O potencial genotóxico da benzofenona-2, substância de estrutura molecular semelhante à benzofenona-3, foi observado em estudos in vitro realizados com células do coral *Stylophora pistillata* (DOWNS et al., 2013).

Para confirmar ou rejeitar a hipótese inicial de que a exposição a benzofenona-3 aumenta a frequência de dano genético nos espécimes analisados, novas baterias experimentais devem ser realizadas.

Considerações Finais

Danos genéticos podem ocorrer em um organismo devido à exposição a um determinado fator exógeno, como podem, eventualmente, refletir um processo celular natural. Neste projeto, alterações nucleares em eritrócitos dos espécimes pesquisados puderam ser observados em animais expostos ou não a substância teste. A quantidade de lâminas analisadas, no entanto, não resultou em dados que

pudessem ser tratados estatisticamente. Assim, para confirmação ou rejeição da hipótese de que a exposição a benzofenona-3 aumenta a frequência de anormalidades nucleares em eritrócitos de peixe *Astyanax sp*, mais testes devem ser realizados e seus respectivos resultados submetidos a análises estatísticas.

Agradecimentos

A Universidade Estadual de Goiás pelo suporte financeiro por meio do Programa de Bolsas de Iniciação Científica (BIC-UEG), Bolsa de Incentivo ao Pesquisador (BIP-UEG) e Pró-Projetos Pesquisa (Edital nº 029/2016).

Referências

BALOGH, Tatiana Santana et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 4, p. 732-742, Agosto, 2011. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365_05962011000400016&lng=en&nrm=iso. Acesso em 24 de março de 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962011000400016>.

FLOR, Juliana; DAVOLOS, Marian Rosaly; CORREA, Marcos Antonio. Protetores solares. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 153-158, Fev. 2007. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422007000100027&lng=en&nrm=iso. Acesso em 26 de março de 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000100027>.

KIM, S.; CHOI, K. Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review. *Environ Int* 70: 143-157, 2014.

KIM, S.; JUNG, D.; CHOI, K. Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) - A two generation exposure study. *Aquatic Toxicology* 155: 244-252, 2014.

MOURA, Célia José de. **Radiações e Filtros Solares**. Revista Racine. São Paulo, n.34, p.3-4, set./out.96.

DOWS, C.A.; KRAMARSKY-WINTER, E.; FAUTH, J.E.; SEGAL, R.; BRONSTEIN, O.; JEGGER, R.; LICHTENFELD, Y.; WOODLEY, C. M.; PENNINGTON, P.; KUSHMARO, A.; LOYA, Y. Toxicological effects of the sunscreen UV filter, benzophenone-2, on planulae and in vitro cells of the coral, *Stylophora pistillata*. *Ecotoxicology*, 23: 175-191.