

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELLIE ANNE LÓPEZ BARRERA

Avaliação dos efeitos da exposição de nanopartículas de prata em larvas de *Rhamdia quelen* e da coexposição com Benzo(a)pireno em indivíduos adultos

**Curitiba
2013**

ELLIE ANNE LÓPEZ BARRERA

Avaliação dos efeitos da exposição de nanopartículas de prata em larvas de *Rhamdia quelen* e da coexposição com Benzo(a)pireno em indivíduos adultos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Ecologia e Conservação.

Orientador:

Prof. Dr. Ciro A. de Oliveira Ribeiro

**Curitiba
2013**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TESE POR MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, APENAS PARA FINS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS.

Catlogação na publicação

López-Barrera, Ellie Anne

Avaliação dos efeitos da exposição de nanopartículas de prata em larvas de *Rhamdia quelen* e da coexposição com Benzo(a)pireno em indivíduos adultos Ellie Anne López Barrera Orientador:

Ciro Alberto Oliveira Ribeiro- Curitiba, 2013.

160p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação. Área de concentração: Ecotoxicologia) – Universidade Federal do Paraná.

1. Jundia 2. Fase larval 3. Biomarcadores 4. Mistura de poluentes.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da tese, a que se submeteu **Ellie Anne López Barrera** para fins de adquirir o título de Doutora em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 21 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Orientador e Presidente

Prof.ª Dra. Juliane Ventura Lima
Membro

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
Membro

Prof.ª Dra. Flavia Sant'Anna Rios
Membro

Prof. Dr. Daniel Bussolaro
Membro

Visto:
Prof.ª Dra. Maria Regina Torres Boeger
Coordenadora do PPG-ECO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 571

CERTIFICADO

O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

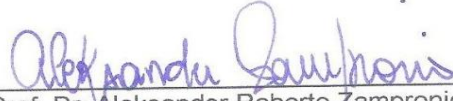
PROCESSO: 23075.098688/2011-42

APROVADO: 04/11/2011 – R.O. 10/2011

TÍTULO: Avaliação da exposição de nanopartículas de prata (NPAg) e do benzo(a)pireno (BaP) em *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae)

AUTORES: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Ellie Anne López Barrera

DEPARTAMENTO: Biologia Celular


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEUA

AGRADECIMENTOS

Debo escribir esta parte en mi lengua materna: Español, porque mi corazón siente en este idioma.

Comenzare dándole gracias a esa energía mágica y única que me impulsa a vivir y respirar a cada segundo: Dios, por todas las grandes maravillas que me permite sentir y disfrutar.

A mis padres, motor imparable de mi formación como persona. Juntos hicieron de mi lo que soy y me regalaron lo mas valioso que tengo: La vida.

A mi familia de sangre: hermana, primos, tios y abuelos. Compañeros de caminata que siempre me apoyan en cada iniciativa y fase de mi vida. Pendientes de mis alegrías y de mis tristezas. Fuerza que necesite y anhele tantas veces durante este tiempo de formación en que me aleje físicamente, pero que llevo siempre junto a mí como uno de mis valiosos tesoros.

A mi hermana de corazón Debora, a mi Mamá adoptiva Maria Carmen, a mi abuelita adoptiva Carmen y a mi hermana heredada Helena. Gracias por el apoyo y el cariño que me ofrecieron siempre, la sonrisa y la compañía que tanto necesite en estos años lejos de casa. Siempre me hacen sentir como parte de su familia y ya hacen parte de la mía.

A los amigos que conoci en mi camino en Brasil y que desde ahora llevare para siempre a cualquier lugar del mundo donde me encuentre. A los que me enseñaron siempre que se debe seguir luchando con alegría y perseverancia. A los que siempre estaban para darme su ayuda incondicional. A los que con una sonrisa siempre me decían que debía acordarme de respirar para no caer. Diana Ochoa, Lury Forero, Leonardo López, Oscar Gallo, Guilherme Longo, Fernanda Bonetti, Aline Kloh, Catarina Silva, Gisela Gaia, Juan Pablo Quimbayo, Suzana Guimaraes, Felipe Shibuya.

A los amigos de toda la vida que se encuentran en varias partes del mundo pero que me hicieron entender que la distancia solo es un estado mental, dándome asi fuerzas para continuar siempre adelante: ¡Hasta la victoria siempre! Rafael Barragan, Irene Valderrama, Lina Maria Juanias, Carolina Arias, Liz Barreto, Lilian Barreto.

El apoyo incondicional de Juan Ramon Esquivel y de la Piscicultura Panama. Gracias por la compañía recibida de Marley, Lidio y todos los trabajadores que sufrían con mis tropiezos e intentaron ayudar para que los experimentos pudieran desarrollarse.

Este trabajo no podría haberse concluido sin el apoyo del Laboratorio de Toxicología Celular. Encabezado por el Profesor Ciro Alberto Ribeiro de Oliveira, quien confio en mi desde el dia que toque a su puerta queriendo aprender un poco más.

A mis amigos y compañeros de dia a dia, que me daban palabras de apoyo y que hicieron mi estadia lo más agradable posible, apoyando, aconsejando y ayudando en lo que fuera posible. Samuel, Andressa, Daniele, Renata, Dandie, Izabella, Flavia, Heloisa, Ana Carol, Stefane, Sonia, Claudia, Francisco, Marco, Halina, Maritana.

A Sabrina Araujo por el apoyo, las enseñanzas y amistad brindada desde que nos conocimos.

Al Centro de microscopia de la Universidad Federal do Paraná por el auxilio en los análisis de Microsocpia de Trasmision y Varredura.

A la agencia financiadora Capes por la beca que permitió la estadia en Brasil.

Agradecer a todas las personas que siempre me brindaron una sonrisa, un saludo y que me hicieron sentir en Brasil como en mi país. Agradezco la oportunidad y la acogida que recibí de todos durante esta fase de mi vida.

“Eu alego, além do mais, que deixamos essas substâncias químicas serem empregadas com pouca ou nenhuma investigação previa de seu efeito sobre o solo, água, animais selvagens e os próprios seres humanos. As gerações futuras provavelmente não perdoarão nossa falta de preocupação prudente com a integridade do mundo natural que sustenta toda a vida.”

R. L. Carson

RESUMO

O incremento da entrada de resíduos da nanotecnologia no ambiente e seus efeitos tóxicos na biota aquática ainda são pouco conhecidos, tem levado ao desenvolvimento da nanotoxicologia. Recentemente, um foco importante de pesquisa tem sido a elucidação dos efeitos biológicos da coexposição de poluentes já existentes nos sistemas, com a identificação do aumento ou a diminuição dos efeitos tóxicos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da exposição à nanopartículas de prata (AgNP) em diferentes fases de vida do jundiá (*Rhamdia quelen*). Analisaram-se os efeitos após exposição hídrica no desenvolvimento de larvas e também a interação dos poluentes em exposição via oral (*gavagem*) em adultos. Primeiro avaliou-se a exposição às AgNP em diferentes concentrações (0,03, 0,3 e 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em varios tempos de exposição. Analisam-se taxa de eclosão, taxa de sobrevivência e deformidades morfológicas. A exposição aos aglomerados de AgNP diminuiu a taxa de eclosão nas concentrações avaliadas. Observa-se o efeito do tempo e concentração de exposição na taxa de sobrevivência. As deformidades observadas foram: atraso no crescimento esquelético e torção da cauda, nadadeiras atrofiadas, edema ocular, deformidade facial, distensão do tórax e caquexia. A análise química demonstrou a maior incorporação de prata às 96hpf, reforçando os resultados encontrados na sobrevivência e deformidades, sugerindo a entrada ativa de prata nas ultimas horas de exposição. Foi desenvolvida uma modelagem matemática para avaliar os efeitos de xenobióticos sobre a dinâmica da população após a exposição em larvas para a espécie estudada, como uma ferramenta para análises de efeitos em nível populacional. Finalmente, foram avaliadas por meio de biomarcadores os efeitos de exposição isolada e coexposição às AgNP e ao Benzo(a)pireno (BaP) após exposição via oral por *gavagem* em indivíduos adultos da espécie. Os animais mantiveram-se em tanques rede em ambiente natural, e foram expostos a cada cinco dias durante 15 dias à doses de AgNP (0,03, 0,3 e 3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), BaP (0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e coexposições dos poluentes. Biomarcadores bioquímicos (AChE, GST, GSH, LPO, PCO, METs e δ -ALAd) e análises histopatológicas foram realizadas em diferentes tecidos alvos (fígado, músculo, cérebro, rim anterior e posterior, sangue). A associação de ambos os contaminantes pode interferir com a toxicidade, comparativamente com a exposição isolada. Foi ativada a resposta oxidante das células, no entanto não apresnetou estresse oxidativo. O mecanismo de desintoxicação de agregados de nanopartículas de prata e a sua coexposição com BaP em adultos de *Rhamdia quelen* foi eficiente. A análise histopatológica de fígado, rim anterior e rim posterior demonstra uma resposta inflamatória generalizada após a exposição. Em síntese, as diferentes fases de vida do jundiá apresentam sensibilidades aos poluentes diferenciadas, mostrando que exposição na fase larval pode ocasionar maiores efeitos na sobrevivência, na fase adulta se observa uma resposta de indução do mecanismo de desintoxicação de xenobióticos, sendo esta eficiente. As simulações da dinâmica populacional realizadas com o modelo desenvolvido oferecem uma primeira aproximação dos efeitos tóxicos em nível populacional ao avaliar fases iniciais de desenvolvimento.

Palavras-chave: Jundiá, Fase larval, biomarcadores, Mistura de poluentes.

ABSTRACT

The increase in waste input of nanotechnology on the environment whose toxic effects on aquatic biota are still poorly known has led to the development of nanotoxicology. Recently, an important focus of research has been to elucidate the biological effects of exposure to co-existing pollutants systems and the identification of changes in toxic effects. The aim of this study was to assess the effects of exposure to silver nanoparticles (AgNP) on different stages of silver catfish (*Rhamdia quelen*) life. We analyzed the exposure effects to developing larvae in the water and also the interaction of the pollutants oral exposure (*gavage*) in adults. First, we evaluate exposure of AgNP in different concentrations (0.03, 0.3 and 3 μmL^{-1}) and different times. Hatching, survival and morphological deformities were analyzed. AgNP decreased hatching in the tested concentrations. We also observed the effect of time and exposure concentration on survival. The deformities observed were: growth retardation and skeletal twisting tail, atrophied fins, ocular edema, facial deformity, torax swelling and cachexia. Chemical analysis showed the higher incorporation of silver at 96 hpf, reinforcing the results found in the survival and deformities, and suggesting the active input of silver in the last hours of exposure. We developed a mathematical model to evaluate the xenobiotics effects on the population dynamics after exposure in larvae of this species as a tool for analysis of effects at the population level. Finally, isolated effects of exposure and co-exposure to AgNPs and Benzo (a) pyrene (BaP) after oral *gavage* in adults of this species were evaluated through *in vivo* studies using biomarkers approach. The animals were kept in network tanks and were exposed every five days for 15 days to doses of AgNP (0.03, 0.3 and 3 $\mu\text{g.g}^{-1}$), BaP (0.3 $\mu\text{g.g}^{-1}$) or their association. Biochemical biomarkers (AChE, GST, GSH, LPO, PCO, δ -ALAD, METs) and histopathological analyses were evaluated in different target tissues (liver, muscle, brain, anterior and posterior kidney, and blood). The contaminants combination can interfere with toxicity as compared with isolated exposure. The cellular defense mechanisms were efficient for detoxification of silver nanoparticles aggregates and their co-exposure to BaP in adults, however it was observed oxidative stress. Histopathological analysis of liver and anterior and posterior kidney showed a generalized inflammatory response after exposure. In summary, the different stages of life of the silver catfish exhibited differential sensitivities to pollutants, showing that larval exposure to pollutants can cause major effects on survival, and in adulthood, can induce an efficient mechanism of detoxification of xenobiotics. The population dynamics simulations performed with the developed model in this work provided a first approach of toxic effects at the population level to assess early stages of development.

Keywords: Silver catsfish, larvae stage, biomarkers, Pollutants Mixture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1. Exemplar de *Rhamdia quelen*. http://www.vivaterra.org.br/peixes_doce_2.htm..... 24
- FIGURA 2. Vias de exposição, absorção, distribuição e degradação de nanopartículas no ambiente. As linhas sólidas indicam rotas que foram demonstrados em laboratório ou em campo ou que estão atualmente em uso (remediação). Letras de cor rosa indicam possíveis vias de degradação, e em cor azul são indicadas possíveis vias e fontes de nanopartículas. Modificado de OBERDÖRSTER *et al.*, 2005. 36
- FIGURA 3. Procedimentos para a obtenção de zigotos de *Rhamdia quelen* na Piscicultura Panamá. A. Tanque para manutenção de progenitores. B. Inoculação de hipófise de carpa para induzir a desova. C. Desova e fecundação de *Rhamdia quelen in vitro*. D. Ativação do desenvolvimento embrionário..... 42
- FIGURA 4. Sistemas de incubação testados para ovos de *R. quelen*. A. Microplacas de cultivo celular Biofilm® de 96 poços. B. Sacolas de polipropileno com saturação de oxigênio. C. Tubos de 50mL de fundo cônico, graduados com tampa. D. Incubadora tipo Zoug de 50L..... 43
- FIGURA 5. Imagem de MEV do Neuromasto de *Danio rerio* (a) mostrando as *hair cells* (b), quinecílio (k) e estereocílio (s). Esquema de um neuromasto (c). Modificado de www.zebrafish.cl/metazoan/images.php 47
- FIGURA 6. Caracterização das nanopartículas de prata (AgNP) usando microscopia eletrônica de transmissão (MET)(a). (A) Histograma de distribuição de tamanho das AgNP mostrando tamanho médio de 7.83 ± 2.21 nm e (B) Área de superfície entre 41.388-315.2 nm²..... 51
- FIGURA 7. Histograma de distribuição de tamanho da nanopartículas de prata em concentração nominal de (A). $0,03 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, (B). $0,3 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e (C). $3 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ 52
- FIGURA 8. Determinação das concentrações de prata em larvas de *Rhamdia quelen* após exposição aos agregados de nanopartículas de prata (AgNP)..... 54
- FIGURA 9. Taxa de eclosão após 24hpf de incubação em 24° C de embriões de *Rhamdia quelen* expostos aos agregados de nanopartículas de prata. Os asteriscos representam tratamentos com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$)..... 55
- FIGURA 10. Taxa de sobrevivência de larvas de *Rhamdia quelen* após exposição aos agregados de nanopartículas de prata em diferentes tempos. As letras e asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$)..... 56
- FIGURA 11. Frequência de deformidades em larvas de *Rhamdia quelen* após exposição aos agregados de nanopartículas de prata em diferentes tempos. (A). Deformidades Axiais, (B).

Deformidades Nadadeiras, (C). Deformidades Cefálicas, (D). Deformidades de Tórax/ Abdômen. Letras representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$). 58

FIGURA 12. Índice de deformidade de larvas de *Rhamdia quelen* após exposição a nanopartículas de prata em diferentes tempos. Letras representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$). 60

FIGURA 13. Dispersão em 3D para a concentração e tempo de exposição versus (A) índice de deformidades e (B) Concentração de prata (Ag) em larvas de *Rhamdia quelen* após exposição à nanopartículas de prata. 61

FIGURA 14. Localização ultraestrutural de AgNP em larvas de *Rhamdia quelen* após 96 horas de exposição. AgNP (setas) em (A) fibras musculares, (B) no citosol de células epiteliais, (C) próximas do núcleo de células epiteliais e (D) em vesículas de células epiteliais. (n) Núcleo, (s) sarcômeros, (ce) células epiteliais. 62

FIGURA 15. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* de 96 hpf após exposição a agregados de nanopartículas de prata. (A-D) Controle; (E-G) $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$; (H-J) $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$; (K-N) $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$. (bf) cavidade bucofaringea (fenda oral), (e) olho, (f) nadadeira, (n) narina, (op) opérculo, (y) vitelo, setas brancas: neuromastos, (*) : barbilhões. Escala: A= 500 μm ; B= 100 μm ; C= 50 μm ; D=5 μm ; E=100 μm ; F-M= 10 μm 64

FIGURA 16. Stochastic model for population dynamic of *Rhamdia quelen*. 77

FIGURA 17. Faces diagram of *Rhamdia quelen* population dynamic. The scale bar indicates the population size average. Black zone indicates extinction and red zone refers to the maximum observed average. Green zone indicates the parameters set where the population average is half of the maximum observed. S_b = fry survival rate, SPL = larvae survival rate due to polluting. Stars = points selected for assessed the temporal sensibility of population. Horizontal lines indicate SPL correspondent to experimental assay of silver nanoparticles (AgNP) exposure in different concentrations (0.03, 0.3, 3 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). 81

FIGURA 18. Simulation of temporal variability of *Rhamdia quelen* population with different fry survival rate (S_b) and larvae survival rate due to polluting (SPL) for 200 years. 82

FIGURA 19. Simulation of temporal variability of *Rhamdia quelen* population with different maximum larval survival rate (S_b) and larvae survival rate due to polluting (SPL) for 50 years. 83

FIGURA 20. Mecanismos de Toxicidade celular das Nanopartículas de prata. Modificado de VÖLKER *et al.*, 2013. 92

FIGURA 21. Tanques rede alocados em açudes na Piscicultura Paulo Lopes, SC para o desenvolvimento do experimento (A). Espécime de *Rhamdia quelen* utilizado no experimento (B). Escala B=10 cm. 98

FIGURA 22. Concentração de prata em tecido de (A) Fígado, (B) Músculo e (C) Rim Anterior. As letras e símbolos representam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).	117
FIGURA 23. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) determinados em bile de <i>Rhamdia quelen</i> após coexposição às AgNP e BaP. A. HPAs de dois anéis, B. HPAs de quatro anéis, C. HPAs de cinco anéis, D. HPAs de seis anéis, E. Somatória dos HPAs de diferentes anéis.	118
FIGURA 24. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em tecido de (A) Cérebro e (B) Músculo de <i>Rhamdia quelen</i> após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP. As linhas horizontais representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).	120
FIGURA 25. Biomarcadores Bioquímicos em Fígado de <i>Rhamdia quelen</i> após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP. A. Atividade da GST Glutathione S-Transferase, B. Concentração de Glutathione Reduzida- GSH, C. Carbonilação de Proteínas-PCO, D. Peroxidação Lipídica-LPO. As linhas horizontais representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).	121
FIGURA 26. Biomarcadores Bioquímicos em sangue de <i>Rhamdia quelen</i> após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP. A. Atividade da δ -ALAd ; B. Peroxidação lipídica. As linhas horizontais representam as diferença estatisticamente significativas ($p < 0.05$).	123
FIGURA 27. Determinação de Metalotioneínas em rim posterior de <i>Rhamdia quelen</i> após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP.	124
FIGURA 28. Análise de Ensaio Cometa em sangue de <i>Rhamdia quelen</i> após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP.	126
FIGURA 29. Microfotografias de micronúcleos observados em sangue de <i>Rhamdia quelen</i> após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP. A). Células normais, B). Vacuolated, C). Notched. D.) Micronúcleo, E). Lobed, E. Escala 10 μ m.	127
FIGURA 30. Análise de Micronúcleos em sangue de <i>Rhamdia quelen</i> após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP.	128
FIGURA 31. Histopatologia de Fígado de <i>Rhamdia quelen</i> após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP. A). Tecido hepático normal. B). Congestão Vasculare (seta), C). Dilatação de sinusóides (seta), D). Granulomatose Perivascular (seta preta), E) foco basófilo com necrose, F). Área de necrose com hemorragia (seta). G). Esteatose (seta: célula adiposa), H). Ducto biliar normal (seta), I) Granulomatose peribiliar com presença de melano-macrófagos (seta: ducto biliar), J). Infiltração leucocitária (seta). Coloração: Hematoxilina/eosina.	131

FIGURA 30. Histopatologia de Rim Anterior de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP. A). Rim Anterior com aspecto normal. B). Área de concentração de Eritrócitos (seta), C).Centros de destruição de Eritrócitos (seta), D). Concentração de Eritrocitos (cabeça de seta) e Centros de Melano-macrófagos (seta), E). Infiltração leucocitaria (setas), F). Áreas acidófilas. Coloração: Hematoxilina/eosina. 132

FIGURA 31. Histopatologia de Rim Posterior de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP. A). Tecido Normal, B). Alteração Glomerular (seta), C). Glomerulo dilatado, D Melano-macrófagos (setas), E). Granulomatose perivascular (seta), F). Granulomatose Perivascular (seta) e glomérulos alterados, G). Área de necrose, H). Alteração do epitélio tubular (seta). Coloração: Hematoxilina/eosina. 133

FIGURA 34. Índice de Bernet para avaliar as alterações morfológicas de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP. A. Fígado, B. Rim Anterior, C. Rim Posterior. As letras representam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0.05$). 134

FIGURA 35. Análise de Centro de Melano-macrófagos de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP. A. Fígado, B. Rim Anterior. As letras representam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0.05$). 136

FIGURA 36. Análise de novos néfrons no rim posterior de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP. 137

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Aspectos reprodutivos de <i>Rhamdia quelen</i> . Modificado de FAO, 2010	26
TABELA 2. Resumo de estudos avaliando efeito tóxico em varias espécies de peixes expostos a nanopartículas de prata (AgNP).....	38
TABELA 3. Tratamentos analisados para avaliar o efeito em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> , expostas a nanopartículas de prata durante os estádios primários de desenvolvimento.....	44
TABELA 4. Categorias de deformidades observadas em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> após exposição aos agregados de AgNP.....	57
TABELA 5. Parameters of scientific literature used for modeling of a dynamic population of <i>Rhamdia quelen</i>	80
TABELA 6. Tratamentos para avaliar o efeito de nanopartículas de prata coexpostas com Benzo(a)pireno em <i>Rhamdia quelen</i> por via oral.....	99
TABELA 7. Média do número de células analisadas para avaliar os danos nucleares por ensaio cometa observados em sangue de <i>Rhamdia quelen</i> após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP.	125
TABELA 8. Ocorrência das alterações morfológicas em <i>Rhamdia quelen</i> após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP (n=11).	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
AgNP	Nanopartículas de prata
BaP	Benzo(a)pireno
DMSO	Dimetil Sulfoxido
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FAAS	Espectrofotometria de Absorção Atômica de Flama
GST	Glutathione S-transferase
GSH	Glutathione Reduzida
HPAS	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
hpf	Horas após a fertilização
IDM	Índice de deformidade morfológica
LPO	Peroxidação Lipídica
NPs	Nanopartículas
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MTs	Metalotioneínas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PCO	Carbonilação de Proteínas
PFA	Paraformaldeído
SOD	Superóxido dismutase

SUMARIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	19
CAPITULO I	33
Avaliação dos efeitos de Nanopartículas de prata no desenvolvimento e viabilidade de larvas de <i>Rhamdia quelen</i> (Teleostei, Heptapteridae).....	33
RESUMO	34
ABSTRACT	34
1. INTRODUÇÃO	35
2. OBJETIVOS.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Preparação e caracterização da suspensão de Nanopartículas de prata	41
3.2. Desenho experimental.....	41
3.3. Testes de toxicidade	44
3.4. Processamento das amostras	45
3.5. Análises estatístico dos dados.....	50
4. RESULTADOS	50
4.1. Caracterização das Nanopartículas de Prata (AgNP).....	50
4.2. Determinação química de prata nas larvas.....	53
4.3. Taxa de eclosão	54
4.4. Taxa de sobrevivência	55
4.5. Deformidades Morfológicas.....	57
4.6. Relação Concentração-tempo-efeito.....	60
4.7. Localização ultraestrutural de AgNP em larvas de <i>Rhamdia quelen</i>	61
4.8. Alterações morfológicas dos neuromastos	63
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÕES	69
7. REFERÊNCIAS.....	70
CAPITULO II	74
Modelagem preliminar dos efeitos de poluentes no tamanho da população de <i>Rhamdia quelen</i> (Teleostei, Heptapteridae) após exposição no estágio larval.....	74
RESUMO.....	75
ABSTRACT	75

1. INTRODUCTION.....	76
2. MODEL DEVELOPMENT.....	77
3. RESULTS	80
4. DISCUSSION	84
5. REFERENCES.....	85
CAPITULO III	88
Resposta integrada de biomarcadores em adultos de <i>Rhamdia quelen</i> expostos via oral à nanopartículas de prata em coexposição com Benzo(a)pireno	88
RESUMO.....	89
ABSTRACT	90
1. INTRODUÇÃO	91
2. OBJETIVOS.....	97
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	98
3.1. Desenho experimental.....	98
3.2. Análises de Biomarcadores.....	100
3.3. Análises Histopatológicas.....	107
3.4. Análises de Genotoxicidade	110
3.5. Determinação de Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na bile	113
3.6. Determinação Química de Prata por Espectrofotometria de Absorção Atômica de Chama (FAAS).....	114
3.7. Análise estatístico de dados.....	115
4. RESULTADOS	116
4.1. Determinação Química de Prata.....	116
4.2. Determinação de Policíclicos Aromáticos (HPAs) na bile	118
4.3. Biomarcadores Bioquímicos.....	119
4.4. Biomarcadores Genéticos	125
4.5. Biomarcadores Histopatológicos.....	128
5. DISCUSSÃO.....	137
6. CONCLUSÕES	144
7. REFERÊNCIAS.....	145
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	159

INTRODUÇÃO GERAL

Os ecossistemas aquáticos estão submetidos a uma pressão constante decorrentes das atividades humanas. A poluição e o comprometimento destes estão associados com a introdução direta ou indireta de substâncias tóxicas no ambiente que resultam em efeitos deletérios tais como danos para os organismos vivos, perigo para a saúde humana, obstáculo para as atividades como a pesca e diminuição da qualidade da água. Além disso, pode-se dizer que o problema da poluição dos ecossistemas aquáticos está associado às características da toxicidade, persistência e bioacumulação de substâncias tóxicas às quais os organismos vivos estão expostos (BRAGA *et al.*, 2006).

Dentre os grupos de substâncias potencialmente danosas para ecossistemas aquáticos e cujos problemas críticos já foram identificados estão o petróleo e derivados, esgotos sanitários, metais pesados, materiais radioativos, organoclorados, pesticidas (REBOUÇAS *et al.*, 2006) e mais recentemente os nanoresíduos provenientes da nanotecnologia (BISWAS e WU, 2005; KLAINE *et al.*, 2008). Neste cenário, corpos d'água em geral atuam como receptores finais destas substâncias e a sensibilidade destes ecossistemas aos impactos causados por estas substâncias dependem das características ecológicas e biogeoquímicas de cada região em particular, incluindo as próprias atividades humanas instaladas (LANA *et al.*, 2006).

Nestes ambientes é preocupante a emergente introdução de poluentes emergentes e o aumento na utilização de nanopartículas metálicas (<100nm) pela indústria (produtos tecnológicos, cosméticos, de limpeza e/ou de aplicação biomédica), o que acrescenta riscos de toxicidade para os organismos que habitam os corpos d'água (BISWAS e WU, 2005). Desta forma, o conhecimento que se tem até o momento em relação à interação dos nanocompostos com os sistemas biológicos (célula, tecido, organismo, comunidade, população, ecossistema) são ainda limitados para entender sua toxicodinâmica, fazendo deste tema objeto de preocupação e despertando o interesse de vários grupos de pesquisa.

Uma vez que as nanopartículas (NPs) são liberadas no meio ambiente é necessário compreender o seu destino e transporte a fim de determinar os ambientes nos quais estas podem ocorrer, ou mesmo se acumular e, portanto, quais organismos são mais suscetíveis se expostos (OBERDÖRSTER *et al.*, 2007). O potencial tóxico das NP está relacionado com suas propriedades como: tamanho, forma, composição, capacidade de interação por agregação, cristalização e superfície funcional (FISCHER e CHAN, 2007, BUZEA *et al.*, 2007). Somado a isto, entender as relações usando uma análise de unidades funcionais em diferentes níveis de complexidade permitirá reconhecer potenciais efeitos tóxicos das NPs e as vias de desintoxicação (BOUDOU e RIBEYRE, 1997).

A crescente produção e aplicação de nanopartículas metálicas tem provocado a ampla discussão sobre os riscos potenciais destes materiais ao ambiente e à saúde humana. Entre os compostos metálicos utilizados na indústria esta a prata (Ag) que é um metal não essencial distribuído amplamente no meio ambiente. Quando está presente em elevadas concentrações no ambiente aquático causa toxicidade aos organismos, sendo que a forma iônica é a mais tóxica (GROSSEL *et al.*, 1999). No entanto, a recente e acelerada fabricação de nanopartículas de prata (AgNP) tem aumentado o risco de toxicidade para os organismos. As AgNP têm sido amplamente utilizadas na medicina, alimentos, indústrias de cosméticos e eletrônicos e na remediação ambiental (FABREGA *et al.*, 2011), tornando-se um dos materiais manufaturados mais comum na indústria (MAYNARD, 2006).

As AgNP são compostas por átomos de prata (entre 20 e 15.000 dependendo do tamanho) em dimensões menores que 100nm e seu reduzido tamanho confere a estas propriedades diferentes daquelas observadas na prata comum, aumentando seu potencial tóxico pela fácil entrada e ação nos sistemas biológicos (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005; WIJNHOVEN *et al.*, 2009). Vários estudos têm demonstrado que as propriedades físicas e químicas das AgNP (tamanho, morfologia, estabilidade) são fortemente influenciadas pelas condições de experimentação, a cinética de interação dos íons de metal com agentes redutores e pelos processos de absorção dos agentes

estabilizadores com as nanopartículas de metal (KNOLL e KEILMANN, 1999; SENGUPTA *et al.*, 2005).

Análises do comportamento das AgNP sob condições químicas e físicas no meio aquoso são importantes para entender as implicações toxicológicas nos ecossistemas aquáticos. Elzey e Grassian (2010) reportaram o comportamento de AgNP fabricadas comercialmente em ambientes aquosos, registrando aglomeração em pH neutro, com tendência para a dessaglomeração, partículas isoladas, e íons livres de prata em um pH baixo (ácido). A percentagem de prata dissolvida foi pequena, mas detectável em pH neutro e tende a aumentar rapidamente em um pH 5.0. Estes dados são de grande relevância nas avaliações ecotoxicológicas, considerando que a tendência de formar agregados e o aumento do tamanho destes estão relacionados com a menor mobilidade das AgNP em ambientes aquáticos, o que diminui a disponibilidade destes para os organismos que se encontram expostos. Além disso, a acidificação dos ambientes naturais facilitaria a dissolução das nanopartículas de prata contribuindo para o aumento da concentração dos íons de prata em corpos d'água.

Estudos para avaliar a toxicidade das AgNP têm sido desenvolvidos devido a ampla utilização destas em produtos para controlar infecções bacterianas (LEITCH *et al.*, 1993). Estes autores reportam a citotoxicidade em fibroblastos de ratos após exposição *in vitro* em presença de AgNP esféricas, de tamanho entre 7-12 nm, em concentração de $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, por 24 horas. Por outro lado, estudo desenvolvido com linhagem celular (HT-1080 e A431) descreve estresse oxidativo (diminuição dos níveis de Glutathione reduzida (GSH) e Superóxido dismutase (SOD), aumento de peroxidação lipídica (LPO), alterações nos níveis de catalase (CAT) e de Glutathione peroxidase (GPX)) e fragmentação do ADN sugerindo apoptose (ARORA *et al.*, 2008). A interação das AgNP em ensaios *in vivo* também tem sido estudada usando como modelo biológico embriões do peixe *Danio rerio*, demonstrando que AgNP entre 5-46 nm são carregadas por transporte passivo através dos poros de canal do córion interferindo no desenvolvimento embrionário (concentrações $>0,08 \text{ nM}$; LEE *et al.*, 2007)

Outro aspecto importante para avaliar as interações das NP com os organismos está relacionado com a quantidade que entra na célula e a sua localização. Isto pode

ser realizado por meio de diferentes técnicas (microscopia eletrônica de transmissão, espectrometria de emissão atômica e de fluorescência e a microscopia eletrônica de interfase de contraste). Embora estes estudos permitam identificar a presença do poluente, as avaliações de toxicidade *in vitro* com avaliações de citotoxicidade, malformações anatômicas, histopatológicas, dano em macromoléculas (ADN, fosfolipídios e proteínas), estresse oxidativo, análise de expressão gênica e outros tem se mostrado importantes na área da nanotoxicologia porque permitem a comparação com estudos *in vivo*, e são muitas vezes de menor custo permitindo identificar respostas em diferentes níveis de forma rápida e eficiente (MARQUIS *et al.*, 2009).

Ainda assim, as concentrações de poluentes utilizadas nas pesquisas de nanotoxicidade são muito maiores que as encontradas no ambiente natural, fazendo-se necessário a realização de estudos complementares em condições mais realísticas. A avaliação por meio de ensaios *in vivo* permite observar o impacto direto das NP nos organismos, a partir de biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica. Estes estudos permitem também determinar rotas de exposição, concentração das NP em diferentes compartimentos e avaliar danos através de alterações mensuráveis (MARQUIS *et al.*, 2009).

Somado a isto, pouco se sabe sobre a cinética de NP em organismos aquáticos, onde a degradação, transformação e órgãos alvos dentro do organismo carecem de estudos. A dose real à qual os indivíduos são expostos naturalmente não é ainda bem esclarecida, bem como as taxas de absorção, excreção ou mesmo de transformação/imobilização dentro do organismo. A exposição a altas concentrações de NP pode não necessariamente levar a uma elevação na taxa de bioacumulação quando comparado com a exposição à forma iônica do metal. Por exemplo, os metais são normalmente excretados quando absorvidos pelo trato gastrointestinal (OBERDÖRSTER *et al.*, 2006) mas ainda não são completamente esclarecidas as rotas de absorção e excreção das nanopartículas metálicas.

Dependendo do organismo analisado, as prováveis rotas de exposição são muito diferentes, o tecido pulmonar seria o mais crítico para a absorção das NP, devido à sua grande superfície e a frágil barreira que o tecido apresenta entre o ar e o sangue

(MEILI *et al.*, 2007). Para os organismos aquáticos, a captação de NP através das brânquias não é bem esclarecida e não é aceita como a rota mais provável, devido que a camada de muco que envolve o epitélio das brânquias pode agir como uma barreira, impedindo a entrada das NPs no organismo (HANDY *et al.*, 2008, SCOWN *et al.*, 2010). A outra rota de exposição é a via oral, através da ingestão de alimento contaminado o mesmo líquido contendo o poluente. Este tipo de exposição permite o contato direto das NP com os tecidos nos quais se realizaria a entrada direta por endocitoses (VOLKER *et al.*, 2013). Neste contexto, uma adequada avaliação do efeito das AgNP em organismos aquáticos, considerando as possíveis interações das mesmas com poluentes já existentes no ambiente (ex. Benzo(a)pireno) são de relevância para os estudos de ecotoxicidade.

Neste estudo, a espécie utilizada como modelo experimental foi o jundiá (*Rhamdia quelen*) (FIGURA 1) considerado um peixe de grande potencial na aquicultura (CARNEIRO *et al.*, 2002). Esta espécie possui uma ampla variedade de estudos relacionados com a sua biologia, fisiologia reprodutiva, larvicultura, desenvolvimento embrionário, hematologia, fisiologia da resposta ao estresse e condições ótimas de cultivo (CARNEIRO *et al.*, 2002; FRACALOSSO *et al.*, 2002; 2004; GHIRALDELLI *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2000; RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2010), o que fazem com que represente um importante modelo nos estudos sobre os efeitos de xenobióticos em uma espécie nativa.

Somado a isto, é uma espécie que se encontra distribuída nas bacias das três Américas com grande importância para ecossistemas aquáticos por ocupar dois compartimentos, o bentônico por seu hábito alimentar e o demersal por servir como espécie forrageira para outras que são topo de cadeia como o dourado (*Salminus brasiliensis*) e o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (FAO, 2010). Esta espécie ocorre em habitats bentônicos associados a refúgios, como pedras, troncos, vegetação de borda, aquática e de cavernas. Os indivíduos pequenos são observados no fundo ou semiocultos nos refúgios, mas os adultos geralmente estão ocultos e são mais ativos durante a noite quando frequentam as bordas dos corpos d'água (BALDISSEROTTO e RANDUZ-NETO, 2010).

A espécie *Rhamdia quelen* apresenta características morfológicas como cabeça pequena em relação ao comprimento do corpo, a boca achatada e serrilhada, barbilhões nos maxilares, nadadeira dorsal com espinho forte, nadadeira caudal pequena. Tem um corpo largo e pode medir até 50 cm e pesar 5 Kg. Sua coloração varia do cinza oliva ou negro com manchas escuras e irregulares e as nadadeiras são cinzas (BALDISSEROTTO e RANDUZ-NETO, 2010).

Rhamdia quelen (Quoy e Gaimard, 1824) pertence à seguinte divisão taxonômica (SILFVERGRIP, 1996):

Classe: **Osteichthyes**
 Série: **Teleostei**
 Ordem: **Siluriformes**
 Família: **Heptapteridae**
 Gênero: ***Rhamdia***
 Espécie: ***Rhamdia quelen***



FIGURA 1. Exemplar de *Rhamdia quelen*.
http://www.vivaterra.org.br/peixes_doce_2.htm

Nomes vulgares:

Brasil: jundiá, jundiá-tinga, jandiá, jandiá-tinga, mandi e sapipoca.

Argentina: bagre, bagre negro, bagre sapo e bagre suramericano.

América do Norte: South American catfish, Silver catfish, Neotropical catfish

Segundo Silfvergrip (1996) os animais da espécie *R. quelen* se diferenciam das outras espécies do gênero por apresentar as seguintes características taxonômicas:

- Espinho da nadadeira peitoral serrilhado em ambos os lados;
- Nadadeira caudal com lóbulos desiguais;
- Membrana interr radial menor do que 2/3 do comprimento do raio do lobo superior da nadadeira caudal/ lobo inferior da nadadeira caudal;
- Com ou sem poros sensoriais múltiplos na cabeça;
- Manto da narina posterior aberta postero-lateralmente;
- Barbilhões maxilares no mínimo 28,8% do comprimento padrão;

- Arcos branquiais de 5 a 16;
- Vértex pós Weberianas de 36 a 44.

Rhamdia quelen é uma espécie comum em lagoas e poços fundos dos rios com pouca corrente, preferindo ambientes de águas calmas e cálidas, com fundo de areia e lama ou cobertas com vegetação. Apresentam hábito noturno e escondem-se em pedras e troncos e saem destes abrigos após as chuvas à procura de alimento (GOMES *et al.*, 2000). A espécie já nas primeiras fases de vida também apresenta uma acentuada aversão à luz e busca locais escuros (PIAIA *et al.*, 1999) assim como apresentam canibalismo nesta fase (BALDISSEROTTO, 2011).

Adultos de *R. quelen* não são restritos ao habitat bentônico, apresentam hábitos onívoros, com preferência por peixes, insetos, crustáceos, restos vegetais e detritos orgânicos (MEURER e ZANIBONI-FILHO, 1997). Após as épocas de chuvas se nutre dos escombros deixados ao longo dos rios, fazendo que a espécie seja generalista com relação à escolha de alimento (GOMES *et al.*, 2000).

A maturidade sexual de indivíduos de *R. quelen* é atingida por volta de um ano de idade em machos e fêmeas. Os primeiros iniciam o processo de maturação gonadal com aproximadamente 13 cm nos machos e com 16 cm nas fêmeas (GOMES *et al.*, 2000). Os indivíduos maduros apresentam características morfológicas externas visíveis: os machos liberam com facilidade o líquido espermático e apresentam o orifício genital protraído; enquanto que as fêmeas apresentam o orifício genital hepirênico avermelhado e com dilatação ventral (MARDINI *et al.*, 1981).

No habitat natural, *R. quelen* é ovulípara e em época de desova procuram lugares de água rasa, limpa, com pouca corrente e com fundo pedregoso. Os ovos são demersais e não aderentes e a espécie não possui cuidado parental (GOMES *et al.*, 2000). A fecundidade é baixa e apresenta relação diretamente proporcional do comprimento e peso total com o peso da gônada (NARAHARA *et al.*, 1989). O aumento sensível de temperatura ambiente e o término da época de chuvas são considerados

estímulos que desencadeiam o fim do processo de maturação e desova de *R. quelen* (MARDINI *et al.*, 1981).

O desenvolvimento embrionário e larval é influenciado por fatores ambientais como temperatura e turbulência da água. Vinte e quatro horas após a eclosão, a larva apresenta movimentos mandibulares e operculares com diminuição do saco vitelínico. O saco vitelínico é totalmente absorvido no quarto dia após a eclosão (dpe). No quinto dpe podem ser observados os barbilhões bem desenvolvidos, dentículos nas maxilas, olhos pigmentados, nadadeiras peitorais e caudais formadas. A morfogênese está quase completa após quatro meses (PEREIRA *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2009).

Na TABELA 1 estão resumidos alguns aspectos reprodutivos de *R. quelen* importantes utilizados para o cultivo desta espécie.

TABELA 1. Aspectos reprodutivos de *Rhamdia quelen*. Modificado de FAO, 2010

Época reprodutiva	De setembro a fevereiro no hemisfério sul. Após época de chuvas e aumento da temperatura.
Primeira maturidade sexual	Machos e fêmeas maturam ao primeiro ano de vida. Aproximadamente com 15 cm de comprimento total e 80 g de peso.
Desove/ fecundidade	Em águas estancadas ricas em matéria orgânica. Aproximadamente 100 000 ovos/kg.
Fertilização	Desova asincrônica, um ou vários machos podem fertilizar. Não fazem ninhos para o desove nem apresentam cuidados parentais.
Eclosão	Dependente da temperatura. 18 - 20 horas em 25°C.
Larvas	Pequenas e transparentes de 1 a 1,3 mm. Absorção do saco vitelino entre 3 e 5 dias.
Alimentação	Bentófago, onívoro, prefere zooplâncton e posteriormente crustáceos, peixes pequenos e ovos de outros peixes. Nas primeiras etapas tende a apresentar canibalismo se sua dieta é deficiente em proteínas.

Para realizar a desova induzida se leva em consideração o início da maturação gonadal, no qual ocorre um aumento no nível de gonadotrofina na hipófise e no plasma sanguíneo dos peixes. Para induzir a desova se utiliza como hormônio liberador das gonadotropinas: o extrato hipofisário de carpa. Também pode se utilizar gonadotrofina coriônica (HCG) ou hipófise de *Piaractus sp* ou de *Prochilodus sp*. O hormônio deve ser pesado e macerado num pote de porcelana e diluído com solução fisiológica (FAO, 2010).

Para induzir as fêmeas e os machos, se utiliza uma dose total de 5 mg/peso (kg) de extrato de hipófise, aplicando-a numa primeira dose que corresponde a 10% da dose total e uma segunda (90%) após 12 horas de ter recebido a primeira (BALDISSEROTTO, 2011). A desova deve ocorrer de 10 -12 horas pós-inoculação da segunda dose, dependendo da temperatura. A aplicação do hormônio se faz na base da nadadeira dorsal via intramuscular ou intraperitoneal na base das nadadeiras peitorais. Após a inoculação os animais devem ser mantidos em tanques com aeração, temperatura controlada e renovação de água até o momento da desova.

A fertilização pode ser efetuada na água em que os reprodutores se encontram, para evitar o choque térmico dos embriões e aumentar a sobrevivência destes. O tempo de eclosão está relacionado diretamente com a temperatura da água. Em 16°C a eclosão ocorre em torno de três dias (GOMES *et al.*, 2000), com 21°C a eclosão demora 43 horas, em 24°C ocorre as 26h e com 27°C em torno de 20 horas (RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2010).

Desta forma, avaliar os efeitos das AgNP nas diferentes fases do ciclo de vida de *R. quelen*, permitem identificar o risco de exposição quando exposto a concentrações no ambiente natural. Algumas concentrações naturais para AgNP têm sido estimadas para ambientes aquáticos ($0.03 \mu\text{g.L}^{-1}$) (MÜLLER e NOWACK, 2008; BUZEA *et al.*, 2007) e a sua toxicidade em concentrações até 1000 vezes acima foi avaliada para alguns organismos aquáticos (FARRÉ *et al.*, 2009; POWERS *et al.*, 2011; VARNER, 2010). No entanto, muito pouco existe na literatura demonstrando os efeitos ou mesmo o mecanismo de toxicidade envolvendo a exposição de AgNP em pequenas

doses, ou mesmo em coexposição com outros poluentes existentes no ambiente (ex. Benzo(a)pireno).

Levando em consideração a importância de compreender as interações dos poluentes emergentes e a sua coexposição com poluentes existentes no ambiente, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar o efeito de AgNP em *Rhamdia quelen*, com o intuito de levantar dados que possam dirigir futuras investigações quanto aos mecanismos de toxicidade em diferentes etapas do ciclo de vida da espécie. Foram realizados estudos em larvas de *R. quelen* após a exposição nas primeiras horas após fecundação e nas primeiras fases de desenvolvimento (**Capítulo I**). Além disso, pela primeira vez para a espécie, foi desenvolvida uma modelagem matemática sobre o efeito da exposição aos poluentes em larvas da espécie como uma ferramenta para avaliar os efeitos de xenobióticos sobre a população (**Capítulo II**). Finalmente, através de estudos *in vivo* foram avaliados, por meio de biomarcadores, os efeitos de exposição isolada e coexposição à AgNP e ao Benzo(a)pireno (BaP) após exposição via oral por *gavagem* em indivíduos adultos da espécie (**Capítulo III**). Vários biomarcadores, dependendo do ciclo de vida estudado, foram avaliados. As informações geradas são de grande relevância para tomar medidas adequadas no manejo de novos poluentes, no caso, as AgNP, que têm sido liberadas indiscriminadamente nos ecossistemas naturais e cujas consequências tóxicas são recentemente elucidadas ou pouco conhecidas.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, M.P., GOMES, B.V.C., MARTINS, Y.S., SATO, Y., RIZZO, E. & BAZZOLI, N. 2009. **Early development of the Silver Catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces:Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil.** *Aquac. Res.* 40, 172-80
- ARORA, J. JAIN, J.M. RAJWADE, K.M PAKNIKAR. 2008. **Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies.** *Toxicol. Lett.* 179, pp. 93–100.
- BALDISSEROTTO, B., RADÜNZ NETO, J. **Jundiá (*Rhamdia sp.*),** in: Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. (Eds.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Segunda Edição.* UFSM, Santa Maria. 2010. pp.303-325.
- BALDISSEROTTO, B. 2011. **Fisiologia Aplicada de ao cultivo do jundiá.** *Revista Panorama da Aqüicultura.* Vol.125: 40-47.
- BISWAS, P., WU, C. Y. 2005. **Nanoparticles and the Environment, Critical Review Paper.** *J Air Waste Manage.* 55: 708–746.
- BOUDOU, A E RIBEYRE, F. 1997. **Aquatic Ecotoxicology: From the Ecosystem to the Cellular and Molecular Levels.** *Environmental Health Perspectives,* Vol. 105, Supplement 1. pp. 21-35
- BRAGA, B., PORTO, M., TUCCI, C. E. M. **Monitoramento de quantidade e qualidade das águas.** In: Rebouças, A. da C., Braga, B., Tundisi, J. G. *Águas doces no Brasil: Capital ecológico, uso e conservação.* 3. ed. São Paulo: Escrituras, 2006, p. 145-160.
- BUZEA, C. PACHECO. I, ROBBIE, K. 2007. **Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity.** *Biointerphases* vol. 2, issue 4. Pp. MR17 - MR172 1
- CARNEIRO, P.C.F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J.D.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P.; BALDISSEROTTO, B.; GOLOMBIESKI, J.I. 2002. **Jundiá: um grande peixe para a região do sul.** *Panorama da Aqüicultura,* Rio de Janeiro, 12, 69: 41-46
- ELZEY, S.,GRASSIAN, V.H. 2010. **Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments.** *J Nanopart Res.* 12: 1945-1958
- FABREGA, J. LUOMAB, S.N., TYLERA, C.R., GALLOWAYA, T. S., LEAD, J.R. 2011. **Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment.** *Environ Int.* 37, 2: 517–531
- FAO. 2010. **Peces Nativos de Agua Dulce de América del Sur de Interés para la Acuicultura: Una Síntesis del Estado de Desarrollo Tecnológico de su Cultivo.** Serie Acuicultura en Latinoamérica. No. 1. Enero, 2010. Roma, Italia, 204p.

- FARRÉ M, GAJDA-SCHRANTZ K, KANTIANI L, BARCELÓ D. 2009. **Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment.** *Anal. Bioanal. Chem.* 393: 81-95.
- FISCHER, H.C., CHAN, W.C. 2007. **Nanotoxicity: the growing need for in vivo study.** *Curr Opin Biotechnol.* 18(6):565-71.
- FRACALOSSO, D.M., ZANIBONI-FILHO, E., MEURER, S. 2002. **No rastro das espécies nativas.** *Revista Panorama da Aqüicultura.* Vol. 12: 43-49.
- FRACALOSSO, D.M., MEYER, G., WEINGARTNER, M., SANTAMARIA, F., ZANIBONI-FILHO, E. 2004. **Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região Sul do Brasil.** *Acta Scientiarum* 26:345–352.
- GHIRALDELLI, L., MACHADO, C., FRACALOSSO, D.M., ZANIBONI-FILHO, E. 2007. **Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil.** *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 29, 349–356.
- GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; CHIPPARI GOMES, A.R. BALDISSEROTO. B. 2000. **Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae): uma revisão.** *Cienc. Rural, Santa Maria*, v. 30, n. 1, p. 179-185.
- GROSELL, M.; DEBOECK, G.; JOHANNSSON, O.; WOOD, C.M. 1999. **The effects of silver on intestinal ion and acid-base regulation in the marine teleost fish.** *Comparative Biochemistry and Physiology* 124: 259-270.
- HANDY, R. D., OWEN, R., VALSAMI-JONES, E. 2008. **The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs.** *Ecotoxicology*, v.17, p.315–325.
- KLAINE, S. J., ALVAREZ, P. J. J., BATLEY, G. E., FERNANDES, T. F., HANDY, R. D., LYON, D. Y., MAHENDRA, S., MCLAUGHLIN, M. J., LEAD, J. R. 2008. **Nanomaterials in the Environment: Behavior, Fate, Bioavailability and Effects.** *Environ Toxicol Chem.* 27(9): 1825-1851
- KNOLL, B., KEILMANN, F. 1999. **Near-field probing of vibrational absorption for chemical microscopy.** *Nature* 399, 134–137.
- LANA, P.C., BIANCHINI, A., OLIVEIRA-RIBEIRO. C.A., NIENCHESKI, L.F., FILLMANN, G., SANTOS, C. S. 2006. **Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros: Diretrizes Metodológicas.** Rio de Janeiro: Museu Nacional. pp. 156.
- LEE, K.J., NALLATHAMBY, P.D., BROWNING, L.M., OSGOOD, C.J., XU, X.H. 2007. **In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos.** *ACS Nano* 1:133–143
- LEITCH, I. O., KUCUKCELEBI, A., ROBSON, M. C. 1993. **Inhibition of wound contraction by topical antimicrobials.** *Aust. N. Z. J. Surg.*, 63(4), 289-293.

MARDINI, C.V., SILVEIRA, M.A., BARENHO D.H.L. **Técnica de indução da desova em jundiá (*Rhamdia quelen*) empregada na estação experimental de piscicultura da Lagoa dos Quadros**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1981.14 p.

MARQUIS, B. J., LOVE, S. A., BRAUN, K. L., HAYNES, C. L. 2009. **Analytical methods to assess nanoparticle toxicity**. *Analyst*,134, 425–439.

MAYNARD, A.D. 2006. **Nanotechnology: a research strategy for addressing risk**. Woodrow Wilson International Center for Scholars, Washington. www.tinhoahoc.com/Nanotechnology/RiskRelatedResearch_Maynard_7-06-Final.pdf

MEILI C., WIDMER M., HUSMANN F., GEHR P., BLANK F., RIEDIKER M., SCHMID K., STARK W., LIMBACH L. Synthetische Nanomaterialien-Risikobeurteilung und Risikomanagement Grundlagenbericht zum Aktionsplan. B. f. Umwelt and B. f. Gesundheit. **Nanomateriais Sintéticos. Avaliação e relatório de gestão de risco com baseado no plano de ação. B. f. Saúde Ambiental**. 2007. www.umwelt-schweiz.ch/uw-0721-d.

MEURER, S., ZANIBONI-FILHO, E. 1997. **Hábito alimentar do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae), na região do alto rio Uruguai**. In: XII ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, São Paulo, SP,. Anais. São Paulo: SBI 420 p.

MÜLLER, N.C., NOWACK, B. 2008. **Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment**. *Environmental Science and technology*. 42, 4447-4453.

NARAHARA, M.Y., GODINHO, H.M, ROMAGOSA, E. 1989. **Tipo de desova e fecundidade do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae)**. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 16, 1: 37-45.

OBERDÖRSTER G, MAYNARD A, DONALDSON K, CASTRANOVA V, FITZPATRICK J, AUSMAN K, CARTER J, KARN B, KREYLING W, LAI D, OLIN S, MONTEIRO-RIVIERE N, WARHEIT D, YANG H. 2005. **Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy**. *Part Fibre Toxicol* 2:8

OBERDÖRSTER, E., ZHU, S., BLICKLEY, T.M., MCCLELLAN-GREEN P, HAASCH ML. 2006. **Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C60) on aquatic organisms**. *Carbon*. 44(6):1112-1120.

OBERDÖRSTER, G., STONE, V., DONALDSON, K. 2007. **Toxicology of Nanoparticles: A historical perspective**. *Nanotoxicology*,1 : 2-25.

PEREIRA, C.R.; BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; RITTER, F.; SILVA, L.B. **Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a southamerican catfish**. *Brazilian Journal of Biology*, v.66, p.1057-1063, 2006.

PIAIA, R., TOWNSEND, C.R., BALDISSEROTTO, B. 1999. **Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes.** *Aquaculture International*. v. 7: 201-205.

POWERS, C.M., SLOTKIN, T.A., SEIDLER, F.J., BADIREDDY, A.R., PADILLA, S. 2011. **Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition.** *Neurotoxicol Teratol*. 33(6):708-14.

REBOUÇAS, A. DA C., BRAGA, B., TUNDISI, J. G. **Águas doces no Brasil: Capital ecológico, uso e conservação.** 3. ed. São Paulo: Escrituras, 2006. p. 145-160.

RODRIGUES-GALDINO, A.M., MAIOLINO, C.V., FORGATI, M., DONATTI, L., MIKOS, J.D., CARNEIRO, P.C., RIOS, F.S. 2010. **Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes.** *Zygote*. 18(2):131-44.

SCOWN, T. M.; SANTOS, E. M.; JOHNSTON, B. D.; GAISER, B.; BAALOUSHA, M.; MITOV, S.; LEAD, J. R.; STONE, V.; FERNANDES, T. F.; JEPSON, M.; VAN AERLE, R.; TYLER, C. R. 2010. **Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout.** *Toxicological Sciences*, v.115, p. 521-534.

SENGUPTA, S., EAVARONE, D., CAPILA, I., ZHAO, G.L., WATSON, N., KIZILTEPE, T. 2005. **Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system.** *Nature*. 436, 568-572 .

SILFVERGRIP, A.M.C. **A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae).** Stockholm, Sweden, 1996. 156p. (PhD Thesis)-Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.

VARNER, K. **State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More.** Scientific, Technical, Research, Engineering and Modeling Support. Final Report. EPA/600/R-10/89, 2010. U.S. National Exposure Research Laboratory. Environmental Sciences Division. Las Vegas, NV. 2010. pp. 221.

VÖLKER, C., OETKEN, M., OEHLMANN, J. 2013. **The Biological effects and possible modes of action of nanosilver.** *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol 223: 81-106.

WIJNHOFEN SWP, PEIJNENBURG WJGM, HERBERTS CA, HAGENS WI, OOMEN AG, HEUGENS EHW, ROSZEK B, BISSCHOPS J, GOSENS I, VAN DE MEENT D, DEKKERS S, DE JONG WH, VAN ZIJVERDEN M, SIPS AJAM, GEERTSMA RE. 2009. **Nanosilver: a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment.** *Nanotoxicology* 3(2):109–138.

CAPITULO I

Avaliação dos efeitos de Nanopartículas de prata no desenvolvimento e viabilidade de larvas de *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae)

Publicação Relacionada:

E. A. López-Barrera; R. G. Barragan-Gonzalez; A. Glinski; J.R. Esquivel-Garcia; M.A.F. Randi; C. F. Ortolani-Machado; F. Filipak Neto; C. L. Voigt, S. X. Campos, C.A. Oliveira Ribeiro. *Evaluation of silver nanoparticles exposure in larvae silver catfish *Rhamdia quelen**. Manuscrito a ser enviado à publicação para a revista Aquatic Toxicology.

RESUMO

Avaliar o efeito de aglomerados de AgNP como um cenário no qual as AgNP apresentam baixa disponibilidade para organismos, é importante para compreender as implicações toxicológicas em ecossistemas. O presente estudo avaliou os efeitos de agregados e nanopartículas de AgNP (Sigma ®) em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) nas concentrações de 0,03, 0,3 e 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, expostos em tempos de vida de 24, 48, 72 e 96 horas pós-fertilização (hpf). Foram avaliados os efeitos sobre a eclosão e taxa de sobrevivência, deformidades morfológicas e alterações ultra-estruturais em neuromastos. Foi determinada a concentração química de prata nas larvas e identificada a entrada de AgNP em compartimentos celulares por meio de MET. Os resultados demonstram que a exposição a agregados de AgNP diminuiu a taxa de eclosão de todas as concentrações testadas. A taxa de sobrevivência foi dependente do tempo, mas não dependente da concentração ($p < 0,05$). As deformidades larvais aumentaram em um modo dependente do tempo com os mais altos valores de índice de deformidades encontrados após 72 e 96hpf. Nestes grupos, as deformidades da coluna vertebral foram as mais frequentes. Curiosamente, apesar de os prejuízos mais elevados terem sido observados após 96 hpf, o nível mais elevado de prata iônica foi encontrado na concentração intermediária. Os agregados de AgNP induziram efeitos tóxicos em larvas de *R. quelen* afetando o desenvolvimento normal do jundiá o que estabelece um risco em potencial para a manutenção da população desta espécie em condições naturais.

Palavras-chave: Taxa de eclosão, Taxa de sobrevivência, Deformidades morfológicas.

ABSTRACT

To evaluate the effect of nanosilver agglomerates as a cluster scenario where AgNP have low availability to organisms, it is important to understand the implications toxicology in aquatic ecosystems. The current study evaluated the effects of nanosilver bulks of AgNP (<20 nm, Sigma ®) in larvae of silver catfish (*Rhamdia quelen*) under concentrations of 0.03, 0.3 and 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ exposed to 24, 48, 72 and 96 hours post-fertilization (hpf). We evaluated effects on hatching and survival rate, morphological deformities and ultrastructural changes in neuromasts. We determined the chemical concentration of silver in larvae and identified input AgNP into cellular compartments by TEM. Exposure to nanosilver agglomerates decreased the hatching rate for all tested concentration. The survival rate was time dependent but not concentration dependent ($p < 0.05$). The larval deformities increased in a time dependent mode with the highest deformities index values found after 72 and 96hpf. In these groups, the spine deformities were the most frequent. Interestingly despite of the higher damages have been observed after 96 hpf, the higher level of ionic silver was found at middle tested concentration. The nanosilver agglomerates induced toxic effects in *R. quelen* larvae affecting the normal development of this silver catfish leading to a potential risk to the population under natural condition for this species.

Keywords: Hatching rate, survival rate, morphological deformities.

1. INTRODUÇÃO

O destino ambiental e os efeitos de resíduos de prata recebeu atenção considerável a partir da década de 1990, em parte, devido aos efeitos tóxicos encontrados experimentalmente em exposições a níveis baixos de prata (VARNER, 2010). O desenvolvimento acelerado da nanotecnologia (produção e utilização de materiais com uma dimensão menor de 100nm) começou em 2005. No entanto, a quantidade dessas nanopartículas presente nos ambientes naturais e os efeitos tóxicos não têm sido avaliados adequadamente (OBERDÖRSTER *et al.*, 2007). Estima-se que em 2008 as nanopartículas de prata (AgNP) já eram utilizada por 65 companhias de 11 países diferentes e incorporadas na produção de mais de 240 produtos (FAUUS, 2008).

Atualmente, existem centenas de produtos em circulação que contêm AgNP, incluindo cosméticos, materiais de embalagem de alimentos, desinfetantes, produtos de limpeza e, não menos importantes, meias e roupas com propriedades antibacterianas pelo uso da prata. Todos os anos, cerca de 320 toneladas de AgNP são usadas em todo o mundo, algumas das quais são liberadas para águas residuais atingindo os ambientes aquáticos naturais (BLASER *et al.*, 2008). O crescente e acelerado aparecimento no ambiente de novos resíduos da nanotecnologia, com efeitos adversos ainda desconhecidos na biota aquática, tem levado ao desenvolvimento de uma nova linha de investigação da toxicologia: a nanotoxicologia (MOORE, 2006; OBERDÖRSTER *et al.*, 2007; FARRÉ *et al.*, 2009).

As vias de entrada de nanopartículas (NP) nos ecossistemas podem ser variadas (deposição no solo, ar e água) uma vez presentes, podem ser incorporadas em diferentes compartimentos dos sistemas (sedimento, biota e coluna d'água). Desta forma, a exposição às NP no ambiente aquático pode ocorrer através da cadeia trófica ou por contato direto com a água (FIGURA 2). Entretanto, os processos de biodegradação ou degradação física que poderiam se relacionar com a biodisponibilidade das NP nos ecossistemas aquáticos são desconhecidas até o momento.

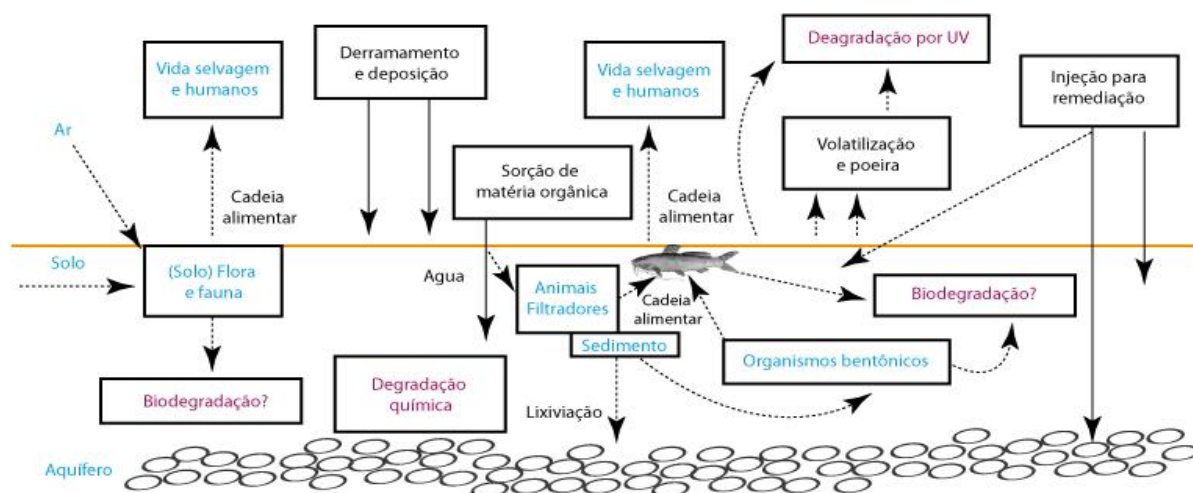


FIGURA 2. Vias de exposição, absorção, distribuição e degradação de nanopartículas no ambiente. As linhas sólidas indicam rotas que foram demonstrados em laboratório ou em campo ou que estão atualmente em uso (remediação). Letras de cor rosa indicam possíveis vias de degradação, e em cor azul são indicadas possíveis vias e fontes de nanopartículas. Modificado de OBERDÖRSTER *et al.*, 2005.

Ao contrário da prata, não há muita informação sobre o destino e os efeitos das AgNP no ambiente. No entanto, acredita-se que uma vez liberadas no ambiente, a mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade de AgNP em qualquer ecossistema são determinadas pela estabilidade coloidal, afetada por fatores químicos e físico-químicos (pH, força iônica, presença/ausência de ácidos húmicos e outros ligantes) (CHEN *et al.*, 2007; WIJNHOVEN *et al.*, 2009). Desta forma, em ambientes naturais a tendência das AgNP seria de se encontrar em tamanhos maiores de 100nm, conhecidos como agregados de AgNP.

Embora em pequenas quantidades, as AgNP liberam mais íons de prata que a prata sólida. Estes íons podem ser mais tóxicos para os organismos e muitos investigadores teorizam que efeitos tóxicos (especialmente em exposição aguda) de materiais contendo AgNP são diretamente proporcionais à taxa de libertação de íons de prata monovalentes (VARNER, 2010). Este cenário permite reconhecer que o incremento de AgNP nos ecossistemas representa um risco para os organismos aquáticos e, em consequência, por bioacumulação, para os seres humanos. Em avaliações de ecotoxicologia a ictiofauna tem sido amplamente utilizada como modelo

experimental, contando com estudos complementares de biologia, genética e ecologia, isso permite usá-los como uma ferramenta para obter informações relacionadas com o seu comportamento e resposta quando expostos aos xenobióticos em bioensaios.

Para avaliar a toxicidade de xenobioticos em fases iniciais de desenvolvimento são determinandos os efeitos no desenvolvimento e viabilidade dos organismos. Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade (taxa de eclosão e sobrevivência, anormalidades morfológicas) são critérios utilizados para detemrnar o nível de toxicidade, pela facilidade de determinação e pelo significado biológico e ecológico que repretetna para o ambiente (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). A toxicidade pode ser afetada por fatores bióticos e abióticos. Os fatores bióticos estão relacionados ao estágio de vida, tamanho, idade e estado nutricional dos organismos. Organismos jovens são mais sensíveis às substâncias tóxicas que os adultos. Por essa razão, recomenda-se o uso de organismos em estágios iniciais de vida (FORBES e FORBES, 1994).

Estudos visando avaliar toxicologicamente as AgNP em peixes em vários estádios de vida têm sido amplamente desenvolvidos, no entanto, com resultados diferentes e pouco conclusivos quando comparados entre eles (TABELA 2). De forma geral, as AgNP avaliadas em vários tamanhos, concentrações e tempos de exposição apresentaram efeitos tóxicos em varias espécies de peixes. Porém, não se tem ainda informações relacionadas aos efeitos tóxicos induzidos pelas AgNP em peixes neotropicais como *Rhamdia quelen*.

TABELA 2. Resumo de estudos avaliando efeito tóxico em varias espécies de peixes expostos a nanopartículas de prata (AgNP).

Espécie	Tamanho da NP (nm)	Concentração nominal ou LC50	Tempo de exposição	Efeitos das AgNP	Referencia
<i>Danio rerio</i> (embrião)	11,6	0,19 nM	0-2h	AgNP transportadas a traves dos canais coriônicos.	LEE <i>et al.</i> , 2007
<i>Danio rerio</i> (embrião- larvas)	5-20	5-100 mg.L ⁻¹	72h	Precipitação de AgNP em sangue, cérebro e sistema nervoso.	ASHARANI <i>et al.</i> , 2008
<i>Danio rerio</i> (embrião-larvas)	20-30	10-20 ppm	72h	AgNP agregadas dentro da pele e o sistema circulatório.	YEO e YOON, 2009
<i>Danio rerio</i> (larvas)	10-20	0,4-4 ppm	2-36 dias	Penetração de AgNP no núcleo celular e organelas. Afeta a regeneração de nadadeiras.	YEO e PAK, 2008
<i>Danio rerio</i> (embrião-larvas e pós-larvas)	20-30	7,07 mg.L ⁻¹	48h	Toxicidade de AgNP em estágios de desenvolvimento. Ag ⁺ mais toxica que as AgNP em pós-larvas.	GRIFFITT <i>et al.</i> , 2008
<i>Danio rerio</i> (embrião)	3- 10- 50- 100	(3nm-LC ₅₀) 93µM (10nm-LC ₅₀) 126 µM (50nm -LC ₅₀)127 µM (100nm- LC ₅₀) 137 µM	120h	Toxicidade e deformidades morfológicas dependentes do tamanho das AgNP .	BAR-ILANT <i>et al.</i> , 2009
<i>Danio rerio</i> (adultos)	26,6	1000 mg.L ⁻¹	48h	Captura de AgNP nas brânquias e diferenças no perfil de expressão gênica para AgNP e Ag ⁺ .	GRIFFITT <i>et al.</i> , 2009
<i>Danio rerio</i> (adultos)	5–20	1.0 g.L ⁻¹ (LC ₅₀) 250 mg. L ⁻¹	24h	Estresse Oxidativo e apoptoses associado com toxicidade de AgNP no fígado.	CHOI <i>et al.</i> , 2010

Espécie	Tamanho da NP (nm)	Concentração nominal ou LC50	Tempo de exposição	Efeitos das AgNP	Referencia
<i>Danio rerio</i> (embrião, larvas)	45-63	3 μM -30 μM	4 dias	AgNP afeta a sobrevivência, morfologia e mudanças na natação.	POWERS <i>et al.</i> , 2011
<i>Danio rerio</i> (adultos)	81	(LC ₅₀) 84 $\mu\text{g.L}^{-1}$	48h	AgNP produz toxicidade respiratória letal. Concentração de AgNP a partir das 24 h.	BILBERG <i>et al.</i> , 2012
<i>Pimephales promelas</i> (embrião)	35-100	(35-LC ₅₀) 9,4 mg.L^{-1} (100-LC ₅₀) 10,6 mg.L^{-1}	96h	Aumento de toxicidade nos embriões após soluções de AgNP brevemente sonicadas se comparadas com soluções diluídas.	LABAN <i>et al.</i> , 2010
<i>Perca fluviatilis</i> (adultos)	81	63-300 $\mu\text{g.L}^{-1}$	2 dias	Brânquias atuam como barreiras físicas de AgNP e estas diminuem a tolerância em condições de hipóxia.	BILBERG <i>et al.</i> , 2010
<i>Oryzias latipes</i> (juvenis)	49,6	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (LC ₅₀ -96h) 34,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	1-2-4-10 dias	AgNP causam danos celulares e em ADN, carcinogênicos e estresse oxidativo.	CHAE <i>et al.</i> , 2009
<i>Oryzias latipes</i> (Embrião, larvas, juvenis)	25	100–1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$	70 dias	Anormalidades morfológicas em primeiros estádios de desenvolvimento, reduzindo pigmentação, diminuição do Maximo de largura do tectum ótico e incremento na taxa de batimento cardíaco.	WU <i>et al.</i> , 2010
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (juvenis)	10-35	10-100 $\mu\text{g.L}^{-1}$	10 dias	Concentração de AgNP dependente do tamanho e concentração em brânquias e fígado. Estresse oxidativo em brânquias.	SCOWN <i>et al.</i> , 2010

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar o efeito tóxico das nanopartículas de prata em larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) expostas durante o estágio larval.

Específicos

1. Determinar a taxa de eclosão de embriões de *R. quelen* expostos a três concentrações de AgNP.
2. Determinar a sobrevivência de larvas de *R. quelen* com 24, 48, 72 e 96 horas pós fertilização (hpf) após exposição a três concentrações de AgNP desde o período de gástrula.
3. Analisar as deformidades morfológicas em larvas de *R. quelen* com 24, 48, 72 e 96 horas pós fertilização (hpf) após exposição a três concentrações de AgNP desde o período de gástrula.
4. Avaliar o grau da severidade das deformidades em larvas de *R. quelen* com 24, 48, 72 e 96 horas pós fertilização (hpf) após exposição a três concentrações de AgNP desde o período de gástrula, por meio do índice de deformidade morfológica (IDM).
5. Avaliar alterações na estrutura dos neuromastos (órgãos mecanorreceptores) das larvas de *R. quelen* de 96 horas pós fertilização (hpf) após exposição a três concentrações de AgNP desde o período de gástrula, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
6. Determinar a localização ultraestructural das nanopartículas de prata em larvas de *R. quelen* de 96 horas pós fertilização (hpf) após exposição a três concentrações de AgNP desde o período de gástrula, através de microscopia eletrônica de transmissão (MET).
7. Determinar por análise química a acumulação de prata em larvas de *R. quelen* com 24, 48, 72 e 96 horas pós fertilização (hpf) após exposição a três concentrações de AgNP desde o período de gástrula.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparação e caracterização da suspensão de Nanopartículas de prata

Nanopartículas de prata (Sigma–Aldrich, Ref. 576832-5G, estabilizadas em tampão de citrato) <10 nm, foram suspendidas em 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de água MilliQ. Depois de três horas em banho de ultrassom e oito ciclos de dois minutos de sonicação com uma amplitude de 100W, a suspensão de AgNP foi armazenada a temperatura ambiente até seu uso. A solução estoque da suspensão de AgNP foi re-sonicada três vezes em ciclos de cinco minutos para realizar as diluições com água MilliQ na preparação das concentrações finais a serem utilizadas. A sonicação foi realizada sob-banho de gelo com o objetivo de manter a temperatura baixa durante o processo, com o intuito de não alterar as condições químicas e físicas da suspensão.

O tamanho e área das AgNP foram medidos pelo analisador de partículas do programa Image J® usando imagens digitais adquiridas por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) no microscópio JEOL JEM 1200 EXII do Centro de Microscopia da Universidade Federal do Paraná. As nanopartículas foram preparadas em telas de cobre recobertas com carbono de 300 grades de malha após a diluição em metanol (100%). Nas suspensões de AgNP utilizadas para realizar a exposição foram analisados o tamanho das partículas e potencial zeta (estabilidade da suspensão) no Zetasizer Nano ZS90 MALVERN®.

3.2. Desenho experimental

Os experimentos foram conduzidos nas instalações do Laboratório de pesquisa da Piscicultura Panamá, Paulo Lopes - SC. Exemplares de *Rhamdia quelen* com características externas de maturação sexual foram coletados e mantidos em tanques de 500L com areação constante e com temperatura média de 24°C controlada por aquecedores com termostato (FIGURA 3A).

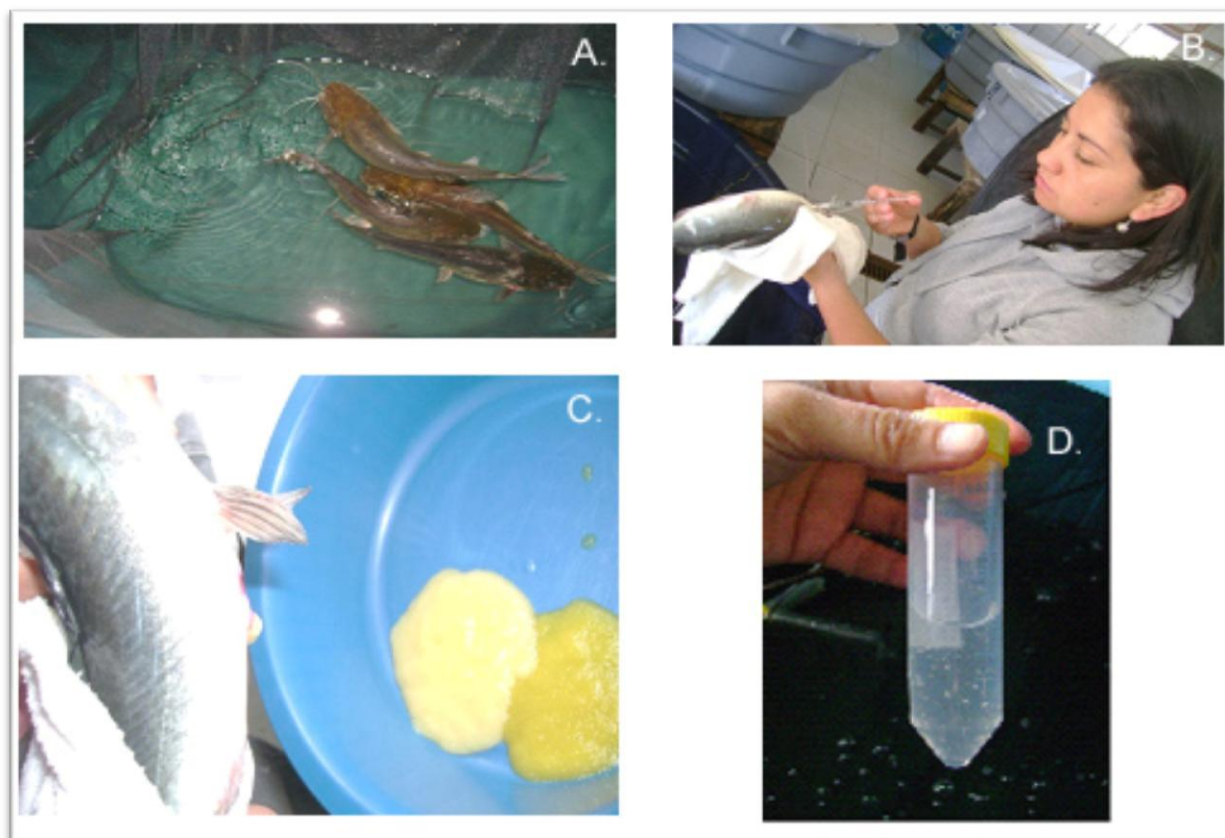


FIGURA 3. Procedimentos para a obtenção de zigotos de *Rhamdia quelen* na Piscicultura Panamá. A. Tanque para manutenção de progenitores. B. Inoculação de hipófise de carpa para induzir a desova. C. Desova e fecundação de *Rhamdia quelen* *in vitro*. D. Ativação do desenvolvimento embrionário.

Os exemplares foram pesados e medidos morfometricamente para identificação, posteriormente foi induzida a desova das fêmeas com extrato de hipófises de carpa. Após a segunda inoculação hormonal das fêmeas (FIGURA 3B) foi calculado segundo as horas grau ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}$) no momento da desova para a espécie ($270^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}$). Sendo este valor o somatório das temperaturas obtidas nas medições a cada hora após a segunda aplicação do hormônio até a desova (11-12h a 24°C ; CARNEIRO *et al.*, 2002). Os machos foram injetados com hormônio na segunda inoculação das fêmeas, para que liberem suficiente esperma na hora da desova. As doses para os dois sexos foram calculadas de acordo com base na massa de cada animal.

Na hora da desova três exemplares fêmeas ($>900\text{ g}$) foram retiradas da água e seu ventre foi pressionado suavemente para liberação dos gametas (FIGURA 3C). Em

recipientes de polipropileno separados foram coletados os gametas (ovócitos e espermatozóides) para posterior hidratação e fertilização (FIGURA 3D).

Posteriormente se realizou a hidratação com água do tanque onde se encontravam os progenitores para manter as mesmas condições abióticas. Três grupos de ovos fecundados provenientes de casais progenitores diferentes foram incubados por oito horas para posteriormente serem utilizados os embriões que tiveram a maior taxa de fecundação entre os três pares testados.

Para determinar o melhor sistema de incubação para *R. quelen* foi realizado um teste piloto com um casal de progenitores incubando os embriões em três sistemas: 1) Microplaca de cultivo celular de 96 poços em incubadora com temperatura controlada (FIGURA 4A), 2) Sacolas de polipropileno com saturação de oxigênio (FIGURA 4B), 3) Tubos de 50ml de fundo cônico, graduados com tampa (FIGURA 4C).

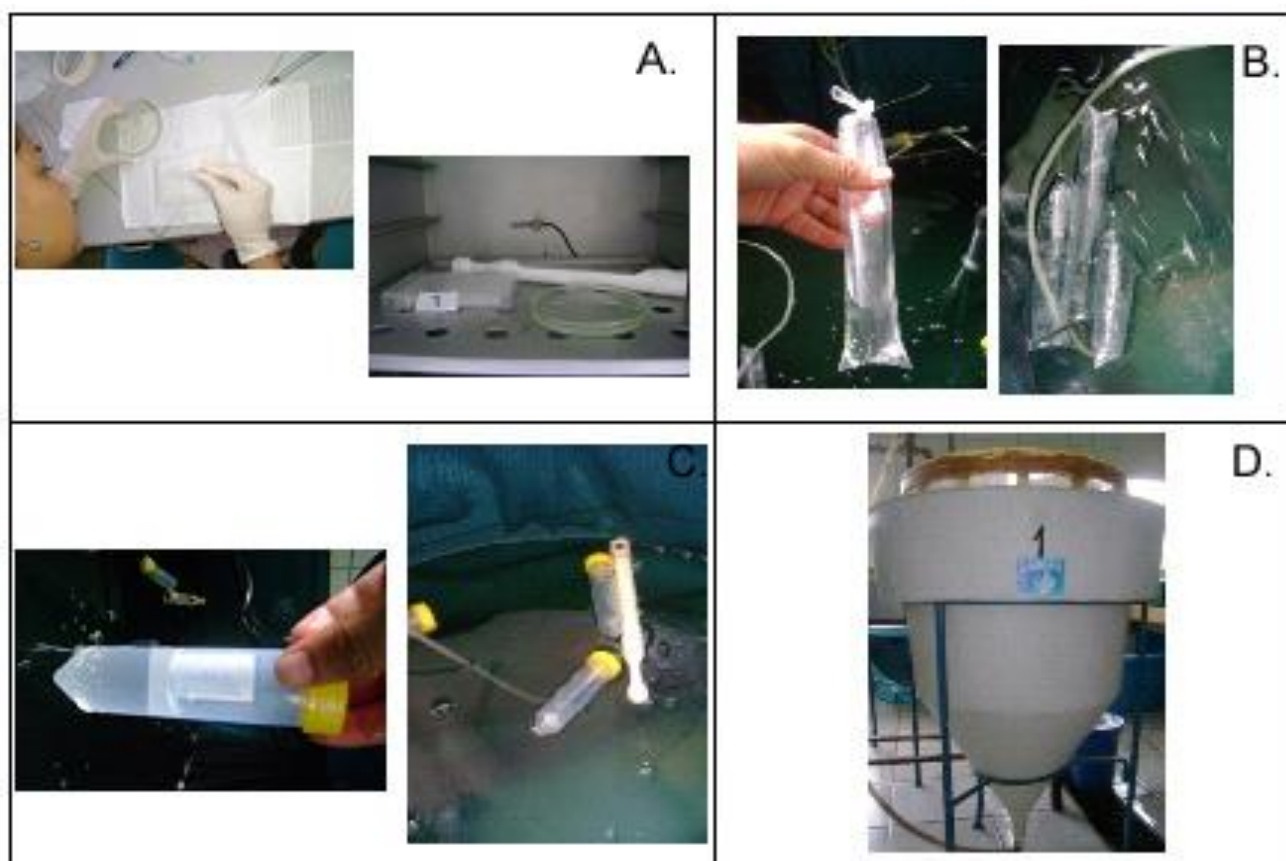


FIGURA 4. Sistemas de incubação testados para ovos de *R. quelen*. A. Microplacas de cultivo celular Biofilm® de 96 poços. B. Sacolas de polipropileno com saturação de oxigênio. C. Tubos de 50mL de fundo cônico, graduados com tampa. D. Incubadora tipo Zoug de 50L.

A taxa de fecundidade e eclosão foram avaliadas nos três sistemas comparando-os com os valores obtidos nas incubadoras tipo Zoug (FIGURA 4D), utilizadas rotinariamente na Piscicultura Panamá. As condições de incubação mantiveram-se nos três sistemas, tendo uma temperatura constante e controlada de $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$, e escuridão às 24h para reproduzir um ambiente similar ao qual se desenvolve a espécie naturalmente. O sistema de incubação que teve maior sucesso (taxa de fecundidade: 40%, taxa de eclosão: 87%) foi o de microplacas de cultivo celular e por isso, este foi utilizado para fazer a incubação para a espécie *R. quelen*.

3.3. Testes de toxicidade

Para realizar os testes de toxicidade foram utilizados gametas de um único casal progenitor para reduzir a variabilidade genética no experimento. Após a fecundação, os embriões foram observados num estereoscópio ($\times 0.67\text{--}6.7$, Olympus) para verificar o estadio. Embriões em estadio de gástrula como descrito por Rodrigues-Galdino e colaboradores (2010) foram transferidos individualmente para poços das placas de cultivos. Os embriões foram expostos aos três tratamentos de AgNP e o controle de água reconstituída, detalhados na TABELA 3. O volume de incubação em cada poço foi de $200\mu\text{l}$ e foram trocados $100\mu\text{l}$ da solução a cada 24h, para garantir a exposição das larvas ao contaminante numa concentração o mais constante possível.

TABELA 3. Tratamentos analisados para avaliar o efeito em larvas de *Rhamdia quelen*, expostas a nanopartículas de prata durante os estádios primários de desenvolvimento.

Tratamento	Concentração Nominal ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
AgNP	0.03
	0.3*
	3
Controle	Água reconstituída (ASTM, 1993)

* Concentração de AgNP tóxica para *Danio rerio* (POWERS *et al.*, 2011)

Os testes foram realizados em triplicata, sendo que 60 embriões foram utilizados por tratamento. Os embriões foram expostos às AgNP a partir do estágio de gástrula, completando assim tempos de exposição de 16, 40, 64 e 88 horas após fertilização (hpf). As coletas para análises foram realizadas as 24, 48, 72 e 96 hpf para comparação morfológica com descrições dos estádios de desenvolvimento publicadas por Rodrigues-Galdino (2010). Durante os testes, a temperatura foi mantida a $24\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, e mantiveram-se protegidos da luz para garantir as condições naturais onde a espécie se desenvolve.

3.4. Processamento das amostras

3.4.1. Testes de Toxicidade em larvas

3.4.1.1. Taxa de Eclosão

Por meio da observação com estereoscópio, foi registrada a taxa de eclosão cerca das 24 hpf. A taxa de eclosão foi calculada como o número de larvas que se encontravam fora do córion e apresentavam natação livre em relação ao total de embriões incubados no início da exposição aos tratamentos.

3.4.1.2. Taxa de Sobrevivência

Foi estimada a porcentagem de sobrevivência das larvas expostas nos quatro tratamentos em períodos de 24, 48, 72 e 96 hpf mediante a observação direta em estereoscópio dos 60 indivíduos incubados, registrando como vivos os indivíduos que se movimentavam e apresentavam batimento cardíaco, observável pela cor transparente neste estágio. A taxa de sobrevivência foi calculada como o número de larvas vivas em relação ao número inicial de embriões incubados em cada tratamento.

3.4.1.3. Deforridades morfológicas

Após a incubação nas situações experimentais, as larvas foram coletadas e fixadas em paraformaldeído 4% diluído em tampão Fosfato-salino (PBS) 0,1M durante três horas a 4°C, posteriormente foram lavadas em PBS 0,1M. As larvas foram conservadas em álcool 70% e transportadas para o Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR) para observação e captura de imagens do material em microscopia de luz.

Para analisar o grau da severidade das deforridades larvais decorrentes da exposição às AgNP foi utilizado o índice de deforridade morfológica (IDM) baseado na proposta de Powers e colaboradores (2011). Para o presente estudo, foram classificadas as deforridades morfológicas nas seguintes categorias:

- 1) Axial (ex. crescimento do esqueleto atrofiado, enrolamento da cauda, lordose, cifose e escoliose);
- 2) Nadadeiras (ex. nadadeiras atrofiadas);
- 3) Região Cefálica (ex. edema ocular, otólitos pequenos);
- 4) Tórax/Abdômen (ex. dilatação, coração anormal, atrofia corporal).

As deforridades foram catalogadas e foi atribuído um valor de importância de 1-4 para cada uma dependendo o grau da lesão morfológica; sendo um para as deforridades que comprometem menos o indivíduo sendo a severidade baixa e quatro para as de maior severidade. Para cada tratamento foram somados os valores das malformações individuais por categorias e somados para gerar uma matriz de valor de categorias. Os valores de todas as categorias foram somados, resultando em um valor total em um ranking de 0-34.

Assim valores de 0-3 foram denominados como normal, e valores de 4-34 anormais. Para os animais que não eclodiram foi atribuído um valor de zero, denominando esta categoria como indivíduos mortos. Esta caracterização foi determinada com base na observação do controle que apresentava valores de anormalidades entre 0-3.

3.4.2. Análise Morfológica dos neuromastos

Os neuromastos são órgãos mecanorreceptores distribuídos na cabeça e no corpo (linha lateral), em manchas de células ciliadas mecanorreceptivas que permitem ao peixe a capacidade de orientação em relação a corrente de água (reotaxia) (COOMBS *et al.*, 2001). Os neuromastos estão compostos por células sensoriais (*hair cells*, FIGURA 5a) que são constituídas por cinecílios ou quinecílios (feixe de cílios longos) e de estereocílios (projeções mais curtas) (FIGURA 5 b,c). Alterações destas estruturas mecanorreceptoras servem como biomarcadores para avaliar os efeitos de xenobióticos no ambiente (FROEHLICHER *et al.*, 2009).

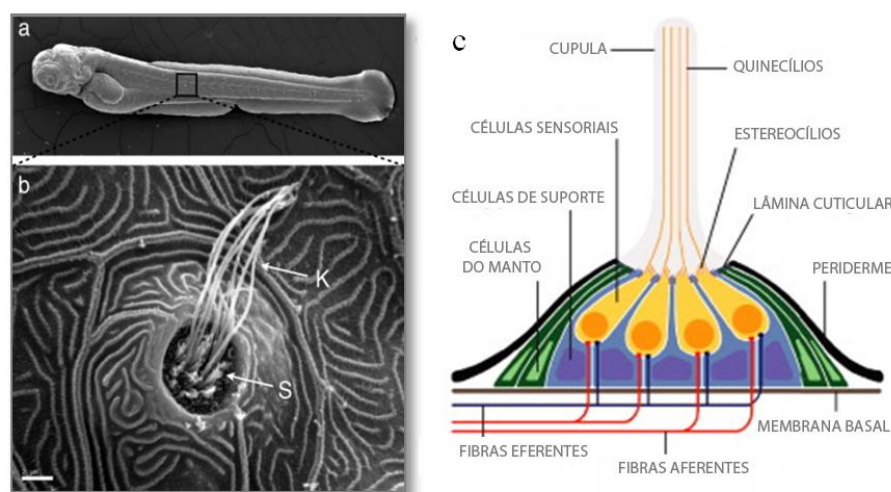


FIGURA 5. Imagem de MEV do Neuromasto de *Danio rerio* (a) mostrando as *hair cells* (b), quinecílio (k) e estereocílio (s). Esquema de um neuromasto (c). Modificado de www.zebrafish.cl/metazoan/images.php

Para identificar as alterações na estrutura dos neuromastos, cinco larvas de 96hpf, foram fixadas em Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 a 4°C) por 2 h. Consecutivamente, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato 0,1M (2X) e armazenadas em tubo graduado de 2ml, de fundo cônico com o tampão, até o processamento no Laboratório de Toxicologia Celular da UFPR.

Posteriormente, foi realizada a desidratação do material em série crescente de etanol (50, 70, 80, 90% Merck®) por 15 min cada e tres banhos de etanol 100% por 15 min cada banho. As amostras passaram, então, por ponto critico utilizando CO₂ líquido no aparelho Balzers R® CPD-010, montadas em soportes de cobre, metalizadas com ouro (Balzers R® SCD-030) e observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM – 6360LV do Centro de Microscopia da UFPR (CME-UFPR).

Foram realizadas observações dos neuromastos da região cefálica, a fim de identificar alterações na microestrutura da superfície corporal. As imagens de MEV foram capturadas digitalmente e analisadas pelo software Adobe Photoshop CS6® pela ferramenta de medição, para determinar os diâmetros da superfície das estruturas.

3.4.3. Localização ultraestrutural de AgNP em larvas de *Rhamdia quelen*

Dois indivíduos de cada tratamento expostos durante 96 hpf e coletados de acordo com o item 3.4.2., foram tratados para visualizar ultraestruturalmente a localização de nanopartículas de prata por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). No Laboratório de Toxicologia Celular as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄ 1% , Cacodilato de sódio 0.1M, NaCl 50mM, CaCl₂ 5mM - pH 7,8 no escuro) por uma hora. O ósmio foi removido com lavagens de tampão cacodilato 0,1M (4X). Acetato de uranila 1% foi utilizado para precontrastar por 1h a 4° C, posteriormente foram realizadas lavagens consecutivas de tampão cacodilato (4X).

Consecutivamente, foi realizada a desidratação em série alcoólica crescente de etanol (50, 70, 90, 100%) e posteriormente a substituição do etanol 100% por óxido de propileno (OP) (2-5 min). Depois, foi realizada a infiltração da resina no material com Epon-812® (Mistura I: OP/Epon 2:1 - 2h; Mistura II: OP/Epon 1:1 - 2h; Mistura III: OP/Epon 1: 2 - 2h). Finalmente as amostras foram deixadas em Epon puro sob vácuo *overnight* para que se completasse a infiltração e houvesse a retirada de bolhas da resina. A polimerização foi realizada em estufa a 60°C, por 72 horas.

Os cortes ultra-finos (60-80 nm) foram contrastados com acetato de uranila 2% (20 min) e citrato alcalino de Pb (5 min) e observados no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II do Centro de Microscopia da UFPR (CME-UFPR).

3.4.4. Determinação Química de Prata por Espectrofotometria de Absorção Atômica de Chama (FAAS)

Para a análise química de prata (Ag) foram coletados pools de larvas de mínimo 0,5 mg por tratamento, correspondentes a cada tempo avaliado (24, 48, 72 e 96 hpf) e armazenadas a -80° C até o processamento na Universidade Estadual de Ponta Grossa no Setor de Ciências Exatas e Naturais.

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e digeridas em dois ml da solução concentrada de HNO_3 (grau AR; Fisher Scientific®). Depois foram colocadas em um digestor Friedrich TE-128/6 Tecnal® a 200° C, por duas horas. Após o arrefecimento, extratos foram filtrados em filtros Whatman quantitativos (No. 540) e transferidos para frascos de fundo redondo de 25 ml, lavados com água Milli-Q deionizada e aferido.

Posteriormente as amostras foram analisadas em Espectrômetro de Absorção Atômica de Chama (FAAS) Varian® modelo 240FS, ligado ao Sistema de preparação de amostras (SPS3) e um sistema de bomba de indução (SIPS). Os padrões de calibração contendo 1 ppm, 0,75ppm, 0,50ppm 0,25ppm e foram feitos a partir de uma solução-mãe (1000 ppm ou $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) de prata SpecSol®. As concentrações são expressadas em $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

3.5. Análises estatístico dos dados

Os valores da eclosão e sobrevivência foram apresentados como média±desvio padrão. Deformidades foram representadas em frequência e o índice de deformidades em valor para cada categoria por tratamento. As taxas de eclosão e de sobrevivência foram analisadas com ANOVA de duas vias após a confirmação da normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos. As análises de deformidades foram realizadas com ANOVA de uma via considerando os tempos como réplicas. Testes *post-hoc* de Dunnett e/ou Tukey foram utilizados para análises das diferenças com o controle e em comparações múltiplas, respectivamente. As análises foram realizadas utilizando o Software R, e assumindo um valor de $p < 0,05$ para significância estatística.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das Nanopartículas de Prata (AgNP)

A caracterização das nanopartículas de prata (AgNP) da prata comerciais (Sigma–Aldrich, Ref. 576832-5G) foi realizada por imagens capturadas em MET (FIGURA 6a). A análise de partículas pelo programa Image J® permitiu a medição das AgNP demonstrando que estas apresentam tamanhos de distribuição de 5-19nm, sendo que a maioria delas está no intervalo de 5-12 nm (FIGURA 6). A área de superfície das nanopartículas individuais (FIGURA 6a) foi medida e variava entre 41.388-315,2 nm² com a maioria das nanopartículas dentro do intervalo de 40-168 nm² (FIGURA 6B).

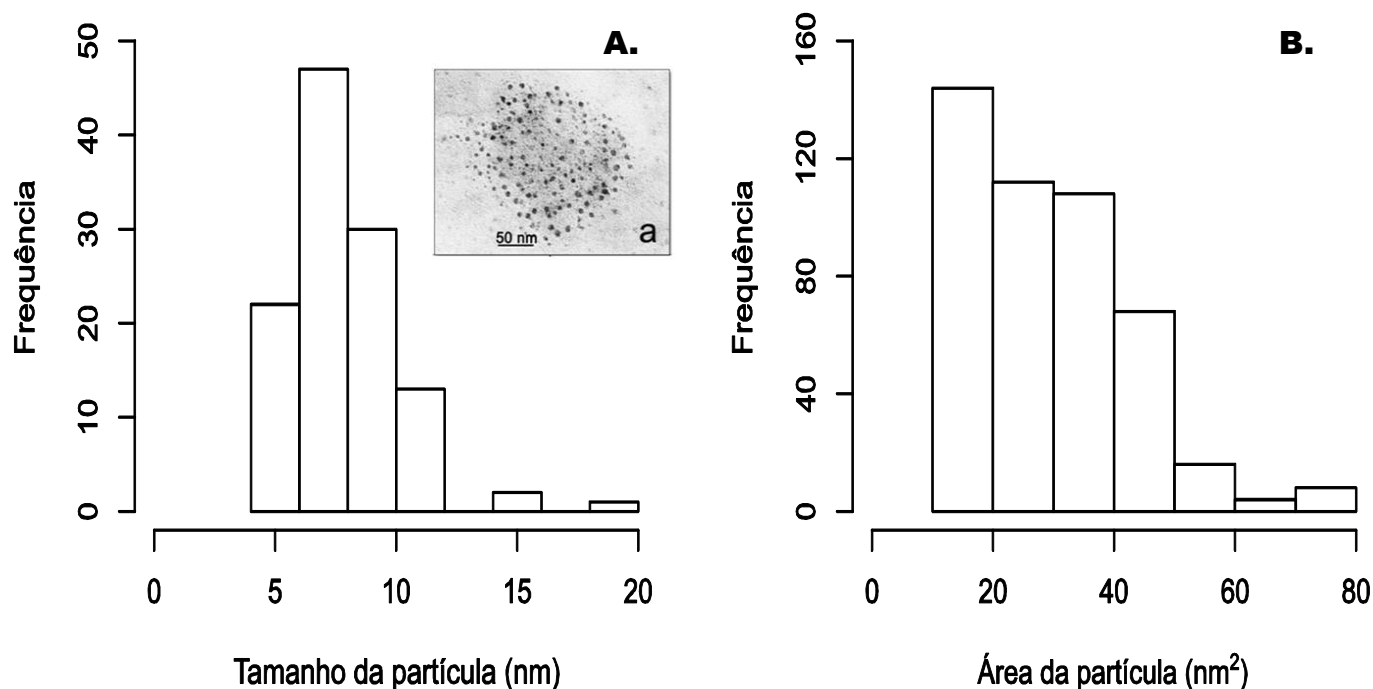


FIGURA 6. Caracterização das nanopartículas de prata (AgNP) usando microscopia eletrônica de transmissão (MET)(a). (A) Histograma de distribuição de tamanho das AgNP mostrando tamanho médio de 7.83 ± 2.21 nm e (B) Área de superfície entre $41.388-315.2$ nm².

Ao realizar a análise das suspensões utilizadas na exposição dos testes de toxicidade, foram registradas partículas de mais de 100 nanômetros de diâmetro (d.nm) para as três concentrações (FIGURA 7) caracterizando estas como agregados de AgNP. Na suspensão de concentração nominal de $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi registrado 64% das partículas com tamanho médio de 629,4 d.nm, no entanto, só 17,1% registrou tamanhos de nanopartículas (<100nm) (FIGURA 7A) podendo estar disponíveis na suspensão.

A suspensão com concentração nominal de $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou três picos de partículas, sendo que 60,7% das partículas com tamanhos médios de 720 nm e 23,7% tamanhos maiores de 1000 nm, assim, só 15,4% encontra-se em tamanho de nanopartículas (FIGURA 7B). Na suspensão de concentração nominal de $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram registradas poucas nanopartículas (6%) sendo que a maioria apresentam tamanhos maiores de 100nm (32%) (FIGURA 7C).

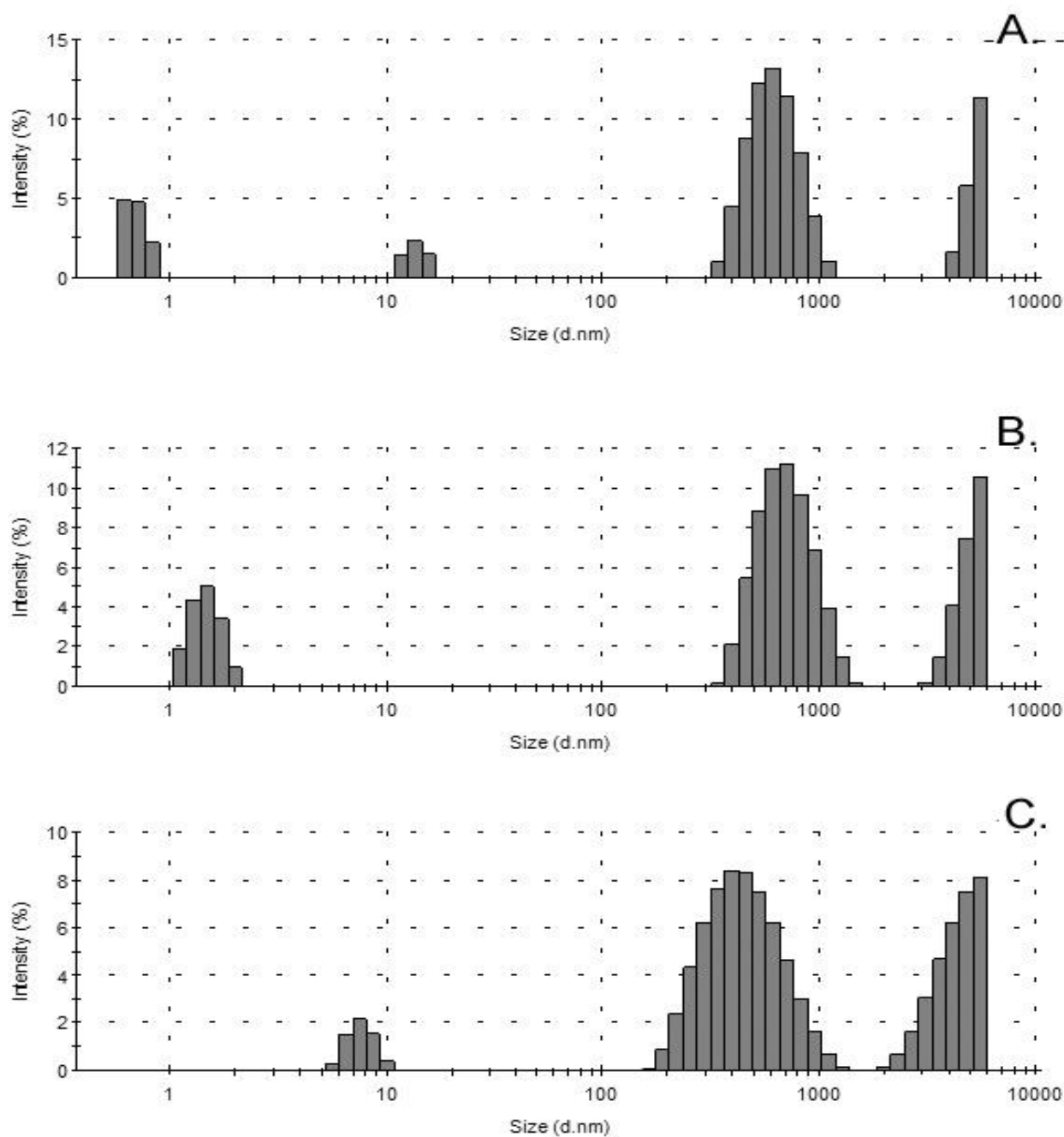


FIGURA 7. Histograma de distribuição de tamanho da nanopartículas de prata em concentração nominal de (A). 0,03 µg.ml⁻¹, (B). 0,3 µg.ml⁻¹ e (C).3 µg.ml⁻¹.

Nas suspensões preparadas para os testes de toxicidade, também foi medida a magnitude do potencial zeta, que indica as condições de estabilidade da suspensão. Devido à repulsão entre as partículas se diminui a tendência de aglomeração. Se as partículas apresentam um potencial zeta elevado (>30), seja ele positivo ou negativo, elas vão se repelir, garantindo assim a estabilidade da suspensão. As três suspensões de AgNP analisadas registraram valor de potencial zeta menor de 30 ($-10,8$, $-12,4$ e $-15,4$; respectivamente), indicando que as partículas nas suspensões têm tendência de agruparem-se.

4.2. Determinação química de prata nas larvas

A concentração de prata (Ag) registrada em larvas apresentou um padrão diferente nas três concentrações nominais avaliadas, sendo no controle não detectável (FIGURA 8). Na concentração nominal menor ($0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e na maior ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) não se observa uma relação tempo dependente de Ag nas larvas como ocorreu na concentração intermediária ($0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (FIGURA 8).

Nesta concentração foi observada uma concentração de Ag diretamente proporcional ao tempo de exposição, no entanto, às 96hpf foi registrado o maior valor de Ag ($0,0035 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de todos os tratamentos e os tempos de exposição, contudo, este valor é 100 vezes inferior ao da concentração inicial de exposição ($0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Na maior concentração avaliada foi registrado o incremento de Ag nas larvas a partir das 48hpf, não obstante ao tempo foi registrada uma ligeira diminuição (FIGURA 8).

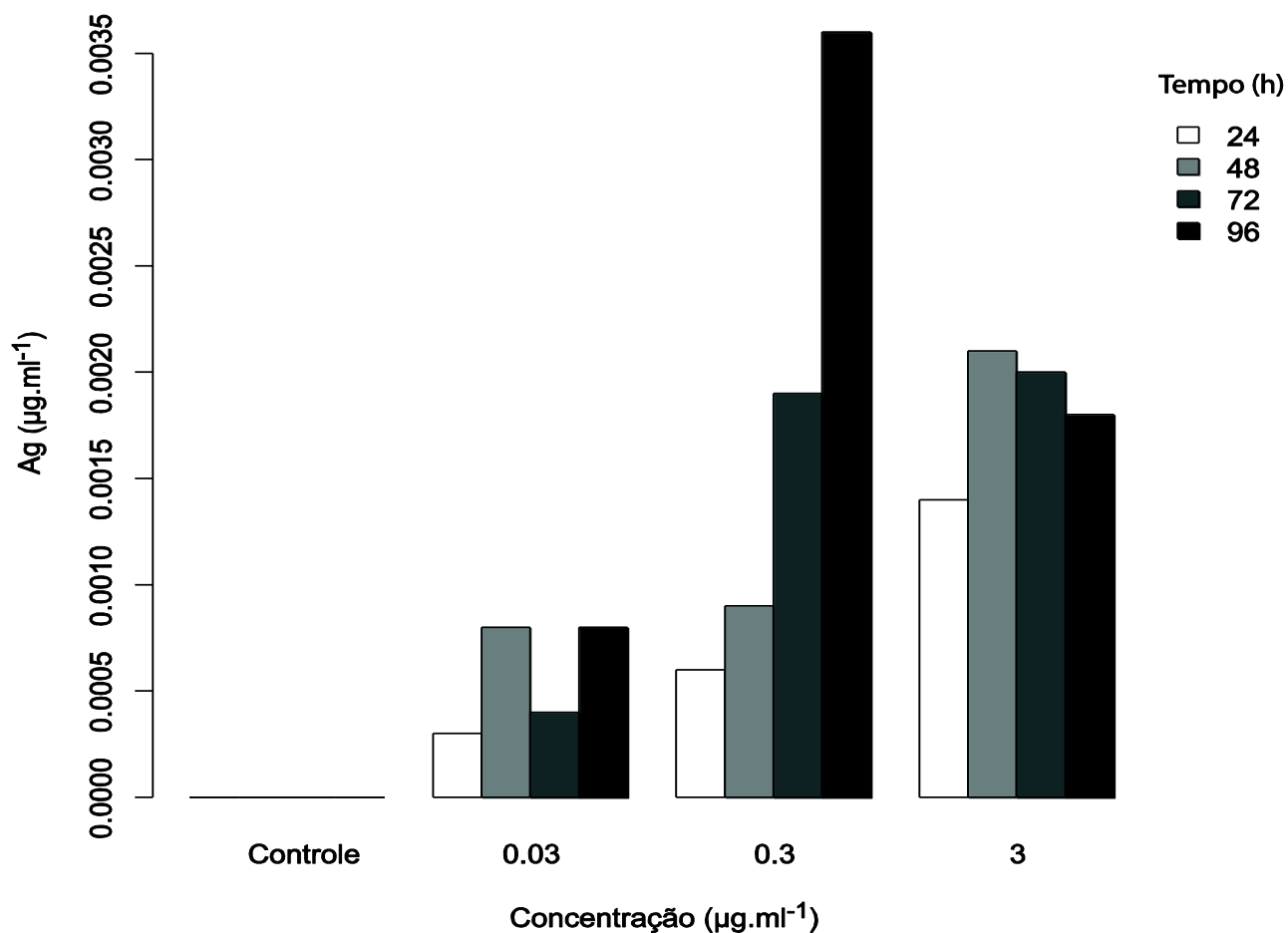


FIGURA 8. Determinação das concentrações de prata em larvas de *Rhamdia quelen* após exposição aos agregados de nanopartículas de prata (AgNP).

A toxicidade de cada concentração de AgNP foi avaliada para entender as relações de concentração-tempo-efeito, em larvas de *Rhamdia quelen* expostos desde estádios embrionário a partir de critérios como são a taxa de eclosão, taxa de sobrevivência das larvas e alterações nas deformidades morfológicas e ultraestruturas.

4.3. Taxa de eclosão

Após 24 hpf foi avaliada a taxa de eclosão de cada tratamento e observado o efeito negativo ocasionado pela exposição aos agregados de nanopartículas de prata.

Foi registrado um decréscimo em média de 54% na eclosão dos embriões expostos em diferentes concentrações (FIGURA 9). Na concentração menor e na intermediária observam-se valores em torno de 53% na taxa de eclosão ($0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$: $n=32$, 53%; $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$: $n=32$, 54%), no entanto na maior concentração houve menor taxa de eclosão ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$: $n=29$, 48%). Diferenças estatísticas foram observadas em todos os tratamentos em relação ao controle, mas não entre as concentrações testadas (FIGURA 9).

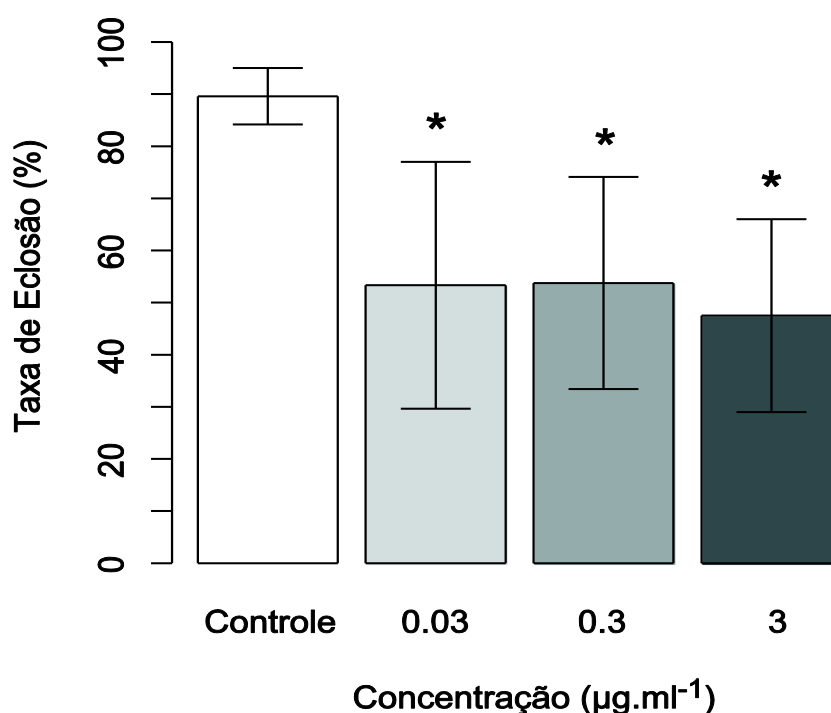


FIGURA 9. Taxa de eclosão após 24hpf de incubação em 24°C de embriões de *Rhamdia quelen* expostos aos agregados de nanopartículas de prata. Os asteriscos representam tratamentos com diferenças estatisticamente significativas ($p<0.05$).

4.4. Taxa de sobrevivência

A taxa de sobrevivência mostrou diferença significativa entre todos os tratamentos e tempos de exposição quando comparados com o grupo controle evidenciando o efeito do xenobiótico exposto em larvas em todos os tempos testados (FIGURA 10). Os agregados de AgNP causam na taxa de sobrevivência uma diminuição dependente do

tempo, no entanto, se observam algumas diferenças entre as concentrações testadas dentro do mesmo tempo de exposição (FIGURA 10). Assim, a taxa de sobrevivência tem uma tendência inversamente proporcional ao tempo de exposição nas concentrações de AgNP.

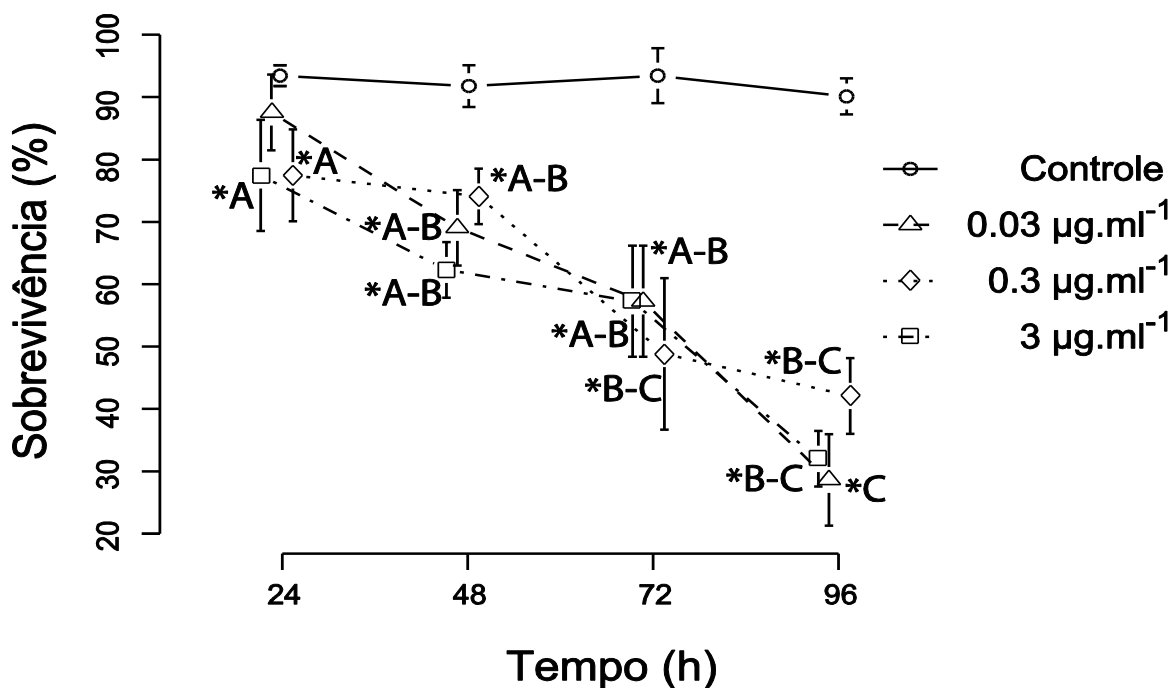


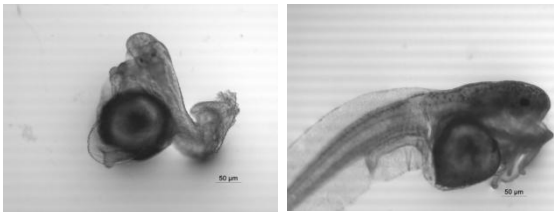
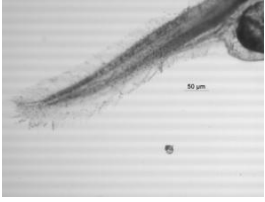
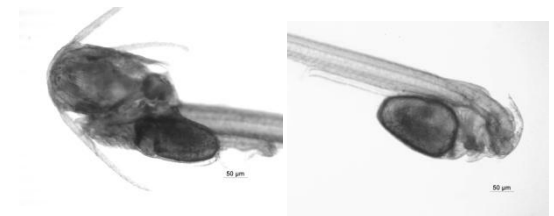

FIGURA 10. Taxa de sobrevivência de larvas de *Rhamdia quelen* após exposição aos agregados de nanopartículas de prata em diferentes tempos. As letras e asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Para todas as concentrações avaliadas foi registrado um padrão semelhante e a sobrevivência diminuiu progressivamente ao longo do tempo, com valores significativamente menores registrados em 96 hpf. No entanto, às 96 hpf, em concentrações extremas ($0,03$ e $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a sobrevivência diminuiu mais quando comparadas com a concentração intermediária ($0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (FIGURA 10).

4.5. Deformidades Morfológicas

Ao analisar as deformidades larvais após exposição às AgNP foram observadas alterações no desenvolvimento ao longo do tempo de exposição. As deformidades encontradas foram agrupadas em quatro categorias como descritas na TABELA 4.

TABELA 4. Categorias de deformidades observadas em larvas de *Rhamdia quelen* após exposição aos agregados de AgNP.

Categoria	Descrição	Exemplos de deformidades observadas
Axial	Crescimento do esqueleto atrofiado (4), enrolamento da cauda (4), coluna vertebral apresentando cifose ou lordose (4).	
Nadadeiras	Nadadeiras atrofiadas danificadas (2) e/ou apresentando lesão na estrutura (1).	
Cefálica	Deformidades faciais (3), ausência de olhos (4), edema ocular (4), deformidades na estrutura bucal (4).	
Tórax/ Abdômen	Distensão e/ou atrofia corporal (2), edema cardíaco (4).	

*Numeros entre parênteses representam o valor assigando ao grau de severidade para o IDM.

De forma geral, foi evidente o aparecimento de deformidades com o aumento da concentração (FIGURA 11). As deformidades começam a aparecer a partir das 24 hpf e as deformidades axiais foram as mais frequentes, sendo encontradas tanto no controle como nos tratamentos avaliados (FIGURA 11).

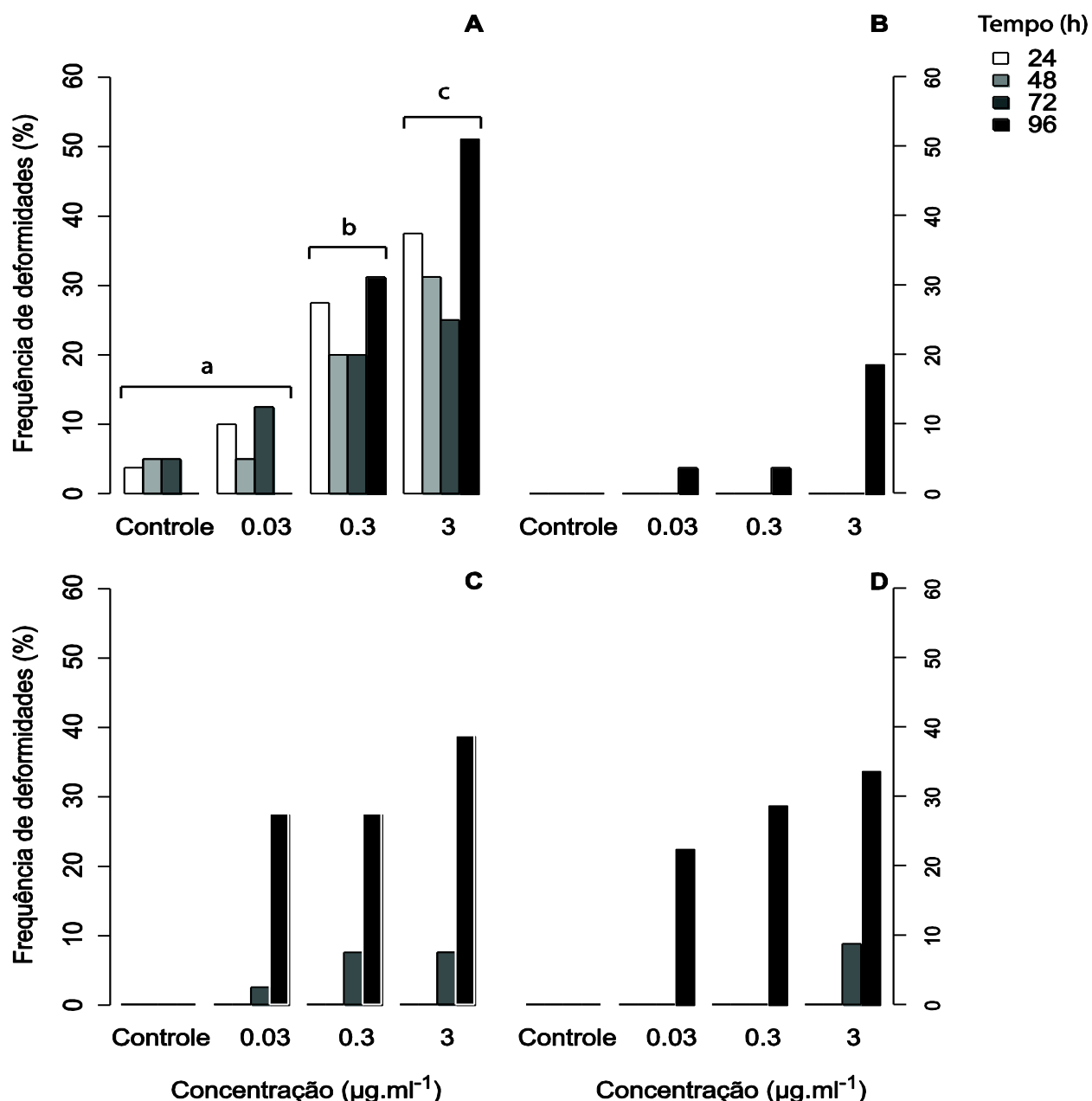


FIGURA 11. Frequência de deformidades em larvas de *Rhamdia quelen* após exposição aos agregados de nanopartículas de prata em diferentes tempos. (A). Deformidades Axiais, (B). Deformidades Nadadeiras, (C). Deformidades Cefálicas, (D). Deformidades de Tórax/ Abdômen. Letras representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

As deformidades de nadadeiras, cefálica e torax/abdômen se apresentaram em baixas frequências, sendo que a ocorrência mais rara foi na categoria de nadadeiras. No entanto, foi registrada a sua ocorrência nas três concentrações. As deformidades cefálicas e de tórax/abdômen foram reportadas a partir das 72hpf sendo que a maior ocorrência foi às 96hpf (FIGURA 11).

Analisando as deformidades axiais foram observadas diferenças estatísticas para todas as concentrações, entretanto não houve diferença entre o controle e a concentração mais baixa ($0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Foi observado que na concentração intermediária e na maior, a frequência de deformidades teve um aumento de até três vezes em relação à menor concentração, durante os tempos avaliados (FIGURA 12).

O fator de importância das deformidades foi avaliado pelo índice de deformidades em cada concentração e tempo de exposição. A exposição aos agregados de nanopartículas de prata mostrou um efeito dependente do tempo de exposição, quanto maior o tempo maior foi o índice de deformidades após 96 hpf de exposição em todos os tratamentos (FIGURA 12). As concentrações extremas ($0,03$ e $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram um padrão semelhante no índice de deformidade (diretamente proporcional ao tempo), enquanto na concentração intermediária ($0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) este padrão foi diferente, pois os valores de importância das deformidades diminuíram com o tempo, no entanto às 96hpf foi observado um drástico aumento nas deformidades larvais (FIGURA 12).

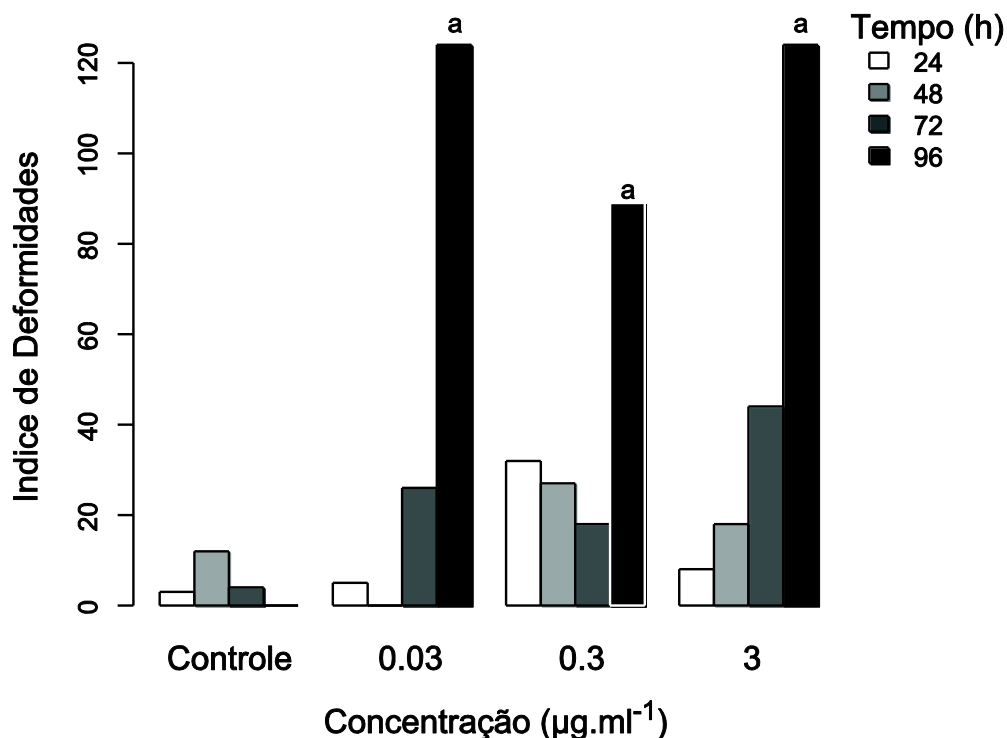


FIGURA 12. Índice de deformidade de larvas de *Rhamdia quelen* após exposição a nanopartículas de prata em diferentes tempos. Letras representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

4.6. Relação Concentração-tempo-efeito

Os diagramas de dispersão apresentados na FIGURA 13 mostram a relação entre o tempo de exposição e a concentração com o índice de deformidades (FIGURA 13A) e a concentração de Ag das larvas (FIGURA 13B). As diferenças no índice de deformidades foram determinadas pelo tempo ($p < 0.05$) (FIGURA 13A). Entretanto, a concentração de Ag dependeu diretamente da concentração usada na exposição ($p < 0.05$) (FIGURA 13B), embora fosse observado que o tempo também afeta a concentração da Ag, não foi estatisticamente significativa (FIGURA 13B).

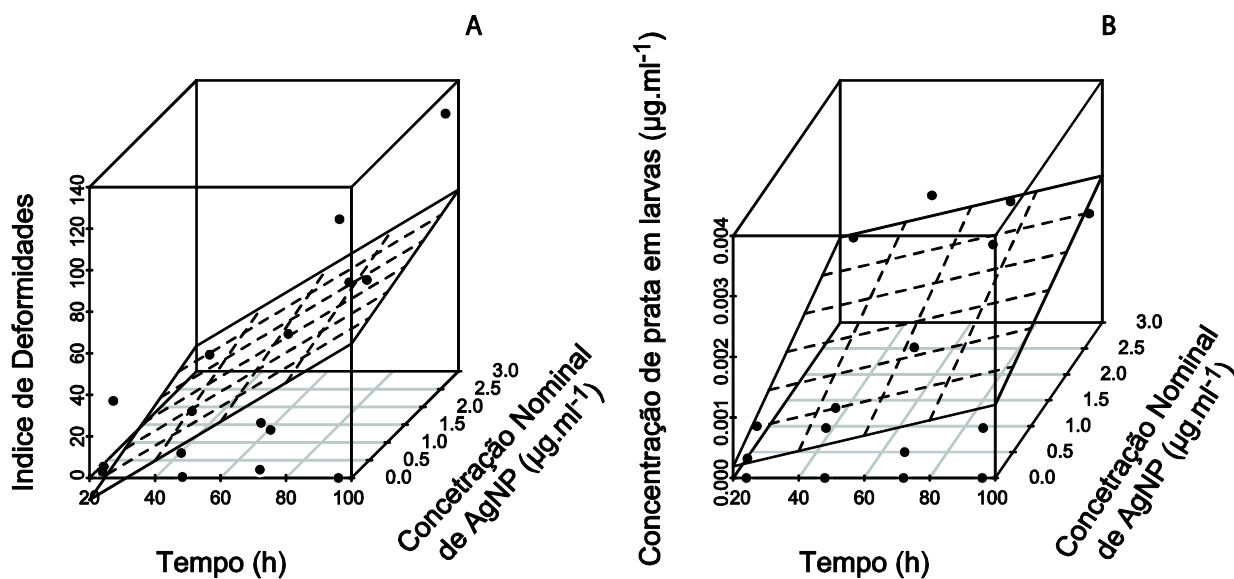


FIGURA 13. Dispersão em 3D para a concentração e tempo de exposição versus (A) índice de deformidades e (B) Concentração de prata (Ag) em larvas de *Rhamdia quelen* após exposição à nanopartículas de prata.

4.7. Localização ultraestrutural de AgNP em larvas de *Rhamdia quelen*

Foram analisadas as eletromicrografias obtidas em microscopia eletrônica de transmissão (MET) de larvas após 96 horas de exposição. Foram observadas AgNP dentro das ultraestruturas celulares nas três concentrações avaliadas (FIGURA 14). As nanopartículas de prata estão depositadas em fibras musculares (FIGURA 14A), de forma isolada no citosol de células epiteliais (FIGURA 14B), próximo ao núcleo de células epiteliais (FIGURA 14C) e dentro de vesículas de células epiteliais (FIGURA 14D).

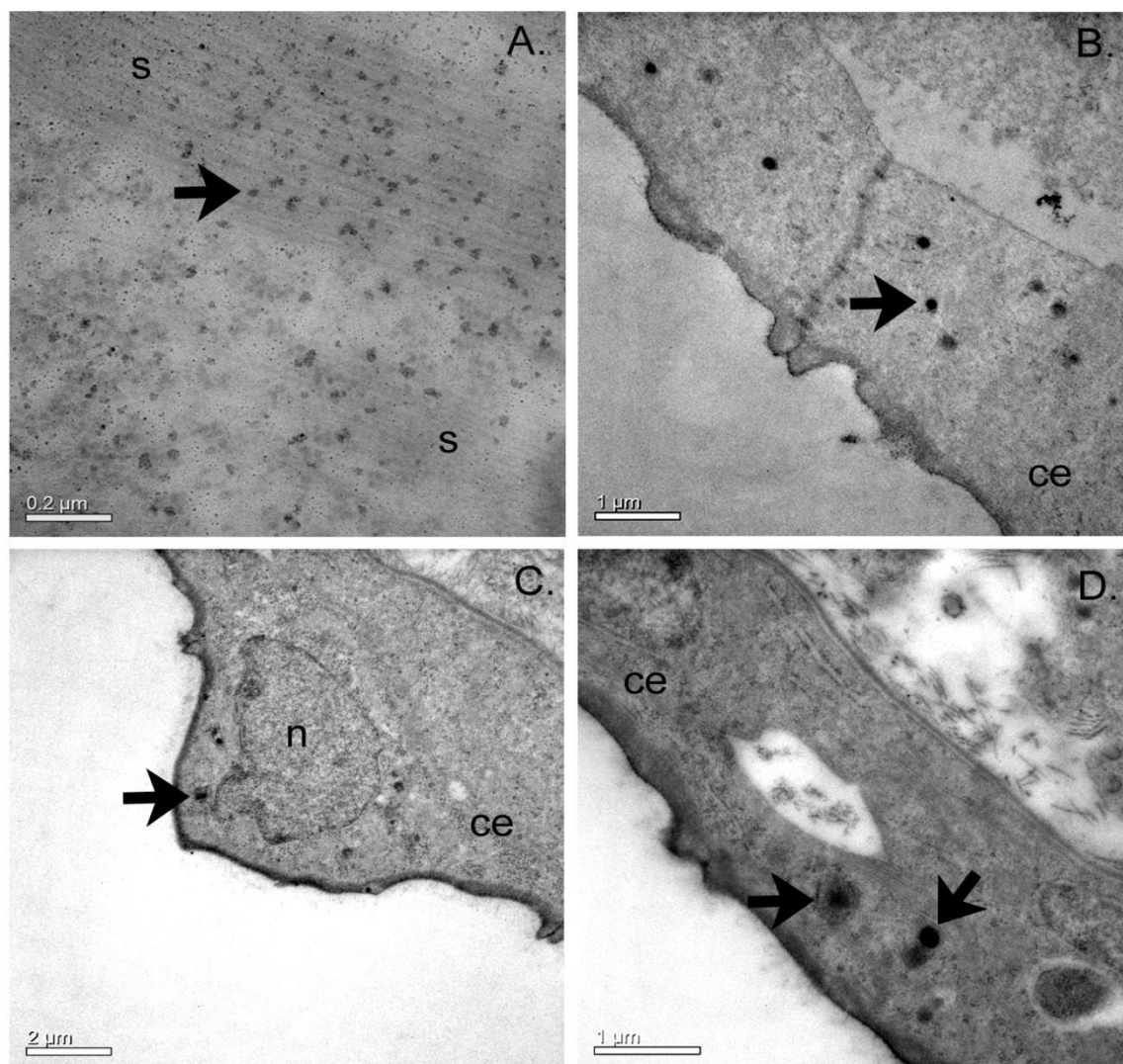


FIGURA 14. Localização ultraestrutural de AgNP em larvas de *Rhamdia quelen* após 96 horas de exposição. AgNP (setas) em (A) fibras musculares, (B) no citosol de células epiteliais, (C) próximas do núcleo de células epiteliais e (D) em vesículas de células epiteliais. (n) Núcleo, (s) sarcômeros, (ce) células epiteliais.

4.8. Alterações morfológicas dos neuromastos

Através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) alterações morfológicas foram evidentes nos órgãos mecanorreceptores. A presença e distribuição dos neuromastos foram mais visíveis na região cefálica das larvas avaliadas após 96 hpf (FIGURA 15A-C, E). Morfológicamente são estruturas circulares discretas conformados por células ciliadas, tornando-se ligeiramente salientes com projeções simples alongadas (quincílios) e projeções curtas (estereocílios) alinhadas na região central (FIGURA 15D).

De forma geral, os indivíduos expostos aos agregados de AgNP mostraram visivelmente uma maior presença de produção de muco, quando comparado com o controle (FIGURA 15 A,G), sendo este mais evidente na concentração mais baixa ($0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (FIGURA 15F). Morfológicamente, os neuromastos de organismos expostos a menor concentração de AgNP mostraram claramente alterações nos prolongamentos de quincílios e aglomeração dos mesmos (FIGURA 15 F,G), alterando a sua estrutura funcional.

Em indivíduos expostos a concentração intermediária ($0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) também foram observadas alterações morfológicas em neuromastos (FIGURA 15H-J). Foi observada a ocorrência de agrupamentos de células formando estruturas esféricas nos neuromastos (FIGURA 15J) e uma redução visível dos quincílios (FIGURA 15H-J). No tratamento de $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ocorreu a atrofia da quincílios e redução visível no número destes comparado com o grupo de controle, também foi observado o agrupamento celular e diminuição do diâmetro da base dos neuromastos ($<40\mu\text{m}$) (FIGURA 15K-M).

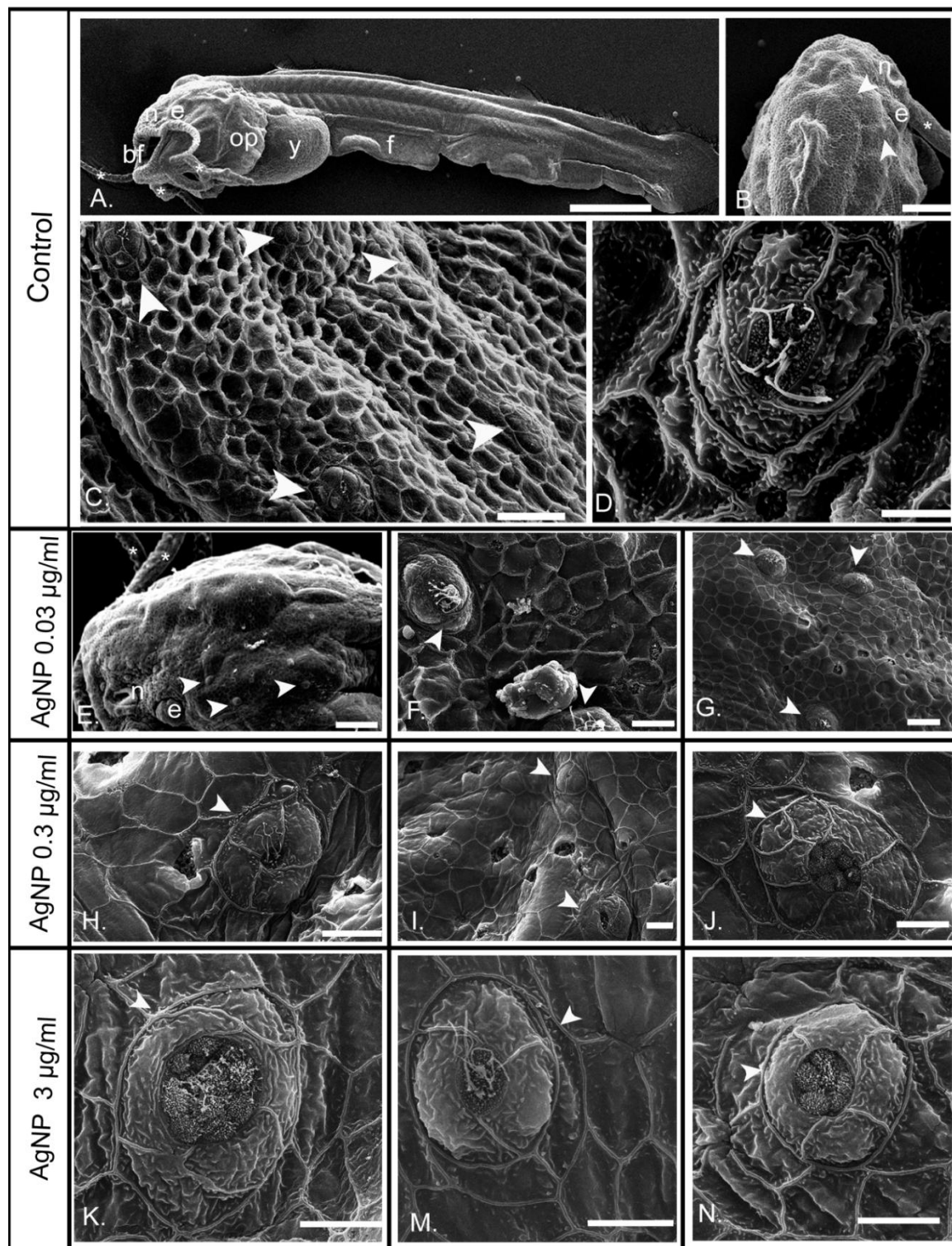


FIGURA 15. Microscopia eletrônica de varredura das alterações morfológicas dos neuromastos em larvas de *Rhamdia quelen* de 96 hpf após exposição a agregados de nanopartículas de prata. (A-D) Controle; (E-G) $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$; (H-J) $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$; (K-N) $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$. (bf) cavidade bucofaringea (fenda oral), (e) olho, (f) nadadeira, (n) narina, (op) opérculo, (y) vitelo, setas brancas: neuromastos, (*) : barbilhões. Escala: A= 500 μm ; B= 100 μm ; C= 50 μm ; D=5 μm ; E=100 μm ; F-M= 10 μm

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que as implicações ecológicas deste estudo estão claramente relacionadas com a disponibilidade das AgNP para a biota. Os ambientes aquáticos naturais são de composição altamente complexa o que pode, dependendo das condições físico-químicas, afetar diferentemente o comportamento das AgNP (FABREGA *et al.*, 2011). Isto está relacionado com variações de pH e força iônica, bem como as concentrações de macromoléculas orgânicas naturais que terminam por afetar a disponibilidade das AgNP, gerando agregados aos quais os organismos encontram-se realmente expostos.

Com os resultados deste estudo foram demonstradas, pela primeira vez, fortes evidências de que os agregados de AgNP apresentam efeitos tóxicos em larvas de peixes neotropicais como o jundiá (*Ramdia quelen*), afetando a sobrevivência e a morfologia larval. Além disso, o estudo demonstrou que a concentração de Ag em larvas está diretamente relacionada à concentração nominal de exposição, assim como as alterações morfológicas (deformidades) estão relacionadas ao tempo de exposição.

A fim de assegurar comparações com outros estudos realizados em nanotoxicologia, foi essencial a caracterização não só das AgNP utilizadas, mas também das suspensões utilizadas para os testes, determinando se a exposição era de fato às nanopartículas ou aos agregados. Este tipo de cuidado possibilitou definir, ou discutir, o modo de ação das AgNP em suspensão e entender as questões referentes ao risco de exposição para os organismos expostos. A dificuldade em discutir os resultados com dados publicados em literatura científica se relaciona com a ausência deste tipo de análise, demonstrando assim, que uma caracterização minuciosa das partículas antes do desenvolvimento do experimento é determinante na interpretação e discussão dos resultados obtidos.

Ao analisar o tamanho das AgNP nas suspensões utilizadas nas exposições foi observada uma disponibilidade de nanopartículas diferenciada nas concentrações testadas, sendo que a maior concentração apresentou pouca quantidade de AgNP

quando comparada com as outras concentrações. Esta disponibilidade diferencial está relacionada com a toxicidade encontrada e a concentração de prata nas larvas onde foi maior na concentração intermediária às 96 hpf. No entanto, na menor concentração foi observada uma baixa concentração de Ag nas larvas a pesar de ter uma maior disponibilidade de nanopartículas na suspensão. Este padrão pode ser explicado pela maior produção de muco observada nesta concentração, que estaria atuando como uma barreira física de proteção das larvas corroborada pelas as imagens de MEV. Entretanto, na maior concentração a quantidade de Ag determinada nas larvas foi menor quando comparada com a concentração intermediária, embora tenha apresentado níveis superiores quando comparada com os indivíduos expostos à concentração mais baixa.

Os resultados permitem inferir o efeito tóxico foi maior na sobrevivência nas concentrações de 0,03 e 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Este resultado pode ser explicado pelo aumento da agregação das AgNP interferindo com a disponibilidade da prata na maior concentração (BAR-ILAN *et al.*, 2009) e o efeito protetor do muco na menor concentração. O incremento nos agregados de AgNP pode levar a um aumento de toxicidade pela obstrução da troca de gases na membrana (LEE *et al.*, 2007) gerando, em consequência, hipóxia interna o que ocasiona danos celulares (BILBERG *et al.*, 2010) e conseqüentemente afeta a sobrevivência larval.

Assim, o aumento na concentração de Ag nas larvas expostas observada na concentração intermediária (0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$),, possa ser explicado pela maior disponibilidade de AgNP nas condições avaliadas, o que permitiria a entrada ativa das mesmas. Desta forma, as nanopartículas pequenas, que conseguiriam entrar nas larvas, se tornam mais tóxicas devido à sua maior área de superfície específica, o que leva a uma maior biodisponibilidade (ADAMS *et al.*, 2006).

Concluindo, verificamos que a biodisponibilidade é um fator determinante na toxicidade de AgNP para as larvas de *R. quelen*, e que algumas características destas partículas são importantes na interpretação dos resultados como a formação de agregados por exemplo. Portanto, caracterizar minuciosamente as nanopartículas

antes de aplicar qualquer desenho experimental torna-se essencial para a adequada discussão dos resultados.

A taxa de sobrevivência das larvas de *R. quelen* diminuiu em função do tempo de exposição, atingindo cerca de 70% de mortalidade em 96hpf. De acordo com Wang e colaboradores (2010), na espécie *Danio rerio* a bioacumulação de AgNP e os efeitos sobre a sobrevivência estão relacionados com a perda da integridade da membrana celular. Se comparado com outras espécies de peixes (LEE *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2010; LABAN *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2010), *R. quelen* é mais sensível em relação ao tempo de exposição quando expostos à agregados de AgNP.

Nessa espécie, a frequência e o grau de importância das deformidades já foram representativos a partir da exposição por 24 hpf, sendo que as mais comuns são as encontradas na coluna vertebral e na área cefálica. Isso que reforça a hipótese de perturbação neurotóxica e comportamental relacionada à exposição às AgNP, como descrito por Powers e colaboradores (2011). A deposição e acúmulo de AgNP em núcleos de células do sistema nervoso já foi relatados por outros autores (ASHARANI *et al.*, 2008). Tal fato poderia levar à interrupção de processos neurológicos com graves consequências para a sobrevivência dos indivíduos e possivelmente para a manutenção da população nos ambientes naturais (FABREGA *et al.*, 2011; GRIFFITT *et al.*, 2008), já que estes danos são encontrados nos estádios iniciais do desenvolvimento.

Organismos com deformidades adquiridas durante o desenvolvimento podem ter seu desempenho comprometido quando alevinos ou mesmo na vida adulta podendo interferir negativamente com a sobrevivência destes indivíduos. Alterações encontradas nos neuromastos de *R. quelen* podem afetar a sua reotaxia. Isto os torna susceptíveis a predadores e afeta também as funções mecanorreceptoras que servem de compensação devido ao sistema visual limitado ou pouco desenvolvido (FROEHLICHER *et al.*, 2009). Tais aspectos são essenciais para a procura de alimento considerando que a espécie apresenta hábitos forrageiros principalmente noturnos e se alimenta de presas bentônicas (BALDISERTTO e RADÜNZ- NETO, 2010).

Estudos prévios demonstraram que o sistema sensorial dos peixes é um alvo em potencial para os metais tóxicos, sendo reportadas alterações do sistema da linha lateral, neuromastos, células ciliadas, epitélio olfatório e dérmico, assim como efeitos sub-letais do sistema nervoso sensorial em peixes em várias espécies como: o paulistinha (*Danio rerio*), a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e o salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*) (OWENS *et al.*, 2008, HANSEN *et al.*, 1999, FROEHLICHER *et al.*, 2009) e em peixes neotropicais como o *Trichomycterus brasiliensis* (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 1995).

As modificações nos neuromastos observadas afetaram principalmente a integridade dos quinecílios e esterocílios, os quais são estruturas essenciais para a função mecanorreceptora. Assim, estas alterações morfológicas afetam o sistema mecanorreceptor em peixes afetando negativamente o comportamento (SCHULZ e LEUCHTENBERGER, 2006; FROEHLICHER *et al.*, 2009). Os possíveis efeitos associados a estas lesões estão relacionados com o desempenho da prevenção individual contra possíveis predadores, ou mesmo na busca pelo alimento, o que certamente comprometeria a manutenção da população. Portanto, a avaliação destas estruturas-chave no comportamento, desta espécie e de outros teleósteos é um indicativo de que este tipo de estudo pode ser determinante na avaliação dos riscos de exposição para a espécie a xenobióticos.

Como discutido anteriormente, o aumento da secreção de muco na superfície epitelial observado após a exposição a agregados de nanopartículas de prata pode ser uma resposta local do epitélio na imobilização ou neutralização de agentes químicos estressores, protegendo os neuromastos como relatado para outras estruturas de peixes como as brânquias (SANDERSON *et al.*, 1996; TAO *et al.*, 1999; BILBERG *et al.*, 2010). A produção de muco na superfície epitelial de organismos aquáticos é uma resposta comum a irritantes químicos, mas uma secreção de muco poderia também bloquear fisicamente a hidrodinâmica e propriedades biomecânicas dos neuromastos.

Por tanto, os dados deste estudo mostram que as larvas da espécie de peixe neotropical jundiá (*Rhamdia quelen*) são sensíveis à exposição à nanopartículas de prata em agregados. Além disso, são um bom bioindicador de efeitos de poluentes em

ecossistemas aquáticos devido à sensibilidade da avaliação toxicológica e as possíveis consequências que poderiam prejudicar níveis mais elevados de organização biológica como população e/ou a comunidade de ictiofauna.

6. CONCLUSÕES

- ▶ Os agregados de AgNP apresentam potencial tóxico para larvas do jundiá (*Rhamdia quelen*).
- ▶ A exposição diminuiu a sobrevivência e aumentou a ocorrência de deformidades.
- ▶ A toxicidade dos agregados de AgNP é mais dependente do tempo de exposição do que a concentração do poluente.
- ▶ Os efeitos tóxicos levam a uma maior frequência de deformidades com o decorrer do tempo de exposição.
- ▶ Os agregados de AgNP afetam a estrutura do neuromasto o que pode comprometer a funcionalidade mecanorreceptora destas estruturas

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, L.K., LYON, D.Y., MCINTOSH, A., ALVAREZ, P.J.J. 2006. **Comparative ecotoxicity of nano-scale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspensions**. *Water Res.* 40(19): 3527–3532.
- ASTM. American Society for Testing and Materials. **Standard Guide for conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians**. Annual Book of ASTM Standards. 1993. 11.04. 456-475.
- ASHARANI, P.V., WU, Y.L., GONG, Z., VALLIYAVEETIL, S. 2008. **Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models**. *Nanotechnology*. 19:255102.
- BALDISSEROTTO, B., RADÜNZ NETO, J. **Jundiá (*Rhamdia sp.*)**, in: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Eds.), *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Segunda Edição. UFSM, Santa Maria. 2010. pp.303-325.
- BAR-ILAN, O., ALBRECHT, R.M., FAKO, V.E., FURGESON, D.Y. 2009. **Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos**. *Small* 5:1897–1910.
- BILBERG, K., MALTE, H., WANG, T., BAATRUP, E. 2010. **Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*)**. *Aquat Toxicol.* 96: 159–165.
- BILBERG, K., HOVGAARD, M.B., BESENBACHER, F., T., BAATRUP, E. 2012. **In Vivo Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Zebrafish (*Danio rerio*)**. *J Toxicol.* 2012:1-9
- BLASER, S.A., SCHERINGER, M., MACLEOD, M., HUNGERBÜHLER, K. 2008. **Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles**. *Science of the Total Environment*. 390(2-3): 396-409
- CARNEIRO, P.C.F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J.D.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P.; BALDISSEROTTO, B.; GOLOMBIESKI, J.I. 2002. **Jundiá: um grande peixe para a região do sul**. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, 12, 69: 41-46
- CHAE, J.Y., PHAM, C.H., LEE, J., BAE, E., YI, J., GU, M.B. 2009. **Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*)**. *Aquat Toxicol.* 94 (4): 320–327

- CHEN, M., FENG, Y., WANG, X, LI, T., ZHANG, J. QIAN, D. 2007. **Silver nanoparticles capped by oleylamine: formation, growth, and self-organization.** *Langmuir*. 23: 5296–5304
- CHOI, J.E., KIM, S AHN, J.E. YOUN, P., KANG, J,S., PARK, K., YI, J., RYU, D. 2010. **Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish.** *Aquat Toxicol*. 100 (2): 151–159
- COOMBS S, BRAUN, S.B., DONOVAN, B. 2001. **The orienting response of Lake Michigan mottled sculpin is mediated by canal neuromasts.** *J Exp Biol*. 204: 337-348.
- FABREGA, J. LUOMAB, S.N., TYLERA, C.R., GALLOWAYA, T. S., LEAD, J.R. 2011. **Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment.** *Environ Int*. 37, 2: 517–531.
- FARRÉ, M., GAJDA-SCHRANTZ, K., KANTIANI, L., BARCELO, D. 2009. **Ecotoxicity and analysis of nanomaterials 769 in the aquatic environment.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 393, 81-95.
- FAUUS, E. **The Silver Nanotechnology Commercial Inventory.** 2008. University of Virginia. http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/6718/fauss_final.pdf.
- FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice.** Londres: Chapman and Hall, 1994. 247 p.
- FROEHLICHER, M., LIEDTKE, A., GROH, K.J., NEUHAUSS, S.C.F., SEGNER, H., EGGEN,R.I.L. 2009. **Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: Promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies.** *Aquat Toxicol*. 95 (4): 307-319
- GRIFFITT, R.J., LUO, J., GAO, J., BONZONGO, J.C., BARBER, D.S. 2008. **Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms.** *Environ Toxicol Chem*. 27: 1972-1978.
- GRIFFITT, R.J., HYNDMAN, K., DENSLOW, N.D., BARBER, D.S. 2009. **Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles.** *Toxicol. Sci*. 107, 404–415.
- HANSEN, J.A., MARR, J.C.A., LIPTON, J., CACELA, D., AND BERGMAN, H. L. 1999. **Differences in neurobehavioral responses of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*O. mykiss*) exposed to copper and cobalt: 1. Behavioral avoidance.** *Environmental Toxicology and Chemistry* .18:1972-1978.

LABAN, G., NIES, L.F., TURCO, R.F., BICKHAM, J.W., SEPÚLVEDA, M.S. 2010. **The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos.** *Ecotoxicology*. 19:185–195.

LEE, K.J., NALLATHAMBY, P.D., BROWNING, L.M., OSGOOD, C.J., XU, X.H. 2007. ***In vivo* imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos.** *ACS Nano* 1:133–143

MOORE, M.N. 2006. **Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?.** *Environ. Int.* 32: 967–976.

OBERDÖRSTER G, MAYNARD A, DONALDSON K, CASTRANOVA V, FITZPATRICK J, AUSMAN K, CARTER J, KARN B, KREYLING W, LAI D, OLIN S, MONTEIRO-RIVIERE N, WARHEIT D, YANG H. 2005. **Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy.** *Part Fibre Toxicol* 2:8

OBERDÖRSTER, G., STONE, V., DONALDSON, K. 2007. **Toxicology of Nanoparticles: A historical perspective.** *Nanotoxicology*, 1 : 2-25.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A; FERNANDES, L.M.; CARVALHO, C.S.; CARDOSO, R.I; TURCATTI, N.M. 1995. **Acute Effects of Inorganic Mercury on Olfactory Epithelium of *Trichomycterus brasiliensis*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 31:104-109.

OWENS, K.N., SANTOS, F., ROBERTS, B., LINBO, T., COFFIN, A.B., KNISELY, A.J., SIMON, J.A., RUBEL, E.W., RAIBLE, D.W. 2008. **Identification of genetic and chemical modulators of zebrafish mechanosensory hair cell death.** *PLoS ONE* 7(2): e29727. doi:10.1371/journal.pone.0029727.

POWERS, C.M., SLOTKIN, T.A., SEIDLER, F.J., BADIREDDY, A.R., PADILLA, S. 2011. **Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition.** *Neurotoxicol Teratol*. 33(6):708-14.

RODRIGUES-GALDINO, A.M., MAIOLINO, C.V., FORGATI, M., DONATTI, L., MIKOS, J.D., CARNEIRO, P.C., RIOS, F.S. 2010. **Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes.** *Zygote*. 18(2):131-44.

SANDERSON, S., STEBAR, M., ACKERMANN, K., JONES, S., BATJAKAS, I.I., KAUFMAN, L. 1996. **Mucus entrapment of particles by a suspension-feeding tilapia (Pisces: Cichlidae).** *J Exp Biol*. 199: 1743–1756.

SCOWN, T. M.; SANTOS, E. M.; JOHNSTON, B. D.; GAISER, B.; BAALOUSHA, M.; MITOV, S.; LEAD, J. R.; STONE, V.; FERNANDES, T. F.; JEPSON, M.; VAN AERLE, R.; TYLER, C. R. 2010. **Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout.** *Toxicol Sci.* 115: 521-534.

SCHULZ, U.H. , LEUCHTENBERGER, C. 2006. **Activity patterns of South American silver Catfish (*Rhamdia quelen*).** *Braz. J. Biol.* 66 (2): 565–74.

TAO, S., LIU, C., DAWSON, R., CAO, J., LI, B. 1999. **Uptake of particulate lead via the gills of fish (*Carassius auratus*).** *Arch Environ Con Tox.* 37: 352–357.

VARNER, K. 2010. **State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More.** Scientific, Technical, Research, Engineering and Modeling Support. Final Report. EPA/600/R-10/89, 2010. U.S. National Exposure Research Laboratory. Environmental Sciences Division. Las Vegas, NV. pp. 221.

WANG, Y., SEEBALD, J.L., SZETO, D.P., IRUDAYARAJ, J. 2010. **Biocompatibility and biodistribution of surface-enhanced Raman scattering nanoprobe in zebrafish embryos: *in vivo* and multiplex imaging.** *ACS Nano.* 27;4(7):4039-53.

WIJNHOFEN, S. W. P.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; HERBERTS, C. A.; HAGENS, W. I.; OOMEN, A. G.; HEUGENS, E. H. W.; ROSZEK, B.; BISSCHOPS, J.; GOSENS, I.; VAN DE MEENT, D.; DEKKERS, S.; DE JONG, W. H.; VAN ZIJVERDEN, M.; SIPS, A. N. J. A. M.; GEERTSMA, R. E. 2009. **Nano-silver- A review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment.** *Nanotoxicology* . 3:109– 138

WU, Y., ZHOU, Q.F., LI, H.C., LIU, W., WANG, T., JIANG, G.B. 2010. **Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test.** *Aquat. Toxicol.* 100: 160-167.

YEO, M.K., PAK, S.W. 2008. **Exposing zebrafish to silver nanoparticles during caudal fin regeneration disrupts caudal fin growth and p53 signaling.** *Mol Cell Toxicol.* 4:311–7.

YEO, M.K., YOON, J.W. 2009. **Comparison of the effects of nano-silver antibacterial coatings and silver ions on zebrafish embryogenesis.** *Mol Cell Toxicol.* 5: 23-31.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações.** Editora Rima, São Carlos, 2006, 478p.

CAPITULO II

Modelagem preliminar dos efeitos de poluentes no tamanho da população de *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae) após exposição no estágio larval

Publicação Relacionada:

E. A. López-Barrera; S. Araujo; C.A. Oliveira Ribeiro. *Preliminary modeling effects in silver catfish (*Rhamdia quelen*) on population size of larvae exposed to pollution.*

RESUMO

A modelagem ecológica tem sido gradualmente mais usada por ecotoxicologistas, incrementado seu uso para entender os efeitos de poluentes e para simulá-los nas análises de risco ambiental. Este trabalho avaliou os efeitos da exposição a substâncias tóxicas, através do desenvolvimento de um modelo para avaliar a dinâmica populacional de jundiá (*Rhamdia quelen*) quando expostos aos poluentes durante as fases iniciais do ciclo de vida. Foi proposto um modelo de população baseado no indivíduo (IBM). A partir deste modelo foi avaliado o efeito do poluente na taxa de crescimento populacional a partir de dados observados e previstos em estudos de biologia e ecologia da espécie. Fêmeas foram usadas para este modelo e foi assumida uma modelagem estocástica. Este modelo pode ser aplicado para avaliação de pesquisas relacionadas com a sobrevivência das larvas recorrente da exposição a poluentes ambientais. Essas simulações nos permitiram determinar o risco ambiental do uso de poluentes ao nível da população.

Palavras-chave: Modelo baseado em Indivíduo (IBM), modelagem estocástica, Jundiá.

ABSTRACT

The ecological modeling has been used by more gradually ecotoxicologists, increased its use to understand the effects of pollutants and to simulate them in the analysis of environmental risk. This study evaluated the effects of exposure to toxic substances, through the development of a model to assess the population dynamics of catfish (*Rhamdia quelen*) when exposed to pollutants during the early stages of the life cycle. A model proposed it is based on the individual population (IBM). From this model we evaluated the effect of the pollutant in the population growth rate from data observed and predicted in studies of biology and ecology of the species. Females were used for this model and assume a stochastic modeling. This model can be applied to assessment of research-related larval survival of recurrent exposure to environmental pollutants. These simulations allow us to determine the environmental risk from the use of pollutants at the population level.

Keywords: Individual-based model (IBM), Stochastic modeling , Silver catfish

1. INTRODUCTION

Ecotoxicology is a multidisciplinary science that combines disciplines as chemistry, biochemistry, toxicology, pharmacology, physics and ecology. One of the objectives of this discipline is to predict population-level effects of contaminant exposure based on individual responses (DEVILLERS, 2009). Aquatic organisms are exposed to fluctuating concentrations or sequential pulses of contaminants that can affect the survival, proliferation and stability of a population, therefore there is a need to predict and simulate possible effects resulting from pollutants exposure.

To achieve this aim, the mathematical modeling is being increasingly used by ecotoxicologists to understand the effects of pollutants and to simulate them in the frame of predictive hazard. There is plenty of literature describing experimental and observational toxicity tests that address individual assessment endpoints, however, toxicity impacts at the population level may not correlate with individual toxicity responses (FERSON *et al.*, 1996). Consequently, recent research addresses effects of toxicity at the population-level (GLEDHILL and VAN KIRK, 2011).

Fishes are widely used as model organisms in ecotoxicology (BRAUNBECK *et al.*, 2008; NORRGREN, 2012) and neotropical species as silver catfish (*Rhamdia quelen*) has been evaluated for different environmental pollutants (KREUTZ *et al.*, 2010, 2011; BECKER *et al.*, 2009; CERICATO *et al.*, 2009; KOCHHANN *et al.*, 2009; GHISI *et al.*, 2010; PAMPLONA *et al.*, 2011). It is a South american native fish which a wide range of studies of biology, ecology, reproductive physiology, larval and embryonic development and growing have been done (GHIRALDELLI *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2000; CARNEIRO *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 2001, RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2010).

The aim of this work was the develop of a mathematical model to assess the population dynamics of *Rhamdia quelen* when exposed to toxics through early development and larval stages. Exposure to toxic substances in the course of these

stages can primarily affect the survival but also harm the stability of the population because it will cause injuries to fish fry and will not contribute for future generations.

2. MODEL DEVELOPMENT

We propose an *Individual Based Model (IMB)* for the dynamics of *Rhamdia quelen* population when exposed to toxics. The individuals and their age are explicitly modeled and we do not assume any spatial restriction. We followed the population model described by GLEDHILL and VAN KIRK (2011), where eggs, fry, and each age adult are modeled (FIGURE 16), however, we assume stochastic events instead of deterministic equations.

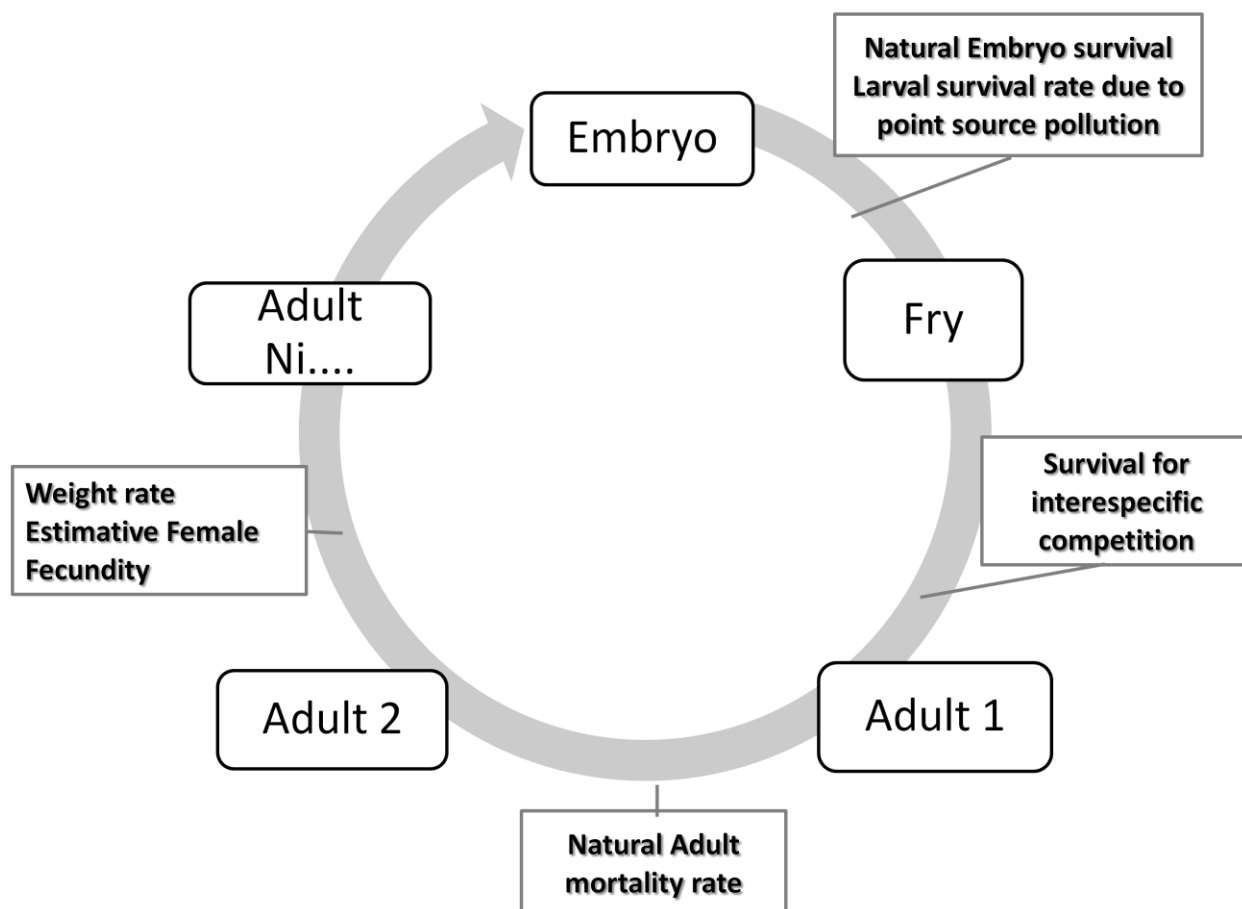


FIGURE 16. Stochastic model for population dynamic of *Rhamdia quelen*.

The events imposed to the population depend on the stage of each individual:

- *Embryo- Larval:*

Each embryo has a survival probability of

$$S_n^E * S_p^L,$$

where S_n^E is a natural embryo survival due natural factors and S_p^L is the larval survival rate due pollutants exposure. If $S_n^E = S_p^L = 1$, there is no selective pressure on the embryonic stage, and all individuals will develop to the larval stage. As the survival rates decrease the influence of these rates may be crucial to the maintenance of the population.

- *Fry-Juvenile:*

On the stage from Fry to Juvenile it was calculated the survival for interspecific competition (S_c^F), as proposed by GLEDHILL and VAN KIRK (2011):

$$S_c^F = \frac{S_b}{1 + an_t}, \quad a = \frac{S_b}{K/2}$$

where, S_b is the maximum survival rate for interespecific competition; K is a carrying capacity (this is divided by two because only female are modeled) and n_t is number of larvae at time t .

- *Adult*

From one to eighteen years old the individuals can die due to natural factors and has life reproductive (GOMES *et al.* 2000). We assume a constant annual mortality rate r_n^A , which means that each individual has probability of $S_n^A = 1 - r_n^A$, to survive. Those individuals, who survive, can then leave descendants. The fecundity of

individuals depends on their weight (and consequently also depends on the age). In order to include this feature in the model, adults are separated into classes of age with annual interval. According to OLAYA-NIETO and colleagues (2010), the number of eggs a female can produce is described as:

$$F_i = 564.86 * W_i^{0.73},$$

where W_i is a female weight at the age i . The correlation between weight and age can be described following Beverton-Holt model (BENADUCE *et al*, 2006):

$$W_{i+1} = \frac{rW_i}{1 + \alpha W_i},$$

where r is the rate of weight increase per year and α is a constant of growth inhibition.

The number of embryos generated by the population of adult is:

$$n^E = \frac{1}{2} f \sum_{i=1}^{I_{max}} F_i n_i^A,$$

Where I_{max} is the maximum reproductive age n_i^A is the number of adults at the age i and f is the fecundity. The term $\frac{1}{2}$ appears because we only modeled female in the population and it is assumed 1:1 natural sex ratio (OLAYA-NIETO *et al.*, 2010)

In TABLE 5 are summarize all parameters involved in the model. Most of them were found in the literature, except for S_b (maximum fry survival rate) and S_p^L (larval survival rate due to polluting). We present our results as function of these two parameters.

TABLE 5. Parameters of scientific literature used for modeling of a dynamic population of *Rhamdia quelen*

Parameter	Short description	Estimative parameter	Data class	Reference
S_n^E	Natural embryo survival rate	0.9	Experimental	LOPEZ-BARRERA <i>et al.</i> , submitted
S_p^L	Larval survival rate due to polluting	*		
S_b	Maximum fry survival rate due to competition	*		
K	Carrying capacity	75 fish/m ³	Aquaculture	POUEY <i>et al.</i> , 2011
r_n^A	Natural Adult mortality rate	0.35 per year	Field-Modeling	GUBIANI <i>et al.</i> , 2012
r	Rate of weight increase per year	1.5	Modeling	BENADUCE <i>et al.</i> , 2006
α	Constant of growth inhibition	0.17	Modeling	BENADUCE <i>et al.</i> , 2006
W_1	Weight at one year old	60 g	Modeling	BENADUCE <i>et al.</i> , 2006
l_{max}	Maximal reproduction age	18 years	Modeling	BENADUCE <i>et al.</i> , 2006
f	Fecundity rate	0.75	Field	SAMPAIO <i>et al.</i> , 2006

*No parameter estimated. We present our results as function of these parameters

3. RESULTS

We studied the temporal dynamics of an adult population of silver catfish under different combinations of pressures imposed by point source pollution exposure, S_p^L , and maximum larval survival rate, S_b . For all simulations we started with 200 individuals as eggs and any adult. We tested different initial conditions and observed that our predictions did not change qualitatively.

We first investigated the average size of the population after a temporal transient (when the population achieves the convergent regime) for all combinations of S_p^L e S_b (FIGURE 17). For each parameter combination we ran 10 simulation during 200 generations and computed the average adult population for the last 100 generations. We have checked that 100 generations were enough to eliminate the transient. The proportion of the population size is represented by colors increased from black to red (FIGURE 17).

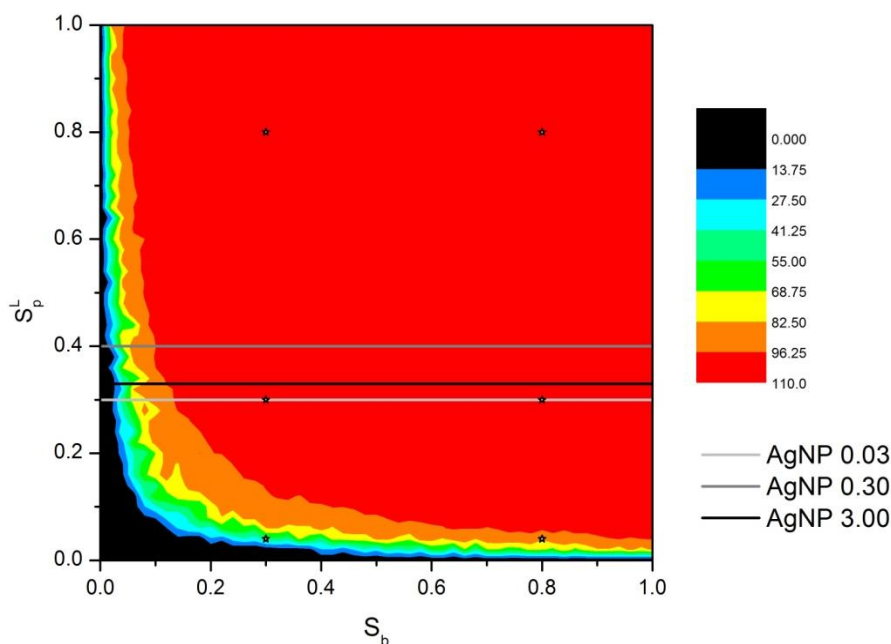


FIGURE 17. Faces diagram of *Rhamdia quelen* population dynamic. The scale bar indicates the population size average. Black zone indicates extinction and red zone refers to the maximum observed average. Green zone indicates the parameters set where the population average is half of the maximum observed. S_b = fry survival rate, S_p^L = larvae survival rate due to polluting. Stars = points selected for assessed the temporal sensibility of population. Horizontal lines indicate S_p^L correspondent to experimental assay of silver nanoparticles (AgNP) exposure in different concentrations (0.03, 0.3, 3 $\mu\text{g.ml}^{-1}$).

In absence of toxicity effects, $S_p^L = 1$, the average of population can achieve its maximum for any fry survival rate (S_b) higher than approximately 0.05. As the pollutant exposure increases, this threshold increases (see red area in FIGURE 17). It is interesting to point out that, according to FIGURE 17, if fry survival rate is greater than approximately 0.2, any larval survival rate due to polluting greater than 0.2 does not seem affect the population. However this statement is not absolute, we have checked

that the mean effect of the pollutant is in the temporal transit (in the first years of simulations). The lower the survival rate due to polluting, the slower the population achieves its convergent regime (FIGURE 18)

In order to understand the temporal sensibility of population dynamic of silver catfish we investigated the temporal evolution, during 200 years, for different combinations of fry survival rate and larval survival rate due to point source pollution. An interesting pattern was found considering $S_p^L = 0.04$ and two values of $S_b = \{0.3, 0.8\}$. We observed that the convergent population sizes are not so different; nevertheless, the population convergence is reached in the first years for higher S_b , whereas it takes about 50 years for lower S_b value (FIGURE 18).

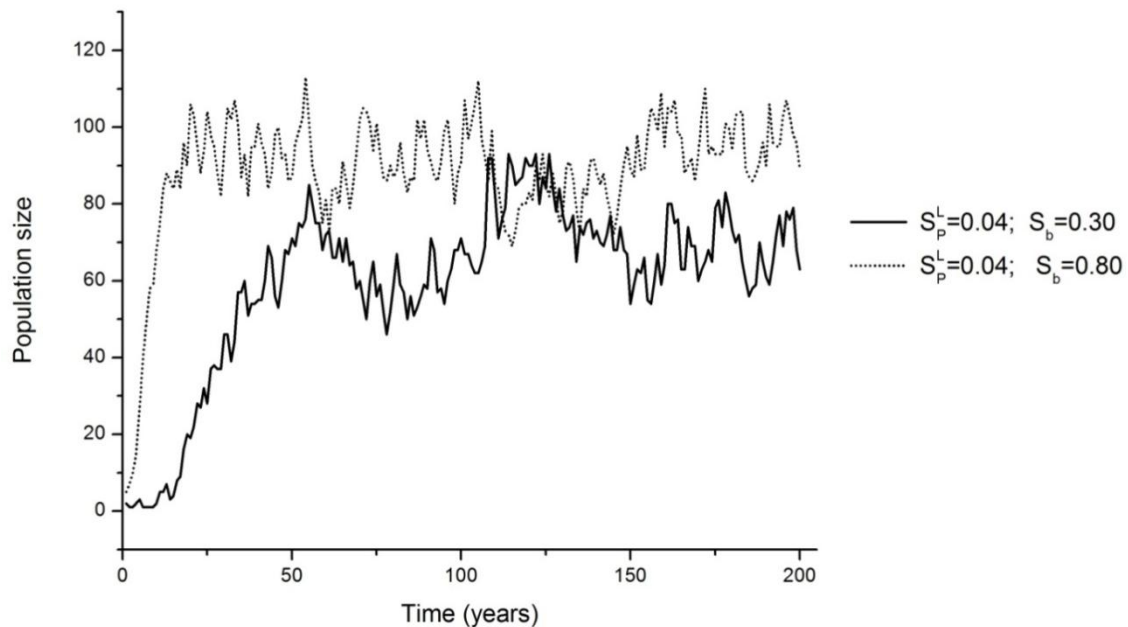


FIGURE 18. Simulation of temporal variability of *Rhamdia quelen* population with different fry survival rate (S_b) and larvae survival rate due to polluting (S_p^L) for 200 years.

We also analyzed first 50 years of simulation for two values of fry survival rate $S_b = \{0.3; 0.8\}$, and three values of larval survival rate due to polluting $S_p^L = \{0.04; 0.3; 0.8\}$ (a total of six combinations). We noticed that the population is not so sensitive as the parameter combinations previously mentioned: all other combinations

reach the convergent population regime in few years. However, the pattern where more favorable conditions to growth (higher values of S_b and s_p^L) achieve the convergent regime faster, is still observed. (FIGURE 19)

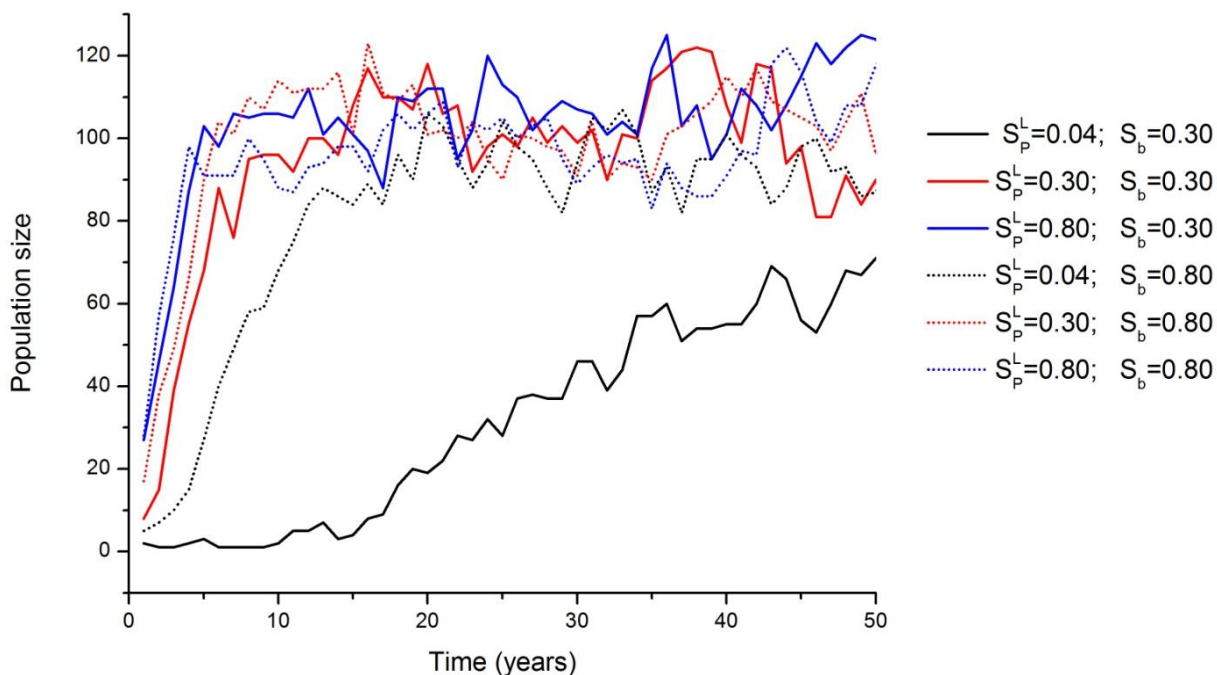


FIGURE 19. Simulation of temporal variability of *Rhamdia quelen* population with different maximum larval survival rate (S_b) and larvae survival rate due to polluting (S_p^L) for 50 years.

For model application we used data of larval survival due exposure to silver nanoparticles (AgNP) in three different concentrations (0.03, 0.3, 3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) of experimental time of 96 hours pos fertilization (hpf). The larvae survival rate due to AgNP (S_p^L) was represented as horizontal lines in FIGURE 18 for each concentration assessed.

Observed the trend of dynamic population when S_b is higher than 0.1 the convergent population regime is achieved in the three cases of AgNP exposure. These simulations show that the population dynamic is not affected by isolated exposure of

AgNP and the population can recover after punctual impact of pollutant in larval survival.

Nevertheless, the data generated in this experiment does not differentiate between dead and deformed larvae and the larvae survival rate could be sub estimated. In future experiments, it is necessary to consider this differentiation and assume that abnormalities due to pollutant exposure cause dead and individuals could not contribute to the following generations.

4. DISCUSSION

Is important to assess toxicity mechanisms of pollutants interpret temporal simulations. In this model, the pollutants affect only larval survival, thus the population reach stability because each female can bring forth from 50 to 450 eggs per year in hers reproductive life. When the pollutants affect the endocrine regulation and have consequences in the reproductive fitness, this value of forth eggs will be low and the stability of population will be injured.

Other patterns involved into population dynamics are connected with associated pollutants, which occurred on the aquatic system. Therefore, this model allows the assessment of the co exposition of pollutants in an early stage of development and in the larvae stage. The simulation of toxics effects on population level are evident and permit using the model to determinate the use of pollutants up taken indiscriminately into natural environmental.

The evaluation results illustrate the usefulness of the proposed system in assessing the population dynamic risk in a long time scale. This model can be applied when assessing the larvae survival from environmental pollutants exposure. These simulations allows to determinate the hazard risk of use of pollutants in population level. These data are relevant for analyses of conservation projects and environmental impact analysis, because the duration time is important for fulfill the objectives in low cost but

considering the stability of species and durability of mitigation measure after pollutant exposure and permitting the conservation intervention validity.

Some caveats should be taken into consideration regarding this model, because the model has a punctual exposure and it was not used environmental parameters that could affect the population size, as temperature or pH. Toxic effects in the other age classes that not larvae will be included into the model and will allow the identification of which silver catfish age class is more susceptible to pollutants exposure.

5. REFERENCES

- BECKER, A.G.; MORAES, B.S.; MENEZES, C.C.; LORO, V.L.; SANTOS, D.R.; REICHERT, J.M.; BALDISSEROTTO, B. 2009. **Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 56, p. 770-775.
- BENADUCE, A.P DA SILVA; RODRIGUES, L.A.D.; MISTRO, D.C., BALDISSEROTTO, B. 2006. **A mathematical model for growth in weight of silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae, Siluriformes, Teleostei).** *Cienc. Rural [online]*. vol.36, n.5 ISSN 0103-8478
- BRAUNBECK, T., HINTON, D.E., STREIT, B. **Fish Ecotoxicology**. 2008. Berlin, Germany. 396 pp.
- CARNEIRO, PCF, MIKOS, JD, SCHORER , M, FILHO PRCO, BENDHACK F. 2003. **Live and formulated diet evaluation through initial growth and survival of jundiá larvae, *Rhamdia quelen*.** *Sci agric*. 60:615-619.
- CERICATO, L.; NETO, J. G. MACHADO; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; DA ROSA, J. G. S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; MARQUEZE, A.; BARCELLOS, L.J.G. 2009. **Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals.** *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology*, v. 149, p. 363-367.
- DEVILLERS, J. 2009. **Ecotoxicology Modeling**. In: Emerging Topics in Ecotoxicology. Principles, Approaches and Perspectives. Vol 2. New York. USA. 339 p.
- FERSON, S., GINZBURG, L., GOLDSTEIN, R., 1996. **Inferring ecotoxicological risk from toxicity bioassays.** *Water Air Soil Pollut*. 91, 71–82.

GHIRALDELLI, L.; MACHADO, C.; FRACALOSSO, D. M.; ZANIBONI-FILHO, E. 2007. **Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil.** *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 29, n. 4, p. 349-356,

GHISI N DE C, RAMSDORF WA, FERRARO MV, DE ALMEIDA MI, RIBEIRO CA, CESTARI MM. 2010. **Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil.** *Environ Monit Assess.* 2011 Sep;180(1-4):589-99.

GLEDHILL, M., VAN KIRK, R. 2011. **Modeling effects of toxin exposure in fish on long-term population size, with an application to selenium toxicity in bluegill (*Lepomis macrochirus*).** *Ecological Modelling.* Vol 222,19: 3587–3597

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; CHIPPARI GOMES, A.R. BALDISSEROTO. B. **Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae): uma revisão.** *Cienc. Rural, Santa Maria*, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GUBIANI E.A., GOMES L.C., AGOSTINHO, A.A. 2012. **Estimates of population parameters and consumption/biomass ratio for fishes in reservoirs, Paraná State, Brazil.** *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 177-188.

KOCHHANN, D.; PAVANATO, M. A.; LLESUY, S.; CORREA, L. M.; RIFFEL, A. P. K.; LORO, V. L; MESKO, M. F. ; FLORES, E. M M ; DRESSLER, V. L; BALDISSEROTTO, B. 2009. **Bioaccumulation and oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations.** *Chemosphere 77*: 384–391.

KREUTZ, L.C., BARCELOS, L.J.G., MARTENINGHE, A., SANTOS, E.D., ZANATAA, R., 2010. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to aeromonas hydrophila challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 694-697.

KREUTZ, L.C., BARCELOS, L.J.G., VALLE DE FARIA, S., SILVA DE OLIVEIRA, T., ANZILIERO, D., SANTOS, E.D., PIVATO, M., ZANATAA, R. 2011. **Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate.** *Fish & Shellfish Immunology.* 30, 1, 51–57

LOPES J.M. LOPES, L.V.F. SILVA AND B. BALDISSEROTTO. 2001 **Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH.** *Aquaculture International.* Volume 9, Number 1 (2001), 73-80, DOI: 10.1023/A:1012512211898

NORRGREN, L. 2012. **Fish models for ecotoxicology.** *Acta Vet Scand.* 2012; 54, 1: S14. doi: 10.1186/1751-0147-54-S1-S14.

OLAYA-NIETO, C. HERNÁNDEZ ROSSO, D., AYARZA PÉREZ, E. 2010. **Reproductive Biology of Liso *Rhamdia quelen* (Pisces: Heptapteridae) in the Sinu River, Colombia.** *Acta Biologica Colombiana*. Vol. 15,3: 61 - 74

PAMPLONA JH, OBA ET, DA SILVA TA, RAMOS LP, RAMSDORF WA, CESTARI MM, RIBEIRO CA, ZAMPRONIO AR, DE ASSIS HC. 2011. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and environmental safety*. 74:3, 342-349

POUEY, J.L., PIEDRAS, S. R. N., ROCHA, C. B., TAVARES, R. A., SANTOSS, J. D. M., BRITTO, A. C. P. 2011. **Desempenho produtivo de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidos a diferentes densidades de estocagem.** *Ars Veterinaria*, Vol. 27, n.4, 241-245.

RODRIGUES-GALDINO, A.M., MAIOLINO, C.V., FORGATI, M., DONATTI, L., MIKOS, J.D., CARNEIRO, P.C., RIOS, F.S. 2010. **Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes.** *Zygote*. 18(2):131-44

SAMPAIO EV, SATO Y. **Biologia reprodutiva e desova induzida de duas espécies de bagre (Osteichthyes: Siluriformes) da bacia do rio São Francisco.** *Acta Sci Biol Sci*. 2006;28(3):263-268.

CAPITULO III

Resposta integrada de biomarcadores em adultos de *Rhamdia quelen* expostos via oral à nanopartículas de prata em coexposição com Benzo(a)pireno

Publicação Relacionada:

E. A. López-Barrera; R. G. Barragan-Gonzalez; S. Liebel; T. Vicari; J.R. Esquivel-Garcia; S. R. Grotzner; M.A.F. Randi; F. Filipak Neto; C. L. Voigt, S. X. Campos, M.M. Cestari; C.A. Oliveira Ribeiro. *Response of integrated biomarkers of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to nanosilver aggregates and Benzo(a)pyrene*. Manuscrito a ser enviado à publicação para a revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

RESUMO

Os corpos de água são considerados receptores finais de várias substâncias tóxicas incluindo os poluentes emergentes. Recentemente estudos de nanotoxicologia em peixes têm aumentado, contudo pouco se sabe da toxicologia em peixes neotropicais. Este estudo avaliou os efeitos em adultos de jundiá (*Rhamdia quelen*) expostos às AgNP em coexposição com BaP examinando as respostas associadas a (1) biotransformação de xenobióticos, (2) estresse oxidativo, e (3) integridade do ADN. Biomarcadores bioquímicos (AChE, GSH, GST, LPO, PCO, δ -Alad, METs), histopatológicos (Índice de Bernet, Contagem de Centro de Melano-Macrófagos e de novos nefros) e genotóxicos (Ensaio cometa e Análise de Micronúcleos) foram avaliados em tecidos alvos. Determinações químicas de prata (Espectrofotometria de Absorção Atômica de Chama) e de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em bile foram mensuradas. Os resultados deste estudo apoiam as hipóteses referentes às relações mecanicistas nas quais a coexposição de AgNP com BaP segue o mecanismo de Cavalo de Troia. As respostas observadas indicam que em exposição via oral sub-crônica (15 dias- 3 doses) os mecanismos de desintoxicação foram ativados (GSH, GST, METs), no entanto, não se observam danos causados estresse oxidativo que comprometam as macromoléculas (PCO, LPO) nem no ADN (Ensaio Cometa e Análise de micronúcleos) e não foram alterados os processos metabólicos (AChE e δ -Alad). A análise histopatológica confirma uma resposta inflamatória generalizada após a exposição aos poluentes e uma resposta imune dos organismos pelos danos observados nos tecidos.

Palavras-chave: Exposição oral, inflamação crônica, Depleção da Imunidade, Mecanismo de Cavalo de Tróia.

ABSTRACT

The aquatic systems are considered final receivers of various substances including toxic pollutants. Recently toxicology studies in fish have increased, yet little is known of toxicology in neotropical fishes. This study evaluated the effects on adult silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to AgNP in co-exposition with BaP examining the responses associated with (1) biotransformation of xenobiotics, (2) oxidative stress, and (3) integrity of DNA. Biochemical biomarkers (AChE, GSH, GST, LPO, CPO, δ -Alad, METs), histopathological (Index Bernet, Melano-Macrophage Centre and New nephrons) and genotoxic (Comet Assay and Analysis of Micronuclei) were evaluated in target tissues. Chemical determinations of ionic silver (Atomic Absorption Spectrometry Flame) and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) were measured in bile. The results of this study support the hypotheses regarding the mechanistic relationships in which the co-exposure to BaP and AgNP follows the Trojan Horse mechanism. The observed responses indicate that oral exposure in sub-chronic (15 day-3 doses) detoxification mechanisms were activated (GSH GST METs), however, not observed oxidative stress damage which could compromise the macromolecules (PCO LPO) or DNA (Comet assay and micronucleus analysis) and were not altered metabolic processes (AChE and δ -Alad). Histopathological analysis confirms a generalized inflammatory response after exposure to pollutants and immune response bodies for the observed injuries in the tissues.

Keywords: Oral exposure, Chronic Inflammation, Immunity Depletion, Trojan-horse type mechanism

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos encontram-se submetidos a uma grande quantidade de poluentes por serem receptores finais do descarte de resíduos orgânicos e inorgânicos de origem antrópica, utilizados tanto em áreas domésticas, como agrícolas e /ou industriais. Este cenário permite reconhecer a problemática à qual os organismos vivos se encontram submetidos: doses e concentrações diferentes de múltiplos xenobióticos. Recentemente, o número de pesquisas tem aumentado com o intuito de elucidar os efeitos tóxicos de poluentes quando expostos de forma isolada e associada (coexposição) com outros xenobióticos e identificar se atuam de forma sinérgica ou antagônica em organismos bioindicadores (PESONEN e ANDERSSON, 1997; OLGUN *et al.*, 2004).

Para avaliar as respostas dos organismos aquáticos frente a poluentes tem-se utilizado biomarcadores em estudos de monitoramento ambiental ou ensaios experimentais. Biomarcadores podem ser definidos como qualquer resposta alterada mensurável ao nível individual em decorrência da exposição a poluentes ambientais, ou ao estresse químico gerado por um xenobiótico (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Os mesmos autores dividem os biomarcadores em três classes:

- Biomarcadores de exposição: detectam e medem a quantidade de uma substância exógena, seus metabólitos ou o produto da interação entre o xenobiótico e a molécula ou célula alvo em um compartimento do organismo;
- Biomarcadores de efeito: alterações bioquímicas, fisiológicas ou outra alteração nos tecidos ou fluidos corporais de um organismo que podem ser reconhecidos e associados com uma doença ou possível prejuízo à saúde;
- Biomarcadores de susceptibilidade: indicam a habilidade adquirida ou inerente de um organismo a responder a exposição a um xenobiótico específico, incluem fatores genéticos e mudanças nos receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo à exposição.

Um biomarcador para ser eficiente deve ter grande susceptibilidade, sensibilidade, especificidade e baixo custo para análise (STEGEMAN *et al.*, 1992). O uso de biomarcadores também permite avaliar a toxicidade em diferentes escalas de organização biológica: molecular, celular e tecidual, que indicam os efeitos destas exposições e suas mudanças nos processos biológicos, sendo utilizados como um sinal prévio que reflete a resposta biológica consequente da exposição aos xenobióticos (AMARAL *et al.*, 2006).

Para avaliar a interação das nanopartículas de prata com os organismos quando expostos é necessário compreender os mecanismos de toxicidade celular. Embora os estudos para avaliarem efeitos tóxicos das AgNP e dos íons de prata tenham sido principalmente realizados *in vitro*, Völker e colaboradores (2013) baseados nos resultados de vários outros autores elucidaram alguns dos mecanismos de ação das AgNP (FIGURA 20).

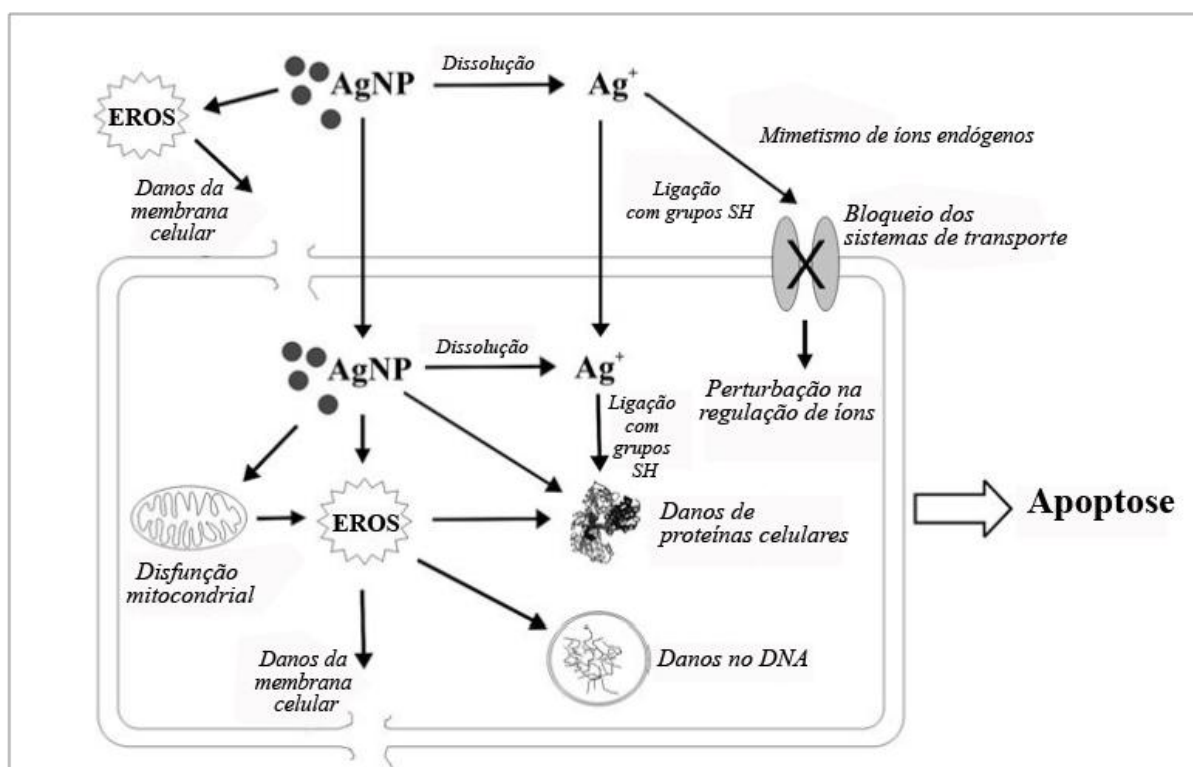


FIGURA 20. Mecanismos de Toxicidade celular das Nanopartículas de prata. Modificado de VÖLKER *et al.*, 2013.

Os mecanismos de ação que se conhecem até o momento podem ser resumidos em quatro principais:

1. Incremento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem causar danos celulares e apoptose. A geração de EROS e o estresse oxidativo podem ser catalisados pelas propriedades das AgNP e também podem causar disfunção das mitocôndrias, podendo ocorrer combinação dos dois mecanismos (SIMON *et al.*, 2000; CARLSON *et al.*, 2008; ARORA *et al.*, 2009; ASHARANI *et al.*, 2009; FOLDBJERG *et al.*, 2009, 2011).
2. Interação com enzimas celulares pela forte afinidade com os grupos tiols, quando ligados a estes podem causar inativação de proteínas, enzimas ou ocasionar dano celular. No ADN as AgNP podem se ligar em bases de purinas e pirimidinas (WEI *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2010; HUSSAIN *et al.*, 1992; LIAU *et al.*, 1997).
3. Mimetismo de íons endógenos se ligando em cálcio, sódio ou íons de potássio. Como modo de ação podem bloquear o transporte sistêmico e induzir distúrbios de regulação de íons (ORRENIUS *et al.*, 1992; HUSSAIN *et al.*, 1994).
4. Íons de prata podem afetar os organismos da mesma forma que quando liberados da AgNP. No entanto, há evidências de que não são todos os efeitos derivados dos íons de prata (GAISER *et al.*, 2013; LABAN *et al.*, 2010; FABREGA *et al.*, 2011).

As AgNP apresentam algumas características importantes para a toxicidade celular como alta solubilidade, capacidade de isoladamente ou na composição de agregado aumentar a sua reatividade e a capacidade de se transformar em uma fonte constante de íons de prata uma vez no interior dos compartimentos celulares (STENSBERG *et al.*, 2011).

A toxicidade dos íons de prata tem sido amplamente registrada (WHO, 2002), no entanto, as formas de nanopartículas de prata (nanopartículas ou agregados) também

demonstram graves efeitos tóxicos em espécies de água doce quando realizados estudos *in vivo* (VÖLKER *et al.*, 2013; FABREGA *et al.*, 2011; SCOWN *et al.*, 2010). Os efeitos tóxicos que são gerados após a exposição à AgNP são variados e dependem das concentrações das AgNP, que por sua vez estão sujeitas às propriedades físico-químicas do meio (ALLEN *et al.*, 2010; GAISER *et al.*, 2009). Outro fator que influencia na toxicologia está relacionado com a preparação das AgNP, o modo de exposição, a frequência da mesma e a dosagem utilizada nas avaliações (ROH *et al.*, 2009).

As estimativas da quantidade de AgNP no ambiente, calculadas por modelagem a partir de dados de produção da engenharia de nanomateriais, indicam que para o compartimento aquático é estimado uma concentração de 0,03 a 0,08 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MULLER e NOWACK, 2008). Esta concentração parece baixa se comparada com as concentrações de outros poluentes que se encontram nos ecossistemas aquáticos. No entanto, os compostos xenobióticos encontrados no ambiente aquático formam misturas complexas que fazem a investigação do efeito real destes compostos extremamente difícil.

Entendendo a complexidade dos sistemas aquáticos como receptores finais de vários tipos de xenobióticos, Limbach e colaboradores (2007) propuseram um mecanismo de toxicidade denominado como *Cavalo de Tróia*, no qual se refere à associação de alguns tóxicos com nanocompostos, que facilitariam o ingresso às células e compartimentos celulares de outras substâncias potencializando o efeito tóxico para os organismos. Neste contexto, a citotoxicidade das AgNP através de um mecanismo do tipo *Cavalo de Tróia* tem sido sugerida por vários estudos (LUOMA, 2008; LIMBACH *et al.*, 2007; LUBICK, 2008; PARK *et al.*, 2010).

De uma ampla variedade de xenobióticos introduzidos no ecossistema, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são considerados poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais (WHO, 1988), sendo os xenobióticos de maior permanência nos sedimentos e água de sistemas aquáticos (MEADOR *et al.*, 1995). O Benzo (a) pireno (BaP) é o HPA mais comum no ambiente e é considerado precursor

de ações mutagênicas e tumorais em sistemas biológicos (EPA, 2006; TSUKATANI *et al.*, 2003).

HPAs são formados por átomos de carbono e hidrogênio e organizados sob a forma de anéis aromáticos fusionados entre si, sendo que o BaP apresenta cinco anéis aromáticos (EPA, 2006). Estes xenobióticos tem sua origem na combustão incompleta da matéria orgânica dependente principalmente de fatores físicos como a temperatura e a pressão (LATIMER e ZHENG, 2003).

O transporte de HPAs se dá principalmente através de material particulado fino atmosférico ou por meio aquoso, atingindo regiões distantes de suas origens (GARBAN *et al.*, 2002; ROSE e RIPPEY, 2002). Nas regiões tropicais existem poucos dados se comparados com as zonas temperadas, principalmente se considerarmos os estudos com mistura complexas onde se incluem os HPAs (WILCKE *et al.*, 2003). Somado a isto, as atividades petroquímicas (refinamento, derramamento direto dos produtos e derivados), elevam consideravelmente os níveis ambientais de HPAs em corpos receptores, como lagos, rios e oceanos (PAGE *et al.*, 1999, YUNKER *et al.*, 2002, SISINNO *et al.*, 2003).

Embora a solubilidade do BaP na água seja baixa ($0,0038 \text{ mg.L}^{-1}$), a presença nos corpos d'água junto com detergentes capazes de dissolver o BaP tem sido reportada (HATTEMER-FREY e TRAVIS, 1991) e somado a isso, a capacidade das AgNP para se concentrar em HPAs quando coexpostas em soluções aquosas tem sido também descritas (ROMANOVSKAYA *et al.*, 2011). Neste contexto, a coexposição às AgNP e ao BaP, uma vez absorvidos pelas células e entrando de uma forma potencializada por associação com as AgNP, tornaria o BaP metabolicamente ativo e reativo a grupos nucleofílicos presentes em macromoléculas celulares, o que poderia catalisar os danos celulares, comprometendo o funcionamento de órgãos e afetando a integridade dos organismos expostos.

As nanopartículas de prata podem ser tóxicas para a biota por vários mecanismos de ação (VÖLKER *et al.*, 2013, YU *et al.*, 2013), no entanto, torna-se necessário prever corretamente o risco ecológico, entendendo a sua transformação, distribuição e

toxicidade em organismos aquáticos como os principais expostos, incrementando assim o entendimento da interação com outros poluentes existentes nos ambientes, os quais potencializam a complexidade dos mecanismos de toxicidade nas misturas de poluentes.

O presente estudo teve como intuito avaliar os efeitos da coexposição de AgNP e BaP em adultos de jundiá (*Rhamdia quelen*) após exposição por via oral (gavagem), afim de determinar o risco de coexposição sub-crônica destes poluentes. Foram utilizados para as análises toxicológicas biomarcadores bioquímicos, histopatológicos e genéticos. Foram realizadas a determinação química de HPAs na bile e a determinação química de prata em músculo, fígado e rim posterior.

A descrição da espécie utilizada como modelo nestes estudos encontra-se detalhada no Capítulo I desta tese. Este é o primeiro trabalho realizado com espécies de peixes neotropicais onde a coexposição de dois xenobióticos, um considerado emergente e outro com características bem conhecidas foram consideradas. Através de múltiplos biomarcadores espera-se diagnosticar o risco em potencial da exposição a estes poluentes, e avaliar se a coexposição confirma a teoria de *Cavalo de Tróia*, no que se refere à toxicidade do BaP quando na presença de AgNP. Com isso espera-se obter dados que possam contribuir para a compreensão dos riscos de exposição a estas duas moléculas para a biota e indiretamente para população humana.

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar os efeitos tóxicos de nanopartículas de prata (AgNP) coexpostas com benzo(a)pireno (BaP) em adultos da espécie *Rhamdia quelen* após exposição sub-crônica por via oral.

Específicos

1. Avaliar a peroxidação lipídica (LPO) em fígado e eritrócitos de *R. quelen* após coexposição à AgNP e BaP;
2. Determinar a concentração de glutathiona reduzida (GSH) e a Carbonilação de Proteínas (PCO) em fígado de *R. quelen* coexpostos à AgNP e BaP;
3. Avaliar a resposta antioxidante mediante a atividade da glutathiona S-transferase em fígado de *R. quelen* coexpostos à AgNP e BaP;
4. Avaliar o dano hepático de *R. quelen* após coexposição à AgNP e BaP, determinando as δ -ALAd no soro sanguíneo;
5. Determinar a neurotoxicidade em *R. quelen* após coexposição à AgNP e BaP medindo atividade da acetilcolinesterase em cérebro e músculo;
6. Analisar histopatologicamente tecidos alvo (fígado, rim anterior e posterior) de *R. quelen* coexpostos à AgNP e BaP;
7. Avaliar a genotoxicidade em *R. quelen* coexpostos à AgNP e BaP, por meio do Ensaio Cometa e contagem de micronúcleos em eritrocitos;
8. Determinar a expressão de Metalotioneínas (MTs) em rim posterior de *R. quelen* após coexposição à AgNP e BaP;
9. Determinar por análise química a concentração de prata (Ag) em tecidos alvo (fígado, músculo e rim posterior) e determinar quimicamente os HPAs em bile de *R. quelen* após coexposição a AgNP e BaP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho experimental

Para o desenvolvimento do estudo, indivíduos sexualmente maduros (adultos) de *Rhamdia quelen* foram alocados nos açudes da Piscicultura Panamá- SC em tanques rede, com o objetivo de preservar as condições naturais em que se desenvolve a espécie (FIGURA 21). Os indivíduos avaliados apresentaram pesos de $98,36 \pm 21,36$ gramas e foram alimentados diariamente com ração comercial Nicolussi contendo 45% de proteína bruta.

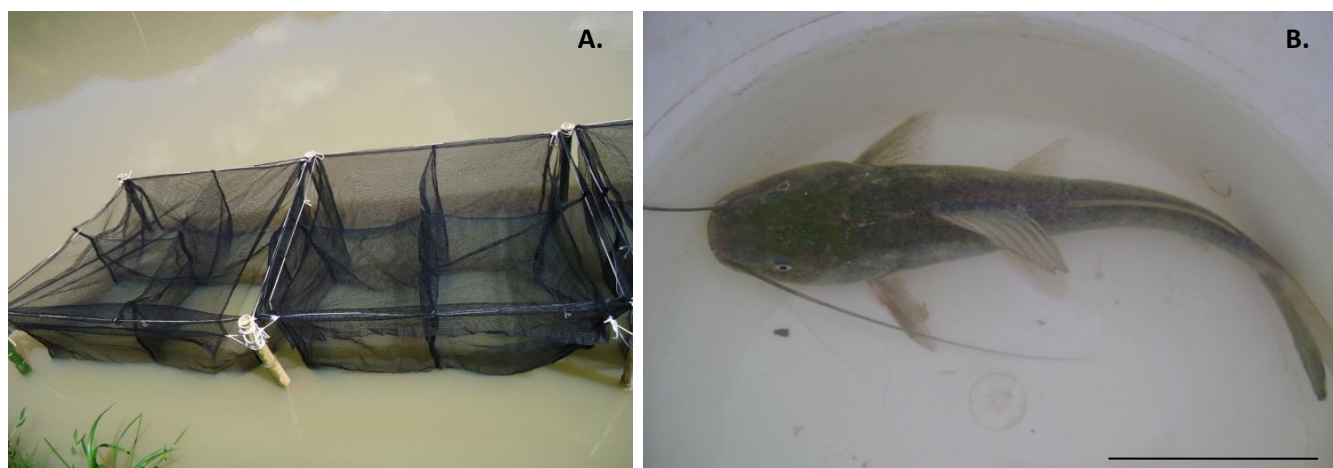


FIGURA 21. Tanques rede alocados em açudes na Piscicultura Paulo Lopes, SC para o desenvolvimento do experimento (A). Espécime de *Rhamdia quelen* utilizado no experimento (B). Escala B=10 cm.

Os animais expostos e os controles foram agrupados de cinco a seis indivíduos dentro dos tanques rede, totalizando onze animais por tratamento e completando 99 animais para todo o experimento. Foi realizada uma exposição sub-crônica por um período de 15 dias, correspondendo a três doses, aplicadas a cada cinco dias.

A cada exposição os indivíduos eram anestesiados com MS222 0,02% (ácido etil-éter-3-amino-benzóico, Sigma®) e pesados para calcular a dose do poluente (TABELA 6) em relação à massa corporal. Logo após, foi realizada a exposição oral por

meio de gavagem e os indivíduos eram realocados nos tanque rede onde permaneciam até a outra dose ou até o sacrifício.

TABELA 6. Tratamentos para avaliar o efeito de nanopartículas de prata coexpostas com Benzo(a)pireno em *Rhamdia quelen* por via oral.

Tratamento	Concentração (µg/g)
AgNP	0,03
	0,3*
	3
BaP	0,3**
Misturas (AgNP + BaP)	0,03 + 0,3
	0,3 + 0,3
	3 + 0,3
Controle DMSO	0,1%
Controle PBS pH 7,2	---

AgNP: Nanopartículas de prata, BaP: Benzo(a)pireno, DMSO: Dimetil Sulfoxido, PBS: tampão Fosfato-salino

* Concentração de AgNP toxica para *Danio rerio* (POWERS *et al.*, 2011)

** Concentração de BaP estimada em *Salvelinus alpinus* (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2007)

As AgNP foram preparadas como descrito no item 3.1. do Capítulo I. Para este desenho experimental foi utilizado como controle tampão Fosfato-salino (PBS) 0,1M para manter o equilíbrio osmótico nos indivíduos. Como solvente de BaP foi utilizado o Dimetil Sulfoxido (DMSO) sendo este utilizado como controle do BaP.

Após cinco dias da última exposição, cada exemplar foi anestesiado com MS222 0,02% e retirado sangue com o auxílio de seringa e agulha heparinizadas através da veia caudal para análises dos biomarcadores de genotoxicidade. Em seguida, foi realizada a disseção e retirada do fígado, bile, músculo, cérebro, rim anterior e armazenados a -80°C para posteriores análises de biomarcadores bioquímicos e fixados os tecidos para análises dos biomarcadores histopatológicos.

3.2. Análises de Biomarcadores

Para as análises bioquímicas foram coletados: eritrócitos, plasma, fígado, rim anterior e posterior, músculo e cérebro. A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi medida em músculo e cérebro. O tecido hepático foi utilizado para medir os níveis de glutathiona reduzida e tios não proteicos (GSH), peroxidação lipídica (LPO), carbonilação de proteínas (PCO) e avaliar a atividade da Glutathiona S-Transferase (GST). Os eritrócitos foram utilizados para avaliar a atividade da Delta- aminolevulinato desidratase (δ -ALAD) e para determinar a LPO no plasma. No rim posterior foram determinados os níveis de metalotioneínas (MTs).

Os tecidos coletados foram homogenizados em diferentes soluções, dependendo a análise, em proporção de 0,3 mg de tecido em 0,5mL de tampão. Músculo e cérebro foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5 para músculo e pH 8,0 para cérebro) e centrifugados a 12.000 g a 4°C por 20 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para análise de AChE. Fígado, rim posterior e eritrocitos foram homogeneizados em tampão fosfato a 4°C, 0,1M, pH 7,5.

Posteriormente a solução foi centrifugada a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para todas as análises bioquímicas. Esta solução foi mantida em *freezer* -80°C para leitura das análises bioquímicas.

Com o intuito de normalizar as amostras, conteúdo de proteínas de cada amostra foi medido através de método de Bradford (1976), usando albumina bovina sérica (BSA) como padrão. Em microplaca de 96 poços, foram colocados 10 μ L do sobrenadante das amostras e 250 μ L do reativo de *Bradford* (Sigma®). Caso a cor da amostra esteja mais intensa que a do padrão de BSA se deve diluir a amostra até que fique visualmente menos intensa que a do padrão de BSA, mas mais intensa que a do tampão. Posteriormente foram realizadas as leituras de absorbância a $\lambda = 595$ nm. Para cada amostra, foi determinada a concentração de proteína a partir da comparação dos valores de absorbância obtidos da curva-padrão de BSA realizada em paralelo.

3.2.1. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A enzima acetilcolinesterase (AChE) tem uma função neural como um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso autônomo e é altamente catalítica (SOREQ e SEIDMAN, 2001). É responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh), regulando a transmissão do impulso nervoso; portanto a inibição da sua atividade acumula ACh, o que pode ocasionar efeitos de excitação pós-sinápticos prolongados hiperestimulando os nervos, fibras dos músculos e gerando paralisia que pode levar a morte (CHEBBI e DAVID, 2009; PRETTO *et al.*, 2010). Variados estudos reportaram a inibição da AChE por poluentes como organoclorados, pesticidas, carbamatos, metais pesados e hidrocarbonetos (OLIVEIRA RIBEIRO e SILVA DE ASSIS, 2005; ZINKL *et al.*, 1987, 1991; PAYNE *et al.*, 1996).

A atividade da AChE foi medida segundo o método de Ellman e colaboradores (1961) modificado para microplaca por Silva De Assis (1998). O sobrenadante (proteínas solúveis da fração) foi separado para análise enzimática e normalizado para 1,0 mg de proteína/mL. Em microplacas, as análises foram realizadas em triplicata foram adicionados 20 µL da amostra e 130 µL de DTNB 0,75 mM (5,5 – ditio-bis-2-nitrobenzoato). Posteriormente 50 µL do substrato acetilcolina (9 mM) foi adicionado a cada poço imediatamente antes da leitura no espectrofotômetro a 405 nm. A leitura foi realizada 4X com intervalos por segundos.

3.2.2. Atividade Glutationa S-transferase Total (GST)

A Glutationa S-Transferase (GST) é o principal grupo de proteínas solúveis do fígado, e podem ser de origem citosólica, mitocondrial ou microsomal. As GST são um grupo de isoenzimas que realiza uma série de funções nas células: remoção de espécies reativas de oxigênio (EROS) consequência do estresse e a conjugação de glutatona reduzida (GSH) por meio do grupo sulfídrico, essencial no processo de detoxificação celular (SHEEHAN *et al.*, 2001). As GSH funcionam também como proteínas de transporte e estão relacionadas com a transferência dos hidroperóxidos

lipídicos (LPO) entre estruturas lipídicas como vacúolos e microssomas (LEAVER e GEORGE, 1998).

A atividade das GST foi medida pelo método de KEEN *et al.*, 1976 (com modificações), por meio da determinação indireta do tioéter pelos substratos GSH (molécula endobiótica) formado com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, substrato sintético para determinar a atividade da maioria das isoformas de GST), medindo a absorbância ($\lambda = 340$ nm). As amostras foram descongeladas em gelo, submetidas ao ultra-som (6 ciclos de 4s cada) e centrifugadas a $9.000 \times g$ por 30 min a 4°C . Um volume de 50 μl do sobrenadante (proteínas solúveis da fração) da amostra foram adicionado aos poços de uma microplaca de 96 poços e, imediatamente antes das leituras a 340 nm, 100 μl de meio de reação que contém GSH a 1,5 mM, CDNB 2 mM, tampão fosfato de potássio a 0,1 M (pH 6,5), foram acrescentados. O aumento gradual na absorbância foi monitorado e registrado por leitor de absorbância para microplacas em intervalos de 15 segundos num período total de 3 minutos. A atividade global das GST foi expressa em micromoles de tioéter formado por minuto por miligrama de proteínas.

3.2.3. Concentração de tióis não protéicos (Glutathiona e outros tióis)

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos (HUBER *et al.*, 2008). Possuem uma atividade protetora para a célula pela redução de espécies oxidantes o que as torna de importância na avaliação do estresse oxidativo (MANAHAM, 2000). Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), altamente polarizável, tornando-a um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos, o que a torna um doador de elétrons a outros compostos tornando-a altamente redutora. Desta forma a GSH é uma proteção bioquímica da célula contra EROS e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive (HUBER *et al.*, 2008).

A concentração de Glutathiona reduzida (GSH) foi determinada segundo o método de Sedlak e Lindsay (1968), por meio da determinação de tióis não proteicos e GSH. A cada 250 µl de amostra (sobrenadante de fígado) foi adicionado 50 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 48% para precipitação proteica. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 1.000 x *g* por 15 min a 4°C. Para as leituras, foram adicionados em microplacas 50 µl do sobrenadante da amostra (proteínas solúveis da fração) e 230 µl de tampão Tris-base (400 mM, pH 8,9). Como branco, foi utilizado 230 µl do tampão Tris-base a 400 mM mais 50 µl de TCA a 8% em PBS. Por último, 20 µl de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) a 2,5 mM (em metanol a 25%, tampão Tris-base 300 mM, pH 8,9) foram acrescentados; e procederam-se imediatamente as medidas de absorvância ($\lambda = 415$ nm). A determinação do conteúdo de GSH foi realizada através de comparação com curva-padrão de GSH (0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 32 nM GSH) e a unidade de medida foi expresada em micromoles de GSH e tióis não proteicos por miligrama de proteínas.

3.2.4. Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica é um processo em nível celular, cuja medição é utilizada para avaliar o estresse oxidativo (DRÖGE, 2002). Os efeitos tóxicos resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios, mediados por EROS e espécies reativas de nitrogênio (ERN), conhecidas genericamente como radicais livres (RL), desencadeiam este processo ao retirar átomos de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, alterando a fluidez e a funcionalidade destas (LIMA *et al.*, 2001).

A produção de hidroperóxidos lipídicos foi verificada pelo método de FOX (oxidação do ferro do sulfato ferroso de amônio) e quantificada pela formação do complexo Fe⁺³ - laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado (JIANG *et al.*, 1991, 1992). As amostras foram submetidas ao ultra-som por 2

min em gelo, após acréscimo de metanol PA (500 µl) e centrifugadas a 1.000 x g por 10 min a 4°C. Para as leituras, 30 µl do sobrenadante da amostra (proteínas solúveis da fração) mais 270 µl de meio de reação [(laranja de xilenol a 100 µM, H₂SO₄ a 25 mM, BHT (hidroxitolueno butilado) a 4 mM, FeSO₄.NH₄ (sulfato ferroso amoniacal) a 250 µM (acrescentados na sequencia descrita em metanol a 90%)] foram adicionados em microplaca. Após 30 min. de reação a temperatura ambiente em microplacas tampadas, para reduzir a evaporação do metanol, procedeu-se a medida de absorbância ($\lambda = 570$ nm; faixa de leitura = 550-570 nm). Em paralelo às amostras, 30 µl de metanol a 50% e 1 µl de peróxido de hidrogênio a 30% foram empregados, respectivamente, como branco e controle positivo.

3.2.5. Carbonilação de proteínas (PCO)

O estresse oxidativo gera o aparecimento de grupos carbonilas (como grupos aldeídos e cetonas) em proteínas como consequência de várias reações oxidativas, resposta bioquímica denominada de carbonilação de proteínas (PCO) (CATTARUZZA e HECKER, 2008). As proteínas carboniladas tendem a ser mais hidrofóbicas e resistentes à proteólise, o que pode ocasionar danos celulares como consequência das alterações químicas nestas macromoléculas (WONG *et al.*, 2008; SUZUKI *et al.*, 2010).

A determinação de carbonilação de proteínas foi realizada indiretamente por meio da reação destas com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) que forma dinitrofenil-hidrazonas que podem ser detectadas a 358-370 nm (LEVINE *et al.* 1994; QUINLAN e GUTTERIDGE, 2000). Após centrifugação 200 µL do sobrenadante das amostras (Proteínas solúveis da fração) foram adicionados a 800 µL de DNPH a 10 mM (preparado em HCl a 2 M) . Os brancos tiveram um volume igual de HCl a 2 M (sem DNPH). Após mistura em vórtex durante 5 min os tubos foram mantidos em banho-maria a 30°C por 1,5 h. Após incubação, as proteínas precipitaram-se pela adição de 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) a 28%. Posteriormente foi centrifugado a 9.000 g por 10 min. O *pellet* de proteínas foi lavado por ressuspensão (3X, em etanol/acetato de

etila 1:1), depois homogeneizado em vórtex e centrifugado. As proteínas foram solubilizadas em cloreto de guanidina a 6 M, centrifugadas a 9.000 g por 5 min para remover material insolúvel. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente ($\lambda = 360$ nm) em cubetas utilizando o coeficiente de absorção molar de $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para hidrazonas. Antes da reação (em uma alíquota reservada das proteínas solúveis da fração) as proteínas foram quantificadas e após o ensaio (proteínas em cloreto de guanidina) para evitar erros por perdas durante o procedimento. Os resultados são expressos em nanomoles de carbonilas por miligrama de proteínas quantificadas após o ensaio corrigidas pela concentração de proteínas inicial.

3.2.6. Análises da δ -ALAd (Delta- aminolevulinato desidratase)

A Delta- aminolevulinato desidratase (δ -ALAD) é uma metaloenzima que catalisa a condensação do ácido aminolevulínico (ALA) para formar moléculas de porfobilinogênio (PBG) essenciais na biossíntese do grupo heme que proporciona elétrons para a respiração celular (GIBSON *et al.*, 1955). Esta enzima contém um grupo sulfidril e numerosos metais, como o chumbo (RODRIGUES *et al.*, 1989), o mercúrio (ROCHA *et al.*, 1995), e outros compostos, que oxidam os grupos sulfidril (-SH) podem modificar a sua atividade (FLORA *et al.*, 1998). Portanto, δ -ALAD é inibida por substâncias que competem com zinco e/ou que oxidam os grupos-SH (FARINA *et al.*, 2002, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2003) e está associada com situações de estresse oxidativo (PANDE *et al.*, 2001; PANDE e FLORA, 2002; TANDON *et al.*, 2002). Portanto, a inibição da δ -ALAD é reconhecida como um útil biomarcador de exposição e efeito a metais, tanto em seres humanos e outras espécies animais (TIMBRELL, 2000).

A análise da δ -ALAd foi realizada através da técnica modificada de Sassa (1982), Rodrigues e colaboradores (1989), Bainy (1990) e Alves Costa (2001). O ensaio quantifica o porfobilinogênio (PBG; PBG: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$, PM = 226,23 g.mol⁻¹) formado pela δ -ALAd ALA (δ -ALA. HCl: PM = 167,59 g.mol⁻¹) a partir de 2 moléculas de δ -ALAd, que produz a cor vermelho-rósea quando reage com a solução de Ehrlich. As proteínas

solúveis da fração foram sonicadas (6 ciclos, 4X). Posteriormente 50 µl de amostra foram adicionados a 550 µl da solução de [δ -ALA] final = 4 mM. O branco continha 50µl de amostra e 550 µl das soluções de análise (adicionas no t=0). Imediatamente depois foram incubadas durante 1-2 h em 25°C. A reação foi interrompida com banho de gelo seguido e precipitado com TCA/HgCl₂. As amostras foram centrifugadas a 5000 xg (~7300 rpm), 4°C por 5 min. Do sobrenadante foi pipetado 150 µl (amostra e branco) em microplaca. Finalmente foi adicionado 150 µl aos poços da microplca. Após 15 min de reação a absorbância foi lida em espectrofotômetro de microplaca a 550 nm. A quantificação foi realizada por comparação com uma curva padrão de PBG a 0, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 20 µg.ml⁻¹.

3.2.7. Determinação de Metalotioneínas (MTs)

As metalotioneínas (MTs) são proteínas não enzimáticas, de cadeia única, de baixo peso molecular, com um conteúdo alto em metal e enxofre (KOJIMA *et al.*, 1999). A síntese MTs pode ser induzida por uma variedade de estímulos, entre os quais incluem metais, hormônios, toxinas e estresse (KLAASSEN *et al.*, 1999), sendo que os metais são os indutores mais potentes. Estudos mostram seu envolvimento na desintoxicação de metais (ROESIJADI, 1992; KLAASSEN *et al.*, 1999), na proteção das células contra o estresse oxidativo (DALTON *et al.*, 1996; VIARENGO *et al.*, 1999) e também no metabolismo dos metais essenciais para as células (controle homeostático da absorção e metabolismo do cobre e zinco) (COUSINS, 1985). Portanto, são consideradas como um biomarcador de exposição específico para metais e estudos de monitoramento tem incluído a determinação dos níveis desta proteína nos tecidos dos animais (OLSSON *et al.*, 1990).

A determinação da concentração das MTs foi baseada no método descrito por Viarengo e colaboradores (1997). O tecido foi homogeneizado utilizando-se 5 mL de tampão de homogeneização Tris-HCl e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) por grama de tecido e centrifugado a 30.000g durante 45 min. Foram retirados 0,250 mL do

sobrenadante, adicionando 0,265 mL de etanol absoluto (resfriado a -20°C) e 20 μl de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a $6.000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Após este procedimento, foram pipetados 300 μl do sobrenadante e adicionados 20 μl de HCl puro (37%) e 900 ml de etanol puro frio para cada volume de sobrenadante.

As amostras foram homogeneizadas novamente e colocadas a -20°C por 1 h e posteriormente centrifugadas a $6.000 \times g$ durante 10 min, sendo que o precipitado foi ressuspensionado com 1 mL de etanol 87% e clorofórmio 1% diluídos em tampão Tris-HCl (20mM). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a $6.000 \times g$ durante 10 min, sendo que o precipitado foi ressuspensionado com 150 μl de NaCl (250 mM). Posteriormente foi adicionado 150 μl da solução de EDTA (4mM). As amostras foram homogeneizadas (agitador magnético) e posteriormente adicionados 4,2 mL da solução de DTNB.

As amostras foram novamente homogeneizadas em agitador magnético e centrifugadas a $3.000 \times g$ por 5 min. A absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram expressos em função da concentração de GSH. Para isto, um padrão com concentrações de GSH: 15, 30, 60, 90 e 120 μM foi analisado. Os padrões foram preparados com 100 μl de solução padrão de GSH em 1,2 mL da solução de DTNB .

3.3. Análises Histopatológicas

Foram coletadas amostras de fígado, rim anterior e posterior, que foram fixadas em ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) por 16 horas. Posteriormente as amostras foram transferidas para álcool 70% e lavadas finalmente com álcool 70%. Após esta fase, as amostras passaram por uma bateria crescente de álcool para desidratação (70-100%) e xilol. Consecutivamente foram diafanizadas em xilol e emblocadas em resina Paraplast Plus (Sigma®). Cortes com espessura de 5 μm foram obtidos e preparados em lâminas cobertas de albumina.

Posteriormente foram coradas com Hematoxilina e Eosina e observadas ao microscópio de luz para análise e captura de imagens.

3.3.1. Alterações Morfológicas

As alterações morfológicas foram analisadas em microscópio de luz e registradas através de fotomicrografias. O índice de lesão histopatológica proposto por Bernet e colaboradores (1999) foi calculado para avaliar o grau de dano em fígado, rim anterior e posterior para avaliar a qualidade das lesões histológicas.

O índice atribui um valor numérico a cada lesão observada. Esse valor pode variar de 0 a 6, sendo zero ausência de lesão e seis lesão com maior grau de severidade. Este valor é multiplicado por um valor que classifica as alterações pelo grau de importância: (1) importância patológica mínima onde a lesão é facilmente reversível; (2) importância moderada, reversível em muitos casos e (3) importância severa, geralmente irreversível, levando à diminuição das funções do órgão. Para cada órgão é calculado um valor para cada tipo de lesão, a somatória destes evidencia o estado histopatológico do órgão avaliado.

3.3.2. Contagem dos centros de melano-macrófagos (CMM)

Os centros de melano-macrófagos (CMM) são agregados de macrófagos contendo pigmentos como a hemossiderina, lipofusina e melanina. Estas células fagocitam o material estranho ao tecido, auxiliando o processo de detoxificação celular e produzindo melanina, características que os fazem um biomarcador histopatológico de poluição (AGIUS e ROBERTS, 2003). Pela função dos macrófagos, tem sido proposto que a sua frequência de aparição pode ser influenciada por vários poluentes, incluindo metais, fazendo com que os CMM se proliferem ou a sua produção seja inibida (FOURNIE *et al.*, 2001; FACEY *et al.*, 2005).

Foi realizada a contagem dos centros de melano-macrófagos como proposto por Rabito e colaboradores (2005). Observações de amostras de fígado e rim anterior foram realizadas em microscópio de luz através do sistema-teste quadriculado acoplado a uma das oculares do microscópio. A ocular tem uma área total de 1 mm², equivalendo cada menor divisão da quadricula a 0,01 mm² de área. Foi realizada a somatória da frequência de CMM após observação de 15 campos em objetiva de 10X selecionados aleatoriamente, registrando os resultados da contagem em CMM por mm².

3.3.3. Contagem de novos néfrons

Lesões no tecido renal podem ser indicações de toxinas específicas e assim podem ser utilizadas como indicadores para o monitoramento de efeitos de contaminantes (SCHWAIGER *et al.*, 1997, SCHWAIGER, 2001; SILVA, 2004). O rim de peixes tem a capacidade de reparar danos em néfrons e possui a habilidade de responder à injúria renal com a neogênese de novos néfrons (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995; REIMSCHUESSEL, 2001). Após dano renal induzido por agentes tóxicos, pode haver a produção de néfrons (REIMSCHUESSEL, 2001), o novo néfron demora várias semanas para amadurecer, desenvolvendo os segmentos proximal e distal e tornando-se acidófilo quando se distinguem as células do estágio adulto (COMIER *et al.*, 1995). A presença de novos néfrons em peixes pode indicar que o comprometimento fisiológico destes não está impedindo qualquer regeneração tecidual (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

Foi realizada a contagem de novos néfrons como proposto por Pamplona (2009). Lâminas de tecido de rim posterior foram observadas no microscópio de luz e os novos néfrons foram contabilizados através do sistema-teste quadriculado acoplado a uma das oculares do microscópio com as características descritas no item 3.3.2. Foi realizada a somatória da frequência de novos néfrons após observação de 15 campos

em objetiva de 10X selecionados aleatoriamente, registrando os resultados da contagem em novos néfrons por mm².

3.4. Análises de Genotoxicidade

3.4.1. Ensaio Cometa (“Single Cell Gel Electrophoresis”)

O Ensaio cometa (teste de células individualizadas em gel de agarose) é uma técnica para a avaliação de dano e de reparo do ADN em células proliferantes e não proliferantes individualmente empregando-se amostras celulares extremamente pequenas. É uma técnica útil para o estudo de danos e reparos no ADN. As células com dano aumentado no ADN mostram um aumento na migração de ADN cromossomal do núcleo em direção ao ânodo, que se assemelha à forma de um cometa (SPEIT e HARTMANN, 1999). O ensaio Cometa tem amplas aplicações em toxicologia genética, em testes de genotoxicidade *in vitro*, *in vivo*, e no biomonitoramento ambiental.

Foi adotado o protocolo padronizado no Laboratório de Citogenética da UFPR (FERRARO *et al.*, 2004). Préviamente ao sacrifício dos animais foi feita a preparação das lâminas com cobertura de agarose. Foram dissolvidos 1,5 g de agarose normal em 100 ml de PBS, sob agitação e aquecimento por duas horas. Após este procedimento as lâminas foram mergulhadas na agarose até alcançar a parte esmerilhada; procurado fazer uma camada fina de agarose.

Amostras de sangue foram coletadas com agulha heparinizada através de extração na veia caudal. Aproximadamente 10 µl de sangue de cada animal foi misturada com 1 ml de soro bovino fetal. Desta solução, 10 µl de suspensão celular e misturados com 120 µl de agarose, previamente preparada e levemente aquecida (37°C), depois de colocadas sobre uma lâmina com a cobertura de agarose normal, coberta com lamínula e levada a geladeira por 15 minutos. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em solução de lise dentro de cubetas e mantidas a 4°C por 24 horas.

Para realizar a eletroforese, a cuba de prolipopileno foi mergulhada em gelo (4°C) e no escuro. Posteriormente, as lâminas foram colocadas na cuba horizontal de eletroforese preenchendo os espaços vazios com lâminas limpas. Posteriormente foi adicionado tampão de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir as lâminas e mantidas nesta solução por 30 minutos para a desespiralização do ADN. A corrida de eletroforese foi realizada a 25V e 300 mA por 25 minutos. Terminada a eletroforese, as lâminas foram retiradas e neutralizadas com 5 mL de tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos, duas vezes.

As lâminas de Ensaio Cometa foram analisadas adicionando 20 µl de brometo de etídeo para a coloração e cobertas com lamínula para serem analisadas imediatamente sob o microscópio de epifluorescência com aumento de 400x em teste cego, 1000 núcleos em cada lâmina. Os núcleos foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética. Os núcleos são classificados em: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano máximo) e 4 (núcleo destruído ou em apoptose).

3.4.2. Análises de micronúcleos

Os micronúcleos são estruturas compostas por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que, durante a mitose, não foram incorporados ao núcleo principal. O micronúcleo é o resultado da perda de fragmento(s) cromossômico(s) ou de cromossomo(s) inteiro(s), que podem ser induzidos por xenobióticos que os danificam, produzindo quebras ou afetam o fuso mitótico (BOHRER *et al.*, 2005).

Os fragmentos ou cromossomos inteiros que não se incluem aos núcleos das células em divisão ficam perdidos no citoplasma e formam a própria membrana nuclear, originando micronúcleos, observados como pequenos corpúsculos arredondados de cromatina, separados do núcleo principal (SILVA *et al.*, 2003). Através da frequência de micronúcleos é capaz de medir tanto as quebras

cromossômicas quanto perdas cromossômicas, sendo essa técnica sensível para o monitoramento de danos genéticos (FENECH, 2000).

Para visualizar micronúcleos, as células precisam ter passado por um ciclo mitótico, aumentado assim, a frequência de células micronucleadas o que tem sido relacionado à exposição a poluentes carcinógenos (BOHRER *et al.*, 2005). A análise de micronúcleo é considerada como um método para se avaliar a capacidade do poluente de induzir dano cromossômico estrutural e/ou numérico em células em estágio de divisão, associados à iniciação e/ou progressão de tumores, que podem ter efeitos reprodutivos adversos (RIBEIRO, 2003).

Para esta análise o sangue foi coletado e uma gota e com o auxílio de uma lamínula foi realizado o esfregaço. A secagem do material foi realizada durante uma noite (“overnight”). As lâminas foram submetidas a um banho de 15 minutos em metanol P.A. (100%) para a fixação. Em seguida, foi feita uma lavagem com água destilada corando-se a lâmina por 40 minutos em Giemsa 5%; lavada posteriormente com água destilada e seca ao ar, em temperatura ambiente.

Depois de seco, o material foi observado em microscópio de luz para contagem dos micronúcleos presentes e posterior análise dos dados. A análise citogenética foi realizada em microscópio de luz em resolução 100X, com contagem de 1000 células por lâmina. As alterações nucleares foram classificadas como descrito por Carrasco e colaboradores (1990), procedimento padronizado no Laboratório de Citogenética da UFPR.

Os micronúcleos foram analisados e os resultados foram expressos como a somatória de todas as classes de alterações observadas. Foram considerados para as análises apenas eritrócitos nucleados e com membranas celulares e nucleares intactas. No entanto, foram consideradas nas análises as partículas arredondadas, com um diâmetro de 1/5 a 1/20 do núcleo principal, sem nenhuma ligação com o mesmo, e com uma coloração característica coerente com o núcleo principal e uma imagem não refratária.

3.5. Determinação de Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na bile

O metabolismo de vertebrados é eficaz na biotransformação e eliminação de HPAs, e os níveis em tecido não são considerados um bom marcador de bioacumulação porque não indicam os níveis destes xenobióticos no meio ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003). A análise de metabólitos de HPAs em bile de peixe tem sido utilizada como um biomarcador para monitorar a presença destes poluentes no ambiente (LIN *et al.*, 1996; AAS *et al.*, 2000; HANSON e LARSSON, 2008; BEYER *et al.*, 1996, 2010).

Para realizar esta análise foi utilizada a técnica padronizada no Laboratório de Toxicologia Celular da UFPR. Trata-se de uma modificação da técnica desenvolvida por Lin e colaboradores (1996) que usavam a medição por fluorescência fixa (*Fixed Fluorescence-FF*) de metabólitos do tipo naftaleno e metabólitos do tipo benzo(a)pireno, comparando com análises por cromatografia. Foi adaptado de Aas e colaboradores (2000) a medição de biliverdina e realizada a normalização em relação a este pigmento para eliminar a interferência da fluorescência do pigmento na análise.

Neste estudo, as amostras de bile foram diluídas em etanol 48%, nas proporções de 1:1000 até 1:2000. (ex. 1:1000; 1:1200; 1:1400; 1:1600; 1:1800; 1:2000) e posteriormente analisadas por fluorescência fixa. Posteriormente foi medida a razão de fluorescência através da fórmula:

$$\text{Razão de Fluorescência} = \frac{\text{Fluorescência da diluição} \times \text{Fator da diluição}}{\text{Fluorescência da bile } 100\%}$$

Se o valor da reação for igual a 1 não é necessário realizar a normalização. Se houver variação entre os tratamentos, a reação é normalizada para biliverdina anotando a diluição adicional para a estimativa final. Com as amostras normalizadas foi medida a fluorescência de HPAs para as amostras e o Etanol 48%. Para cada estrutura de HPAs foram usadas diferentes λ de excitação e emissão (λ Exc/Em): 2 anéis

(288/330); 4 anéis(334/376); 5 anéis(364/406); 6 anéis (380/422). A concentração de HPAs foi calculada pela formula:

$$[\text{HPAs}] = \frac{[\text{Media FF} - \text{FF Etanol 48\%}] \times \text{Diluição}}{a}$$

Onde Media FF é a média da fluorescência da amostra; FF Etanol 48% é a Fluorescência do Etanol em diluição de 48%; Diluição é o fator de diluição utilizado para realizar a leitura da amostra, e a é a pendente da equação da reta da curva padrão para cada anel de HPA.

Os resultados foram expressos em ng.ml^{-1} para cada estrutura de HPAs. Foram analisados *pools* de amostras de três (3) indivíduos por tratamento para garantir um volume necessário para realizar as análises.

3.6. Determinação Química de Prata por Espectrofotometria de Absorção Atômica de Chama (FAAS)

Para a análise química de prata (Ag) foram coletados 5g de amostras de fígado, músculo e rim anterior e congelados a -80°C para posterior processamento na Universidade Estadual de Ponta Grossa Setor de Ciências Exatas e Naturais. As análises para determinação química de prata iônica foram realizadas por Espectrofotometria de Absorção Atômica de Flama (FAAS).

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e digeridas em dois ml da solução concentrada de HNO_3 (grau AR; Fisher Scientific®). Depois foram colocadas em um digestor Friedrich TE-128/6 Tecnal ® a 200°C , por duas horas. Após o arrefecimento, extratos foram filtrados em filtros Whatman quantitativos (No. 540) e transferidos para frascos de fundo redondo de 25 ml, lavados com água Milli-Q deionizada e aferido.

Posteriormente as amostras foram analisadas em Espectrômetro de Absorção Atômica de Chama (FAAS) Varian® modelo 240FS, ligado ao Sistema de preparação de amostras (SPS3) e um sistema de bomba de indução (SIPS). Os padrões de calibração contendo 1 ppm, 0,75ppm, 0,50ppm 0,25ppm e foram feitos a partir de uma solução-mãe (1000 ppm ou $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de prata SpecSol®. As concentrações são expressadas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.7. Análise estatístico de dados

Os dados de biomarcadores bioquímicos foram analisados em relação aos pesos dos organismos. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para correlacionar os resultados provenientes das análises bioquímicas com os pesos dos indivíduos e padronizar os dados, no entanto, não foram observadas correlações para nenhum dos biomarcadores bioquímicos analisados.

Posteriormente os dados de biomarcadores bioquímicos foram analisados com ANOVA de uma via após a confirmação da normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos. Foram considerados os indivíduos como réplicas ($n=11$) para cada tratamento. Testes post-hoc de Dunnett e/ou Tukey foram utilizados para análises das diferenças com o controle e em comparações múltiplas, respectivamente. Para as análises sempre foram realizadas comparações dos tratamentos de AgNP expostos isoladamente e análises de cada mistura com a dose correspondente de AgNP e BaP.

Para analisar os biomarcadores de genotoxicidade (Ensaio Cometa e Micronúcleos) foram realizadas análises de comparação com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, após a confirmação da não normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos. Para analisar os biomarcadores histopatológicos, nas alterações morfológicas foi aplicada uma ANOVA de uma via após a confirmação da normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos. Foram considerados os indivíduos como réplicas ($n=11$) para cada tratamento. Testes post-hoc de Tukey foram utilizados para análises das diferenças dos tratamentos com o controle. As análises dos Centros de

Melano-mácrofagos e novos néfrons foram avaliadas com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, após a confirmação da não normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos.

Para análises de determinações de HPAs em bile e a determinação química da prata iônica foi aplicada uma ANOVA de uma via após a confirmação da normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos. Quando necessário foi aplicado o teste post-hoc de Dunnett e/ou Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software R, e assumindo um valor de $p < 0,05$ para significância estatística.

4. RESULTADOS

Para realizar a exposição via oral foram preparadas doses de AgNP a partir das suspensões caracterizadas no item 4.1. do Capítulo I.

4.1. Determinação Química de Prata

Ao realizar a determinação química de prata (Ag) em fígado, rim anterior e músculo observa-se uma diferença na quantidade de prata para cada tecido. Sendo que a ordem de concentração de Ag nos tecidos foi: Fígado > Músculo > Rim Anterior. No entanto, foi um padrão geral nos três tecidos que a concentração de Ag é diretamente proporcional ao aumento da dose de exposição de AgNP (FIGURA 22).

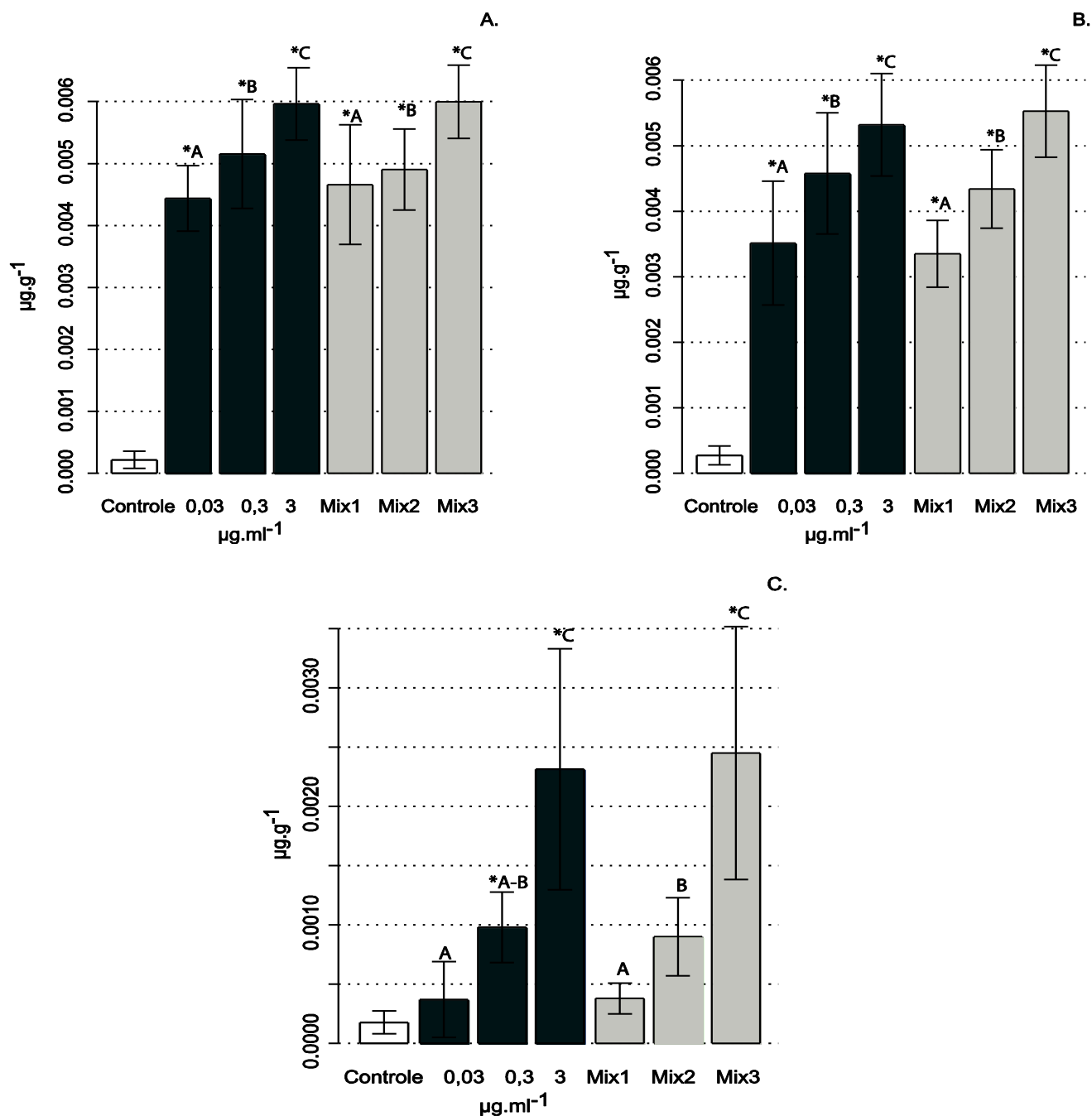


FIGURA 22. Concentração de prata em tecido de (A) Fígado, (B) Músculo e (C) Rim Anterior. As letras e símbolos representam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Contudo, ao comparar os tratamentos com sua respectiva exposição e coexposição, os dados não apresentam diferenças estatísticas (FIGURA 22). Isto indica que a quantidade de prata nos três tecidos não foi aumentada com a coexposição ao BaP.

4.2. Determinação de Policíclicos Aromáticos (HPAs) na bile

Ao determinar a concentração de HPAs de dois, quatro, cinco e seis anéis na bile, foram detectados níveis em todos (FIGURA 23). As concentrações observadas nos HPAs de cinco anéis apresentaram um padrão de aumento nos HPAs quando realizadas as coexposições se comparado com as exposições isoladas (FIGURA 23C).

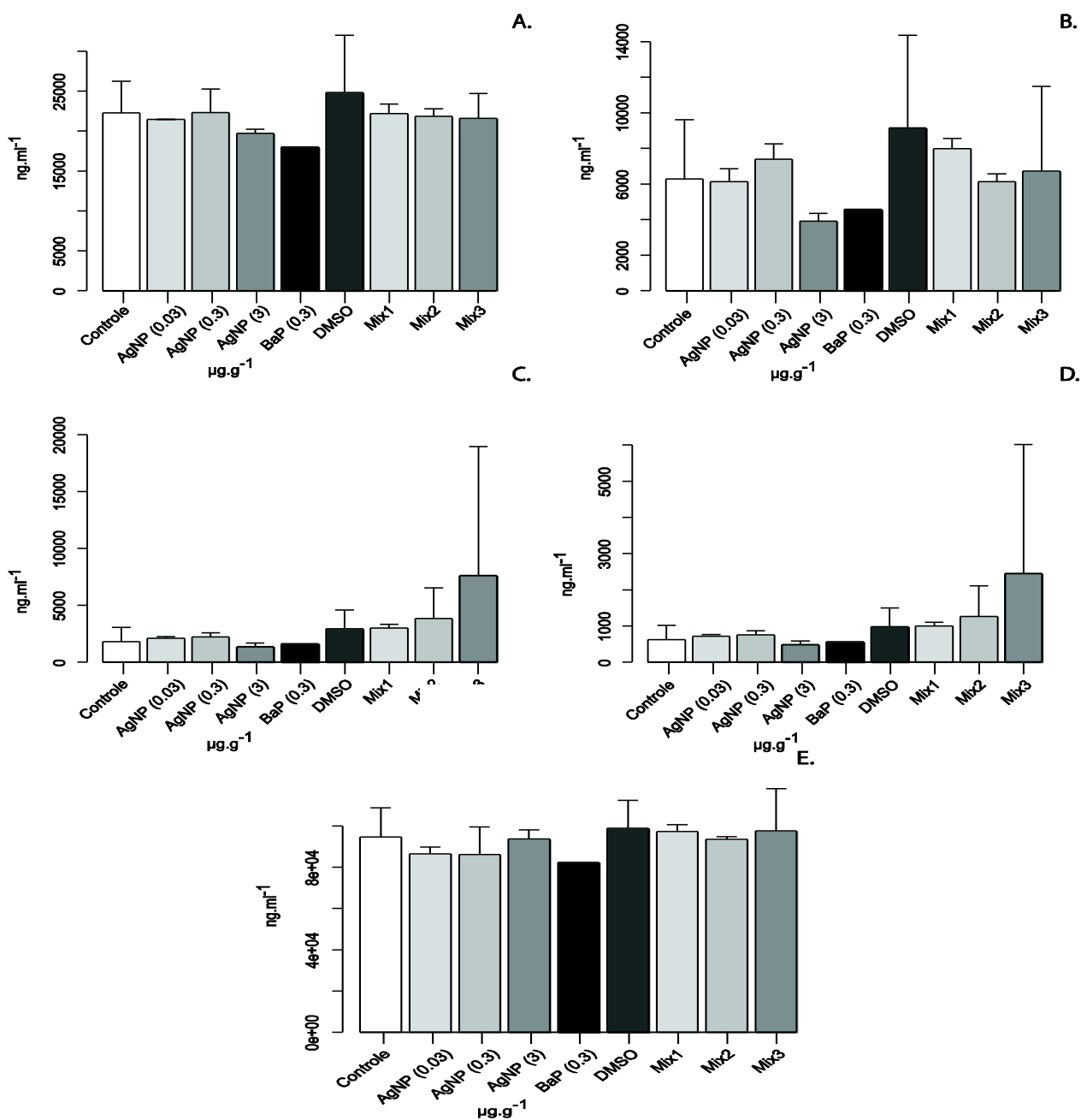


FIGURA 23. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) determinados em bile de *Rhamdia quelen* após coexposição às AgNP e BaP. A. HPAs de dois anéis, B. HPAs de quatro anéis, C. HPAs de cinco anéis, D. HPAs de seis anéis, E. Somatória dos HPAs de diferentes anéis.

Porém, ao realizar as análises estatísticas não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em nenhum HPA avaliado, porque o coeficiente de variação dos dados é muito alto (FIGURA 23).

4.3. Biomarcadores Bioquímicos

Ao realizar as análises estatísticas dos dados bioquímicos não foram detectadas diferenças entre os tratamentos de BaP e o DMSO (teste t, $p > 0.05$) por isso foram utilizados nas comparações unicamente os dados da exposição isolada com BaP.

4.3.1. Acetilcolinesterase (AChE) em Cérebro e Músculo

Foi determinada a atividade de AChE nos tecidos alvo músculo e cérebro. Ao analisar o tecido de cérebro foram observadas diferenças estatísticas entre o controle e a menor dose de AgNP exposta isoladamente (FIGURA 24A). Comparando as misturas com sua exposição de AgNP correspondente de forma isolada também foram observadas diferenças evidenciando a diminuição da atividade da enzima induzida pelo BaP quando realizada a coexposição, no entanto este padrão não foi observado na maior dose testada (FIGURA 24A).

Em músculo foram observadas diferenças entre o controle e a mistura de maior doses de AgNP. As AgNP expostas de forma isolada estimularam a atividade da AChE comparado como o controle. No entanto nas coexposições dos poluentes foi observada uma diminuição da atividade da AChE (FIGURA 24B).

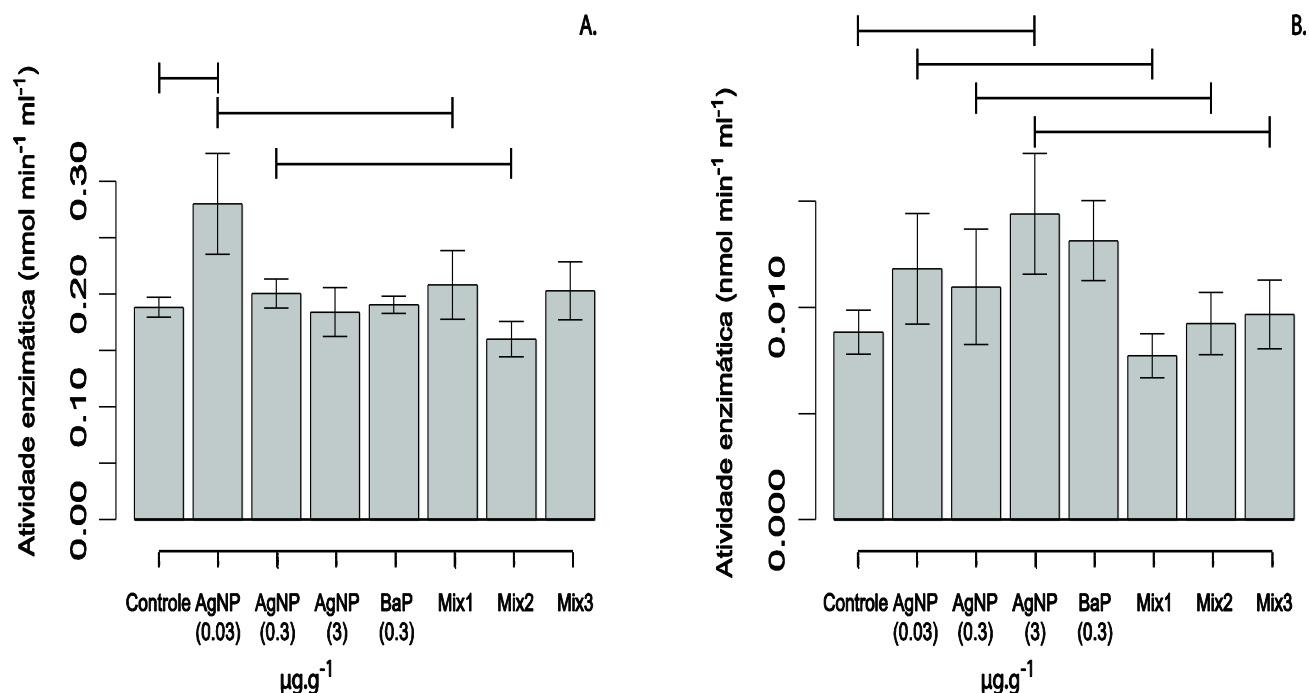


FIGURA 24. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em tecido de (A) Cérebro e (B) Músculo de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP. As linhas horizontais representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

4.3.2. Glutathiona reduzida (GSH), Glutathiona S-Transferase (GST) Peroxidação Lipídica (LPO) e Carbonilação de Proteínas (PCO) em Fígado

No fígado, por ser um tecido essencial na detoxificação, foram realizadas análises bioquímicas para determinar às concentrações de GSH e tióis totais, a atividade da GST, a peroxidação de lipídeos (LPO) e a carbonilação de proteínas (PCO). A exposição isolada da menor dose de AgNP aumentou a atividade da GST quando comparada com o controle e com o tratamento da coexposição, mostrando diferenças estatísticas (FIGURA 25A). A dose intermediária teve maior atividade de GST comparada com ao tratamento de coexposição correspondente (FIGURA 25A).

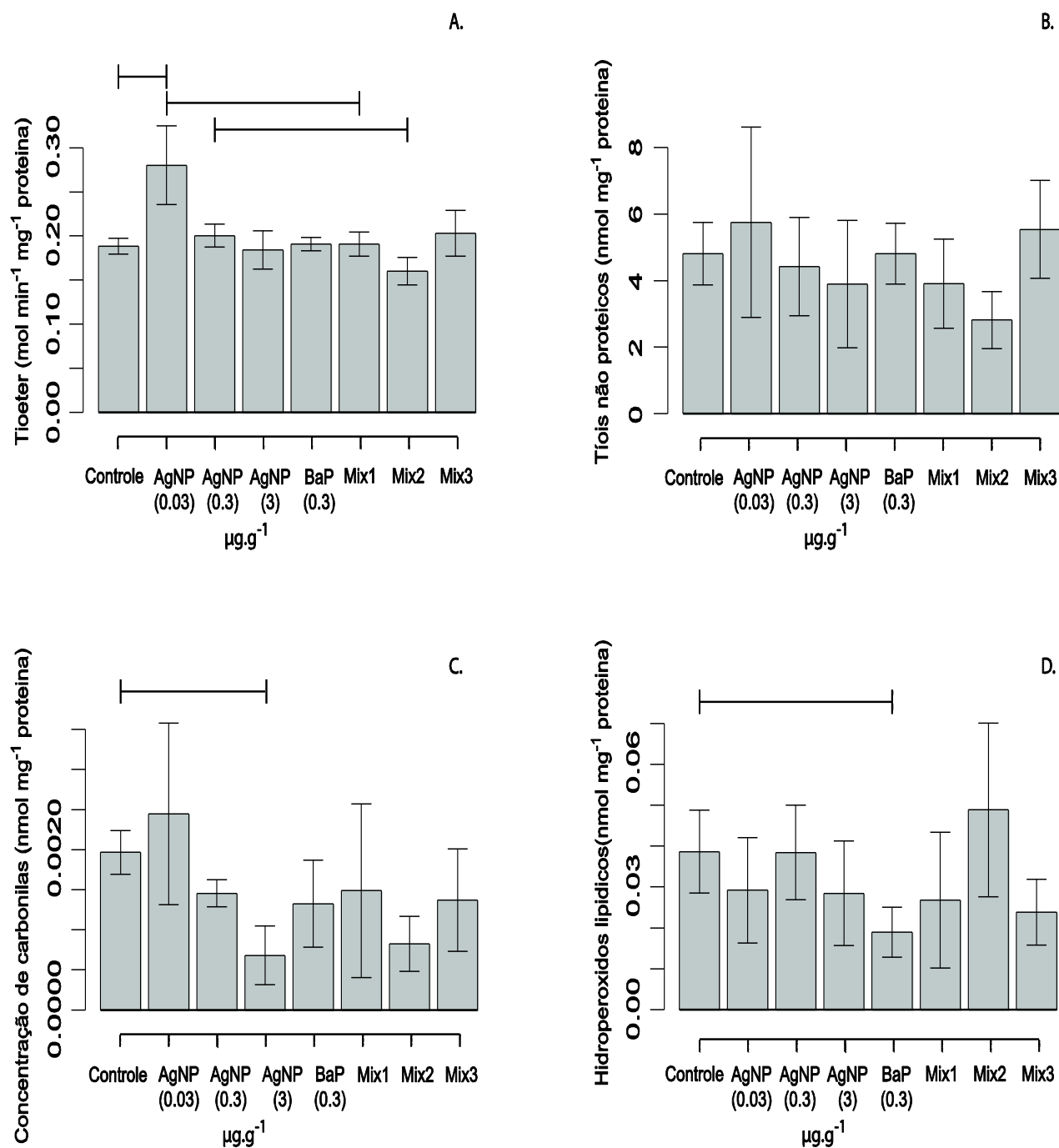


FIGURA 25. Biomarcadores Bioquímicos em Fígado de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP. A. Atividade da GST Glutathione S-Transferase, B. Concentração de Glutathione Reduzida- GSH, C. Carbonilação de Proteínas- PCO, D. Peroxidação Lipídica-LPO. As linhas horizontais representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Por outro lado, a concentração das GSH não apresenta diferenças entre os tratamentos avaliados pela ampla variação dos valores registrados, observando que para a dose menor e intermediária o efeito da coexposição diminuiu a atividade da GSH, embora, na maior dose da coexposição é evidente o aumento da concentração. Este padrão também se manteve nos tratamentos de coexposição (FIGURA 25B).

O comprometimento das estruturas moleculares foi avaliado pela LPO e PCO no fígado. Foi observada uma diminuição significativa na carbonilação de proteínas na maior dose de AgNP, sendo estatisticamente diferente do controle (FIGURA 25C).

Nos outros tratamentos, a PCO registrou valores com um alto índice de variação que não permitiu definir um efeito dos poluentes para este biomarcador. Em relação à Peroxidação Lipídica, foi observada uma diminuição na quantidade de hidroperóxidos lipídicos indicando menor dano em lipídeos quando realizada a exposição isolada de BaP em relação ao controle (FIGURA 25D).

4.3.3. Delta- aminolevulinato desidratase (δ -ALAd) e Peroxidação Lipídica (LPO) em Sangue

No sangue foi determinada a atividade da δ -ALAd e peroxidação lipídica para identificar a existência de alguma interferência que poderia estar comprometendo os indivíduos dos grupos expostos (FIGURA 26). A atividade da δ -ALAd nos tratamentos de exposição isolada de AgNP e nas misturas registrou uma diminuição na atividade da enzima indicando um efeito negativo das AgNP na hematopoiese (FIGURA 26A), no entanto não foi estatisticamente diferente, pela variação dos valores.

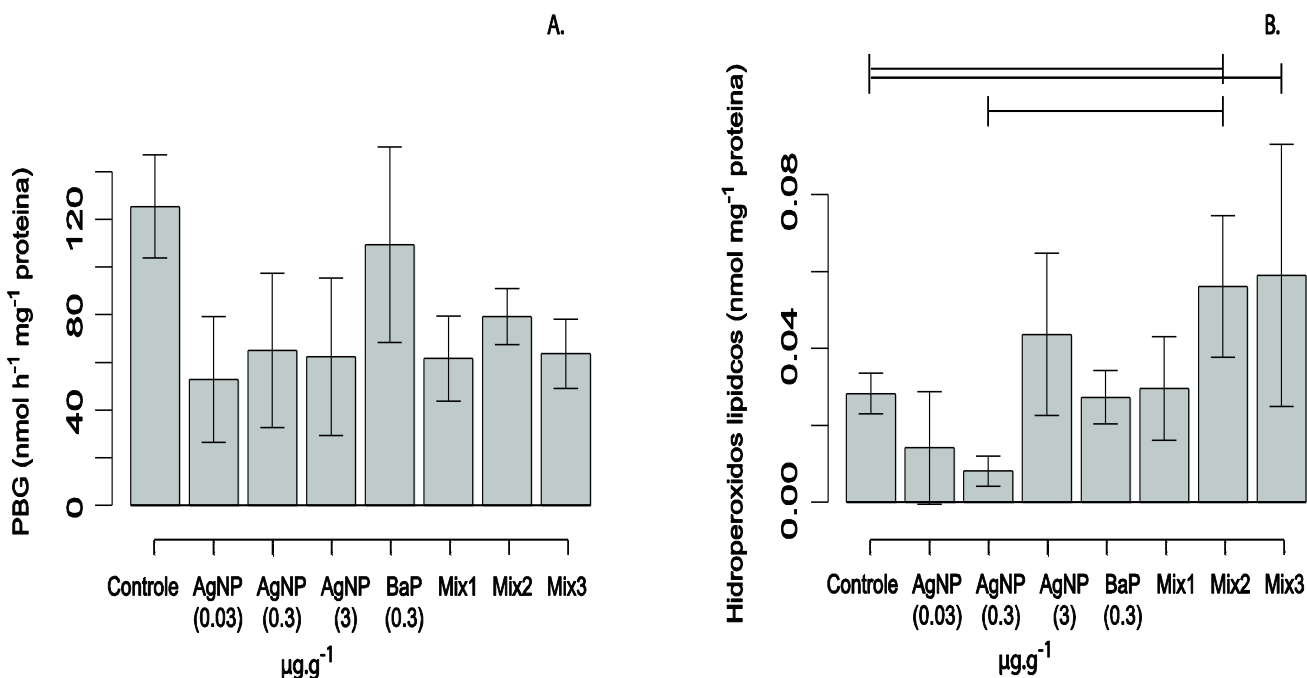


FIGURA 26. Biomarcadores Bioquímicos em sangue de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP. A. Atividade da δ -ALAd ; B. Peroxidação lipídica. As linhas horizontais representam as diferença estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

A quantidade de hidroperóxidos lipídicos nas células sanguíneas indicou que a peroxidação lipídica diminuiu na dose menor e intermediária de AgNP em relação ao controle. Foram detectadas diferenças estatísticas entre o controle e as misturas intermediária e maior (FIGURA 26B). Na maior dose de exposição isolada de AgNP e nas três misturas potencializaram a produção de danos lipídicos, sendo mais evidente na dose intermediária (FIGURA 26B).

4.3.4. Metalotioneínas (MTs) em Rim Posterior

Foi avaliada no rim posterior a quantidade de metalotioneínas produzidas quando os animais foram expostos às AgNP isoladas e coexposição com BaP (FIGURA 27). Não houve diferença significativa entre as médias das MTs nos tratamentos de

exposição isolada e coexposição. Isto é devido possivelmente à variação dos valores de MTs que foi alta, com a sobreposição dos erros padrões nas amostras (FIGURA 27).

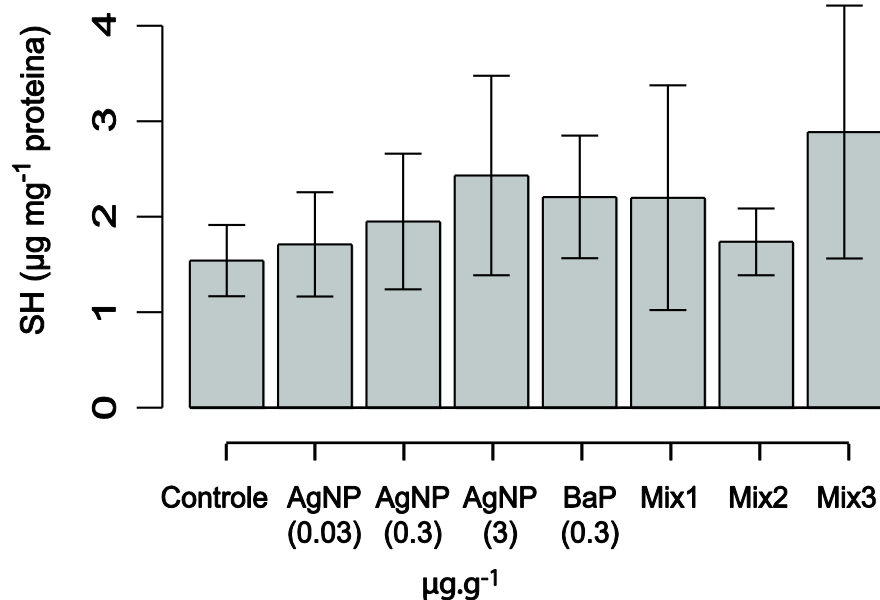


FIGURA 27. Determinação de Metalotioneínas em rim posterior de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP.

Embora que as análises estatísticas não demonstrem diferenças, observando a tendência dos dados, as exposições isoladas de AgNP mostram um aumento proporcional à dose. Contudo, aumentou a produção de MTs nas misturas de menor e maior dose (FIGURA 27).

4.4. Biomarcadores Genéticos

4.1.1. Ensaio Cometa

Foram observados diferentes graus de dano nuclear no ensaio cometa, no entanto, o controle apresenta uma frequência alta de dano nuclear e a variação dos valores em todos os tratamentos analisados foi grande (TABELA 7). Os danos nucleares pequenos a médios (2 e 3) tiveram as maiores frequências para todos os tratamentos (TABELA 7). Os danos de tipo 4, que representam núcleos destruídos ou em apoptose tiveram uma mediana alta no controle, se consideramos este valor como normal para a espécie avaliada, pode se afirmar que a exposição sub- crônica por via oral de doses de AgNP e sua coexposição com BaP não é genotóxica (TABELA 7).

TABELA 7. Média do número de células analisadas para avaliar os danos nucleares por ensaio cometa observados em sangue de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP.

Tratamentos ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	N	Dano Nuclear				
		0	1	2	3	4
Controle	9	7	19	34	21	7
AgNP (0.03)	11	27	48	19	4	4
AgNP (0.3)	11	17	31	13	15	3
AgNP (3)	11	16	42	18	12	7
BaP (0.3)	11	12	24	19	24	7
DMSO	10	13	52	12	5	4
Mix 1	10	17,5	40,5	25,5	10	2
Mix 2	11	7	22	25	23	4
Mix 3	11	22	53	10	4	1

N= número de lâminas observadas correspondendo cada uma a um indivíduo exposto.

Dano Nuclear: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano máximo) e 4 (núcleo destruído ou em apoptose).

Ao realizar as análises do ensaio cometa não foram observadas diferenças entre os escores dos tratamentos de exposição isolada de AgNP e coexposição com BaP (FIGURA 28).

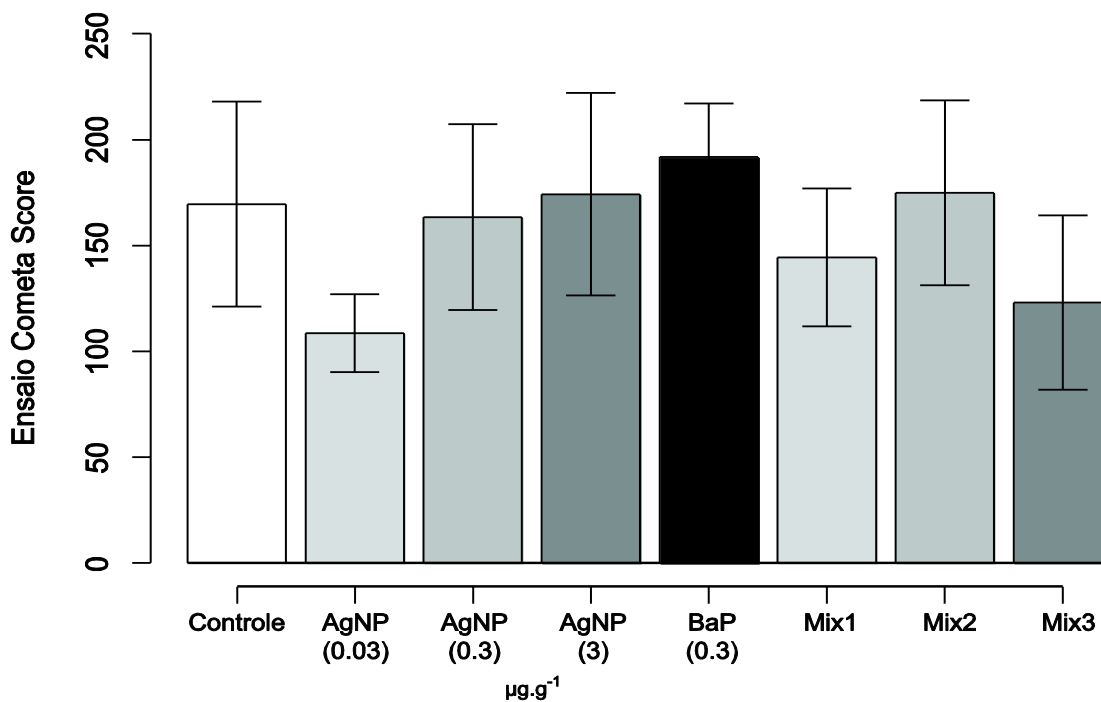


FIGURA 28. Análise de Ensaio Cometa em sangue de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP.

4.1.2. Análise de Micronúcleos

Ao realizar a análise de micronúcleos nos diferentes tratamentos foram encontradas várias anormalidades nucleares (FIGURA 29) que podem corresponder a processos decorrentes da exposição aos tóxicos. Com descrito por Carrasco e colaboradores (1990), as alterações nucleares foram classificadas como:

- a) *Blebbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro) (FIGURA 29D).
- b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os blebbed (FIGURA 29E).
- c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior (FIGURA 29B).
- d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear (FIGURA 29C).

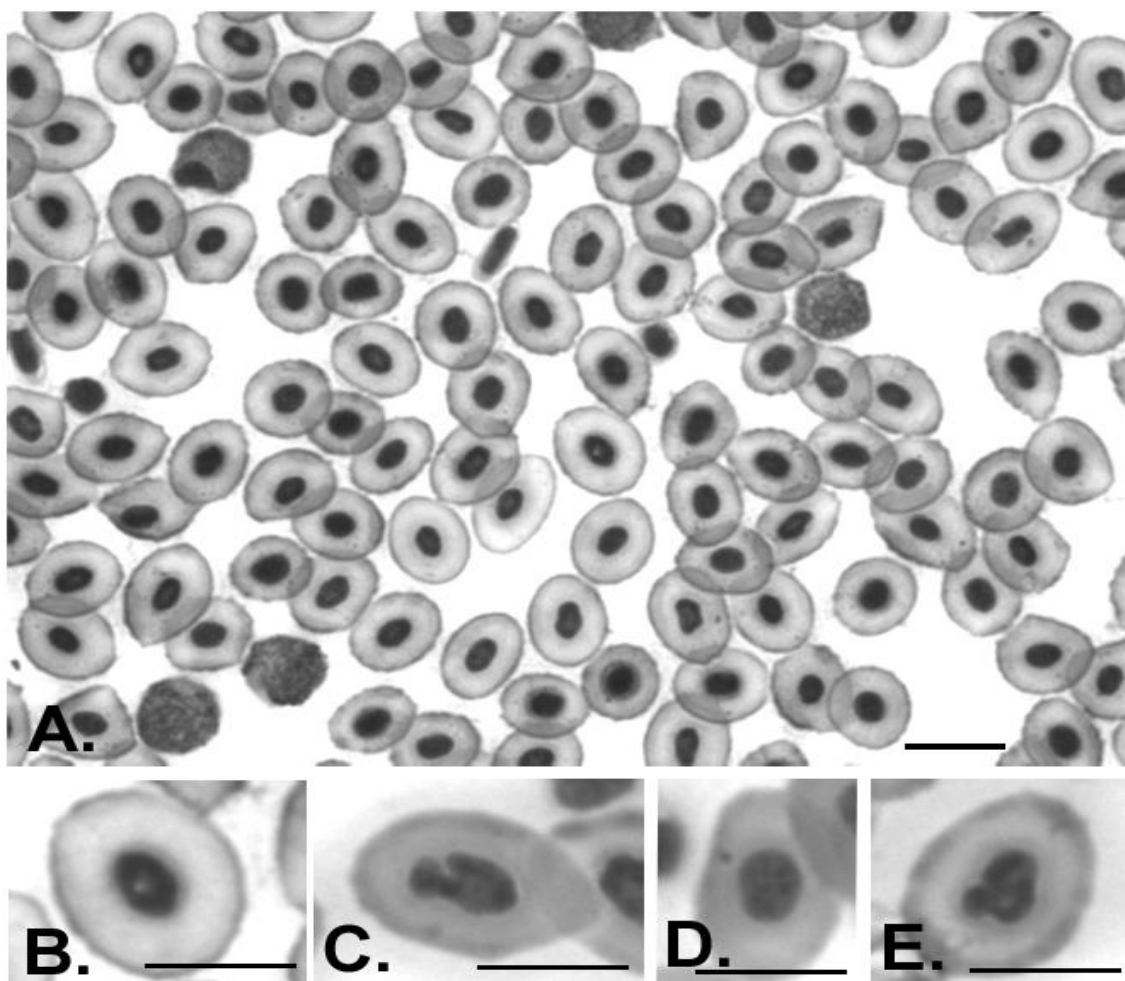


FIGURA 29. Microfotografias de micronúcleos observados em sangue de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP. A). Células normais, B). Vacuolated, C). Notched. D.) Micronúcleo, E). Lobed, E. Escala 10 μm

Ao realizar a análise estatística dos micronúcleos não foram observadas diferenças entre os escores dos tratamentos de exposição isolada de AgNP e coexposição com BaP (FIGURA 30). No entanto, a variação dos dados foi alta, observou-se um aumento no número de alterações nas exposições isoladas de BaP e a maior dose de AgNP se comparada com o controle (FIGURA 30).

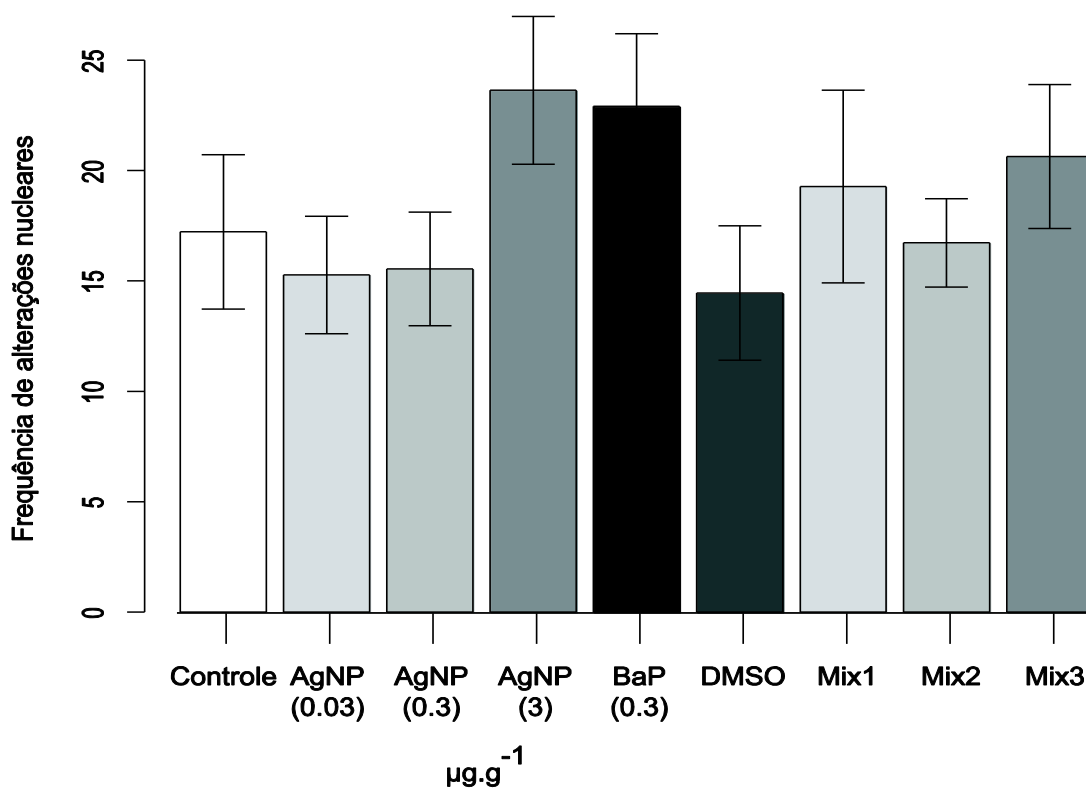


FIGURA 30. Análise de Micronúcleos em sangue de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e coexposição com BaP.

4.5. Biomarcadores Histopatológicos

Para realizar as análises histopatológicas foram consideradas unicamente as exposições isoladas a ambos os poluentes, pois o material referente às amostras das misturas teve problemas na inclusão e emblocagem.

4.5.1. Alterações Morfológicas

Foram avaliadas alterações morfológicas no fígado, rim anterior e posterior. Cada tecido apresenta morfologia diferente, para a análise foram consideradas para cada um as alterações como se descreve na TABELA 8 e podem ser observadas nas FIGURAS 31-33, para cada tecido respectivamente.

TABELA 8. Ocorrência das alterações morfológicas em *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP (n=11).

Alteração Morfológica	Frequência de ocorrência				
	Controle	AgNP (0.03 $\mu\text{g.g}^{-1}$)	AgNP (0.3 $\mu\text{g.g}^{-1}$)	AgNP (3 $\mu\text{g.g}^{-1}$)	BaP (0.3 $\mu\text{g.g}^{-1}$)
Fígado					
Congestão Vascular	0%	64%	55%	55%	27%
Granulomatose Perivascular	0%	18%	9%	9%	0%
Granulomatose Peribiliar	0%	9%	0%	0%	0%
Foco Basófilo	0%	9%	9%	36%	9%
Infiltração Leucocitária	0%	73%	73%	91%	55%
Esteatose	0%	0%	0%	9%	0%
Hemorragia	0%	9%	0%	0%	0%
Necrose	0%	0%	0%	0%	0%
Centros de Melano- macrófagos	0%	14%	18%	11%	15%
Rim Anterior					
Concentração de Eritrócitos	0%	9%	18%	9%	9%
Centro de destruição de Eritrócitos	0%	64%	45%	64%	82%
Necrose	0%	55%	0%	9%	0%
Hemorragia	0%	0%	19%	0%	0%
Centros de Melano- macrófagos	9%	11%	24%	30%	35%
Rim Posterior					
Alteração Glomerular	0%	72%	55%	45%	72%
Alteração Tubular	0%	64%	18%	9%	27%
Granulomatose Perivascular	0%	18%	18%	0%	9%
Granulomatose Peritubular	0%	9%	18%	0%	9%
Necrose	0%	9%	0%	0%	0%
Novos Nefrons	9%	0%	21%	18%	27%

No fígado foi observado com maior frequência as alterações de congestão vascular e infiltração leucocitária, evidenciando um processo inflamatório agudo no tecido induzido principalmente pelas doses de AgNP em exposição isolada (TABELA 8, FIGURA 31B,J). Somado a isto, a granulomatose perivascular e peribiliar observadas, formam lesões vasculares hepáticas que reduzem o calibre dos. Alterações como a esteatose ou vacuolização dos hepatócitos foram menos frequentes (TABELA 8, FIGURA 31G) e só foi observada para a maior dose de AgNP.

No rim anterior foram observadas alterações relacionadas com o sistema hematopoiético e circulatório. A alta ocorrência de centros de concentração e destruição de eritrócitos evidencia um processo de inflamação agudo que pode danificar o tecido, como observado na menor dose de AgNP (TABELA 8, FIGURA 32B-E). Contudo, este padrão inflamatório acontece em todos os tratamentos avaliados.

No rim posterior as alterações estão relacionadas com os glomérulos e os túbulos renais, principalmente (TABELA 8, FIGURA 33). Os glomérulos foram observados com morfologias degenerativas como: condensação, dilatação, congestão por eritrócitos e presença de células basófilas (FIGURA 33A). Os túbulos foram observados com alterações nas células peritubulares que alteram a estrutura dos mesmos (FIGURA 33B) assim como granulomatoses peritubulares (FIGURA 33C). Neste tecido foram observadas necroses com menor frequência, no entanto, o tamanho das lesões foram maiores se comparadas com os outros tecidos avaliados (TABELA 8, FIGURA 33G).

Nos três tecidos avaliados foram observadas alterações que indicam um processo inflamatório agudo. Foram observados centros de melano-macrófagos (CMM) nos mesmos, no entanto, para o rim posterior estes foram achados com frequência baixa e associados à granulomatoses na menor dose de AgNP (FIGURA 33E). As análises dos CMM para fígado e rim anterior serão detalhadas no item 4.5.2. deste capítulo.

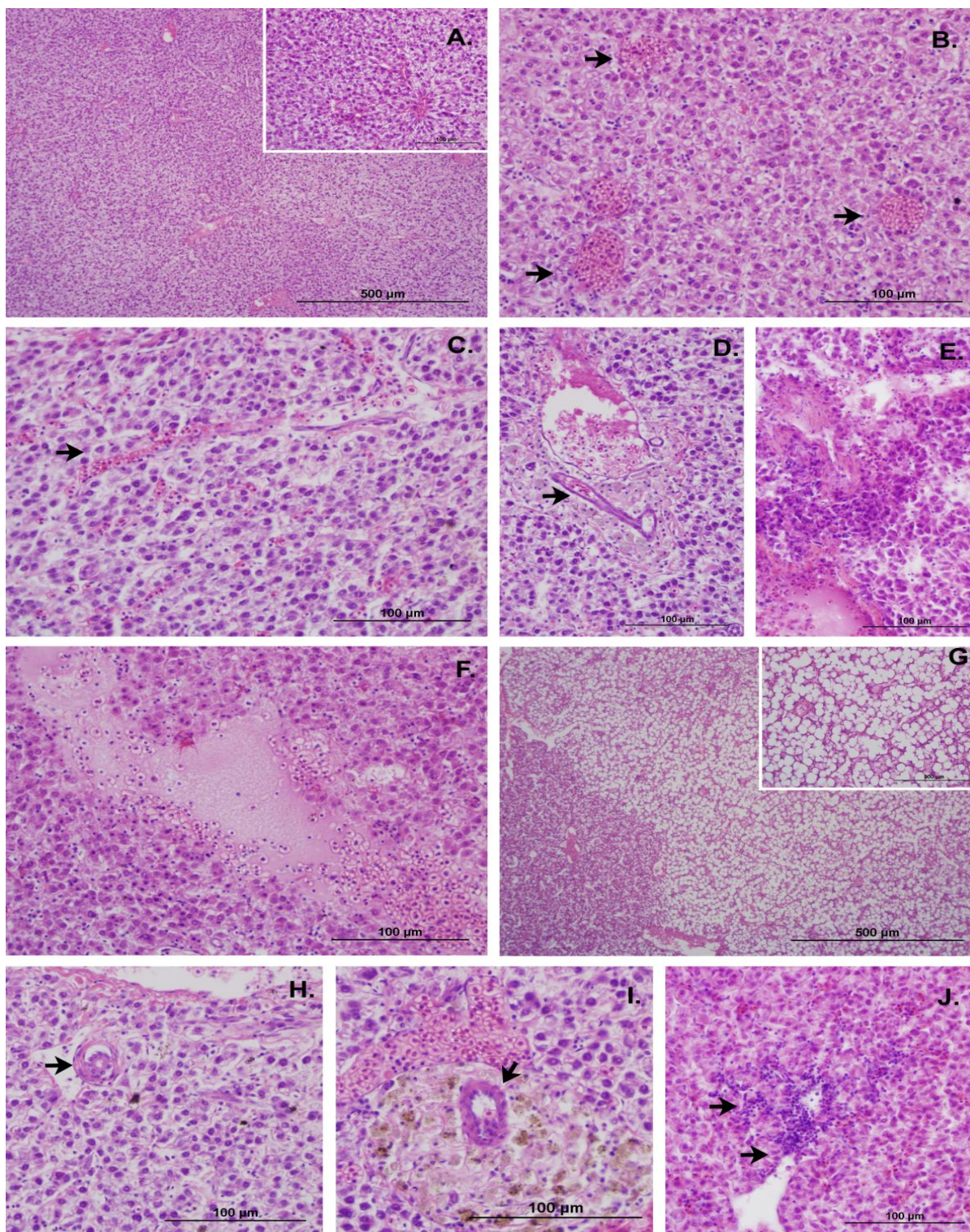


FIGURA 31. Histopatologia de Fígado de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP. A). Tecido hepático normal. B). Congestão Vascular (seta), C). Dilatação de sinusóides (seta), D). Granulomatose Perivascular (seta preta), E) foco basófilo com necrose, F). Área de necrose com hemorragia (seta). G). Esteatose (seta: célula adiposa), H). Ducto biliar normal (seta), I) Granulomatose peribiliar com presença de melano-macrófagos (seta: ducto biliar), J). Infiltração leucocitária (seta). Coloração: Hematoxilina/eosina.

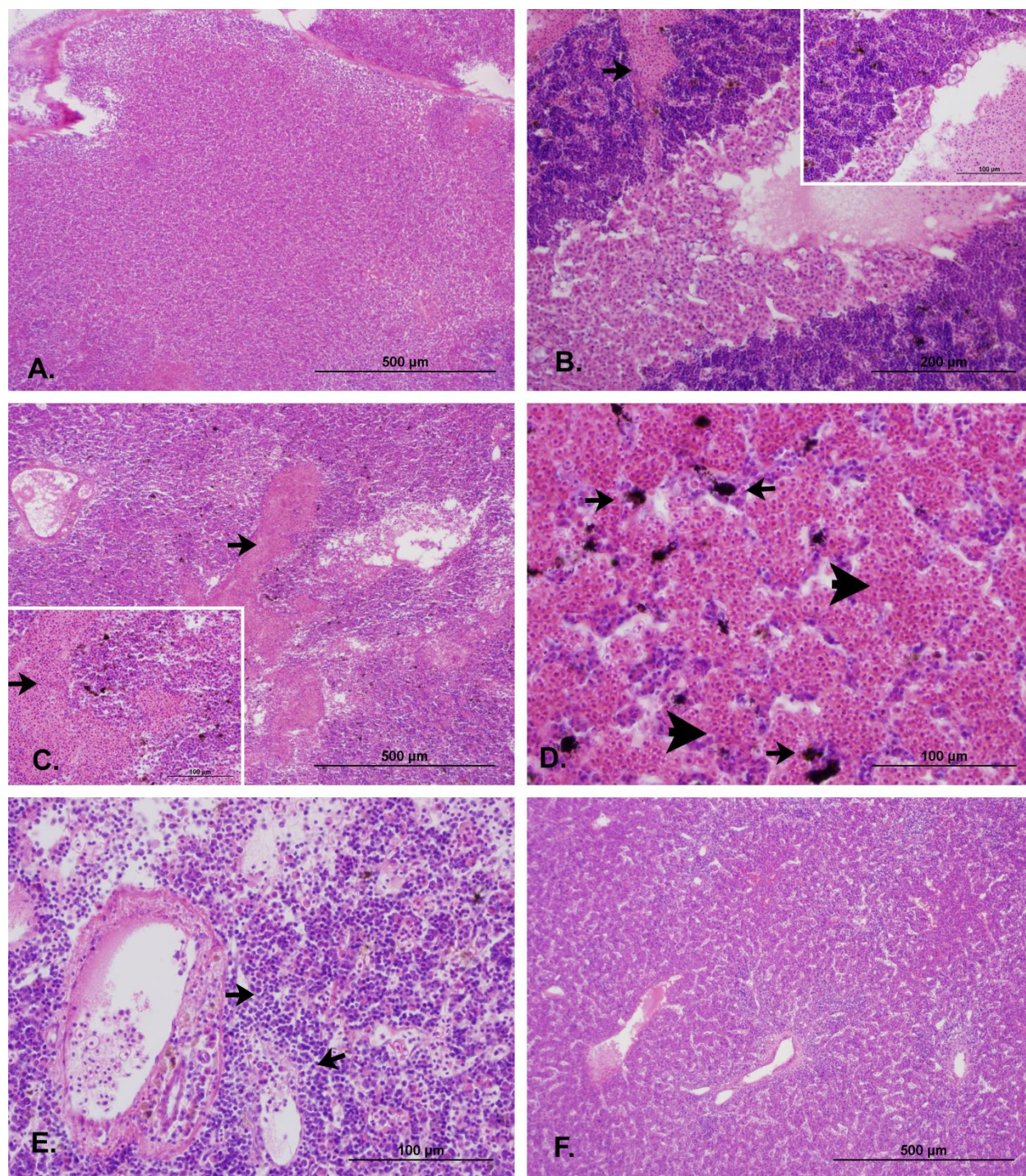


FIGURA 32. Histopatologia de Rim Anterior de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP. A). Rim Anterior com aspecto normal. B). Área de concentração de Eritrócitos (seta), C).Centros de destruição de Eritrócitos (seta), D). Concentração de Eritrocitos (cabeça de seta) e Centros de Melano-macrófagos (seta), E). Infiltração leucocitaria (setas), F). Áreas acidófilas. Coloração: Hematoxilina/eosina.

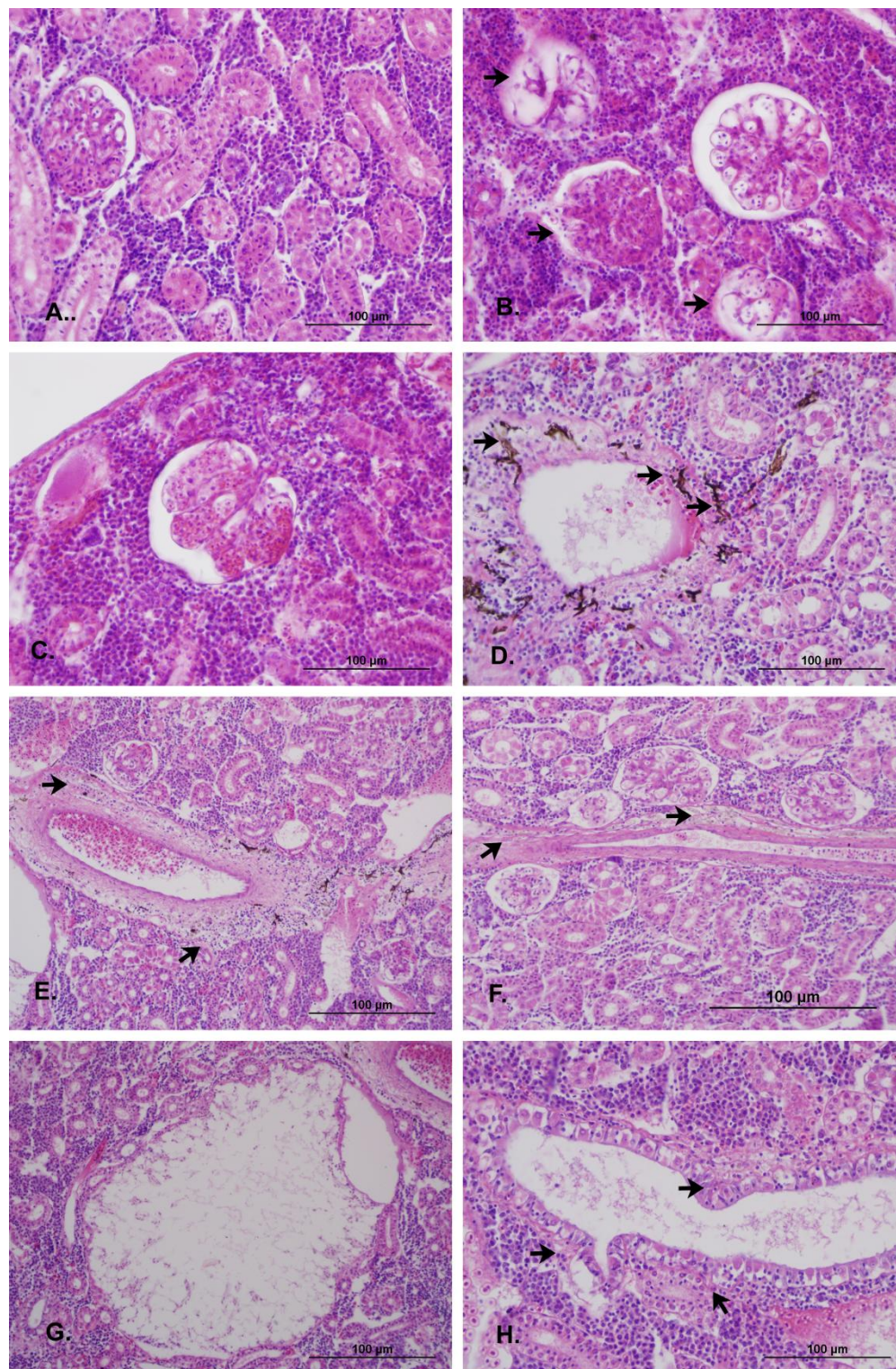


FIGURA 33. Histopatologia de Rim Posterior de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP. A). Tecido Normal, B). Alteração Glomerular (seta), C). Glomerulo dilatado, D) Melanomacrófagos (setas), E). Granulomatose perivascular (seta), F). Granulomatose Perivascular (seta) e glomerúlos alterados, G). Área de necrose, H). Alteração do epitélio tubular (seta). Coloração: Hematoxilina/eosina.

O Índice de Bernet no fígado mostrou um aumento na severidade das lesões nas doses de AgNP em relação ao controle e a exposição de BaP (FIGURA 34A), sendo que a dose maior de AgNP apresentou o maior comprometimento do sistema hepático. Ao realizar as análises do Índice de Bernet para o tecido hepático foram observadas diferenças estatísticas entre o BaP e a maior dose de AgNP (FIGURA 34A).

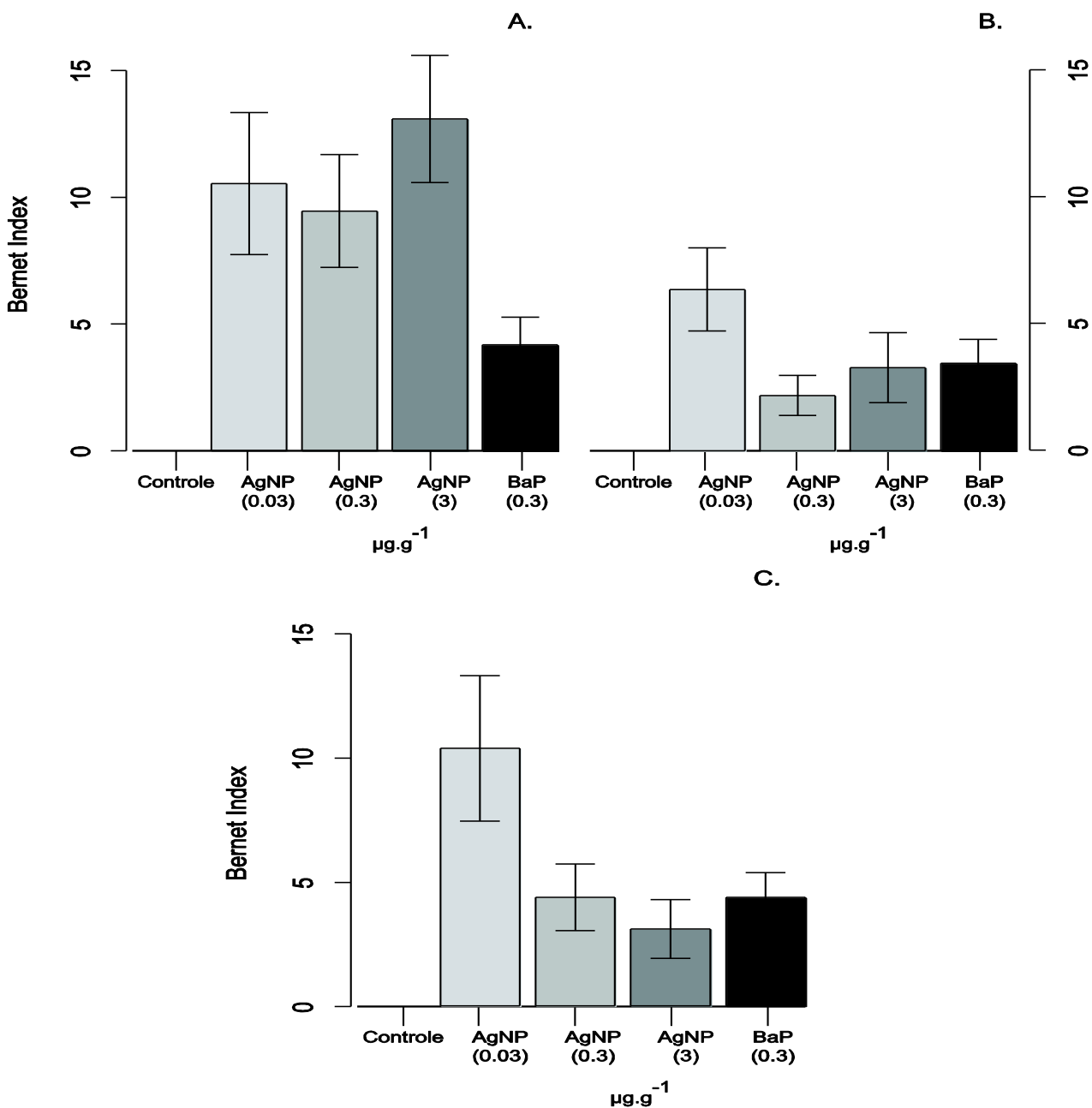


FIGURA 34. Índice de Bernet para avaliar as alterações morfológicas de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP. A. Fígado, B. Rim Anterior, C. Rim Posterior. As letras representam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

No rim anterior o coeficiente de variação dos valores calculados foi grande, mas não foram observadas diferenças estatísticas ao avaliar o índice de Bernet (FIGURA 34B). Contudo, foi observado um maior comprometimento do tecido na dose menor de AgNP e um resultado similar entre os outros tratamentos avaliados (FIGURA 34B). No rim posterior se observa um padrão similar ao do rim anterior para o índice de Bernet. No entanto, para o rim posterior foram observadas diferenças entre a menor e a maior dose de AgNP, sendo que na menor dose o comprometimento do órgão foi maior (FIGURA 34C).

4.5.2. Contagem de Centros de Melano-macrófagos (CMM)

Ao analisar o fígado e o rim anterior foram observados Centro de Melano-macrófagos. Observa-se um aumento na ocorrência de CMM na dose intermediária de AgNP. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (FIGURA 35A).

No rim anterior foram observados maiores ocorrências de CMM na exposição isolada de BaP e observou-se um padrão de aumento dos CMM dependente das doses de AgNP (FIGURA 35B). Os tratamentos de dose intermediária e maior de AgNP assim como o BaP tiveram diferenças em relação ao controle, no entanto a menor dose de AgNP apresentou menor frequência de ocorrência de CMM não foi estatisticamente diferente do controle (FIGURA 35B)

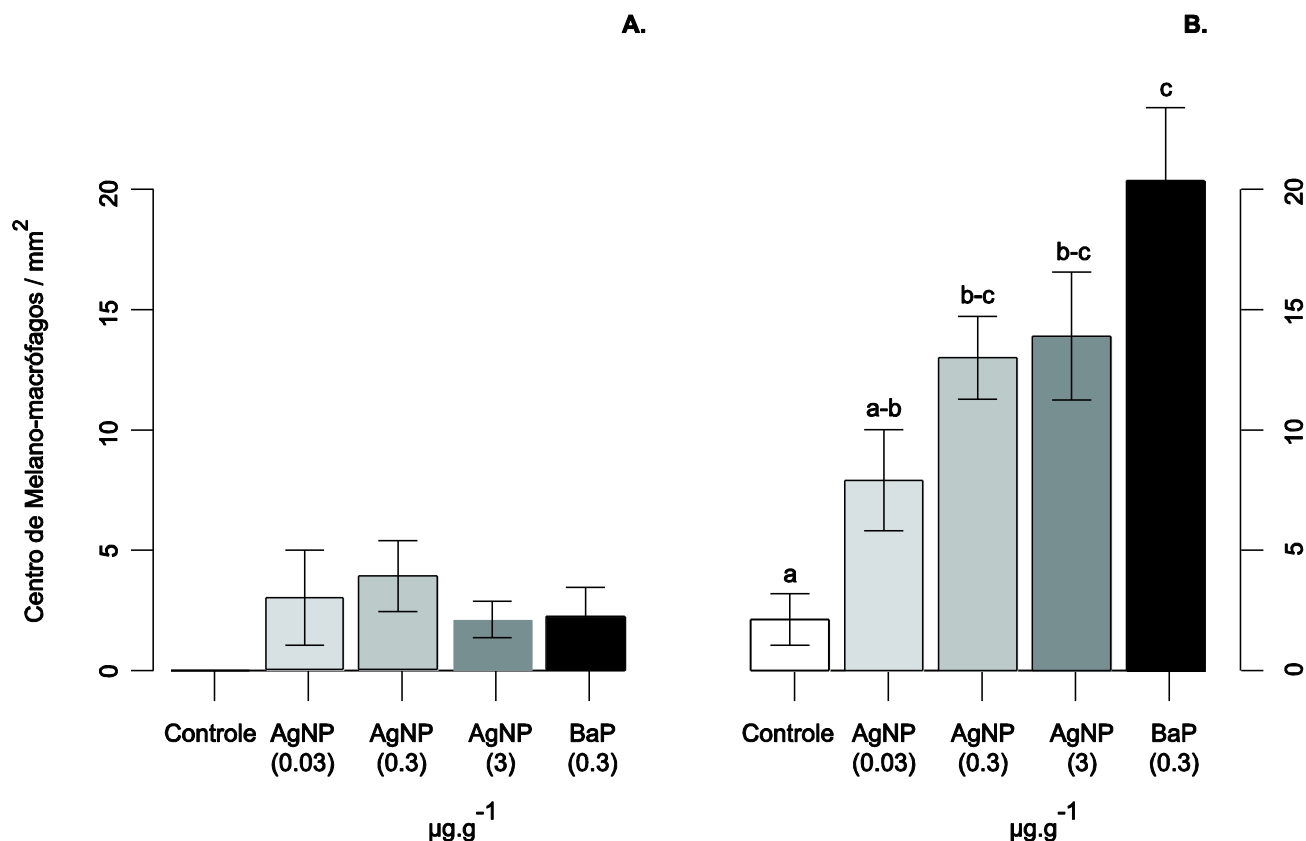


FIGURA 35. Análise de Centro de Melano-macrófagos de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP. A. Fígado, B. Rim Anterior. As letras representam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

4.5.3. Contagem de novos néfrons

A ocorrência de novos néfrons teve um coeficiente de variação alto entre os tratamentos, no entanto as doses de AgNP intermediária e maior, assim como o tratamento com BaP apresentaram maior frequência de aparição de novos néfrons (FIGURA 36). Na menor dose de AgNP não foram observados a formação de novos nefrons. Contudo, comparando a produção de novos néfrons entre os tratamentos, não foram observadas diferenças estatísticas (FIGURA 36).

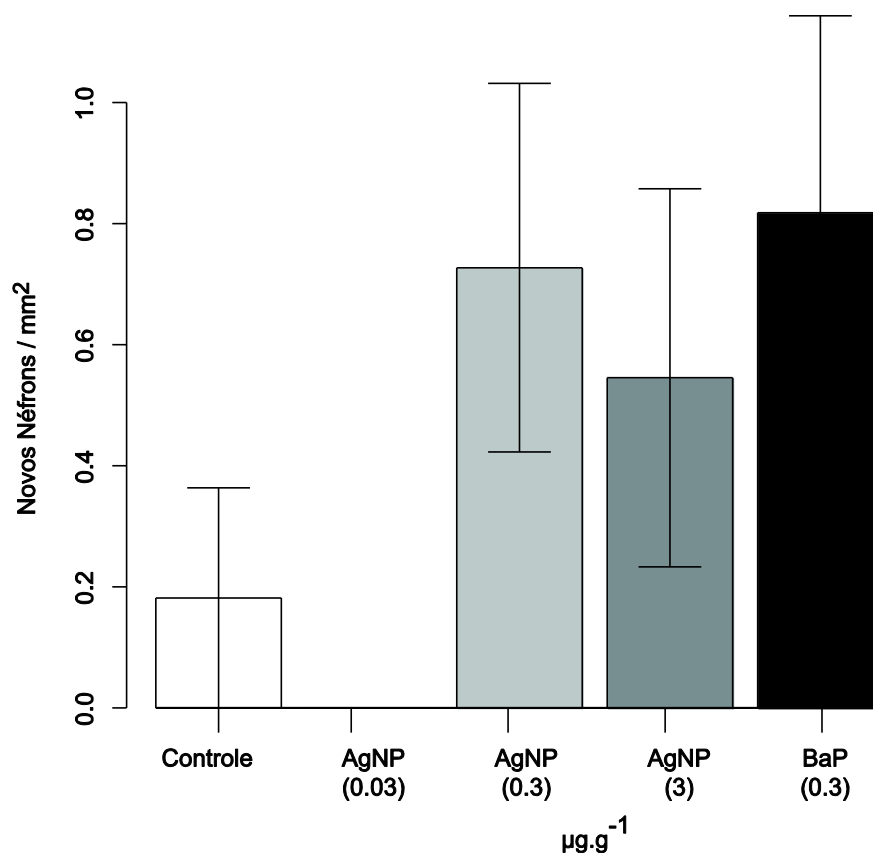


FIGURA 36. Análise de novos néfrons no rim posterior de *Rhamdia quelen* após exposição isolada aos agregados de AgNP e BaP.

5. DISCUSSÃO

A caracterização das AgNP utilizadas para realizar a exposição por via oral neste estudo, indicou uma proporção maior de partículas acima de 100nm, o que leva a considerá-las agregados de nanopartículas de prata ao invés de AgNP. Além disso, o potencial zeta medido demonstrou que estes agregados podem ter um comportamento instável na suspensão. Estes aspectos são interessantes, pois dão mais realismo aos resultados de toxicidade discutidos neste estudo, uma vez que no ambiente aquático vários fatores podem afetar a cinética de agregação das nanopartículas como: a matéria orgânica (HUYNH e CHEN, 2011), a radiação solar (CHENG *et al.*, 2011) e o oxigênio dissolvido na água (ZHANG *et al.*, 2011). Todos estes fatores influenciam

diretamente a dissolução, podendo favorecer a agregação das AgNP, podendo dificultar sua mobilidade e, em consequência, sua disponibilidade e citotoxicidade.

Mesmo em avaliações nos estudos de nanotoxicologia onde são controladas as variáveis experimentais nos bioensaios, se faz necessário determinar a influência da composição do meio de exposição e a real concentração das AgNP, considerando a estabilidade destas nas suspensões (TEJAMAYA *et al.*, 2012). Uma adequada caracterização da natureza do nanotóxico estudado torna-se importante para entender as mudanças nestas partículas e delinear os reais efeitos da dose ou concentração de exposição, devido ao impacto direto que esta dinâmica pode ter nos resultados dos testes ecotoxicológicos.

Neste trabalho foram utilizados diferentes biomarcadores representando diferentes níveis de organização biológica com o intuito de permitir uma visão mais integrada das respostas biológicas frente à exposição isolada dos agregados de AgNP e à sua coexposição com BaP. Com o intuito de avaliar aspectos neurotóxicos dos xenobióticos testados foi utilizada a atividade da enzima AChE em cérebro e músculo, a qual como já reportado em outros trabalhos (OLIVEIRA RIBEIRO e SILVA DE ASSIS, 2005) mostrou uma atividade diferenciada por tecido.

No cérebro foi observada uma maior atividade da AChE na menor dose de AgNP isolada, o que pode estar relacionada com a disponibilidade nesta concentração. O padrão observado na atividade da AChE no cérebro também poderia ser explicado pelo período de exposição. Após 15 dias pode estar acontecendo uma modulação da atividade da AChE, conservando o nível basal no cérebro. O tempo de exposição também pode estar influenciando o efeito neurotóxico do tratamento com BaP isolado, o qual em exposição aguda apresenta alteração da transmissão colinérgica por inibição da AChE (PLANIKUMAR *et al.*, 2012).

Por outro lado, no músculo foi observado um aumento da atividade dose dependente corroborado pela quantificação da prata neste tecido. Este padrão já foi descrito em avaliações de neurotransmissores em soro humano utilizando nanopartículas de prata coloidal, que levaram a uma ativação da atividade das enzimas

AChE e Mono-aminoxidase (ABBAS, 2011). Com as misturas de AgNP e BaP foi observada uma inibição na atividade da enzima no músculo, provavelmente devido à presença do BaP. Esta resposta está claramente relacionada com um efeito antagônico do BaP em relação às AgNP quando co-expostas, uma vez que apresentam mecanismos de neurotoxicidade diferentes. Não pode ser descartada também a possibilidade de encapsulamento das nanopartículas de prata por proteínas ou biomoléculas (SENNUGA, 2011) diminuindo a neurotoxicidade. A melhor resposta da atividade da AChE foi observada no músculo, se comparado com o cérebro, classificando este tecido como um alvo preferencial na avaliação de neurotoxicidade de AgNP em peixes em exposição sub-crônica.

Os biomarcadores bioquímicos avaliados no fígado (GST, GSH, PCO e LPO) mostram que em exposição sub-crônica aos agregados de nanopartículas de prata os indivíduos adultos de *R. quelen* não tiveram estresse oxidativo, no entanto, foi ativada a resposta oxidativa nos tecidos avaliados. Por tanto, os mecanismos antioxidantes acionados foram capazes de mitigar o estresse oxidativo no tecido hepático dos jundias. Esta hipótese torna-se mais plausível quando é observado que sob efeito da menor dose de AgNP administrada de forma isolada há um aumento da GSH em relação ao grupo controle, o que pode ser interpretado como uma maior disponibilidade das AgNP devido ao pequeno tamanho e uma resposta celular no mecanismo de defesa antioxidante. Uma vez na célula, haveria um aumento na oxidação das AgNPs por diluição oxidativa direta através do oxigênio, presente intracelularmente, ativando a transformação dos agregados em prata iônica (Ag^+) (LIU *et al.*, 2011) a qual seria responsável pelos danos celulares.

Por outro lado, as AgNP que conseguiram entrar na célula podem reagir com as espécies reativas de oxigênio provenientes das reações de biotransformação ou bioativação ativadas pela presença do BaP e reagir com grupos tióis oxidando indiretamente a AgNP e liberando Ag^+ e água (LEVARD *et al.*, 2012). Este tipo de reação gera um ambiente com aumento da concentração de Ag e níveis de EROS favorecendo o estresse oxidativo, o que pode explicar uma maior biossíntese de GSH

com o intuito de manter o equilíbrio redox intracelular, sendo assim que as AgNP foram oxidantes dentro da célula.

Na concentração intermediária de coexposição foi observada uma depleção da GSH, possivelmente pelo efeito do BaP ao se ligar covalentemente com esta macromolécula como descrito por Van Veld e colaboradores (1997), ou pela geração de estresse oxidativo devido à ativação do Sistema P450 e com isso diminuindo os níveis de GSH, ou ainda pelo consumo da molécula na fase II do sistema de desintoxicação. Estudos analisando a atividade da EROD após exposição à BaP indicam um aumento na peroxidação lipídica possivelmente devido à indução do estresse oxidativo causado pelo poluente no tecido hepático (AU *et al.*, 1999; DIGIULIO *et al.*, 1993). Outra hipótese para a resposta observada, esta relacionada com o efeito das AgNP de induzir glutationização pela reação do grupo sulfidril da GSH com o xenobiotico para alterar o ambiente REDOX como proteção do meio intracelular, no entanto este processo é reversível (DEKANT, 2009).

Mesmo sob exposição sub-crônica, os dados mostram que o tecido hepático não apresentou danos em macromoléculas como proteínas (carbonilação de proteínas - PCO) nem em fosfolipídeos de membranas (lipoperoxidação- LPO), demonstrando que a resposta oxidativa foi ativada, sustentando o fato de que o mecanismo antioxidante foi eficiente a ponto de neutralizar tais efeitos. Embora seja descrita a desnaturação de proteínas pela exposição à AgNPs e a indução do aumento da LPO em fígado da espécie de truta *Oncorhynchus mykiss* (GAGNÉ *et al.*, 2012) estes danos não foram observados no presente estudo com *R. quelen* nas condições testadas. Os estudos onde foram observados efeitos nas macromoléculas tiveram durações de 24 e 48h (FOLDBJERG *et al.*, 2012) e de 96h (GAGNÉ *et al.*, 2012), demonstrando que o efeito das AgNP foi mais agudo nos tecidos afetados (pulmão e fígado, respectivamente).

Histologicamente foi evidente o padrão de resposta inflamatória generalizada no tecido do fígado em todos os tratamentos expostos às AgNP. Alterações observadas como a congestão vascular, infiltração leucocitária, e as granulomatoses perivascular e peribiliar encontram-se associadas à defesa do tecido como resposta imune primária (MATUSHIMA *et al.*, 2006). Os centros de melano-mácrofagos observados em tecido

hepático nos tratamentos analisados, tanto de AgNP como de BaP, demonstram que os animais expostos estão respondendo aos xenobióticos mediante processos de defesa como a degradação de tecidos danificados e também processos inflamatórios como resultado da exposição a AgNP (GAGNÉ *et al.*, 2012). Estes dados inserem na discussão outros aspectos que merecem destaque. Possivelmente as vias de toxicidade para as AgNPs não estejam relacionadas com a indução do estresse oxidativo, mas sim com efeitos adversos como observado para a maioria dos metais tóxicos levando à morte celular. Isto explicaria o padrão de resposta inflamatória encontrado por diferentes tipos de alterações ou lesões no tecido hepático.

Ao observar as concentrações de HPA de cinco anéis na bile foi evidente o aumento destas substâncias nos tratamentos de coexposição quando comparados com os de exposição isolada, revelando um aumento no metabolismo do BaP. Este padrão sugere que a coexposição de AgNP e BaP segue o mecanismo de *Cavalo de troia*, sugerido na literatura para este nanometal com outros xenobióticos (LUOMA, 2008; LIMBACH *et al.*, 2007; LUBICK, 2008; PARK *et al.*, 2010). Este mecanismo poderia explicar a entrada de BaP associado por aglomeração.

Embora as variações da atividade da enzima δ -ALAd no tecido sanguíneo de adultos de *Rhamdia quelen* não tenham sido significativas pela grande variação interindividual, foi evidente uma tendência à inibição da atividade enzimática pelas AgNP em agregados, tanto em exposição isolada quanto em coexposição com BaP. Esta resposta pode estar relacionada com a entrada rápida dos poluentes na corrente sanguínea, no entanto, nenhuma resposta padrão é observada apesar de Tomokuni (1979) ter reportado a inibição da atividade da δ -ALAd pela exposição à prata iônica (Ag^+) em eritrócitos humanos em concentrações de 0.1 a 1.0 mmol. L⁻¹. A explicação para esta alta variabilidade poderia ser que para os padrões experimentais deste estudo, possivelmente neste período os organismos se encontrem em uma fase de compensação na síntese da enzima.

Os efeitos inibitórios observados neste estudo para a atividade da δ -ALAd podem potencialmente afetar o desempenho dos organismos expostos no aumento dos

precursores de grupamento HEME na célula, originando uma baixa concentração de hemoglobina funcional (ALVES COSTA, 2006) afetando o metabolismo celular pela diminuição na síntese de hemeoproteínas em geral. Esta resposta foi descrita em outros peixes como *Hoplias malabaricus* (ALVES COSTA *et al.*, 2007), *Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinus fontinalis* e *Cyprinus carpio* (SCHMITT *et al.*, 1993, 2002) quando expostos a outros metais pesados como o mercúrio (Hg), chumbo (Pb), Cádmio (Cd) e Zinco (Zn). Esta inibição é explicada pela afinidade de ligação de nanopartículas de prata com os grupamentos sulfidríla, (LIU *et al.*, 2011) no sítio ativo da δ -ALAd. Este efeito pode induzir danos oxidativos principalmente em tecidos hemocitopoiéticos como os observados na análise histopatológica do rim anterior pelo acúmulo do substrato da enzima que favorece um estado oxidante celular.

O efeito negativo das AgNP na função hematopoiética do rim anterior foi evidente morfológicamente ao se observar um aumento significativo na ocorrência de centros de destruição de eritrócitos e de centros de melano-macrófagos em todos os tratamentos, também associados a lesões de inflamação crônica (AGIUS e ROBERTS, 2003). Neste estudo, no tratamento com BaP observa-se também um aumento significativo dos CMM comparado com os tratamentos de AgNP. No entanto, Reynolds e colaboradores (2003) demonstrou que a presença desta patologia na espécie de peixe *Platichthys flesus* não está relacionada com os PHAs e sim com os processos inflamatórios prolongados decorrentes da depleção no sistema imune nos organismos expostos.

No tecido sanguíneo também foram avaliados os efeitos dos poluentes através da peroxidação lipídica em eritrócitos, onde foi encontrado um aumento da LPO somente quando os poluentes se encontram em coexposição, apesar de já ter sido descrito que a exposição a AgNP é capaz de aumentar os níveis de dano lipídico (ARORA *et al.*, 2008; ASHARANI *et al.*, 2009; PIAO *et al.*, 2011). Isto não significa que isoladamente a exposição à AgNPs não possa aumentar os níveis de LPO no sangue como reportado acima, mas que nas condições experimentais e para a espécie *R. quelen*, estes danos não foram evidenciados. Isto também não significa que o BaP não possa também induzir este tipo de efeito em peixes, como já descrito para mamíferos (KIM *et al.*, 2000; UNO *et al.*, 2004). Estes dados servem para corroborar a hipótese do *Cavalo de Tróia*

atribuído às AgNPs com relação a algumas moléculas orgânicas, sendo esta uma importante informação visto que a liberação de AgNPs no ambiente vai potencialmente favorecer este mecanismo também para outras moléculas orgânicas. Tais aspectos merecem mais atenção e estudos deverão ser realizados com o intuito de confirmar esta hipótese, o que muda o papel tóxico das AgNPs quando lançadas nos ambientes naturais.

Os testes de genotoxicidade utilizados neste estudo não identificaram efeitos na estrutura do ADN em eritrócitos tanto pelo ensaio cometa como nas análises de micronúcleos. Estes dados demonstram que para o desenho experimental empregado e para a espécie em estudo tanto as AgNPs como o BaP aplicados isoladamente ou em associação não apresentam efeito genotóxico. No entanto, estudos de genotoxicidade com AgNP sugerem que a ausência deste tipo de alterações esteja relacionada com fenômeno de agregação do nanocomposto, o que poderia dificultar a sua entrada ativa no compartimento celular (NYMARK *et al.*, 2012). Estudos analisando células sanguíneas de humanos demonstraram danos no ADN por meio do teste de ensaio cometa (FLOWER *et al.*, 2012); contudo, deve ser considerado que a exposição foi direta e o tempo de exposição foi de 5 min e 3h. Isto permite evidenciar que os eritrócitos são susceptíveis a danos no ADN quando as AgNP conseguem entrar diretamente na corrente sanguínea mas o efeito tóxico é diferenciado com a exposição via oral, fazendo com que os dados obtidos neste experimento sejam mais realísticos e confiáveis, do ponto de vista ecológico.

Mitchelmore e Chipman (1998) estabeleceram a sensibilidade do ensaio cometa em hepatócitos de peixes (*Salmo trutta*) *in vitro* e sanguíneo exposto a BaP, demonstrando a sensibilidade genotóxica do fígado pelo processo de biotransformação do poluente neste tecido na geração de metabolitos citotóxicos. No entanto, no mesmo estudo fica demonstrada a baixa sensibilidade dos eritrócitos para medir dano genético após exposição ao BaP, como corroborado com os resultados deste estudo. Portanto, a baixa genotoxicidade observada na exposição à AgNP e BaP, isolada e em coexposição, em *Rhamdia quelen*, pode estar relacionada com o desenho experimental empregado.

No rim posterior foi realizada análise de metalotioneínas, mas nenhum resultado foi significativo quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, a análise histopatológica do tecido demonstrou que as alterações encontradas podem afetar a funcionalidade do órgão, evidenciando que o mecanismo de imobilização de metais pela expressão da metalotioneína não é acionado, ou é ineficiente, para evitar os efeitos oriundos da exposição à prata. Corroborando esta hipótese, foi observado que lesões glomerulares, como as encontradas no presente estudo têm sido associadas com vias pro-inflamatórias e também à exposição a outros metais tóxicos (KURTOVICK *et al.*, 2008).

6. CONCLUSÕES

- ▶ A coexposição de adultos da espécie *Rhamdia quelen* a agregados de AgNP e ao BaP demonstra um aumento na toxicidade, comparativamente com a exposição isolada, sugerindo a presença de um mecanismo tipo *Cavalo de Troia*.
- ▶ O mecanismo de detoxificação de xenobióticos (avaliado mediante GST, GSH, METs) se mostra eficiente, já que danos em macromoléculas não são observados (LPO e PCO) e nem afeta o funcionamento metabólico (δ -Alad, AChE).
- ▶ A análise histopatológica de fígado, rim anterior e rim posterior evidencia um padrão de resposta inflamatória generalizada após a exposição a agregados de AgNPs e uma indução da resposta imune nos indivíduos expostos.
- ▶ Análises de genotoxicidade não evidenciaram efeitos tóxicos, o que pode estar relacionado mais com o desenho experimental escolhido para este estudo.
- ▶ Indivíduos adultos de *Rhamdia quelen* expostos por via oral a agregados de AgNPs e coexposição com BaP não apresentam danos teciduais que possam comprometer os organismos expostos a estas concentrações.

7. REFERÊNCIAS

- AAS, E., BEYER J., GOKSOYR, A. 2000. **Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation.** *Biomarkers* . 5(1):9 - 23
- ABBAS, S.A. 2011. **The effects of gold and silver nanoparticles on Choline Estrase and Monoamino oxidase enzymes activities.** *International Journal of Chemistry*. Vol. 3, No. 4: 61-68.
- AGIUS, C., ROBERTS, R.J. 2003. **Melano-macrophage centers in their role in fish pathology.** *J. Fish Dis.* 26, 499-509.
- ALLEN, H. J., IMPELLITTERI, C., MACKE, D., ROOSE D., LAZORCHAK J. M., POYNTON H., HECKMAN L., GOVINDASWAMY S., NADAGOUDA M. 2010. **Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*.** *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol 29, 12:2742–2750.
- ALVES COSTA, J.R.M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*.** Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 133f, 2001.
- ALVES COSTA, J.R.M. **Padronização de metodologias para o uso de biomarcadores de contaminação ambiental em Traíra (*Hoplias malabaricus*, Erythrinidae): δ -alad, metalotioneína e vitelogenina.** Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 132f, 2006.
- ALVES COSTA, J.R.M., MELA, M., SILVA DE ASSIS, H.C., PELLETIER, E., RANDI, M.A.F., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. 2007. **Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead(II) or methylmercury.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.67, p.82-88.
- AMARAL, A.; SOTO, M.; CUNHA, R.; MARIGÓMEZ, I.; RODRIGUES, A. 2006. **Bioavailability and cellular effects of metals on *Lumbricus terrestris* inhabiting volcanic soils.** *Environmental Pollution* , v. 142 , p. 103-108.
- ARORA, J. JAIN, J.M. RAJWADE AND K.M PAKNIKAR. 2008. **Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies.** *Toxicol. Lett.* 179, pp. 93–100.
- ARORA, S.; JAIN, J.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. 2009. **Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236 (3): 310– 318.

ASHARANI, P.V G. Low Kah Mun, M.P. Hande, S. Valiyaveetil. 2009. **Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells**, *ACS Nano* . 3: 279–290.

AU, D. W. T., R. S. S. WU, B. S. ZHOU AND P. K. S. LAM., 1999. **Relationship between ultrastructural changes and EROD activities in liver of fish exposed to Benzo(a)pyrene**. *Environmental Pollution*. 104: 235–247.

BAINY, A. C. D. **Assimilação de cádmio e chumbo no sangue e tecidos de *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae) e seus efeitos sobre a δ -aminolevulinato desidratase eritrocitária**. Dissertação de mestrado, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.1990.

BERNET, D., SCHMIDT, H., MELER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T. 1999. **Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution**. *Journal of Fish Diseases*. 22: 25-34.

BEYER, J., M. SANDVIK, K. HYLLAND, E. FJELD, E. EGAAS, E. AAS, J.U. SKAARE AND A. GOKSOYR. 1996. **Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus L.*) and Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway**. *Aquat. Toxicol.*, 36, 75-98

BEYER, J., JONSSON G., PORTE C., KRAHN M.M., ARIESE F. 2010. **Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: a review**. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 30:224-244

BOHRER, P. L.; FILHO MS, PAIVA RL, DA SILVA IL, RADOS PV. 2005. **Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens**. *Acta Cytol.*, Chicago, v. 49, n. 3, p. 265-72.

BRADFORD, M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Anal. Biochem.* v. 72, p.248-254.

CARLSON, C., HUSSAIN, S. M., SCHRAND, A.M., BRAYDICH-STOLLE, L.K., HESS, K.L., JONES, R.L., SCHLAGER, J.J. 2008. **Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size- dependent generation of reactive oxygen species**. *J. Phys. Chem. B*. v.112, p.13608-13619.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. 1990. **Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects**. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, V. 47: 2123 -2136.

CATTARUZZA, M.; HECKER, M. 2008. **Protein carbonylation and decarboxylation: a new twist to the complex response of vascular cells to oxidative stress**. *Circ. Res.* V. 102, p. 273- 274.

CHEBBI, S. G., DAVID, M. 2009. **Neurobehavioral responses of the freshwater teleost, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) under quinalphos intoxication.** *Molecular Toxicology*, 25, 241-249.

CHENG, Y. W.; YIN, L. Y.; LIN, S. H.; WIESNER, M.; BERNHARDT, E.; LIU, J. 2011. **Toxicity reduction of polymer-stabilized silver nanoparticles by sunlight .** *J. Phys. Chem. C* 115: 4425–4432

COMIER, S. M.; NEIHEISEL, T. W.; WERNING, P.; RACINE, R. N.; REIMSCHUESSEL, R. 1995. **New nephron development in fish from polluted waters: a possible biomarker.** *Ecotoxicology*, n. 4, p. 156-168.

COUSINS, R.J. 1985. **Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin.** *Physiological Review*. 65: 238-309.

DALTON, T.P.; LIO, Q.W.; BITTEL, D.; LIANG, L.C.; ANDREWS, G.K. 1996. **Oxidative Stress Activates Metal Responsive Transcription Factor 1 Binding Activity: Occupancy *In Vivo* Of Metal Response Elements In the Metallothionein I Gene Promoter.** *Journal Of Biological Chemistry*. 271: 26233-41.

DEKANT, W. 2009. **The role of biotransformation and bioactivation in toxicity.** *Experientia Supplementum*, 2009, V.99: 57-86.

DI-GIULIO, R.T, HABIG, C., GALLAGHER, E.P. 1993. **Effects of black rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish** *Aquatic Toxicology*, 26 : 1–22

DRÖGE, W. 2002. **Free radicals in the physiological control of cell function.** *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, D., ANDRES J.R, V., FEATHRSTONE, R. M. 1961. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochem. Pharmacol.* v.7, p.88–95.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 2006. **Current national recommended water quality criteria.** <http://www.epa.gov/ost/criteria/wqcriteria.html#priority>

FABREGA, J., LUOMA S.N., TYLER, C.R., GALLOWAY, T.S., LEAD, J.R. 2011. **Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment.** *Environment International*. Vol 37, 2: 517–531.

FACEY, D. E.; BLAZER, V. S.; GASPER, M. M.; TURCOTTE, C. L. 2005. **Using Fish Biomarkers to Monitor Improvements in Environmental Quality.** *Journal of Aquatic Animal Health* 17:263–266.

FARINA, M.; BRANDÃO, R.; LARA, F. S.; PAGLIOSA, L. B.; SOARES, F. A.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B. T. 2003. **Profile of nonprotein thiols, lipid peroxidation and δ -aminolevulinate dehydratase activity in mouse kidney and liver in response to acute exposure to mercuric chloride and sodium selenite.** *Toxicology*, v. 184, p. 179-187.

FARINA, M., BARBOSA, N.B.V., NOGUEIRA, C.W., FOLMER, V., ZENI, G., ANDRADE, L.H., BRAGA, L.A., ROCHA, J.B.T., 2002. **Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of δ -aminolevulinate dehydratase from rat liver and cucumber leaves.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35, 623–631.

FENECH, M. 2000. **The *in vitro* micronucleus technique.** *Mutat. Res.*, Amsterdam, Vol. 455, n.1-2, p. 81–95.

FERRARO, M.V.M, FENOCCHIO, A.S, MANTOVANI, M.S, RIBEIRO, C.D, CESTARI, M.M. 2004. **Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *Hoplias malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus as chromosome aberration tests.** *Genet Mol Biol.* V27:103–107.

FLORA, S.J.S., GUBRELAY, U., KANNAN, G.M., MATHUR, R. 1998. **Effects of zinc supplementation during chelating agent administration in cadmium intoxication in rats.** *J. Appl. Toxicol.*, 18, 357–362.

FLOWER, N.A.L., BRABU B., REVATHY M., GOPALAKRISHNAN C., RAJA S.V.K., MURUGAN S.S., KUMARAVEL T.S. 2012. **Characterization of synthesized silver nanoparticles and assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay.** *Mutat. Res.* 742 (2012), pp. 61–65

FOLDBJERG, R., OLESEN, P., HOUGAARD, M., DANG, D.A., HOFFMANN, H.J. AUTRUP, H. 2009. **PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes.** *Toxicol. Lett.* 190, 156-162.

FOLDBJERG, N.M., DANG, D.D. AUTRUP, H. 2011. **Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line A549.** *Arch Toxicol* 85: 743-750.

FOLDBJERG R, IRVING ES, HAYASHI Y, SUTHERLAND DS, THORSEN K, AUTRUP H, BEER C. 2012. **Global gene expression profiling of human lung epithelial cells after exposure to Nanosilver.** *Toxicological Sciences.* 130(1):145-57

FOURNIE, J. W., SUMMERS, J. K. COURTNEY L. A., D.ENGLE V., BLAZER V. S. 2001. **Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments.** *Journal of Aquatic. Animal Health* 13:105–116.

GAGNÉ F, ANDRÉ C, SKIRROW R, GÉLINAS M, AUCLAIR J, VAN AGGELEN G, TURCOTTE P, GAGNON C. 2012. **Toxicity of silver nanoparticles to rainbow trout: a toxicogenomic approach.** *Chemosphere*. 89: 615-622.

GAISER BK, FERNANDES T, JEPSON M, LEAD JR, TYLER CR, BAALOUSHA M, BISWAS A, BRITTON GJ, COLE PA, JOHNSTON B, JU-NAM Y, ROSENKRANZ P, SCOWN T, STONE V. 2009. **Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium oxide nanoparticles.** *Environ Toxicol Chem* 31: 144–154.

GAISER BK, HIRN S, KERMANIZADEH A, KANASE N, FYTIANOS K, WENK A, HABERL N, BRUNELLI A, KREYLING WG, STONE V. 2013. **Effects of silver nanoparticles on the liver and hepatocytes *in vitro*.** *Toxicol Sci*. 131(2):537-47.

GARBAN, B., BLANCHOUH H., MOTELAY-MASSEI A., CHEVREUIL M., OLLIVON D. 2002. **Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: trends from urban to remote sites.** *Atmospheric Environment*, 36 :5395–5403.

GIBSON, K.D., NEUREBERGER, A., SCOTT, J.J., 1955. **The purification and properties of deltaaminolevulinic acid dehydratase.** *Biochem. J.*, 61, 618–629.

HANSON N., LARSSON A. 2008. **Fixed wavelength fluorescence to detect PAH metabolites in fish bile: increased statistical power with an alternative dilution method.** *Environ. Monitor. Assess.*, 144 : 221–228

HATTEMER-FREY, H.A., TRAVIS, C.C. 1991. **Benzo(a)pyrene. Environmental partitioning and human exposure.** *Toxicol. Ind. Health* 7:141–157.

HUBER, PAULA C.; ALMEIDA, WANDA P. AND FÁTIMA, ÂNGELO DE. 2008. **Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos.** *Quím. Nova* . vol.31, n.5.

HUSSAIN,S., ANNER, R.R.M., ANNER, B.M. 1992. **Cysteine protects Na, K-ATPase and isolate human lymphocytes from silver toxicity.** *Biochem Bioph Res Co*. 189: 1444-1449.

HUSSAIN, S., MENEGHINI, E., MOOSMAYER, M., LACOTTE, D., ANNER, BM. 1994. **Potent and reversible interaction of silver with pure Na K-ATPase liposomes.** *Biochem Biophys Acta*. 1190: 402-408

HUYNH, K. A., CHEN, K. L. 2011. **Aggregation kinetics of citrate and polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions.** *Environmental Science & Technology*. 45 (13): 5564–5571.

JIANG, Z-Y., WOOLLARD, A.C.S., WOLFF, S.P. 1991. **Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange.**

Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, V.26, p.853-856.

JIANG, Z-Y., HUNT, J.V., WOLFF, S.P. 1992. **Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein.** *Anal. Biochem.*, V.202, p.384-389.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. 1976. **Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases.** *J. Biol. Chem.* V.251, p.6183–6188.

KIM HS, KWACK SJ, LEE BM . 2000. **Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and benzo[a]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[a]pyrene.***Chem Biol Interact* 127: 139-150.

KIM, Y.J., YANG, S.I., RYU, J.C. 2010. **Cytotoxicity and genotoxicity of nanosilver in mammalian cell lines.** *Mol Cell Toxicol.* 6: 119-125

KLAASSEN, C.D.; LIU, J.; CHOUDHURI, S. 1999. **Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 267-94.

KOJIMA, Y.; BINZ, P.A.; KÄGI, J.H.R. **Nomenclature of metallothionein : Proposal for a revision.** In: Metallothionein IV. Klaassen, C.D. (Ed). Birkhäuser Verlag, Basel. 1999.

KURTOVIC, B., TESKEREDŽIĆ, E., TESKEREDŽIĆ, Z. 2008. **Histological comparison of spleen and kidney tissue from farmed and wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*).** *Actaadriat* 49:147–154

LABAN, G., NIES, L.F., TURCO, R.F., BICKHAM, J.W., SEPÚLVEDA, M.S. 2010. **The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos.** *Ecotoxicology.* 19:185–195.

LATIMER, J.S., ZHENG, J., **The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment.** In: Douben, P.E.T. (Ed.), PAHs: An Ecotoxicological Perspective. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2003. pp. 9–33.

LEAVER, M.J., GEORGE, S.G. 1998. **A piscine glutathione S-transferase which efficiently conjugates the end-products of lipid peroxidation.** *Marine Environmental Research* 46 (1–5): 71–74.

LEVARD C, HOTZE EM, LOWRY GV, BROWN GE JR. 2012. **Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity.** *Environ Sci Technol.* Vol. 46 (13): 6900–6914.

LEVINE, R.L., WILLIAMS, J.A., STADTMAN, E.P., SHACTER, E. 1994. **Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins.** *Methods Enzymol.* V.233, p.346–357.

LIAU, S. Y., D. C. READ, W. J. PUGH, J. R. FURR, AND A. D. RUSSELL. 1997. **Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions.** *Lett. Appl. Microbiol.* 25:279–283.

LIMA, É. S., SAES, D., ABDALLA, P. 2001. **Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* vol. 37, n. 3.

LIMBACH L.K., WICK P., MANSER P., GRASS R.N., BRUININK A., STARK W.J.. 2007. **Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress.** *Environ. Sci. Technol.*, 41: 4158–4163

LIN, T.H., HUANG, Y.L., HUANG, S.F. 1996. **Lipid peroxidation in liver of rats administrated with methyl mercuric chloride.** *Biol. Trace Elem. Res.* V.54, p.33-41.

LIU, J.; PENNELL, K. G.; HURT, R. H. 2011. **Kinetics and Mechanisms of Nanosilver Oxysulfidation.** *Environ. Sci. Technol.* 45 (17): 7345– 7353

LUBICK, 2008 **Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles—or both?.** *Environ. Sci. Technol.*, 42 (23):. 8617

LUOMA, S. N. **Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges?.** Woodrow Wilson International Centre for Scholars: Project on Emerging Nanotechnologies, Washington, DC, 2008.

MANAHAN, S. E. Environmental chemistry. 7.ed. Boca Raton. USA. 876p. 2000.

MATUSHIMA E.R., FILHO, L., KANAMURA, A., TAKAMI, C. SINHORINI, I.L. 2006. **Experimental chronic granulomatous inflammatory process in fish: a morphological, ultrastructural and immunocytochemical study.** *Braz. J. Vet. Res. Anim.* 43(2):152-158

MEADOR, J. P., STEIN J. E., REICHERT W. L., VARANASI U. 1995. **Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms.** *Review of Environmental Contamination and Toxicology.* 143: 79-165.

MITCHELMORE, C.L; CHIPMAN J.K. 1998. **Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay.** *Aquatic Toxicology.* V.41(1-2): 161–182

MÜLLER, N.C., NOWACK, B. 2008. **Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment.** *Environmental Science and technology.* 42, 4447-4453.

NOGUEIRA, C.W., BORGES, V.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. 2003. **Organochalcogens effects on aminolevulinatase activity from human erythrocytic cells *in vitro*.** *Toxicol.*, 191, 169-178.

NYMARK, P., CATALÁN, J., SUHONEN, S., JÄRVENTAU, H., BIRKEDAL, R., CLAUSEN, P.A., JENSEN, K.A., VIPPOLA, M., SAVOLAINEN, K., NORPPA, H. 2012. **Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells.** *Toxicology.* doi: 10.1016/j.tox.2012.09.014.

OLGUN, S.; GOGAL, R.M.JR.; ADESHINA, F.; CHOUDHURY, H.; MISRA, H.P. 2004. **Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes.** *Toxicology*, 196: 181-195.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., J. PADROS, F.X. VLADEZ DOMINGOS, F.M. AKAISHI, M.A.F. RANDI, É. PELLETIER. 2007. **Histopathological evidence of antagonistic effects of tributyltin (TBT) on benzo(a)pyrene (BaP) toxicity in the Arctic Charr (*Salvinus alpinus*).** *Science Total Environment.* 372 :549-553.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C. **AChE inhibition as a biomarker for pollutants contamination in tropical aquatic ecosystems.** In: Parveen, M.; Kumar, S. (Eds). *Recent Trends in the Acetylcholinesterase System.* Netherlands: 2005. p.103-124.

OLSSON, P.E.; HYLLNER, S.J.; ZAFARULLAH, M.; ANDERSSON, T.; GEDAMU, L. 1990. **Differences in metallothionein gene expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes and the RTH-149 cell line.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 24: 78-82.

ORRENIUS S, MCCABE MJ JR, NICOTERA P.1992. **Ca²⁺-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death.** *Toxicol Lett.* 64-65:357-64.

PAGE D.S., BOEHM, P.D., DOUGLAS, G.S., BENICE, A.E., BURNS, W.A., MANKIEWICZ, P.J. 1999. **Pyrogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments Record Past Human Activity: A Case Study in Prince William Sound, Alaska.** *Marine Pollution Bulletin.* Vol 38 (4): 247–260.

PAMPLONA, J.H. **Avaliação dos Efeitos Tóxicos da Dipirona sódica em peixe *Rhamdia quelen*: Estudo Bioquímico, Hematológico e Histopatológico.** Dissertação Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. 2009.

PANDE, M., MEHTA, A., PANT, B.P., FLORA, S.J.S. 2001. **Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats.** *Environ.Toxicol. Pharmacol.*, 9, 173–184.

PANDE, M., FLORA, S.J.S. 2002. **Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of α -lipoic acid and succimers in rats.** *Toxicol.*, 177, 187–196.

PLANIKUMAR, L., KUMARAGURU, N.A., RAMAKRITINAN, C.M., ANAND, M. 2012. **Biochemical response of anthracene and benzo[a]pyrene in milkfish *Chanos chanos*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 75:187–197.

PARK E.J., YI J., KIM Y., CHOI K., PARK K. 2010. **Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism.** *Toxicol In Vitro*, 24 : 872–878

PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W. & FANCY, L.L. 1996. **Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in new found land.** *Marine pollution bulletin*, v. 32, p.225-231.

PESONEN, M.; ANDERSSON, T. 1997. **Primary hepatocyte cultures: an important model of xenobiotic metabolism.** *Aquat. Toxicol.*, v.39: 253–267.

PIAO, M.J. . K.A. KANG, I.K. LEE, H.S. KIM, S. KIM, J.Y. CHOI, J. CHOI, J.W. HYUN. 2011. **Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis.** *Toxicol. Lett.* 201: 92–100.

POWERS, C.M., SLOTKIN, T.A., SEIDLER, F.J., BADIREDDY, A.R., PADILLA, S. 2011. **Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition.** *Neurotoxicol Teratol.* 33(6):708-14.

PRETTO, A., LORO, V. L., MORSCH, V. M., MORAES, B. S., MENEZES, C., CLASEN, B., HOEHNE, L. 2010. **Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium.** *Archives of environmental contamination and toxicology*, 58(4), 1008-14.

QUINLAN, G.J., GUTTERIDGE, J.M.C. **Carbonyl assay for oxidative damage to proteins.** In: Taniguchi, N., Gutteridge, J.M.C. (Eds), *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Oxford University, New York, p.257-258, 2000.

RABITTO, I.S., ALVES COSTA, J.R.M., SILVA DE ASSIS, H.C., PELLETIER, È., AKAISHI, F.M., ANJOS, A., RANDI, M.A.F., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. 2005. **Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*:**

histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.60, p.147-156.

REIMSCHUESSEL, R. 2001. **A fish model of renal regeneration and development.** *Ilar Journal*. V.42, p. 285 – 291.

REYNOLDS WJ, FEIST SW, JONES GJ, LYONS BP, SHEAHAN DA, STENTIFORD GD. 2003. **Comparison of biomarker and pathological responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) induced by ingested polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination.** *Chemosphere*. 52:1135–1145

RIBEIRO, L. R. **Teste de micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo.** In: RIBEIRO, L. R, SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental. Canoas, Ulbra; 2003. p. 173-200.

ROCHA, J.B.T., PEREIRA, M.E., EMANUELLI, T., CHRISTOFARI, R.S., SOUZA, D.O. 1995. **Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver kidney and blood of suckling rats.** *Toxicol.*, 100, 27–37.

ROESIJADI, G. 1992. **Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals.** *Aquatic Toxicology*. 22: 81-114.

RODRIGUES, A.L., BELLINASSO, M.L., DICK, T. 1989. **Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae).** *Comp. Biochem. Physiol.*, 94, 65–69

ROH, J.Y., SIM, S.J., YI, J., PARK, K., CHUNG, K.H., RYU D.Y, CHOI, J. 2009. **Ecotoxicology of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxigenomics.** *Environ Sci Technol*. 43: 3993-3940.

ROMANOVSKAYA, G.I., OLENIN, A.Y., VASIL'EVA, S. Y. 2011. **Concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons by chemically modified silver nanoparticles.** *Russian Journal of Physical Chemistry A, Focus on Chemistry*. Vol 85(2): 274-278.

ROSE, N.L., RIPPEY, B. 2002. **The historical record of PAH, PCB, trace metal and flyash particle deposition at a remote lake in northwest Scotland.** *Environmental Pollution* 117: 121-132

SASSA, S. 1982. **Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay.** *Enzyme*, v.28, p.133-145.

SCHMITT, C.J., M.L. WILDHABER, J.B. HUNN, T. NASH, M.N. TIEGER, B.L. STEADMAN. 1993. **Biomonitoring of lead-contaminated Missouri streams with an**

assay for erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in fish blood. *Environ. Contam. Toxicol.*, 25 : 464–475

SCHMITT, C.J., C.A. CALDWELL, B. OLSEN, D. SERDAR, M. COFFEY. 2002. **Inhibition of erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity in fish from waters affected by lead smelters.** *Environ. Monit. Assess.*, 77: 99–119

SCHWAIGER, J. 2001. **Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors.** *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, v. 8: 231 – 240

SCHWAIGER, J., WANKE, R., ADAM, S., PAWERT, M., HONNEN, W, TRIEBSKORN, R. 1997. **The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish.** *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, v. 6, n. 1: 75-86.

SCOWN, T. M.; SANTOS, E. M.; JOHNSTON, B. D.; GAISER, B.; BAALOUSHA, M.; MITOV, S.; LEAD, J. R.; STONE, V.; FERNANDES, T. F.; JEPSON, M.; VAN AERLE, R.; TYLER, C. R. 2010. **Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout.** *Toxicological Sciences*, v.115, p. 521-534

SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. 1968. **Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent.** *Analytical Biochemistry*, V.25, p.192-205.

SENNUGA, A.T. 2011. **Biological synthesis of metallic nanoparticles and their interactions with various biomedical targets.** Philosophy at Rhodes University. Grahamstown, South Africa. 182 p.

SHEEHAN, D., MEADE, G., FOLEY, V.M., DOWD, C.A. 2001. **Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily.** *Biochem. J.* 360: 1-16.

SILVA DE ASSIS, H.C. **Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen erfassung von Gewasserverschmutzungen.** Thesis presented at technical University of Berlin, Germany, p. 99, 1998.

SILVA, A. G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática.** 2004. Dissertação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

SILVA, J.; ERDTAMNN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica.** Porto Alegre: Alcance. 2003

SIMON, H.U., HAJ-YEHIA, A., LEVI-SCHAFFER, F. 2000. **Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction.** *Apoptosis* 5: 415-418.

SISINNO, C.L.S., NETTO, D.P., REGO, E.C.P., LIMA, G.S.V. 2003. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial soil waste: a preliminary evaluation of the potential risk of environmental and human contamination in waste disposal areas.** *Cad. Saude Publica*, Rio de Janeiro, 19(2): 671-676.

SOREQ, H., SEIDMAN, S. 2001. **Acetylcholinesterase - new roles for an old actor.** *Nat Rev Neurosci.* 2:294-302.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. 1999. **The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair.** *Met Mol Biol.* Vol. 113, p. 203-212.

STEGEMAN JJ, BROUWER M, RICHARD TDG, FÖRLIN L, FOWLER BA, SANDERS BM, VAN VELD PA. 1992. **Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect.** In: Huggart RJ, Kimerly RA, Mehrle PM, Bergman HL, editors. *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress.* Lewis Publishers; Chelsea, MI, USA. pp. 235–335.

STENSBERG MC, WEI Q, MCLAMORE ES, PORTERFIELD DM, WEI A, SEPÚLVEDA MS. 2011. **Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging.** *Nanomedicine.* 6(5):879-898.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. 2010. **Protein carbonylation.** *Antioxidants & Redox Signaling.* v. 12, n. 3.

TANDON, S.K., SINGH, S., PRASAD, S., SRIVASTAVA, S., SIDDIQUI, M.K.J. 2002. **Reversal of lead induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant, or their combination in the rat.** *Environ. Res.*, 90, 61–66.

TAKASHIMA, F., HIBIYA, T. 1995. **An atlas of fish histology normal and pathological features.** 2.ed. p.152.

TEJAMAYA, M., RÖMER, I., MERRIFIELD, R.C., LEAD, J.R. 2012. **Stability of Citrate, PVP, and PEG Coated Silver Nanoparticles in Ecotoxicology Media.**

TIMBRELL, J.A. **Principles of Biochemical Toxicology,** Taylor & Francis, London. 2000.

TOMOKUNI K. 1979. **The in vitro effect of metal ions on the activity of erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase.** *Jap J Ind Health.* 21:240-5.

TSUKATANI, H., TANAKA, Y., SERA, N., SHIMIZU, N., KITAMORI, S., INOUE, N. 2003. **Validity of mutagenic activity as an indicator of river water pollution.** *Environ. Health Prev. Med.* 8, 133–138.

UNO, S., DALTON, T. P., DERKENNE, S., CURRAN, C. P., MILLER, M. L., SHERTZER, H. G., NEBERT, D. W. 2004. **Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation.** *Mol. Pharmacol.* 65: 1225–1237

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. E. 2003. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review.** *Environmental Toxicology and Pharmacology.* Vol.13:57-149.

VAN VELD, P.A., VOGELBEIN, W.K., COCHRAN, M.K., GOKSOYR, A., STEGEMAN, J.J., 1997. **Route-specific cellular expression of cytochrome P4501A (CYP1A) in fish (*Fundulus heteroclitus*) following exposure to aqueous and dietary benzo[a]pyrene.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 348–359.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. 1997. **A Simple Spectrophotometric Method For Metallothionein Evaluation In Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs.** *Marine Environmental Research.* Vol. 44: 69-84.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CAVALETTO, M.; MARCHI, B.; PONZANO, E.; BLASCO, J. 1999. **Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*.** *Am J Physiol.* 277: R1612-19.

VÖLKER, C., OETKEN, M., OEHLMANN, J. 2013. **The Biological effects and possible modes of action of nanosilver.** *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* Vol 223: 81-106.

WEI , L.N., TANG, J.L., ZHANG, Z.X., CHEN, Y.M., ZHOU, G., XI, T.F. 2010. **Investigation of the cytotoxicity mechanism of silver nanoparticles *in vitro*.** *Biomed Mater* 5: 044103.

WHO (World Health Organization), **Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.** IPCS (International Programme on Chemical Safety). Geneva: WHO. 1988.

WHO (World Health Organization). **Guidelines for drinking water.** www.who.int/water_sanitation_health/GDWQ/Chemicals/ddsum..htm. January 02, 2002.

WILCKE W, AMELUNG W, KRAUSS M, MARTIUS C, BANDEIRA A AND GARCIA MVB. 2003. **Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) patterns in climatically different ecological zones of Brazil.** *Org Geochem* 34: 1405-1417.

WONG, C. M.; CHEEMA, A. K.; ZHANG, L.; SUZUKI, Y. J. 2008. **Protein Carbonylation as a Novel Mechanism in Redox Signaling.** *Circ. Res.* v. 102, p. 310-318.

YU, S., YIN, J., LIU, J. 2013. **Silver nanoparticles in the environment.** *Environ. Sci. Processes Impacts.* 15, 78-92

YUNKER, M.B., MACDONALD, R.W., VINGARZAN, R., MITCHELL, H., GOYETTE, D., SYLVESTRE, S. 2002. **PAHs in the Frase river basin: a critical appraisal of PAH rations as indicators of PAH source and composition.** *Organic Geochemistry.* 33: 489-515.

ZHANG W, YAO Y, LI K, HUANG Y, CHEN Y. 2011. **Influence of dissolved oxygen on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles.** *Environ Pollut.* 159 (12):3757-62.

ZINKL G.J., SHEA P.J., NAKAMOTO R.J., CALLMAN J. 1987. **Brain cholinesterase activity of rainbow trout poisoned by carbaryl.** *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*,38:29-35.

ZINKL G.J., LOCKHART, W.L., KENNY, S.S., WARD, F.J. **The effects of cholinesterase inhibiting insecticides of fish.** In: Cholinesterase inhibiting Insecticides. Ed. Mineau, Elsevier, Amsterdam. 1991. 233-254p.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O acelerado crescimento do uso comercial das nanopartículas de prata (AgNP), inevitavelmente, aumenta a entrada de prata nos ecossistemas e aumenta o risco de toxicidade para a biota com riscos para a exposição humana em geral. As implicações ecológicas referentes à exposição às AgNP têm sido amplamente reportadas na literatura científica, no entanto sem determinar o estado de agregação destas nas soluções de exposição utilizadas nos testes de toxicidade.

Neste estudo foi evidente a toxicidade em larvas de *Rhamdia quelen* quando se realiza a exposição à AgNP em agregados com alterações morfológicas que interferem no desenvolvimento dos organismos, demonstrando o potencial tóxico das AgNP nesta fase de vida da espécie estudada (**Capítulo I**). Neste caso, foi evidente a susceptibilidade desta fase do ciclo de vida e da facilidade de absorção pelas larvas quando comparado com os indivíduos adultos. Estes efeitos podem comprometer o desempenho dos organismos devido às deformidades morfológicas com o decorrer do tempo de exposição, assim como comprometer a capacidade mecanorreceptora das larvas, afetando o comportamento durante as fases iniciais do ciclo de vida e em última instância, interferir com a manutenção da população nos ambientes naturais.

A sensibilidade das larvas foi evidente na avaliação ecotoxicológica, no entanto, ao simular o efeito tóxico das larvas expostas a AgNP a nível populacional não foi detectável um efeito deletério na dinâmica temporal da população (**Capítulo II**). A tendência observada no modelo, no qual são poucas as probabilidades de não alcançar o regime convergente para manter o tamanho da população, permitem afirmar que quando é realizada uma exposição pontual de xenobiótico tóxico nas primeiras fases de desenvolvimento, a dinâmica populacional de *Rhamdia quelen* consegue nivelar o tamanho durante os primeiros 50 anos após a exposição. No entanto, este modelo precisa de ajustes que permitam realizar previsões a partir de simulações como a observada neste trabalho. Estudos de coleta de dados precisam ser ainda realizados com o intuito de aperfeiçoar o modelo e possibilitar sua utilização.

Organismos adultos de *R. quelen* se mostraram mais resistentes que as fases larvais, quando realizada a exposição sub-crônica por via oral à AgNP isolada e em coexposição com BaP. Contudo, a nível histopatológico foi evidente o padrão de resposta inflamatória generalizada nos dois tipos de exposição. Esta resposta pode estar relacionada ao comportamento das AgNP dentro das células, assim, as possíveis reações químicas de transformação que ocorrem em presença de outros compostos intracelulares levam a aumentar a toxicidade pela liberação de prata nestes compartimentos, ativando a primeira linha de defesa imune (inflamação) nos organismos. Os dados evidenciam a capacidade destes organismos adultos de ativar eficientemente os mecanismos de desintoxicação e responder aos efeitos das AgNP e do BaP isoladamente ou em coexposição (**Capítulo III**).

A complexidade das co-exposições de poluentes às quais os organismos aquáticos se encontram sujeitos deve ser considerada dentro de análises ecotoxicológicas, assim como é necessário determinar o comportamento químico de poluentes em sistemas naturais que podem interferir na dinâmica de transformação ou ativação destes poluentes como o pH, temperatura e MOD. Os dados gerados neste trabalho demonstram a necessidade de trabalhar experimentalmente com condições mais realísticas, evidenciando a necessidade de desenvolver análises de química ambiental que permitam aumentar a capacidade de predição dos efeitos dos xenobióticos no ambiente natural.