

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KEZIA AGUIAR DELMOND

GENOTOXICIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO EM *Astyanax serratus*
(CHARACIDAE) EXPOSTOS AO CHUMBO INORGÂNICO (Pb II) E
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO₂) ISOLADOS E EM
ASSOCIAÇÃO.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de Genética.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marta Margarete Cestari.

CURITIBA
2013

À Deus em primeiro lugar, porque Dele e por meio Dele e para Ele são todas as coisas.

À minha família, pais e irmãs, com o amor e a compreensão de vocês tudo se tornou menos difícil.

“A viagem não acaba nunca. Só os viajantes acabam. E mesmo estes podem prolongar-se em memória, em lembrança, em narrativa. Quando o visitante sentou na areia da praia e disse: “Não há mais o que ver”, saiba que não era assim. O fim de uma viagem é apenas o começo de outra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que já se viu, ver na primavera o que se vira no verão, ver de dia o que se viu de noite, com o sol onde primeiramente a chuva caía, ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que mudou de lugar, a sombra que aqui não estava. É preciso voltar aos passos que foram dados, para repetir e para traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomeçar a viagem. Sempre.”

José Saramago

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, meu Senhor e Pai, se hoje estou diante de mais uma conquista, devo tudo à Ele, que tão poderosamente me sustentou em suas mãos em todo tempo!!!

Meu muito obrigada à professora Margarete Cestari, pela confiança em mim depositada, por toda dedicação, competência e experiência durante a orientação desse trabalho.

Aos professores Marcos V. M. Ferraro e Marina I. M. de Almeida por comporem a banca de acompanhamento dessa dissertação e muito contribuírem com as suas sugestões.

Aos professores que compõem a banca de avaliação, Marcos V. M. Ferraro, Wanessa A. Ramsdorf e Helena C. da Silva de Assis, obrigada pela gentileza em aceitar o convite.

A todos os funcionários e professores do Departamento e do Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná.

Aos funcionários do CEPPA (Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos) da Universidade Federal do Paraná, pela contribuição com as análises de quantificação de metais.

Aos funcionários do LACAUT (Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos) em especial à pessoa do professor Carlos Yamamoto e da funcionária Rúbia, por tão gentilmente disponibilizarem o uso de equipamentos.

Aos professores Aldo J. G. Zarbin (Departamento de Química - UFPR), Wido H. Schreiner (Departamento de Engenharia Química - UFPR), Ney Mattoso (Centro de Microscopia Eletrônica – UFPR) e Irineu Mazzaro (Departamento de Física-UFPR) pelos esclarecimentos e a realização das análises de caracterização de nanopartículas.

A professora Helena C. da Silva de Assis e a doutoranda Izonete Cristina Guiloski do Programa de Pós - Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, pela realização das análises enzimáticas. Aos demais alunos do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Helen, Suelen e Etiélen, por cederem equipamentos e espaço físico.

À professora Wanessa Ramsdorf (Wane), pelas sugestões, palavras de incentivo, e claro, os bombons (nada melhor para acalmar os ânimos!!). Obrigada

Wane, você esteve presente em momentos que tudo que eu precisava era ouvir: “Não desista”, não sabe o quanto isso fez diferença!

A todos os meus colegas do laboratório, Taynah, Laercio, Gustavo, Flavinho, Toni, Gabi, Gê, Manu, Tati, Paula, Áurea, Heliandra, Marcos, Franco, Laís, Ana Carolina, vocês foram essenciais durante essa jornada. Muito obrigada pela paciência e o companheirismo de vocês!!! Especialmente, meus agradecimentos à aluna de Iniciação Científica Ana Carolina, por ter estado sempre comigo durante os experimentos. A todos os demais colegas que passaram pelo laboratório durante esses dois anos, que de alguma forma também contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos maravilhosos e amados que fiz em Curitiba, Pâmela, Dairielly, Vítor, Laís, Jessé, Mauro, Renata, Victória, Rodrigo, Gláucia, Andressa, vocês tornaram os meus dias mais doces, mais alegres, mais leves, enfim, amizade que vou levar por toda a vida!!!!!!!!!!!!

A minha família em Curitiba, Isaac (meu primo-irmão-amigo, obrigada por tudo primão!!!), Cátia, Jeferson, Tia Iraci, Camila, Geise, Didio, Gabriel e Christian, com vocês aqui nem parecia que estava tão longe de casa, obrigada por todo amor e compreensão!!

Aos meus queridos e inesquecíveis amigos de Goiânia, Jack, Edvan, Vanessa, Larissa, Flávia, Eloá, Lorena, Rodrygo, Ícaro, Calebe, Maycon, Josué, Newrinha, Catinha, Francieny, Jéssica, Francielly, Tiago, Uydson, Mirely, Joseíla, Waldivino, Pr. Ruy, parece que foi ontem que nos despedimos; muito obrigada por me compreenderem e por acreditarem em mim!!

A minha amada família que de tão longe esteve sempre orando e torcendo por mim, Vó Bibi, Vó Eunice, Vô Alcides, Tias-mães (Lucimar, Lúcia, Leci, Eloá, Helena), Tios mais que amigos (Daniel, Zequinha, Josias, Alcides, Gil, Zé Carlos), meus primos e primas (na verdade somos praticamente irmãos), Tari, Mari, Jéssica, Eloazinha, Joanan, Gissely, Josué, Angélica, Daniel, Dennis, e os caçulinhas: Rebecca, Rúbia, Ana Lydia e Ezequiel, amo muito todos vocês!!!!

Finalmente, meus pais (Dorivan e Luciene) e minhas irmãs (Priscilla e Lydia), Deus não poderia ter escolhido família melhor pra mim!!!!!!!!!!!! Muito obrigada pelo amor incondicional de vocês, por me compreenderem e me apoiarem em meus sonhos. Amo muito vocês e quero ter oportunidade de retribuir tudo que me proporcionaram e proporcionam!!!

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Ilustração do mecanismo de absorção de nanopartículas mediado por endocitose. -----32
- FIGURA 2. Formas estruturais do dióxido de titânio. a) Anatase, b) Rutilo. -----36
- FIGURA 3. Captura de imagem em microscópio de epifluorescência de uma lâmina de Ensaio Cometa em eritrócitos. Os danos estão classificados em escores de 0 a 4, de acordo com o nível de quebras no DNA, comparando a proporção de material genético presente na “cabeça” e na “calda” do cometa-----48
- FIGURA 4. Captura de imagem em microscópio de epifluorescência de uma lâmina de Ensaio de Difusão. À esquerda nucleóides em necrose, à direita a seta indica um nucleóide em apoptose, em volta nucleóides com pouco dano aparente-----48
- FIGURA 5. Lâminas coradas com Laranja de Acridina para análise do Teste de Micronúcleo Písceo, incluindo Alterações Morfológicas Nucleares (AMN) e Frequência de Eritrócitos Imaturos. Seta indica, em a) Eritrócito Binucleado (BN), b) Eritrócito Imaturo Normal, c) Eritrócito maduro com a AMN notched; d) Eritrócito maduro apresentando a AMN do tipo vacuolated; e) Eritrócito imaturo apresentando micronúcleo, f) eritrócito maduro apresentando micronúcleo, nas proximidades, eritrócitos normais.-----52
- FIGURA 6. Exemplares de *Astyanax serratus*, (Characidae)-----62
- FIGURA 7. Eritrócitos de *A. serratus* tratados com NpTiO_2 e $\text{Pb} + \text{NpTiO}_2$ apresentando fragmentação de cromatina (i), vacúolos no citoplasma (ii), citoplasma pouco corado com cromatina desaparecendo (iii), setas indicam vacúolos no citoplasma. -----88
- FIGURA 8. Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio. a) Gráfico obtido por Difração de Raios X, tamanho médio das partículas 107nm, tamanho da

dispersão 45nm. b) Fotomicrografia Eletrônica (MET) de nanopartículas de dióxido de titânio após dispersão (50nm). c) Fotomicrografia Eletrônica (MET) de um agregado de nanopartículas de dióxido de titânio de 200nm-----93

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Comparação das Medianas dos escores no Ensaio Cometa em eritrócitos entre o grupo controle negativo (CN) e os contaminados com Chumbo (Pb), Nanopartículas (Np) e associação (Pb + Np). (* significância estatística em relação ao CN, $p < 0,05$). -----80

GRÁFICO 2. Comparação das Medianas dos escores do Ensaio Cometa em células hepáticas entre os grupos controle negativo (CN), e os contaminados com Pb, Nanopartículas (Np) e as associações (Pb + Np) * $p < 0,05$ significância estatística em relação ao controle negativo (CN).-----81

GRÁFICO 3. Medianas do Total de Alterações Morfológicas Nucleares. *significância estatística em relação ao Controle Negativo, $p < 0,05$ -----85

GRÁFICO 4. Atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST) em *A. serratus* após tratamento com Pb, Nanopartículas de dióxido de Titânio (NpTiO_2) e Pb + NpTiO_2 . * Significância estatística em relação ao controle, $p < 0,05$.-----89

GRÁFICO 5. Atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) em *A. serratus* após tratamento com Pb, Nanopartículas de dióxido de Titânio (NpTiO_2) e Pb + NpTiO_2 . Letras diferentes indicam ausência de significância estatística entre os grupos de tratamento, $p < 0,05$ -----90

GRÁFICO 6. Atividade da enzima Catalase em *A. serratus* após tratamento com Pb, Nanopartículas de dióxido de Titânio (NpTiO_2) e Pb + NpTiO_2 . * Significância estatística em relação ao controle negativo, $p < 0,05$ -----91

GRÁFICO 7. Atividade da enzima Metalotioneína em *A. serratus* após tratamento com Pb, NpTiO_2 e Pb + NpTiO_2 . Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos de tratamento, $p < 0,05$ -----92

LISTA DE TABELAS

TABELA1. Comparação de resposta entre os tecidos sanguíneo e hepático, frente à exposição aos contaminantes, analisados pelo Ensaio Cometa. Valores expressos em Mediana, q1 (quartil 1), q2 (quartil 2), Média e Erro padrão-----82

TABELA 2. Frequências de Apoptose e Necrose observadas em *A. serratus* através do Ensaio de Difusão. Os valores estão expressos em Média e Erro padrão (EP) e Mediana, quartil 1 (q1) e quartil 3 (q3).-----83

TABELA 3. Frequência de alterações morfológicas nucleares (AMN) e micronúcleos (MN) no sangue periférico de *Astyanax serratus* para todos os grupos de tratamentos. -----84

TABELA 4. Frequências relativas de Eritrócitos Imaturos no sangue periférico de *Astyanax serratus* em todos os grupos de tratamento. Valores expressos em Medianas, quartil 1 (q1), quartil 3 (q3)-----87

TABELA 5. Quantificação média de Chumbo no tecido sanguíneo de *A. serratus* para as exposições de 40 mg/kg de Pb e Pb + 0,5 µg/kg NpTiO₂ e Pb + 50 µg/kg NpTiO₂-----94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 A contaminação aquática	12
1.2 A toxicidade dos elementos metálicos e seus compostos	16
1.1.2 Chumbo	21
1.3 Nanotecnologia	26
1.3.1 Nanopartículas de dióxido de titânio	35
1.4 Biomarcadores e Bioindicadores.....	42
1.4.1 Biomarcadores Genéticos.....	44
Ensaio Cometa	44
Ensaio de Difusão do DNA	46
Teste do Micronúcleo Písceo.....	49
1.4.2 Biomarcadores bioquímicos.....	52
Enzimas anti-oxidantes.....	52
GST-transferase	55
Catalase.....	55
Superóxido dismutase	56
Metalotineína	56
1.5 Genotoxicidade em peixes.....	57
O gênero <i>Astyanax</i> – (<i>Astyanax serratus</i>)	60
2. JUSTIFICATIVA	63
3 OBJETIVOS	65
3.1 Objetivo geral	65
3.2 Objetivos específicos	65
CAPÍTULO I	68
Introdução	69
Material e Métodos.....	72
Design experimental	72
Preparo das soluções	73
Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio.....	73
Ensaio Cometa	74
Ensaio de Difusão do DNA	75
Teste do Micronúcleo Písceo.....	76
Enzimas antioxidantes.....	77
Análise química - Quantificação de Chumbo no tecido sanguíneo.....	77
Análise Estatística	78

Resultados	79
<i>Biomarcadores Genéticos</i>	79
<i>Biomarcadores bioquímicos GST, SOD, Catalase e Metalotineína</i>	89
<i>Caracterização das Nanopartículas de Dióxido de Titânio</i>	92
<i>Análise química de quantificação de Pb no tecido sanguíneo</i>	94
Discussão	95
Conclusões	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
APÊNDICES	122

RESUMO

Como reflexo do desenvolvimento econômico e da conseqüente melhoria nos padrões de vida da sociedade, novos materiais são produzidos pela indústria. Nesse contexto, a nanotecnologia é considerada a tecnologia mais promissora dos dias atuais. As propriedades específicas das nanopartículas e demais materiais nanoestruturados, como grande capacidade de penetração, grande área de superfície e reatividade química os torna atrativos em tecnologias industriais e medicinais, porém, pouco se sabe do potencial impacto ao ambiente e aos seres vivos da exposição a esses compostos. Nanopartículas manufaturadas são propositalmente produzidas na escala nanométrica, ou seja, são materiais que possuem estruturas de 100nm ou menos de dimensão. Os efeitos da exposição à Nanopartículas de dióxido de Titânio (NpTiO₂) têm revelado que elas podem induzir danos ao DNA a partir de estresse oxidativo. A possibilidade de que metais e outros compostos possam ser adsorvidos na superfície das NpTiO₂, tem sido alvo de preocupação por parte dos cientistas. O Chumbo em especial é um metal conhecidamente genotóxico e nesse sentido este estudo se propôs a avaliar os efeitos ao DNA de peixes da espécie *Astyanax serratus*, após injeções intraperitoneais em ensaios agudos de 96h com 40mg/kg de Pb (NO₃)₂, com 0,5; 5 e 50 µg/kg de NpTiO₂ e com a associação Pb(NO₃)₂ e as três doses da NpTiO₂. O Ensaio Cometa foi utilizado como biomarcador em células do tecido hepático e eritrócitos, o Ensaio de Difusão do DNA, Teste de Micronúcleo Písceo, Alterações Morfológicas Nucleares e Frequência de Eritrócitos Policromáticos em eritrócitos. Os resultados revelaram que o Pb (NO₃)₂ induziu danos significativos ao DNA apenas no sangue (p=0,0002), nos tratamentos com as NpTiO₂ os danos foram significativos na maior dose (50 µg/kg), para as células hepáticas (p= 0,04) e eritrócitos (p= 0,0013). Nos eritrócitos as associações dos contaminantes induziram danos ao DNA nas doses de Pb (NO₃)₂ + 5 µg/kg NpTiO₂ (p= 0,0415) e Pb + 50 µg/kg NpTiO₂ (p=0,0028), e nas células hepáticas a associação de Pb (NO₃)₂ + 5 µg/kg NpTiO₂ (p= 0,02). Não foram identificadas diferenças estatísticas entre as frequências de apoptose avaliadas pelo Ensaio de Difusão, embora o ensaio tenha revelado um aumento na frequência de morte celular via necrose no grupo da associação de Pb (NO₃)₂ + 5 µg/kg NpTiO₂ (p< 0,05). O Teste de Micronúcleo não revelou aumento na frequência de micronúcleos em nenhum dos tratamentos, apesar disto a alteração do tipo *notched* foi a mais frequente (p<0,05) nos grupos das associações dos contaminantes. A frequência de eritrócitos imaturos (EI) foi avaliada e observou-se uma indução da frequência desses eritrócitos, no tratamento com Pb(NO₃)₂ (p=0,016), nas associações dos contaminantes (para 0,5 µg/kg NpTiO₂ p=0.0008, para 5 µg/kg NpTiO₂ p= 0.0583 e para 50 µg/kg NpTiO₂ p=0.0002). Entre as NpTiO₂ isoladas a dose de 0,5 µg/kg foi a que teve a maior frequência de EI. A associação de Pb(NO₃)₂ + NpTiO₂ 50 µg/kg contribuiu mais para o aumento da frequência de EI do que a dose isolada. Para todos os tratamentos o tecido sanguíneo se mostrou mais sensível que o tecido hepático (p<0,05).

ABSTRACT

As a reflection of economic development and the consequent improvement in living standards of society, new materials are produced by industry. In this context, nanotechnology is considered the most promising technology of current days. The specific properties of nanoparticles and other nanostructured materials, such as great penetration capacity, large surface area and chemical reactivity makes them attractive for industrial and medical technologies, but little is known of the potential impact to the environment and living beings from exposure to these compounds. Manufactured nanoparticles are purposely produced on the nanoscale, or are materials that have structures of 100nm or less in size. The effects of exposing to nanoparticles of titanium dioxide (NpTiO_2) have shown that they can induce DNA damage from oxidative stress. The possibility that metals and other compounds can be adsorbed on the surface of NpTiO_2 , has been the subject of concern by scientists. The Lead in particular is known to be genotoxic metal and this study aimed to evaluate the effects of the DNA of the fish species *Astyanax serratus* through intraperitoneal injections in acute tests of 96h with 40mg/kg of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 0,5, 5 and 50 mg/kg of NpTiO_2 and the association of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ with three doses of NpTiO_2 . The Comet assay was used as a biomarker in liver tissue cells and red blood cells, the DNA Diffusion Assay, Micronucleus Test Piscine, Nuclear Abnormalities and Polychromatic Erythrocytes frequency in erythrocytes. The results showed that the $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ induced significant damage to DNA only in the blood ($p=0.0002$) in treated NpTiO_2 the damage was significant at the highest dose (50 mg / kg), for liver cells ($p=0.04$) and erythrocytes ($p=0.0013$). In association, the contaminant inserts DNA damage in erythrocytes at doses of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + 5 \text{ g/kg NpTiO}_2$ ($p = 0.0415$) and $\text{Pb} + 50 \text{ mg / kg NpTiO}_2$ ($p = 0.0028$), and cells hepatic the combination of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + 5\text{g/kg NpTiO}_2$ ($p=0.02$). No statistical differences were found between the frequencies of apoptosis evaluated by Diffusion Assay, although the assay has revealed an increase in the frequency of cell death via necrosis in the combination group of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + 5 \text{ g/kg NpTiO}_2$ ($p < 0,05$). The micronucleus test revealed no increase in the frequency of micronuclei in any of the treatments, although the Nuclear Abnormalities *notched* type was the most frequent ($p<0.05$) in the groups associations of contaminants. The frequency of polychromatic erythrocytes was evaluated and observed an induction frequency of these erythrocytes, in the treatment with $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ($p = 0.016$), associations of contaminants (for 0.5 mg/kg NpTiO_2 $p = 0.0008$, to 5 mg/kg NpTiO_2 $p = 0.0583$ and 50 mg / kg NpTiO_2 $p = 0.0002$). Among the isolated NpTiO_2 the 0.5 mg/kg dose had a higher frequency of polychromatic erythrocytes. The association of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{NpTiO}_2$ 50 mg/kg contributed more to the increase this frequency than the isolated dose. For all treatments the blood tissue was more sensitive than liver tissue ($p < 0.05$).

1 INTRODUÇÃO

1.1 A contaminação aquática

A água é essencial e indispensável ao desenvolvimento de diversas atividades econômicas, tais como, indústria, geração de energia, aquicultura, irrigação, navegação e abastecimento urbano. Não obstante, representa, sobretudo, o principal constituinte de todos os organismos vivos, sendo consenso o entendimento de que a vida na Terra está condicionada à sua existência (MORAES e JORDÃO, 2002; RIBEIRO, 2010).

Com o avanço da industrialização e o conseqüente crescimento da população urbana, os ecossistemas aquáticos têm sido fortemente alterados. A ínfima parcela de águas superficiais apesar de ser a principal fonte de abastecimento humano é o meio receptor mais usualmente empregado para lançamento de esgotos (POMPEU, ALVES e CALISTO, 2005). Juntas, as atividades industriais, agrícolas e domésticas são responsáveis pelo uso de mais de um terço da água doce acessível, além de serem responsáveis pela contaminação aquática a partir da geração de compostos sintéticos (FENT, 2004).

Em regiões de alta densidade populacional os corpos hídricos recebem uma grande quantidade de resíduos provenientes diretamente da indústria, agricultura e assentamentos urbanos ou indiretamente da deposição atmosférica das emissões (FRENZILLI, NIGRO e LYONS, 2009). Tais poluentes são responsáveis pela alteração de características físico-químicas de rios, lagos e reservatórios urbanos, alterando drasticamente o ecossistema aquático, provocando perdas de características naturais e conseqüentemente da diversidade biológica (POMPEU, ALVES e CALISTO, 2005).

Frenzilli, Nigro e Lyons, (2008) acrescentam que misturas complexas advindas de resíduos industriais podem ser constituídas tanto de poluentes com efeitos conhecidos como daqueles cuja toxicidade é desconhecida.

Como reflexo do desenvolvimento econômico e da conseqüente melhoria nos padrões de vida da sociedade, novos materiais são produzidos pela indústria. Dessa forma, produtos químicos desempenham importante função em setores como os de agricultura, indústria, doméstico, têxteis, transporte e saúde e, apesar de contribuírem significativamente para a melhoria dos padrões de vida em todo o

mundo, o uso desses produtos está associado à contínua liberação de resíduos e efluentes que representam um grave risco ambiental (ROCHA, ROSA e CARDOSO, 2009).

Diante deste fato, Brack *et al.* (2007) consideram que pesquisadores e entidades ambientais possuem como principal desafio a implementação de estratégias de monitoramento para avaliar os efeitos biológicos não só dos compostos gerados pela indústria, mais também da misturas desses produtos. Dados da ACS (*American Chemical Society*), citados por Pimentel *et al.* (2006), afirmam que existe no mundo mais de 11 milhões de substâncias químicas. Desse montante, 90 a 100 mil estão em uso diariamente, seja na indústria alimentícia, farmacêutica ou de uso doméstico. Inevitavelmente, esses compostos tem como destino final o ambiente, seja a partir dos processos de produção, distribuição, utilização ou disposição de resíduos, de maneira localizada ou difusa (ROCHA, ROSA e CARDOSO, 2009).

O desenvolvimento das atividades agrícolas e industriais tem conduzido à síntese de compostos químicos cujas configurações estruturais envolvem átomos ou grupos funcionais raramente ou nunca encontrados naturalmente. Uma vez introduzidos no ambiente, tais compostos podem se tornar poluentes caso determinem efeitos indesejáveis em consequência de sua toxicidade e concentração (ZAGATO e BERTOLETTI, 2006).

A maioria das substâncias químicas consideradas como agentes tóxicos são substâncias exógenas aos organismos, conhecidas como xenobióticos. O termo xenobiótico, derivado do grego *xeno* que significa *estranho*, é usado para indicar uma substância estranha ao sistema biológico. Nesse conceito estão compreendidos compostos de ocorrência natural, drogas, carcinógenos, agrotóxicos, compostos metálicos, etc. Os xenobióticos podem produzir efeitos benéficos, como por exemplos os medicamentos, ou adversos, a partir de agentes tóxicos (LEITE e AMORIM, 2006).

Os xenobióticos, representados pelos agentes tóxicos, podem interagir com o organismo vivo promovendo múltiplas alterações que podem desencadear graves consequências em populações, comunidades ou ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (ZAGATO e BERTOLETTI, 2006).

Segundo Rocha, Rosa e Cardoso (2009), quando é detectada a presença de uma substância estranha ao meio, tem-se uma situação de contaminação. Ainda de

acordo com os autores, no caso em que a qualidade ambiental é comprometida - seja por efeito da exposição a agentes de origem natural ou antrópica, o quadro é de poluição.

Seguindo o raciocínio dos autores, a poluição é a alteração da qualidade ambiental aonde a comunidade exposta é incapaz de neutralizar os efeitos negativos, sendo algum tipo de risco identificado. Em geral, compostos sintetizados industrialmente não são passíveis de degradação natural por microrganismos, sendo persistentes no ambiente (ROCHA, ROSA e CARDOSO, 2009).

Nesse contexto os metais representam um grave risco ambiental, devido à sua estabilidade e persistência (ADHIKARI *et al.*, 2009). Uma vez que os metais tóxicos não são biodegradáveis, eles tendem a se acumular em sedimentos e tecidos de animais. Assim, mesmo em baixas concentrações, os metais podem conduzir efeitos tóxicos em longo prazo, devido a sua transferência através de níveis tróficos (MOHAN *et al.*, 2011).

A toxicidade dos metais está associada aos processos de bioacumulação e biomagnificação, que são respectivamente, a capacidade dos metais de se acumular em organismos e aumentar progressivamente sua concentração ao longo dos níveis tróficos (RIBEIRO, 2010). Peixes são conhecidamente capazes de sofrerem os dois processos, ao se alimentarem de sedimentos e outros animais contaminados podem acumular metais em seus tecidos e contaminar o homem através da alimentação (BUGGY e TOBIN, 2008; LI *et al.*, 2012).

Ainda no âmbito das inovações tecnológicas industriais, a nanotecnologia é um dos ramos da ciência que mais se desenvolve atualmente. Isso se deve, principalmente, às propriedades físico-químicas específicas dos nanomateriais, como grande capacidade de penetração, grande área de superfície e reatividade química, o que os torna atrativos em tecnologias industriais e medicinais, porém, pouco se sabe do potencial impacto ao ambiente e aos seres vivos (MAYANARD, 2006).

A nanotecnologia pode ser entendida como o estudo, a manipulação, a construção de materiais, substâncias, dispositivos, objetos que estão normalmente na escala nanométrica (1 nanômetro = 10^{-9} do metro) e que apresentam propriedades fortemente dependentes dessa escala de tamanho. (SCOWN, 2009). Partículas deste tamanho, ou nanopartículas, apresentam uma grande área

superficial e, frequentemente, exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas (QUINA, 2004).

A indústria da nanotecnologia gera produtos em larga-escala e que são bastante empregados como matéria-prima, sendo desta forma, inevitável que estejam presentes nos ambientes aquáticos por diferentes rotas. Apesar destas características definidas, o conhecimento dos efeitos desses materiais no ambiente e em associação com outros químicos é escasso (VEVERS e JHA, 2008).

O crescente investimento em nanotecnologia impulsiona o mercado mundial e potencializa o consumo de materiais, produtos e processos voltados para esta área. Contudo, em um levantamento realizado em 2010, foi observado que do montante destinado a este tipo de pesquisa, são escassos os recursos empregados em estudos de avaliação da toxicidade dos nanomateriais. Dentre os 73.138 artigos publicados que apresentavam os tópicos nanotecnologia, nanomateriais ou nanopartículas, apenas 1230 abordavam a questão da toxicidade e ecotoxicidade dos mesmos (PASCHOALINO, 2010).

As pesquisas desenvolvidas no ramo da genotoxicidade e ecotoxicidade dos nanomateriais buscam determinar suas propriedades físico-químicas no ambiente, bem como as respostas frente à interação com sistemas biológicos. A preocupação dos pesquisadores está na evidência, um tanto quanto recente, de que substâncias antes consideradas inertes biologicamente se tornem tóxicas no estado nanoparticulado, devido ao aumento da reatividade e da absorção celular (VEVERS e JHA, 2008).

As inovações industriais oferecem uma perspectiva de grandes avanços que garantem a melhoria da qualidade de vida da população. Entretanto o uso intensivo de novos materiais e substâncias químicas traz consigo riscos aos meio ambiente e à saúde humana (QUINA, 2004).

Junto com a urbanização e a necessidade por avanços tecnológicos, cresce também a demanda por uma fonte limpa e segura de água para consumo, agricultura e recreação (Frenzilli *et al.* 2009). O reconhecimento desse problema levou a maior parte dos países do mundo a adotar rígidas legislações ambientais e a procurar por processos tecnológicos alternativos que sejam menos poluidores. Entretanto a legislação em vigor ainda é inepta principalmente pela falta de fiscalização e pela dificuldade em tratar adequadamente as emissões de fontes difusas. Como resultado, extensas áreas do planeta continuam recebendo grandes

cargas de poluentes sob a forma crônica, e os eventuais efeitos sobre os ecossistemas naturais ainda são pouco conhecidos. (LACERDA e MALM, 2008).

Diante dessa realidade, durante as três últimas décadas tem aumentado o interesse da comunidade científica e das agências reguladoras quanto à detecção, conhecimento e controle de agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas (RIBEIRO, 2010).

A biodiversidade das águas superficiais e doces constitui um valioso recurso natural em termos econômicos, culturais, científicos e educacionais. Sua conservação e gestão são fundamentais para os interesses de todos, seres humanos, nação e governo (DUDGEON *et al.*, 2006).

1.2 A toxicidade dos elementos metálicos e seus compostos

O estudo da toxicidade dos metais é muito abrangente e envolve pesquisadores das mais diversas áreas do conhecimento. Esse esforço conjunto é positivo, no entanto traz consigo algumas divergências conceituais, como é o caso do uso ou não do termo “metais pesados”. Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (em inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC), a palavra “pesado” é usada convencionalmente para classificar elementos de alta densidade. E “metal” é uma palavra usada para se referir a um elemento puro ou a uma liga metálica. E sendo assim, o conhecimento da densidade contribui pouco para prever efeitos biológicos de metais, especialmente pelo fato de que elementos metálicos ou suas ligas são, na maioria dos casos, espécies que não reagem com organismos vivos. O uso do termo é criticado pelos químicos principalmente por suas generalizações, ou seja, muitos pesquisadores não distinguem se estão fazendo referência ao elemento puro ou a seus compostos (DUFFUS, 2002).

A tendência em se agrupar certos metais e seus compostos considerados tóxicos em um grupo intitulado “metais pesados”, causa confusões e interpretações precipitadas. Embora os elementos metálicos tenham algumas propriedades em comum, cada elemento possui características físico-químicas distintas, as quais determinam sua toxicidade e comportamento no ambiente (DUFFUS, 2002).

Alguns metais são essenciais, em quantidades mínimas, ao correto funcionamento do organismo; alguns responsáveis pela estabilidade do gradiente iônico das células como o Na, K e Ca e outros atuando como cofatores em reações enzimáticas, Zn, Cu, Fe, Mg. No entanto, dependendo da dose a que o organismo é exposto, estes últimos podem apresentar toxicidade, por outro lado, elementos como Hg, As, Pb, Cd, não tem função biológica conhecida e seus efeitos sobre os organismos podem ser deletérios mesmo em baixas concentrações (ZAGATO e BERTOLETTI, 2006; NAWAZ *et al.*, 2010).

Em particular, os elementos sem função biológica conhecida, podem existir como parte de uma ampla variedade de compostos com propriedades diversas. Como exemplo, não existe similaridade entre as propriedades do elemento estanho puro, o qual é pouco tóxico, e seu composto óxido tributilestanho que se apresenta altamente tóxico para alguns organismos aquáticos (DUFFUS, 2002). De igual modo, o chumbo elementar não representa um problema ambiental para muitas formas de vida, enquanto que ao se dissolver dando origem à forma iônica Pb^{2+} , torna-se altamente reativo e responsável por diversos problemas de contaminação ambiental já ocorridos na história (BAIRD e CANN, 2011).

Duffus (2002) estabelece em seu trabalho algumas classificações para os diferentes elementos metálicos levando em consideração propriedades químicas como densidade, massa atômica, número atômico e esclarecendo assim, as afinidades de alguns elementos por determinados ligantes. Como exemplo, elementos do grupo no qual Hg, Cd e a forma iônica do metal chumbo, Pb^{2+} , estão inseridos, possuem um alto número atômico, tendem a realizar ligações covalentes altamente estáveis com grupos de enxofre, permitindo que sejam praticamente imóveis no ambiente, não sendo excretados pelos organismos vivos e tendendo a se acumular, provocando toxicidade. É provável que esses elementos exerçam seus efeitos tóxicos ao se ligar a resíduos de cisteína críticos nas proteínas, embora as reais consequências fisiológicas variem de um metal para outro (SPIRO e STIGLIANI, 2011).

Íons metálicos podem ter afinidade por membranas biológicas. Alguns íons apresentam tamanho similar aos íons de Cálcio (Ca^{2+}), e interagem com as membranas celulares, provocando alterações estruturais e no transporte de substâncias (FELLENBERG, 1980).

Outra via de interação com as membranas biológicas é a propriedade dos íons metálicos em realizar ligações covalentes com átomos de carbono em um grupo orgânico como o grupo metil (-CH₃). Dessa ligação são originados os chamados compostos organometálicos, os quais tendem a ser lipossolúveis facilitando o movimento através de membranas biológicas. O processo de metilação dos íons metálicos ocorre naturalmente e é responsável por grande parte da distribuição no ambiente de alguns elementos como o mercúrio e o chumbo (BURATINI e BRANDELI, 2006).

Na água, os compostos organometálicos se associam a substâncias húmicas (mistura de compostos orgânicos, como resultado da decomposição de plantas e animais). Os compostos húmicos constituem a forma predominante de material orgânico dissolvido em águas naturais e podem de imediato formar complexos com cátions metálicos além dos compostos organometálicos (CAPARETO, 1999).

De acordo com Capareto (1999), no ambiente aquático a toxicidade dos elementos metálicos depende de vários fatores, dentre eles:

- Especificação do metal (íon dissolvido ou associado à matéria orgânica);
- Presença de outros metais ou compostos químicos (interação/sinergia);
- Condições do meio: temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, pH, (em situações de acidez ocorre o enfraquecimento das ligações dos metais com a matéria orgânica, aumentando assim, sua concentração e mobilidade na água);
- Condições dos organismos expostos: estágio da vida, posição na cadeia alimentar ecológica, tempo de exposição, etc.;

O conhecimento dos estados físicos e químicos do metal é importante para o entendimento dos mecanismos de transporte e também da biodisponibilidade. Para exercer um efeito tóxico, os íons metálicos devem atingir suas moléculas-alvo; e eles podem ser incapazes de fazer isso se estiverem atados em uma matriz insolúvel ou se não forem capazes de atravessar as membranas biológicas (SPIRO e STIGLIANI, 2011). Nesse contexto, as formas bivalentes de cádmio, chumbo e zinco são mais facilmente absorvidas pelos organismos (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

A biodisponibilidade é a chave para a compreensão do potencial tóxico dos metais e seus compostos, a qual depende dos parâmetros já mencionados, propriedades físico-químicas dos elementos metálicos, seus íons e seus compostos, condições ambientais, além de características da biota. As propriedades físico-

químicas dos metais dependem, por sua vez, da estrutura atômica desses elementos, as quais estão sistematicamente descritas na tabela periódica (DUFFUS, 2002).

As fontes de metais para o ambiente podem ser tanto naturais, advindas do intemperismo das rochas, erosão e erupções vulcânicas, quanto de ações antrópicas, como resultado de atividades industriais, mineração e metalurgia. (SPIRO e STIGLIANI, 2011).

Uma vez lançada na natureza uma substância sofre alterações durante seu transporte e distribuição pelo meio, alguns compostos são passíveis de sofrerem degradação natural, outros, ao contrário, apresentam características particulares como a persistência, ou seja, exibem alta resistência à degradação biótica e/ou abiótica (BURATINI e BRANDELLI, 2006). Os elementos metálicos, por não serem passíveis de degradação, são depositados, assimilados ou incorporados na água, sedimentos e animais aquáticos (LINNICK e ZUBENKO, 2000).

A concentração de substâncias na biota é determinada pelo equilíbrio entre absorção, biotransformação e excreção, o que depende da substância, do organismo, e de fatores ambientais. Algumas substâncias tendem a se acumular bastante na biota, outras não; alguns organismos acumulam muitas substâncias, enquanto outros não o fazem (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

Peixes acumulam metais em seus tecidos por processos de absorção direta, através das brânquias ou por absorção indireta, por meio do consumo de alimentos contaminados e sedimentos (NAWAZ *et al.*, 2010). A absorção via dieta representa o principal processo na transferência trófica do contaminante. Em peixes e mamíferos, a absorção do alimento ocorre primariamente no intestino e, no caso de contaminantes hidrofóbicos, é dependente do conteúdo de lipídeos da fonte alimentar, pois a absorção do contaminante ocorre concomitante com a absorção de lipídeos o que aumenta a biodisponibilidade (BURATINI e BRANDELLI, 2006).

O termo bioacumulação é utilizado para se referir à concentração da substância no organismo considerando todas as vias e rotas de exposição, ar, água, sedimento, solo e alimento (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008) Metais são assimilados pelos organismos tanto sob a forma de íons em solução como sob a forma de complexos organometálicos, assim, podem ter sua biodisponibilidade aumentada, facilitando sua bioacumulação. Compostos organometálicos podem sofrer hidrólise após serem assimilados pelo organismo, liberando o íon metálico que

pode se ligar iônica ou covalentemente com aminas, purinas ou outros grupos reativos presentes em substratos endógenos (BURATINI e BRANDELLI, 2006).

Alguns fatores são determinantes no processo de bioacumulação. Fatores ambientais como o teor de oxigênio dissolvido interferem na velocidade de absorção de contaminantes. Em situações de baixa nos níveis de oxigênio, peixes devem filtrar mais água pelas guelras para alcançar a demanda respiratória, dessa forma, quanto maior a quantidade de água contaminada que passa pelas guelras maior a oferta e absorção do elemento tóxico (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

No que diz respeito ao contaminante, fatores como solubilidade, estabilidade e hidrofobicidade, refletem o potencial de bioacumulação de uma substância. Para que ocorra a sua transferência através do epitélio de absorção, o composto deve estar na forma solúvel; geralmente quanto maior a solubilidade de um composto menor o seu potencial de bioacumulação, pois a solubilidade favorece tanto a assimilação como a eliminação pelo organismo. No caso particular dos metais, formas ionizadas de mercúrio, cádmio e chumbo, embora solúveis em água, aderem aos tecidos e são ativamente bioacumuladas. Devido a sua estabilidade e persistência no ambiente, metais podem ser assimilados pelos organismos tanto sob a forma de íons em solução quanto sob a forma de complexos organometálicos (BURATINI e BRANDELLI, 2006).

O tamanho do organismo também é um fator que interfere no processo de bioacumulação, em peixes é observado que animais menores absorvem mais rapidamente substâncias do que os de maior tamanho. Isso é possível pelo fato de que a absorção das substâncias em peixes é controlada pelo fluxo de água através das guelras, pela difusão através do epitélio, pelo fluxo de sangue e pela capacidade de ligação do contaminante com constituintes do sangue. Peixes grandes apresentam a superfície das guelras relativamente menor em relação ao seu peso corporal, tendo assim a velocidade de absorção menor quando comparada aos peixes pequenos (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

A observação de que inúmeras vezes a concentração de metais em organismos aquáticos é mais elevada que a dos mesmos metais na água, levou ao desenvolvimento da hipótese de que estes elementos poderiam se tornar progressivamente mais concentrados em níveis tróficos nas cadeias alimentares (CAPARETO, 1999).

Em seu tempo de vida, um peixe ingere muitas vezes o seu peso em alimento a partir dos níveis tróficos inferiores da cadeia alimentar. Nesse processo, esses animais podem bioacumular metais em seus tecidos e servirem como via de contaminação para outros peixes em uma cadeia sucessiva (BAIRD e CANN, 2011). Esse mecanismo de acúmulo e transferência de substâncias de um nível trófico a outro, exibindo concentrações crescentes à medida que alcançam níveis mais elevados, é definido como biomagnificação (BURATINI e BRANDELLI, 2006).

Os efeitos da bioacumulação e biomagnificação de metais podem ser letais ou sub-letais a praticamente toda biota, desde fitoplâncton, zooplâncton, comunidade bentônica, peixes e outros vertebrados aquáticos, pássaros e finalmente humanos (COELHO e FONSECA, 1986). Efeitos como carcinogenicidade, teratogenicidade e danos no sistema nervoso têm sido documentados como resultado do consumo de metais por humanos (MALIK *et al.*, 2010).

1.1.2 Chumbo

O chumbo é um elemento de ocorrência natural, encontrado em relativa abundância na crosta terrestre, sendo que as maiores fontes geológicas do metal são as rochas ígneas e metamórficas. O chumbo é extraído principalmente do minério Galena na forma de sulfeto de chumbo - PbS. As suas principais fontes naturais incluem as emissões vulcânicas, o intemperismo das rochas e as emissões provenientes do mar. No entanto, devido à intensa exploração desse metal pelo homem, principalmente em atividades do setor industrial, atualmente é difícil avaliar o conteúdo de chumbo originado de fontes naturais (BAIRD e CANN, 2011).

O chumbo foi o primeiro metal a ser extraído de seu minério; o ponto de fusão relativamente baixo (327°C) permite que ele seja facilmente trabalhado e moldado, o que contribuiu para sua exploração pelo homem desde cedo (BAIRD e CANN, 2011). Registros arqueológicos comprovam que os Egípcios, em 1500 a. C. já utilizavam o chumbo na fabricação de armas e utensílios domésticos, como copos, taças e recipientes para líquidos e alimentos, além de aquedutos e reservatórios para fermentação e acondicionamento de bebidas alcoólicas (CAPITANI, PAOLIELLO e ALMEIDA, 2009) As grandes civilizações Gregas e Romanas faziam

uso do chumbo para diversas finalidades: revestimento de construções contra as intempéries, tubulações de água, composição de utensílios de cozinha, além do uso de óxidos de chumbo na conservação e correção do gosto de vinhos, sendo este hábito mantido por muitas vinícolas europeias até poucos séculos atrás. Com o tempo os gregos observaram que a ingestão de bebidas ácidas em recipientes de chumbo poderia provocar doenças, por outro lado, os romanos, além dos recipientes, adicionavam deliberadamente sais de chumbo à vinhos ácidos para adoçar o sabor. Como consequência, os ossos dos romanos apresentam níveis bem mais elevados de chumbo do que os demais humanos da era moderna; especula-se que uma das causas da queda do Império Romano pode ter sido as intoxicações crônicas dos governantes através do consumo de bebidas e alimentos contaminados com o metal (CAPARETO, 1999, SPIRO e STIGLIANI, 2011).

Consta nos registros históricos da Inglaterra, que Jhon Franklin, um explorador do século XIX, morreu envenenado com chumbo juntamente com todos os tripulantes que estavam com ele em uma expedição. Era comum fazer uso de chumbo para selar latas de estanho utilizadas com a finalidade de armazenar comida. Ao reagir com o oxigênio, o chumbo é oxidado à sua forma iônica Pb^{2+} , a qual contaminou o conteúdo das latas (BAIRD e CANN, 2011).

Nos dias atuais, apesar de ter seu uso controlado, o chumbo ainda é muito utilizado em todo o mundo. A produção mundial de chumbo é de cerca de 43 milhões de toneladas por ano (CAPARETO, 1999). As principais fontes antropogênicas do Pb são a mineração e a fundição; além de ser aplicado na indústria como por exemplo em baterias, munições, cabos elétricos, pigmentos de tinta, pesticidas, em soldas, cerâmica, tubulações de água potável, fumo do tabaco e na composição de vidros em taças de cristal (PATRICK, 2006; RIBEIRO, 2010). No Brasil, os maiores consumidores de chumbo são as indústrias de baterias automotivas (80%), seguidos das indústrias de pigmentos com 12% e o setor eletroeletrônico (solda e ligas) com 8% (SILVA, 2001).

Os sais de chumbo, ainda que de forma descontinuada, são muito utilizados pela indústria de tintas como pigmento base, pois apresentam uma coloração brilhante muito explorada nesse setor. O cromato de chumbo é responsável pela cor amarela da sinalização de ruas, enquanto que o óxido de “chumbo vermelho” constitui a base das tintas à prova de corrosão nas pontes e em outras estruturas de metal. O hidroxicarbonato de chumbo (chumbo branco) foi largamente utilizado

como base para tinta de interiores, mas aos poucos está sendo substituído pelo dióxido de titânio (SPIRO e STIGLIANI, 2011).

Outra fonte importante de exposição ao chumbo é a gasolina com aditivos de chumbo. Em 1986 cerca de 10% da produção mundial de chumbo era utilizada em aditivos de gasolina a partir da adição do composto orgânico chumbo - tetraetila como antidetonante e para elevar a octanagem (CAPARETO, 1999). Esse composto é altamente tóxico, sendo prontamente absorvido pela pele e, no fígado, converte-se em íons trialkil-chumbo, os quais atuam como neurotoxinas (SPIRO e STIGLIANI, 2011). Atualmente o chumbo utilizado na gasolina representa 2,2% do consumo total de chumbo no mundo, demonstrando uma tendência de redução do uso desse aditivo, que iniciou a partir das décadas de 70 e 80 em vários países. No Brasil, o uso de aditivos de chumbo na gasolina foi proibido na década de 90 com o estabelecimento da Lei 7823/1993 (CAPITANI, PAOLIELLO e ALMEIDA, 2009). Apesar das restrições de uso em automóveis, o aditivo orgânico de chumbo ainda é legalmente utilizado em todo o mundo em aeronaves, embarcações e máquinas rurais (PATRICK, 2006).

O chumbo, como um elemento metálico, é resistente à degradação, ou seja, não biodegradável, e, uma vez que seu uso remonta desde os tempos antigos, a poluição causada por esse metal e seus compostos é persistente e traz implicações para a toda a biota (GÁRCIA-LÉSTON *et al.*, 2010), atrelado à isso, as propriedades físicas e químicas do chumbo influenciam sua distribuição e comportamento no ambiente, bem como seu potencial de absorção e toxicidade aos organismos vivos (BURATINI e BRANDELLI, 2006). Dessa forma, a assimilação de Pb em ecossistemas aquáticos parece ser determinada pela sua disponibilidade, geralmente mais baixa quando há a presença de matéria orgânica ou partículas minerais. Além disso, temperatura, salinidade, pH e conteúdo de ácidos húmicos e fúlvicos também são fatores que influenciam a acumulação do chumbo a partir da água e do sedimento (JHONSON, 1998, BURATINI e BRANDELLI, 2006).

Sabe-se que uma grande variedade de organismos aquáticos pode assimilar e acumular altas concentrações de chumbo, os compostos orgânicos de chumbo, sobretudo formas metiladas, são mais lipofílicos sendo absorvidos e acumulados mais prontamente (BURATINI e BRANDELLI, 2006). Mesmo com constatações de que o chumbo possa bioacumular em tecidos de organismos, não existem

evidências de biomagnificação ao longo da cadeia trófica, ao contrário, o chumbo é diretamente assimilado do ambiente pela biota (JHONSON, 1998).

Estudos a partir de diversos sistemas biológicos têm sido publicados fazendo referência aos efeitos da exposição ao chumbo, sendo apresentado como neurotóxico, nefrotóxico e responsável por causar danos no sistema cardíaco (RABITTO, 2004; PATRICK, 2006). Além de efeitos carcinogênicos, teratogênicos, aberrações cromossômicas, citotoxicidade e genotoxicidade (JHONSON, 1998; FERRARO *et al.*, 2004; CESTARI *et al.*, 2004; RAMSDORF *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2011;).

Jhonson (1998) descreve que os principais efeitos da toxicidade crônica do chumbo são síndrome neuromuscular, anemias provocadas por inibição de enzimas responsáveis pela biossíntese do grupo heme, danos no rim, esterilidade e desenvolvimento embrionário anormal. Além de problemas no sistema imunológico, aumentando a suscetibilidade a infecções virais e bacterianas.

Uma vez absorvido, 99% do chumbo se concentra nos eritrócitos em circulação, permanecendo na corrente sanguínea por um período aproximado de 30 a 35 dias; após, é disperso para tecidos moles como, fígado, córtex-renal, aorta, cérebro, intestino, baço, e por fim, dentes e ossos. A mensuração de chumbo no sangue é o biomarcador mais comumente aceito para a exposição a esse metal, desde que seja observado o tempo de permanência na circulação de até 35 dias no momento da realização dos testes (PATRICK, 2006).

Um dos mecanismos de toxicidade do chumbo envolve sua capacidade de mimetizar elementos essenciais, principalmente, cálcio, ferro e zinco. O Pb interage e se liga às mesmas proteínas e moléculas que esses metais, alterando assim atividades fisiológicas normais da célula (COMPANY *et al.*, 2011). Patrick (2006), afirma que em uma concentração picomolar o chumbo compete pelos sítios de ligação para fosfoquinase - C no cerebelo, interferindo na entrada de cálcio nas células, o que desencadeia uma série de consequências, como, alteração da função neuronal e da estrutura mitocondrial inibindo a respiração celular e levando a uma ocorrência acentuada de neurotransmissões espontâneas e inibição das de estímulo controlado.

Em estudos de autópsia, Barry (1975), citato por Patrick (2006), observou que o fígado é o principal órgão que acumula e contribui para a redistribuição de chumbo no organismo, sendo responsável por 33% do Pb acumulado em tecidos, seguido

pelo rim, medula, pâncreas, ovário, baço, próstata, glândula adrenal, cérebro, tecido adiposo, testículos, coração e músculo esquelético

Suzuki *et al.* (1996) em um estudo realizado em rim e fígado de ratos, observaram que após exposição ao chumbo foi induzido um aumento da transcrição do gene da glutathione P-transferase (GST-P). A enzima GST-P é responsável pela catalisação da conjugação da glutathione com xenobióticos eletrofílicos; a glutathione atua como uma das primeiras linhas de defesa contra a citotoxicidade de metais pesados. Segundo os autores, em situações de hepatocarcinogênese química em ratos é observado um aumento considerável da enzima GST-P.

Trabalhos com peixes da espécie *Hoplias malabaricus*, têm demonstrado indução de danos ao DNA em células sanguíneas e renais após os animais receberem injeções intraperitoneais de chumbo (RAMSDORF, 2009). Em estudos de contaminação trófica a partir da mesma espécie de peixe outros autores observaram aumento de danos no DNA, por meio do Ensaio Cometa, além de um aumento na frequência de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos através do teste do Micronúcleo Písceo (FERRARO *et al.*, 2004; CESTARI *et al.*, 2004).

O chumbo pode alterar o material genético de peixes após bioacumular nos tecidos do animal. A mutagenicidade e os efeitos clastogênicos e aneugênicos do chumbo estão relacionados com distúrbios na regulação enzimática, o que provavelmente afeta a replicação, tradução e reparo do DNA (FRACASSO *et al.*, 2002)

García-Lestón *et al.*, (2010) sugerem evidência de efeito genotóxico associado à exposição ao chumbo, por meio da inibição do sistema de reparo do DNA e da produção espécies reativas de oxigênio. A enzima DNA- polimerase, na presença de cloreto de chumbo, diminui sua precisão, aumentando assim a incorporação de bases incorretas. Foi observado também que a DNA-polimerase β de humanos tem sua atividade inibida na presença de chumbo divalente (Pb^{2+}). A síntese de RNA também é prejudicada por íons de chumbo que fazem com que a RNA-polimerase inicie a síntese em locais inapropriados do molde de DNA (GARCÍA-LESTÓN *et al.*, 2010).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classifica os compostos inorgânicos de chumbo como prováveis cancerígenos para o ser humano (Grupo 2A), com base em estudos com animais que apresentaram tumores renais

quando expostos a altas concentrações desses compostos na dieta. O chumbo é classificado no Grupo 2B - possível cancerígeno e os compostos orgânicos de chumbo no Grupo 3 – não classificáveis quanto à oncogenicidade. A classificação no Grupo 3 comumente é usada para agentes para os quais a evidência de câncer é inadequada em humanos e inadequada ou limitada em animais de experimentação (CETESB, 2012).

1.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia é indubitavelmente a mais promissora tecnologia do século 21. Com um valor estimado de 147 milhões de dólares de produtos vendidos em 2007 e uma expectativa de 3,1 trilhões para 2015, alguns autores se referem à nanotecnologia como a próxima revolução industrial (SCOWN, 2009). As propriedades específicas das nanopartículas e demais materiais nanoestruturados, como grande capacidade de penetração, grande área de superfície e reatividade química os torna atrativos em tecnologias industriais e medicinais, porém, pouco se sabe do potencial impacto ao ambiente e aos seres vivos (MAYANARD, 2006).

A nanotecnologia pode ser definida como o “design, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas manipulados em escala nanométrica”. Materiais que possuem estruturas na escala de 100 nanômetros (nm) ou menos são considerados nanomateriais, e nesse conceito estão inclusos nanopartículas, fulerenos, e outras moléculas à base de carbono como nanotubos de carbono, quantum - dotz e dendrímeros (SCOWN, 2009). Um nanômetro é a bilionésima parte do metro, a critério de comparação, um fio de cabelo humano, possui 80.000 nm de espessura, hemácias aproximadamente 7.000 nm, e uma molécula de água 0,3 nm; o interesse pela manipulação de materiais em nanoescala se dá justamente pelo fato de que nessa escala as propriedades dos materiais podem ser muito diferentes daqueles de maior escala (DOWLLING *et al.*, 2004).

Dessa forma, as propriedades de nanopartículas, assim como dos demais nanomateriais, dependem muito do tamanho da partícula. No entanto, as nanopartículas manufaturadas, definidas como materiais propositalmente produzidos para atividades humanas na escala nanométrica (BAALOUSHA *et al.*, 2008), não são meramente cristais de pequena dimensão, mais representam um estado

intermediário da matéria, entre a forma “a granel” ou “bruta” e a estrutura molecular (HOET, BRÜSKE-HOHLFELD e SALATA, 2004). Dentro do conceito de nanopartículas estão contempladas as partículas ultra-finas de metais, óxidos de metais, não metais e cerâmicas (SCOWN, 2009).

É importante ser compreendida a definição de nanopartículas manufaturadas, pois nanopartículas podem existir naturalmente, sendo geradas tanto a partir de mecanismos geológicos, a partir de atividades vulcânicas, por exemplo, como por atividades biológicas; como nos processos enzimáticos de degradação da matéria orgânica. No entanto, se compararmos o que é gerado naturalmente com as estimativas de produção de nanopartículas manufaturadas, que são da ordem de milhares de toneladas por ano para cada tipo de material, é justificado a preocupação de toxicologistas e ecotoxicologistas quanto aos possíveis impactos da exposição ambiental a essas substâncias. Arelado a isso, existe o fato de que nanopartículas manufaturadas podem conter substâncias tóxicas em concentrações ou formas estruturais que nunca ocorreriam naturalmente (HANDY, OWEN e VALSAMI-JONES, 2008).

Devido ao seu tamanho extremamente pequeno, as nanopartículas tem uma área de superfície extensa em relação ao seu volume, fazendo com que tenham um aumento do número de átomos quando comparadas com partículas maiores de mesma composição química, esta característica confere às nanopartículas uma alta reatividade e as tornam atrativas às mais diversas aplicações (SCOWN, 2009). Além do aumento da reatividade, materiais em nanoescala também sofrem alterações em suas propriedades ópticas, elétricas e magnéticas. Como exemplo, o dióxido de titânio naturalmente possui coloração branca e brilhante, por outro lado as nanopartículas de dióxido de titânio são transparentes, sendo essa propriedade muito aplicada para absorção de radiação ultravioleta na formulação de filtros solares de alta absorção e em revestimentos fotocatalíticos para vidros (PEREIRA, 2010).

O desenvolvimento da nanotecnologia traz consigo expectativas de solução para muitos problemas na medicina, produção energética e sustentabilidade de recursos ambientais. Na medicina nanopartículas magnéticas tem sido aplicadas na veiculação de drogas, diagnósticos, exames de ressonância magnética e tratamento de doenças. Nesse quesito destacam-se os medicamentos nanoencapsulados que garantem o acesso mais rápido à célula ou tecido alvo, além de serem liberados

gradativamente na corrente sanguínea reduzindo assim os efeitos colaterais. Governantes e investidores em todo o mundo têm investido no estudo e na exploração das propriedades excepcionais das nanopartículas, tendo em vista as novas oportunidades dentro dos setores tecnológico e industrial (SCOWN, 2009).

Na área ambiental, são muitos os benefícios que a nanotecnologia pode proporcionar, dentre eles Quina (2004) destaca o uso de nanomateriais catalíticos que podem aumentar a eficiência e a seletividade de processos industriais, resultando num aproveitamento mais eficiente de matérias-primas, em um consumo menor de energia e na conseqüente redução da geração de resíduos. No setor de energia, a tecnologia dos nanomateriais tem contribuído para o desenvolvimento de sistemas de iluminação de baixo consumo energético, na informática a nanotecnologia tem aprimorado o desenvolvimento de *displays* que podem ser lidos como uma folha de papel, que, além de serem mais leves e possuírem melhor definição, apresentam as vantagens da ausência de metais tóxicos na sua fabricação e de terem um consumo menor de energia.

Ainda enfatizando as possibilidades de melhorias da qualidade de vida e de preservação ambiental, vale destacar que a grande área superficial das nanopartículas lhes conferem excelentes propriedades de adsorção de metais e substâncias orgânicas. O potencial redox e/ou de condução de nanopartículas podem ser aproveitados em processos de tratamentos de efluentes industriais e de águas e solos contaminados, baseados na degradação química ou fotoquímica de poluentes orgânicos (QUINA, 2004). Nesse processo destacam-se as nanopartículas de dióxido de titânio (Np TiO_2), que tem sido muito utilizadas como eficientes catalisadoras para a decomposição de contaminantes orgânicos presentes na água e em efluentes (CENTI *et al.*, 2002; CHOI, STATHATOS e DIONYSIOU, 2006).

A nanotecnologia produz uma série de produtos comercialmente disponíveis, incluindo cosméticos que garantem uma melhor penetração e absorção na pele e em cabelos, creme dentais com nanopartículas de prata que permitem uma maior aderência possibilitando reposição do esmalte e combate à placas bacterianas, na indústria têxtil já são produzidos tecidos revestidos com nanopartículas de dióxido de titânio que ao entrar em contato com a luz ultravioleta permite que manchas sejam oxidadas, desaparecendo completamente, além de tecidos impermeáveis, com repelência à insetos e de ação antimicrobiana (PORTAL BRASIL, 2013).

Pesquisadores brasileiros da Universidade de São Paulo (UNESP) desenvolveram a partir do fungo *Fusarium oxysporum*, nanopartículas de prata para revestirem tecido de algodão com a finalidade de conferir ao tecido ação antibacteriana, principalmente contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, responsável por grande parte das infecções hospitalares. O fungo *F. oxysporum* possui uma enzima que tem a capacidade de reduzir o íon prata em prata metálica, produzindo nanopartículas de prata na ordem de 1,6 nanômetros. Os cientistas, já conhecendo o potencial da prata como bactericida aplicaram esse conhecimento, produzindo através de processos biotecnológicos, um tecido funcional, já patenteado, que poderá ser de grande importância para diversas aplicações, inclusive na prevenção de infecções hospitalares (DURÁN *et al.*, 2005).

Segundo dados do Inventário desenvolvido pelo Projeto de Nanotecnologias Emergentes, do inglês *Project on Emerging Nanotechnologies*, estima-se que existam hoje no mercado mais de 1000 produtos que contenham nanopartículas e demais nanomateriais em sua composição. De acordo com os dados recolhidos pelo projeto os produtos de saúde e beleza lideram o ranking da produção comercial, sendo a maioria constituída de nanopartículas de prata, seguido por nanotubos e nanofibras de carbono, e em sequência, nanopartículas de dióxido de titânio.

Ainda segundo o mesmo inventário, os Estados Unidos são os maiores produtores de nanomateriais, sendo as companhias americanas responsáveis por quase 50% da produção. No grupo dos grandes investidores em nanotecnologia também estão inclusos Alemanha e Japão; o Brasil integra o grupo no qual se encontram China e Índia. O governo brasileiro tem investido nos últimos anos, com recursos do plano plurianual (PPA 2004-2007), cerca de 140 milhões em nanociência e nanotecnologia (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

Todas as possibilidades que a nanotecnologia proporciona, contribuem para o crescente investimento, impulsiona o mercado mundial e potencializa o consumo de materiais, produtos e processos voltados para esta área. Contudo, observa-se que do montante destinado a este tipo de pesquisa, é escassa a quantia empregada em estudos de avaliação da toxicidade dos nanomateriais. Os Estados Unidos, como maiores investidores em nanotecnologia, destinam apenas 3% dos investimentos em estudos de avaliação de riscos da exposição aos nanomateriais. A União Europeia, ao contrário, tem dado exemplo, uma vez que boa parte dos 3,5 bilhões de euros investidos em nanotecnologia é empregada em pesquisas voltadas para a avaliação

da toxicidade e ecotoxicidade dos nanomateriais e questões de segurança em geral (DAVIES, 2007).

As diversas aplicações de materiais em nanoescala além do uso intensivo de produtos que os contenham indicam a inevitável exposição humana e ambiental aos nanomateriais. Em 2004 a produção anual de nanomateriais saltou de 1000 toneladas para 5000 em 2010, com a expectativa de que seja atingida a marca de 100.000 nos próximos 10 anos. Assim, é absolutamente justificável a preocupação sobre os possíveis riscos desses materiais ao ambiente e à saúde humana. No entanto, o investimento em pesquisas que avaliem a potencial toxicidade e ecotoxicidade dos nanomateriais é ínfimo frente à realidade dos riscos apresentados (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

Recentemente o governo brasileiro instituiu a Comissão de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável composta por pesquisadores em nanotecnologia (químicos, físicos, biólogos), além de representantes do direito, do Ministério da Saúde e do Meio Ambiente. A comissão possui, dentre outras finalidades, o objetivo de averiguar a real situação da nanotecnologia no Brasil, o que está sendo produzido, o que está sendo importado, se existe um controle da entrada de produtos no país, além de tornar conhecidos os resultados de pesquisas referentes aos riscos da exposição aos nanomateriais a fim de ser discutido o estabelecimento de uma regulamentação da atividade de nanotecnologia no território brasileiro (BRASIL, 2013).

Segundo Handy, Owen e Valsami - Jones (2008), a ecotoxicologia está dando os primeiros passos na compreensão dos riscos que as nanopartículas manufaturadas representam, uma vez que o comportamento dessas partículas no ambiente, como águas naturais, sedimentos e até mesmo no solo, é muito complexo e envolve vários processos que influenciam diretamente a sua toxicidade. Dentre os comportamentos possíveis, está incluso, a agregação e a habilidade de nanopartículas manufaturadas formarem formas estáveis na presença de água, a interação das nanopartículas com os epitélios de organismos, a influência de fatores abióticos na ecotoxicidade como, presença de matéria orgânica, alterações de pH e a presença de cátions. Ainda segundo os autores, os ambientes poluídos são alvo de preocupação, pois existe a possibilidade de que nanopartículas interajam com outros poluentes (metais, compostos orgânicos) adsorvendo-os em sua superfície,

reduzindo a biodisponibilidade desses compostos ou facilitando sua entrada no interior dos organismos.

O ambiente aquático é conhecido como um depósito natural de poluentes provenientes do solo, da atmosfera e do contato direto através de despejos de efluentes, por exemplo; isto faz com que esse ambiente seja particularmente vulnerável à contaminação por nanopartículas (SCOWN, 2009). Nesse contexto, a absorção de nanopartículas por animais aquáticos é alvo de preocupação por parte dos cientistas. As potenciais rotas de absorção incluem a ingestão direta ou entrada através de barreiras epiteliais como brânquias, órgãos olfatórios ou epitélio corporal (MOORE, 2006). Em nível celular, os mecanismos altamente desenvolvidos de internalização de substâncias no interior das células, permitem que eucariotos absorvam compostos tanto em nanoescala, como em microescala, através dos processos de endocitose e fagocitose, respectivamente (REJMAN *et al.*, 2004).

Um dos pressupostos fundamentais em ecotoxicologia de produtos químicos é a existência de uma estreita relação entre as propriedades físicas e químicas da substância no ambiente, a habilidade do organismo em absorvê-la, e os subsequentes efeitos tóxicos. Em particular, as nanopartículas quando em contato com o ambiente aquático podem formar agregados com a matéria orgânica presente (substâncias húmicas e fúlvicas) sendo estabilizadas na fase líquida. Isso sugere que organismos aquáticos são expostos às nanopartículas em suspensão e não diretamente ao químico em solução aquosa. No entanto, devido à pequena dimensão das nanopartículas, elas facilmente atravessam as lamelas branquiais de peixes, apresentando dessa forma, um risco de exposição tanto trófica - matéria orgânica em suspensão- quanto respiratória - entrada através das brânquias (HANDY *et al.*, 2008).

Os epitélios branquiais e intestinais de peixes são constituídos por uma camada densa de muco que contribui para a impermeabilidade da camada. O muco é, portanto uma solução viscosa de poliânions e é bem conhecida por sua capacidade de quelar cátions (atuam como “ímãs” eletrostáticos ao se prenderem à íons metálicos), especialmente íons de metais tóxicos, sendo que o transporte desses íons para o interior da célula é mediado por proteínas transmembrana (HANDY *et al.*, 2008).

Basicamente, a carga da superfície de nanopartículas e suas propriedades eletrostáticas não são fundamentalmente diferentes da carga de íons, em termos de

efeito biológico. Na verdade, as nanopartículas possuem uma carga policatiónica em sua superfície o que permite uma ligação mais rápida e mais forte às mucoproteínas (SMITHY *et al.*, 2007). Por outro lado a dimensão das nanopartículas não permite uma absorção mediada por transporte de íons como ocorre nos metais, ao invés disso acredita-se que nanopartículas são absorvidas por mecanismo de endocitose (MOORE, 2006) (FIGURA 1).

Estudos de veiculação de drogas mediado por nanopartículas em células do tecido muscular tem reafirmado a sugestão de que a entrada de nanopartículas na célula se dá por endocitose. Os pesquisadores observaram que a absorção é dependente da concentração e do tempo. Em altas doses houve uma redução da eficiência de absorção, indicando uma possível saturação. Após entrarem na célula, as nanopartículas foram transportadas por endossomos primários, e após, para endossomos secundários que se fundem com lisossomos. NO pH ácido dos endolisossomos a carga da superfície das nanopartículas é alterada e então elas escapam desses compartimentos entrando em contato com o citoplasma. Imagens de microscopia eletrônica revelaram que uma vez no citossol as nanopartículas interagiram com as membranas de organelas o que pode ocasionar a desestabilização dessas estruturas (PANYAM e LABHASETWAR, 2003).

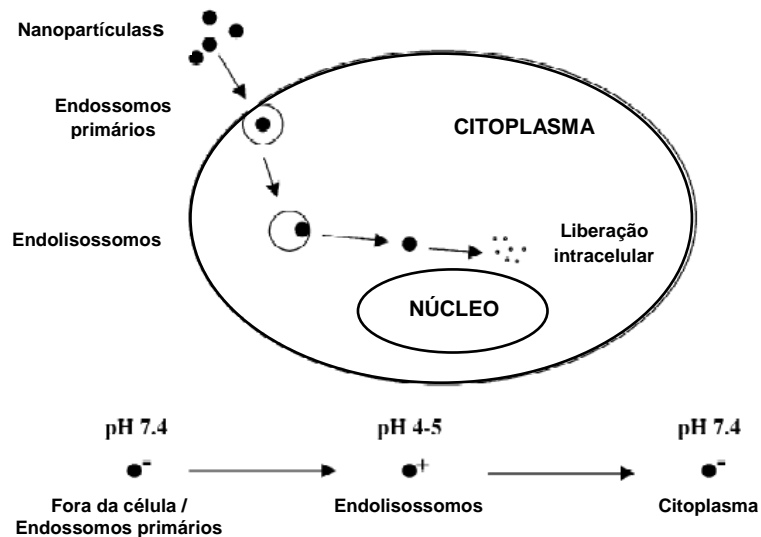


FIGURA 1. Ilustração do Mecanismo de absorção de nanopartículas mediado por endocitose.
Fonte: Adaptado de PANYAM e LABHASETWAR, 2003

Diante do fato de que a dimensão em nanoescala confere novas características supramoleculares resultando em interação direta com componentes celulares como membranas, transportadores de membrana, citoesqueleto, organelas

e até mesmo proteínas e ácidos nucleicos, e que dessa interação dependem as características físicas e químicas próprias de cada nanopartícula, então o problema da exposição aos nanomateriais assume um nível de complexidade maior (MOORE, 2006). No entanto, Moore (2006) afirma que é possível inferir que danos por estresse oxidativo serão observados como resultado da exposição à maioria das superfícies altamente reativas de nanopartículas, sendo possível presumir melhor esse processo pelo conhecimento já adquirido de estudos de estresse oxidativo em animais aquáticos expostos a outros poluentes.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que após a exposição a diferentes tipos de nanopartículas foi observada a geração de espécies de oxigênio e radicais livres, o que resultou em estresse oxidativo, peroxidação lipídica, diminuição de atividade mitocondrial e apoptose em uma variedade de tipos celulares. Os estudos sugerem que a toxicidade observada pode ser resultado tanto da interação de nanopartículas com as membranas celulares quanto da ação no interior do citossol. No caso de nanopartículas fotoativas como a de dióxido de titânio (Np TiO_2), a presença de radiação UV pode induzir a geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo em células, o que coloca em questão a segurança do uso de filtros solares que possuem nanopartículas em sua composição, uma vez que Np TiO_2 podem ser absorvidas a ponto de alcançar as camadas mais profundas da pele (NEWMAN, STOTLAND e ELLIS; SCOWN, 2009.)

Nesse contexto, Singh *et al.*, (2009), afirmam que espécies reativas de oxigênio podem indiretamente induzir danos no DNA, provocando quebras de fita dupla e simples, modificações de bases e formação de cross-link de DNA (ligações cruzadas), sendo que tais alterações, se não reparadas, tem o potencial de promover carcinogênese. Alternativamente, o autor acrescenta que outros mecanismos de ação indireta de nanopartículas podem induzir danos no material genético, como a interação com proteínas envolvidas no ciclo celular, por exemplo. Como mecanismo de ação direta, Singh *et al.* (2009) alertam para o fato de que o pequeno tamanho das nanopartículas lhes conferem propriedades genotóxicas imprevisíveis, e assim sendo, se essas partículas podem atravessar a membrana celular, provavelmente pelo mesmo processo, elas atravessariam também a membrana nuclear interagindo diretamente com a molécula de DNA, ou, se essa situação não ocorresse, uma vez no citossol, as nanopartículas podem danificar o DNA durante a divisão celular, pois nessa fase o material genético não está envolvido em uma membrana nuclear.

Dentre os estudos de toxicidade e ecotoxicidade de nanopartículas manufaturadas, já foi constatado gentoxicidade, citotoxicidade e estresse oxidativo *in vivo* em mamíferos e em estudos *in vitro* a partir de células humanas (BERMUDEZ *et al.*, 2004, BRUNNER *et al.*, 2006; ASHARANI *et al.*, 2009; LINDBERG *et al.*, 2009) estudos *in vitro* em peixes e vários outros animais aquáticos, (OBERDÖRSTER, 2004; SMITH, SHAW e HANDY, 2007; VEVERS e JHA, 2008; RAMSDEM *et al.*, 2009), insetos (POSGAI *et al.*, 2011), células vegetais (GHOSHE, BANDYOPADHYAY e MUKHERJEE, 2010) e em bactérias relevantes aos sistemas naturais (BRAYNER *et al.*, 2006).

A toxicocinética das nanopartículas ainda não é bem compreendida, mais tem se tornado cada vez mais forte a evidência de que suas propriedades físico-químicas exercem um papel central nos comportamentos de absorção celular e subsequentes efeitos biológicos. Existem ainda muitas incertezas quanto aos parâmetros que exerçam a maior influência nas respostas de toxicidade, mais até então se acredita que todos os fatores estejam envolvidos de igual modo na modulação das interações biológicas (SINGH *et al.*, 2009).

Segundo Scown (2009), os estudos de nanotoxicidade revelam claramente que vários parâmetros influenciam o destino e os efeitos de nanopartículas em células e em organismos vivos, dentre eles, o autor ressalta o tipo de partícula (partículas ultra-finas de metais, óxidos de metais, não metais e cerâmicas, nanomateriais de carbono, etc.), tamanho, área de superfície, estrutura cristalina, carga e química da superfície e estado de aglomeração no meio utilizado. Segundo Gullledge (2007) esses e outros parâmetros devem ser conhecidos previamente ao se realizar ensaios de toxicidade com nanopartículas.

A compreensão de que o tamanho das nanopartículas influencia na sua toxicidade já está bastante sedimentada. O tamanho das partículas representa um risco, pois esta propriedade governa a cinética das nanopartículas no organismo, como absorção, distribuição, metabolização e excreção (SINGH *et al.*, 2009). Quanto à forma, estudos tem mostrado que a morfologia de um nanomaterial pode influenciar muito sua rota de absorção. Nanopartículas esféricas tem se mostrado mais facilmente absorvidas do que as formas cilíndricas, enquanto que estas últimas tem a entrada nas células fortemente influenciada pela sua dimensão, as partículas de alto-aspecto (*high-aspect ratio*) são mais rapidamente absorvidas que as de baixo aspecto (*low-aspect ratio*) (CHITHRANI e CHAN, 2007; GRATTON *et al.*,

2008). Em todo caso, Singh *et al.*, (2009) acrescentam que a morfologia e o tamanho da nanopartícula são determinantes na definição da área de superfície; quanto menor o tamanho da partícula, menor o número de partículas por unidade de massa e conseqüentemente maior área de superfície. Os autores complementam que as formas esféricas apresentam maior área de superfície do que as de estrutura octogonal de mesmo tamanho, assim sendo, uma maior área de superfície confere uma maior reatividade ao material permitindo que reaja com membranas biológicas e biomoléculas, causando tanto danos diretos como indiretos através de estresse oxidativo.

Outra importante propriedade das nanopartículas que deve ser observada ao se realizar estudos de toxicidade é a capacidade que esses materiais têm de formar agregados. Dessa forma, é de vital importância a completa caracterização do nível de aglomeração em condições experimentais a fim de se evitar erros na interpretação de resultados, uma vez que no estado aglomerado pode não mais ocorrer estruturas em nanoescala e assim a absorção através das células ser reduzida. Singh *et al.*, (2009) , afirmam que esta informação não está presente em muitos trabalhos publicados, o que pode ser a causa fundamental da inconsistência e conflitos observados em resultados.

A carga e química da superfície, juntamente com fatores do meio como pH e força iônica, influenciam a formação de aglomerados, além de estarem relacionados com a absorção celular. Sabendo que as membranas biológicas são negativamente carregadas, nanopartículas carregadas positivamente representam um maior risco de provocar citotoxicidade quando comparadas com as carregadas com ânions. Em todo caso, não é possível estabelecer se a causa de morte celular está relacionada diretamente com a carga da superfície ou se é devido ao aumento da absorção das nanopartículas carregadas positivamente (NAN *et al.*, 2008). Nesse contexto, Singh *et al.*, (2009), ressaltam a possibilidade de uma maior interação das nanopartículas catiônicas com o DNA, uma vez que o mesmo é carregado negativamente.

1.3.1 Nanopartículas de dióxido de titânio

O dióxido de titânio (TiO₂) é encontrado naturalmente em três formas estruturais possíveis, duas de natureza tetragonal (anatase e rutilo) e outra, menos

comum, de natureza ortorrômbica (Broquite). A maior parte do TiO_2 é extraída do mineral ilmenita (FeTiO_3) o qual é encontrado em rochas metamórficas e ígneas (SKOCAJ *et al.*, 2011). As estruturas anatase e rutilo apresentam o mesmo sistema cristalino, no entanto a anatase forma pirâmides mais longas com o eixo vertical que o rutilo (FIGURA 2). O dióxido de titânio possui um índice de refração em ambas as formas estruturais que lhe permite ser ideal como pigmento opaco branco, propriedade que tem sido explorada pela indústria fazendo com que os pigmentos à base de chumbo sejam substituídos (PEREIRA 2010).

Em 2005 a produção mundial de dióxido de titânio foi de cerca de 5 milhões de toneladas. No ano de 2009 apenas 2,5% da produção correspondia à forma nanoparticulada, no entanto estima-se um aumento de 10% até 2015 e um crescimento exponencial para as próximas décadas; tal crescimento traz preocupações concernentes aos riscos representados pela abundância desse composto no ambiente (SKOCAJ *et al.*, 2011).

Em 1966 o dióxido de titânio foi adicionado à lista da FDA (*Food and Drugs Administration*) como um aditivo corante alimentar, sendo aplicado em laticínios, doces e coberturas, além de ser utilizado para maximizar o sabor de certos alimentos como vegetais secos, nozes, sopas, mostarda, sementes, cerveja e vinho. Como em nanoescala é transparente, o dióxido de titânio tem sido utilizado para retirar a umidade e oxigênio em vários alimentos (PEREIRA, 2010).

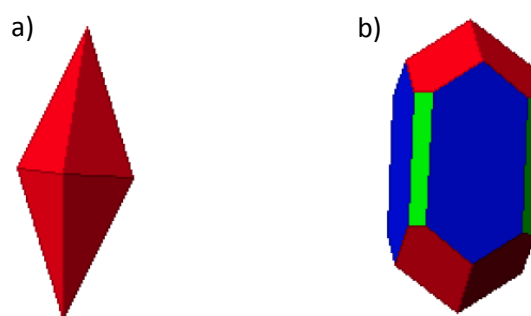


FIGURA 2. Formas estruturais do dióxido de titânio, em a) Anatase, b) Rutilo.
Fonte: PEREIRA, 2010

O uso de nanopartículas de óxidos de metais cresce de forma muito rápida; as de dióxido de titânio em especial são consideradas uma das mais importantes em fotocatalises devido à sua elevada estabilidade, baixa corrosão e propriedade fotocatalítica (PARK *et al.*, 2008). A propriedade fotocatalítica do dióxido de titânio é explorada para decomposição de matéria orgânica presente na água, onde o TiO_2

atua como um eficiente catalizador (ZHANG *et al.*, 2007). Ainda fazendo uso da mesma propriedade, as nanopartículas de dióxido de titânio são úteis na medicina nos tratamentos de carcinoma em células do cólon, atuando como fotossensibilizadores para terapias fotodinâmicas (ZHANG e SON, 2004). Além disso, a indústria de cosméticos, filtros-solares, aditivos para combustível, tintas, e corantes alimentícios tem explorado intensamente as propriedades do TiO_2 em nanoescala (AITKEN, CHAUDHRY e BOXALL, 2006; SCOWN, 2009).

Nanopartículas de dióxido de titânio são consideradas seguras para uso em filtros solares pela entidade americana FDA (*Food and Drugs Administration*), que desde 1999 permitiu o seu uso, no entanto, existem controvérsias quanto a segurança da aplicação desses produtos. Os filtros solares que contém nanopartículas de dióxido de titânio resolveram o problema da cor branca indesejada dos filtros tradicionais, criando uma textura menos viscosa, transparente e que é absorvida mais rapidamente pela pele (NEWMAN *et al.*, 2009) Dada a grande aceitação desses produtos por médicos dermatologistas e principalmente por parte dos consumidores, alguns estudos tem sido realizados questionando a segurança do uso de filtros solares que possuem nanopartículas de dióxido de titânio em sua composição relatando danos no DNA provocados por estresse oxidativo tanto em *in vivo* quanto *in vitro* (DUNFORD *et al.*, 1997, SERPONE, SALINARO e EMELINE, 2001; UCHINO *et al.*, 2002). Os filtros solares constituídos de dióxido de titânio são formulados com partículas ultrafinas de 20 a 50 nm que atuam como micro-refletores dispersando com eficiência as luzes UVB e UVA impedindo queimaduras solares enquanto permanecem invisíveis sobre a pele. Por outro lado o TiO_2 absorve a luz UV com a mesma eficiência com que reflete, catalisando assim a formação de radicais superóxidos e hidroxil que podem desencadear oxidações (JUDIN, 1993 em DUNFORD *et al.*, 1997).

Ambas as formas cristalinas, anatase e rutilo, são consideradas bons semicondutores de energia, sendo a anatase a forma mais ativa. Essas estruturas possuem energia equivalente a de uma luz com comprimento de onda capaz de promover uma alteração eletrostática na superfície da nanopartícula, de forma que ela se torne carregada com elétrons e alguns espaços com cargas positivas chamados de “furos” (h^+). Em solução aquosa esses elétrons reagem com o oxigênio (O^+) e os “furos” com radicais hidroxil (OH^+), formando radicais superóxido e hidroxil. (DUNFORD *et al.*, 1997).

A foto-oxidação do TiO_2 explica a sua toxicidade quando iluminado, e uma vez conhecida a habilidade desse composto em atravessar barreiras biológicas, inclusive a membrana nuclear, os estudos que examinem as consequências da presença de nanopartículas de TiO_2 nas células em especial para a molécula de DNA são muito importantes e urgentes (DUNFORD *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2007). Dentro do núcleo as nanopartículas de dióxido de titânio se agregam a proteínas levando a inibição da replicação, transcrição e proliferação celular (CHEN e MIKECZ, 2005).

Nesse sentido, os efeitos da exposição de nanopartículas, principalmente na forma anatase, têm revelado que elas podem interagir com o DNA tanto de forma direta quanto indireta. Como mecanismo de ação indireta, os estudos trazem o estresse oxidativo, a partir da geração de espécies reativas de oxigênio as quais interagem com o material genético provocando quebras. Por outro lado, vários autores tem demonstrado resultados de interação direta de NpTiO_2 com a molécula de DNA (SINGH *et al.*, 2009).

Park *et al.*, (2008) demonstraram que após adentrarem na célula, as Np TiO_2 se concentram na região perinuclear, que, curiosamente, foi a região onde os autores observaram a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). A partir da constatação de que as ERO foram geradas apenas na região onde as nanopartículas se encontravam os autores sugerem uma interação direta entre nanopartículas e biomoléculas.

Li *et al.*, (2010) realizaram um estudo *in vivo* com camundongos, a fim de verificar se as nanopartículas de TiO_2 interagem diretamente com o DNA. Para tanto os autores fizeram injeções intraperitoneais nos animais em várias concentrações de nanopartículas durante 14 dias e ao fim desse período o DNA foi extraído do fígado. As análises revelaram que o Ti havia se inserido entre os pares de base do DNA ou se ligado à nucleotídeos, essas interações provocaram alterações na conformação da molécula e, em altas doses foram observadas quebras.

Em contrapartida, muitos estudos tem revelado uma ação indireta de toxicidade ao DNA frente à exposição de Np TiO_2 . Testes *in vivo* em mamíferos tem constatado inflamação, fibrose, danos pulmonares, além de citotoxicidade e genotoxicidade (OBERDÜRSTER, 2000; RAHMAN *et al.*, 2002, WARHEIT *et al.*, 2007). Desse modo, sabendo que os efeitos observados de estresse oxidativo e inflamação são induzidos pela presença de espécies reativas de oxigênio, admite-se

que esses danos foram ocasionados por uma ação indireta das Np TiO_2 (SINGH *et al.*, 2009).

Rahman *et al.* (2002) observaram um aumento da frequência de micronúcleos provenientes de fragmentação cromossômica (clatogênicos) em fibroblastos quando expostos às nanopartículas de TiO_2 . Para tanto, foi utilizada uma coloração diferenciada do cinetócoro; os autores atribuíram as quebras observadas à geração de espécies reativas de oxigênio. Em todo caso, Singh *et al.* (2009) afirmam que a avaliação dos resultados torna-se limitada uma vez que a caracterização físico-química das nanopartículas utilizadas no estudo não foi realizada pelos pesquisadores.

Nanopartículas de dióxido de titânio na presença de luz transferem elétrons para substratos como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou compostos orgânicos clorinados gerando rapidamente, radicais hidroxil (VEVERS e JHA, 2008; REVES *et al.*, 2008). No entanto, Gurr *et al.* (2005) mostraram que partículas de anatase de tamanho entre 10 e 20 nm mesmo na ausência de luz, se mostraram tóxicas à células humanas do epitélio bronquial (BEAS-2B), induzindo dano oxidativo ao DNA, peroxidação lipídica, aumento na frequência de micronúcleos, além de aumento na produção de peróxido de oxigênio e óxido nítrico; o mesmo não foi observado para partículas maiores (>200 nm), sugerindo mais uma vez a importância do tamanho da partícula na determinação de toxicidade

Existe uma crescente preocupação de que substâncias antes consideradas inertes biologicamente passem a serem tóxicas no estado nanoparticulado, devido ao aumento de reatividade e facilidade de entrada na célula (REEVES *et al.*, 2008). Como já mencionado, o efeito do tamanho é considerado se não o mais importante, essencial para a determinação da toxicidade de nanopartículas, inclusive mais determinante do que a composição da partícula. Oberdürster *et al.*, (1992) mostraram que o nível de inflamação no tecido pulmonar de ratos estava associado ao tamanho da partículas, nesse estudo as partículas ultrafinas de TiO_2 foram mais tóxicas do que as de maior tamanho. Ainda nesse contexto, o TiO_2 , que é um composto considerado de baixa toxicidade, quando em escala nanométrica estudos têm comprovado que se torna altamente tóxico (OBERDÜRSTER, 2000).

Assim, Tan *et al.* (1996) citados por Zhang *et al.* (2007) afirmam que nanopartículas de dióxido de titânio usadas em filtros solares podem ser absorvidas

tão profundamente na pele até ao ponto de alcançar o sistema linfático, enquanto que partículas maiores (superiores a 1µm de diâmetro) não podem fazê-lo.

Estudos também têm mostrado que nanopartículas de dióxido de titânio podem atravessar a membrana de células vermelhas do sangue (ROTHEN – RUTISHAUSER *et al.*, 2006). Nesse estudo, as células foram incubadas com partículas ultrafinas de TiO₂ de diâmetro médio de 32 nm, os autores detectaram no interior de hemácias humanas partículas ultrafinas e alguns agregados, sendo que agregados de diâmetro superior à 200 nm foram visualizados próximos à membrana, mas não no interior das células. Apesar de concluírem no estudo que a entrada de nanopartículas na célula foi influenciada apenas pelo tamanho da partícula, o mecanismo detalhado de internalização dessas partículas em hemácias precisa ser melhor estudado, em todo caso os autores descartam as vias preferenciais para outros tipos celulares, fagocitose e endocitose (ROTHEN – RUTISHAUSER *et al.*, 2006).

Apesar de estudos em mamíferos afirmarem que nanopartículas de dióxido de titânio podem se acumular em alguns tecidos como fígado, rim, baço, pulmão, coração e cérebro (LI *et al.*, 2010), os detalhes precisos da distribuição corpórea e dos órgãos alvos para essas partículas permanecem desconhecidos e por vezes contraditórios (FEDERICI, SHAW e HANDY, 2007). As informações de estudos ecotoxicológicos são ainda mais limitadas sendo relatados poucos estudos de efeitos tóxicos da exposição de organismos aquáticos à NpTiO₂ (FEDERICI, SHAW e HANDY, 2007).

As análises realizadas em peixes confirmam alguns resultados observados em mamíferos de que os danos apresentados ao DNA por NpTiO₂ podem estar relacionados principalmente à estresse oxidativo. Federici, Shaw e Handy (2007) realizaram um estudo com trutas e os autores observaram alterações nos níveis de ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona nos tecidos do peixe. O TBARS é conhecidamente relacionado com eventos de peroxidação lipídica, enquanto que a glutathiona é uma enzima de ação anti-oxidante. O estudo também revelou danos inflamatórios nas brânquias dos animais expostos, resultado que Handy *et al.* (2008) atribuíram como imunotoxicidade frente à exposição de peixes e outros animais aquáticos às NpTiO₂. No entanto, os autores do estudo acrescentam que como o comportamento do metal titânio em peixes não é conhecido, torna-se inviável afirmar que a nanoescala representa uma potencialização de efeitos de exposição.

A situação apresentada do uso extensivo de nanopartículas de dióxido de titânio para as mais diversas aplicações torna inevitável a presença desses compostos nos ambientes aquáticos, e como fator agravante, pouco se sabe do comportamento desses nanomateriais na água, principalmente do potencial de transferirem outros compostos tóxicos coexistindo no mesmo ambiente. Nesse contexto, a contaminação por metais tóxicos torna-se ainda maior, tendo em vista sua elevada persistência no ambiente (ZHANG *et al.*, 2007).

Um risco concernente à disposição de nanopartículas de óxidos de metais no ambiente aquático tem sido alvo da preocupação de pesquisadores, que é a possibilidade da liberação de metais da superfície da nanopartícula. No caso do metal titânio, não é possível estabelecer as possíveis consequências biológicas, como já mencionado, devido à escassez de estudos de sua toxicidade em espécies de peixes (HANDY *et al.*, 2008). Curiosamente o TiO_2 é capaz de absorver outros metais tóxicos em sua superfície reduzindo assim a disponibilidade desses elementos na água (BARAKAT, 2005). Em todo caso, são necessários estudos mais detalhados do comportamento de Ti e TiO_2 no ambiente aquático assim como sua distribuição e toxicidade em peixes (HANDY *et al.*, 2008).

Zhang *et al.* (2008), testaram a influência da adsorção de cádmio em nanopartículas de dióxido de titânio e o potencial dessas partículas em facilitar o transporte de cádmio em carpas (*Cyprinus carpio*). Os autores observaram um aumento tanto da adsorção de cádmio nas nanopartículas, quanto um maior acúmulo do metal nos tecidos do peixe. Os resultados observados indicam uma sinergia das nanopartículas com o cádmio, o que possivelmente contribuiu para o transporte do metal para os tecidos do animal.

Em um estudo pioneiro, com dáfnias (*Daphnia magna*) e peixes (*Zebra fish*) Zhu *et al.* (2010) mostraram que nanopartículas de dióxido de titânio podem ser transferidas de um nível trófico para outro. Com essa evidência Skocaj *et al.* (2011) chamam a atenção para o foco que deve ser dado nos estudos ecotoxicológicos não apenas na concentração de nanopartículas no ambiente, mais também na sua bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação

A partir da realidade do crescente e contínuo uso e disposição de nanopartículas na natureza, estudos que avaliem os riscos de exposição à esses compostos são emergenciais e necessários. Assim como os demais produtos químicos, as rotas de exposição aos nanomateriais são inúmeras e nesse sentido

informações (eco) toxicológicas são importantes nos vários níveis, para organismos individuais, comunidades e ecossistemas (KAHRU e DUBOURGUIER, 2010).

Nesse contexto, a literatura revela que peixes são mais susceptíveis aos efeitos de estresse oxidativo do que células de mamíferos, justificando assim o uso de testes *in vivo* para a obtenção de resultados mais realísticos (SKOCAJ *et al.*, 2011).

1.4 Biomarcadores e Bioindicadores

Várias são as definições atribuídas ao termo biomarcador, no entanto no senso comum esse termo é utilizado em referência a qualquer efeito observado que reflita uma interação entre um sistema biológico e um risco potencial, o qual pode ser químico, físico ou biológico (WHO, 1993).

Biomarcadores são utilizados com frequência em monitoramentos ambientais e bioensaios para indicar possíveis alterações biológicas que possam estar relacionadas à exposição aos efeitos tóxicos de compostos químicos no ambiente. Nesse sentido, o conceito de biomarcadores é atribuído a respostas biológicas adaptativas frente a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, genéticas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (JESUS *et al.*, 2008).

De acordo com Who (1993), os biomarcadores podem ser subdivididos em três categorias, biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de susceptibilidade Segundo o autor, biomarcadores de exposição são úteis para confirmar e avaliar a exposição de indivíduos ou populações a uma substância fazendo uma relação entre a exposição ao meio e a dosagem do composto no organismo. Já os biomarcadores de efeito são aplicados quando são registrados alterações precoces ou efeitos adversos à saúde devido à exposição externa e absorção de um composto químico. Os biomarcadores de susceptibilidade auxiliam a elucidar variações nos graus de respostas para exposição á tóxicos observadas entre diferentes indivíduos. O autor acrescenta que a bioacumulação de compostos persistentes em tecidos de animais, como os metais tóxicos, por exemplo, pode ser considerada um biomarcador de exposição à esses compostos.

Biomarcadores são importantes na avaliação da qualidade de ambientes aquáticos, pois fornecem informações dos efeitos biológicos dos poluentes ao invés de uma simples quantificação dos níveis ambientais (MCCARTHY *et al.*, 1999). O uso de biomarcadores tem por finalidade verificar de forma preditiva alterações induzidas pelos poluentes em processos celulares e bioquímicos. A identificação dos biomarcadores permite colocar em evidência precocemente o risco da poluição antes do surgimento de alterações irreversíveis na fisiologia dos organismos, sobretudo antes que as populações e comunidades, e até mesmo todo o ecossistema, sejam afetados ou encontrem-se comprometidos (MIRANDA, 2006).

Dentre os marcadores moleculares e celulares, Bombail *et al.* (2001) citam os adutos de DNA, aberrações cromossômicas, quebras no DNA, frequência de micronúcleos e outras anomalias nucleares.

O efeito tóxico de químicos lançados no ambiente para a integridade e funcionamento do DNA tem sido investigado em muitos organismos sob diferentes condições (BOMBAIL *et al.*, 2001). Peixes estão dentre os organismos mais indicados para o monitoramento de corpos hídricos, pois são encontrados virtualmente em qualquer local no ambiente aquático, além de desempenharem um importante papel na cadeia alimentar como carreador de energia de baixos níveis tróficos para níveis superiores (VAN DER OOST, BEYER e VERMEULEN, 2003).

O termo bioindicador é usado para se referir à espécies sentinelas que atuam como primeiros indicadores de efeito da contaminação de seu habitat (ADAMS, 2002). O uso de bioindicadores para o monitoramento ambiental traz informações a respeito da resposta biológica (vegetal ou animal) que um determinado ambiente apresenta na presença de poluentes (AKAISHI, 2004).

Peixes são considerados bons bioindicadores de poluição aquática, pois têm distribuição considerável em vários ecossistemas, são sensíveis o bastante para detectar poluentes mesmo em baixas concentrações, são organismos adequados para trabalhos em laboratório e em populações naturais a captura de indivíduos não altera a conservação da espécie. Todas essas características devem ser observadas para a escolha de um bioindicador (VAN DER OOST, BEYER e VERMEULEN, 2003).

Acrescido a isso, peixes exercem um importante papel na cadeia trófica; esses animais possuem uma intrínseca relação com todos os níveis tróficos, respondendo a efeitos crônicos, acumulativos e persistentes por meio da ingestão

de organismos contaminados habitantes do mesmo ambiente e sendo fonte de alimento para vários animais inclusive para populações humanas (LEMOS *et al.*, 2008). A partir da propriedade conhecida dos peixes de bioacumular poluentes em seus tecidos, os efeitos da contaminação aquática podem se estender a outros organismos, colocando em risco inclusive a saúde humana (MARTINEZ e CÓLUS, 2002).

Outro fator importante ao se optar pelo uso de peixes como bioindicadores é a semelhança fisiológica e histológica do seu sistema orgânico com o de outros vertebrados, o que possibilita que esses animais respondam aos xenobióticos por vias semelhantes às de mamíferos. Essa possibilidade permite aos especialistas testarem as propriedades de agentes químicos e físicos como genotóxicos, citotóxicos, carcinogênicos e teratogênicos (VILLELA *et al.*, 2003).

Efeitos genotóxicos e citotóxicos em peixes podem ser avaliados por várias técnicas, dentre elas se destacam o Teste do Micronúcleo Pisceo, Aberrações Cromossômicas, Ensaio Cometa e Ensaio de Difusão do DNA.

1.4.1 Biomarcadores Genéticos

Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa, ou SCGE (*Single Cell Gel Eletrophoresis*), foi aplicado primeira vez há mais de 15 anos e hoje é considerado o teste mais popular para detectar quebras de fitas de DNA em animais aquáticos, tanto em exposições *in vivo* quanto *in situ*. Dentre as inúmeras vantagens que o Ensaio Cometa oferece como ferramenta de diagnóstico de genotoxicidade, as principais são: a) o dano é detectado em células individuais, b) a maioria dos tipos celulares eucarióticos são sensíveis ao ensaio, c) apenas um pequeno número de células são necessárias para análise, d) é um teste mais rápido e mais sensível que os demais para a avaliação de quebras de fita de DNA, e) as quebras ocorrem durante a exposição, permitindo que sejam avaliadas respostas recentes da biota (FRENZILI, NIGRO e LYONS, 2009).

SINGH *et al.* (1988) adaptaram a técnica do Ensaio Cometa, anteriormente realizada em condições neutras, realizando a eletroforese em meio alcalino, o que

promoveu um desenovelamento mais preciso da molécula de DNA expondo sítios álcali-lábeis. Essa modificação aprimorou a técnica anterior uma vez que permitiu além da detecção de quebras em fita duplas, também em fitas simples e alterações de sítios álcali-lábeis virtualmente em praticamente qualquer célula eucariótica (DHAWAN *et al.*, 2009).

O princípio do Ensaio Cometa consiste fato de que durante a eletroforese o DNA da célula sem fragmentação migrará inteiro, em conjunto, sendo então visualizado um nucleóides intacto. Em caso de danos na molécula de DNA, fragmentos de diversos tamanhos serão produzidos, e assim os fragmentos maiores tendem a migrar mais lentamente quando comparados com os menores. Nesse processo, serão formados nucleóides com uma estrutura que lembra uma calda de cometa, daí o nome dado ao teste (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990). Os nucleóides são classificados em escores de 0 a 4 de acordo com o dano observado. (FIGURA 3).

O Ensaio Cometa tem sido tão bem aceito como ferramenta de avaliação de genotoxicidade devido principalmente a sua capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas. Essas lesões genômicas depois de serem processadas podem resultar em mutação, no entanto, diferentemente das mutações, as lesões detectadas pelo Ensaio Cometa são passíveis de correção (TICE, 1995).

Por outro lado, as críticas á técnica são realizadas no sentido de que não são identificadas quebras referentes a uma exposição específica, ao contrário do que é observado para a formação de adutos de DNA, os quais são relacionados a presença de poluentes específicos. A despeito disso, a simplicidade, eficiência e sensibilidade do Ensaio Cometa frente às sofisticadas e onerosas análises de adutos de DNA faz deste teste uma importante ferramenta de avaliação de genotoxicidade (LEE e STEINERT, 2003).

Em peixes, o Ensaio Cometa é normalmente realizado em tecido sanguíneo devido ao fácil acesso e também à composição de 97% de eritrócitos. No entanto, outros tecidos foram testados, visando avaliar os efeitos genotóxicos tecido – específico de algumas substâncias. Os tecidos mais investigados além do sangue são o fígado (o principal órgão do metabolismo), brânquias (devido ao contato contínuo com a fase aquosa) e rim (o tecido hematopoiético em peixes) LEE e STEINERT, 2003.

Diversos xenobióticos tem sido avaliados quanto à sua habilidade em induzir danos ao DNA a partir do Ensaio Cometa, dentre eles metais, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, herbicidas, nanopartículas, dentre outros (LEE e STEINERT, 2003). Ramsdorf *et al.*, (2009) testaram Chumbo inorgânico (Pb^{+2}) em diversas doses em *Hoplias malabaricus* verificando aumento de quebras no DNA tanto para o tecido sanguíneo quanto para o tecido hepático. Em um estudo *in vitro* Vevers e Jha (2008) avaliaram o potencial de Nanopartículas de Dióxido de Titânio em induzir quebras na molécula de DNA a partir de estresse oxidativo utilizando o Ensaio Cometa como ferramenta, como resultado foi evidenciado aumento de danos na maior dose administrada ($50\mu\text{g ml}^{-1}$) o que não foi verificado na mesma dose em outros testes como o Teste de Micronúcleo.

Ensaio de Difusão do DNA

O Ensaio de difusão foi descrito por Singh (2000) e, segundo o autor é possível com esse ensaio, fazer distinção clara entre células apoptóticas e células em processo de necrose. A apoptose é uma via de morte celular programada em animais e plantas e tem um importante papel na remodelagem de tecidos durante o desenvolvimento e a idade, no entanto a apoptose pode também ocorrer em resposta à danos celulares como a exposição a agentes tóxicos ou doenças, como câncer por exemplo. A necrose, por outro lado, representa uma morte celular não programada (SINGH, 2000).

O Ensaio de Difusão pode ser considerado uma técnica complementar ao Ensaio Cometa, uma vez que este último se torna limitado em fazer distinção quanto à origem das quebras identificadas na análise. No Ensaio Cometa são detectadas além das quebras de fita simples, também as de dupla fita as quais são associadas principalmente a processos de necrose e apoptose. Fragmentos de pequeno peso molecular são gerados durante a apoptose e necrose e difundem na matriz de agarose resultando em um diâmetro nuclear 3 vezes maior do que o tamanho médio normal do núcleo, como consequência da alta dispersão do DNA durante o Ensaio de Difusão (DÍAZ *et al.*, 2009).

Baseado nas diferenças estruturais entre núcleos com necrose a apoptose, Singh (2000) descreveu que é possível ser feita a distinção entre esses núcleos.

Embora alguns pesquisadores tenham encontrado dificuldade em estabelecer essa distinção (GICHNER *et al.*, 2005), a aplicação do Ensaio de Difusão tem proporcionado resultados satisfatórios em alguns estudos de contaminação ambiental (NIGRO *et al.*, 2002, FRENZILLI *et al.*, 2004)

Singh (2000) esclarece que células em apoptose quando submetidas ao Ensaio de Difusão evidenciam um gradiente circular de DNA granular com uma zona central densa e mais clara, tendo uma região externa nebulosa dando a aparência de uma auréola devido ao tamanho dos nucleossomos de DNA. Ao contrário, os núcleos em difusão em processo de necrose mostram um contorno externo bem definido e uma aparência clara. O contorno acentuado em células necróticas pode ser devido ao maior tamanho de fragmento do DNA, em células apoptóticas ocorre a difusão de fragmentos menores. Por outro lado os núcleos com danos, no entanto que não resultaram em apoptose ou necrose podem também ser distinguidos, esses núcleos são maiores e com projeções de DNA em todos os lados (FIGURA 4).

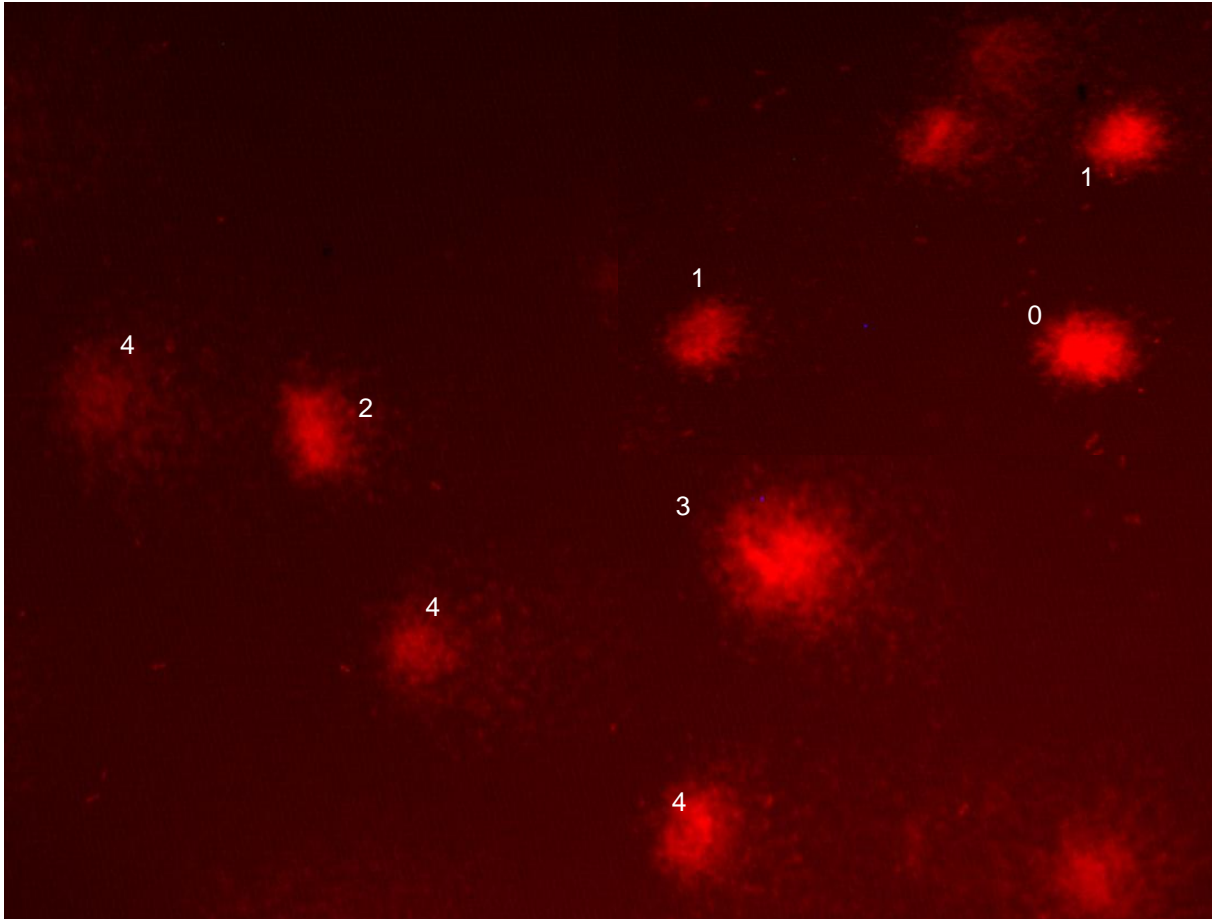


FIGURA 3. Captura de imagem em microscópio de epifluorescência de uma lâmina de Ensaio Cometa em eritrócitos. Os danos estão classificados em escores de 0 a 4, de acordo com o nível de quebras no DNA, comparando a proporção de material genético presente na “cabeça” e na “calda” do cometa.

Fonte: A autora.

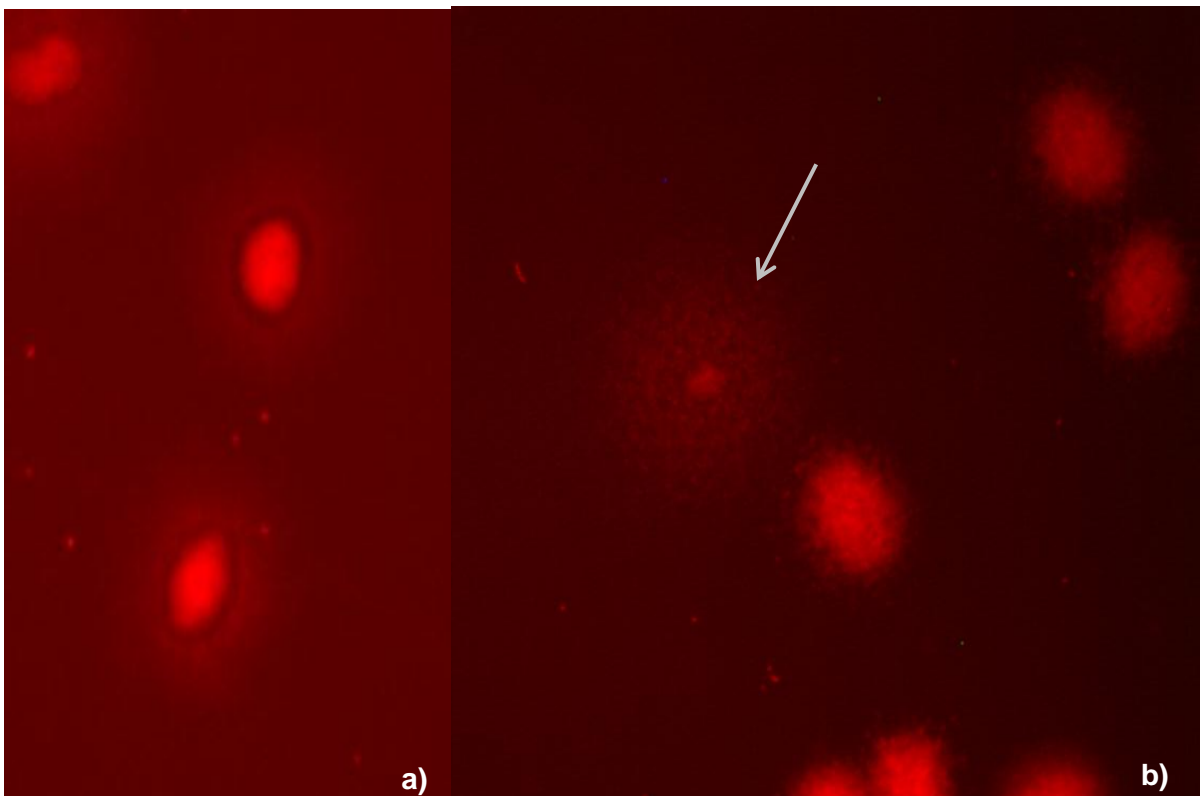


FIGURA 4. Captura de imagem em microscópio de epifluorescência de uma lâmina de Ensaio de Difusão. Em a) nucleóides em necrose, em b) a seta indica um nucleóide em apoptose, em volta nucleóides com pouco dano aparente.

Fonte: A autora.

Teste do Micronúcleo Písceo

Originalmente, o Teste do Micronúcleo foi desenvolvido para estudos *in vivo* dos efeitos de produtos químicos em células eritrocitárias policromáticas obtidas da medula óssea do fêmur de camundongos. (SCHMID, 1975). Mais tarde, Hoofman e Raat (1982), adaptaram o teste para células sanguíneas de peixes, essa modificação da técnica original passou a ser conhecida como *Piscine Micronucleus Test*- Teste de Micronúcleo Písceo.

O Teste do Micronúcleo é utilizado por toda a comunidade científica para estimar danos citogenéticos induzidos por agentes químicos ou físicos. Embora a maioria dos trabalhos publicados tenha feito uso dessa análise principalmente para mamíferos, especialmente roedores, o teste é uma ferramenta muito útil para detectar propriedades genotóxicas de compostos presentes no ambiente aquático (UDROIU, 2006). Em particular, o Teste do Micronúcleo Písceo tem sido aplicado com sucesso para avaliar o potencial de genotóxico de diversos compostos, como chumbo (FERRARI et al., 2004; RAMSDORF et al., 2007), mercúrio (ÇAVAS, 2008) derivados de petróleo (Lemos et al., 2008), nanopartículas de dióxido de titânio (VEVERS e JHA, 2008).

Uma das vantagens em se aplicar o Teste de Micronúcleo Písceo, é que ele pode ser realizado a partir de qualquer população de células em proliferação sem depender do cariótipo envolvido. Como peixes possuem um número elevado de cromossomos, e muitas vezes de pequeno tamanho, a contagem de metáfases para avaliação de aberrações cromossômicas torna-se laborosa e dificultada, enquanto que o estudo de micronúcleos é simples e possível de ser realizado em eritrócitos, devido ao fato destes serem nucleados (HAYASHI et al., 1998).

Sendo assim, o Teste do Micronúcleo em eritrócitos do sangue periférico é uma técnica rápida, sensível e confiável para detectar danos no DNA. Os micronúcleos são cromossomos inteiros ou parte deles que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular (FEREIRE et al., 2008). Alguns critérios são estabelecidos para a correta identificação de micronúcleos, eles devem estar formados, visivelmente separados do núcleo principal da célula, possuir um tamanho que corresponde de 1/5 a 1/20 do tamanho deste núcleo e ainda não ultrapassar 1/3 do tamanho do núcleo principal.

Devem ainda, possuir bordas distinguíveis e com a mesma refração do núcleo principal. No caso de peixes que possuem tamanho normalmente reduzido dos cromossomos, essa proporção de tamanho não pode ultrapassar de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo (CARRASCO, TILBURY e MYERS, 1990; AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Para a análise, devem ser contadas e analisadas entre 1 mil e 2 mil células, observando a integridade das membranas citoplasmáticas e nucleares, desconsiderando para a análise as células que estejam sobrepostas ou danificadas (AL SABTI e METCALFE, 1995).

Algumas substâncias ao interagirem com os cromossomos provocam quebras (clastogênicas) outras afetam os componentes do fuso ou da região centromérica impedindo que cromossomos inteiros sejam incorporados na célula filha durante a divisão celular (aneugênicas). Em todo caso nem todos os produtos genotóxicos são clastogênico, pois muitos induzem à formação dos micronúcleos por sua capacidade de afetarem o fuso (HEDDLE *et al.*, 1991). O Teste do Micronúcleo por sua vez permite serem detectados químicos tanto com ação clastogênica quanto aneugênica, sendo uma ferramenta importante para prever mecanismos de interação de xenobióticos com o material genético (LEMOS *et al.*, 2008).

Como em qualquer técnica, o Teste de Micronúcleo apresenta algumas desvantagens que levam a uma subestimativa de danos e falta de sensibilidade. Este ensaio não é capaz de detectar as não-disjunções mitóticas quando não ocorrem perdas de cromossomos na anáfase, as aberrações cromossômicas provocadas pro rearranjos também não podem ser detectadas, assim como translocações ou inversões se não forem originados fragmentos acêntricos. (METCALFE, 1989).

Algumas alterações na morfologia nuclear também podem ser observadas durante as análises. BOMBAIL *et al.*(2001) afirmam que essas alterações ocorrem quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina.

A detecção de alterações na morfologia do núcleo é considerada um biomarcador de efeito genotóxico, e, no entanto, essa análise pode complementar a investigação do potencial de genotoxicidade de uma substância (ÇAVAS e ERGENE-GOZÜKAR, 2005). Em geral essas alterações morfológicas são classificadas como

(1) *Blebbbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina, (2) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para *Blebbbed*, (3) *Vacuolated*: núcleos que apresentam no seu interior uma região que lembra vacúolos, (4) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma, geralmente com uma profundidade considerável no núcleo (CARRASCO, KAREN e MYERS, 1990). (FIGURA 4).

Micronúcleos incompletos, também chamados de brotos nucleares, são semelhantes ao micronúcleo na estrutura, forma e tamanho, e estão ligados ao núcleo principal da célula por um segmento ou haste de cromatina. Tem sido sugerido que eles surgem da eliminação de DNA amplificado e possivelmente de complexos de reparo. Outra alteração observada é a frequência de células binucleadas, que é um indicador de divisão celular anormal devido a um bloqueio da citocinese, o que resulta em desequilíbrio genético nas células e pode estar envolvido no mecanismo de carcinogênese (FERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

Quanto á coloração das células para análise existe dois métodos tradicionalmente utilizados, a coloração com azul de metileno/Giemsa e a realizada com o corante fluorescente laranja de acridina. A laranja de acridina, ao contrário do azul de metileno, é capaz de se ligar tanto a DNA quanto RNA e sob fluorescência é possível fazer distinção a qual molécula o corante está ligado. Ao se ligar ao DNA a laranja de acridina emite fluorescência intensa de cor amarelo esverdeada e quando se liga ao RNA emite fluorescência intensa de cor vermelha. Essa propriedade permite que seja feita distinção entre eritrócitos jovens ou imaturos (eritrócitos policromáticos) e eritrócitos maduros (eritrócitos normocromáticos) (ÇAVAS; GÖZÜKARA, 2005, McGAHON *et al.* 1995).

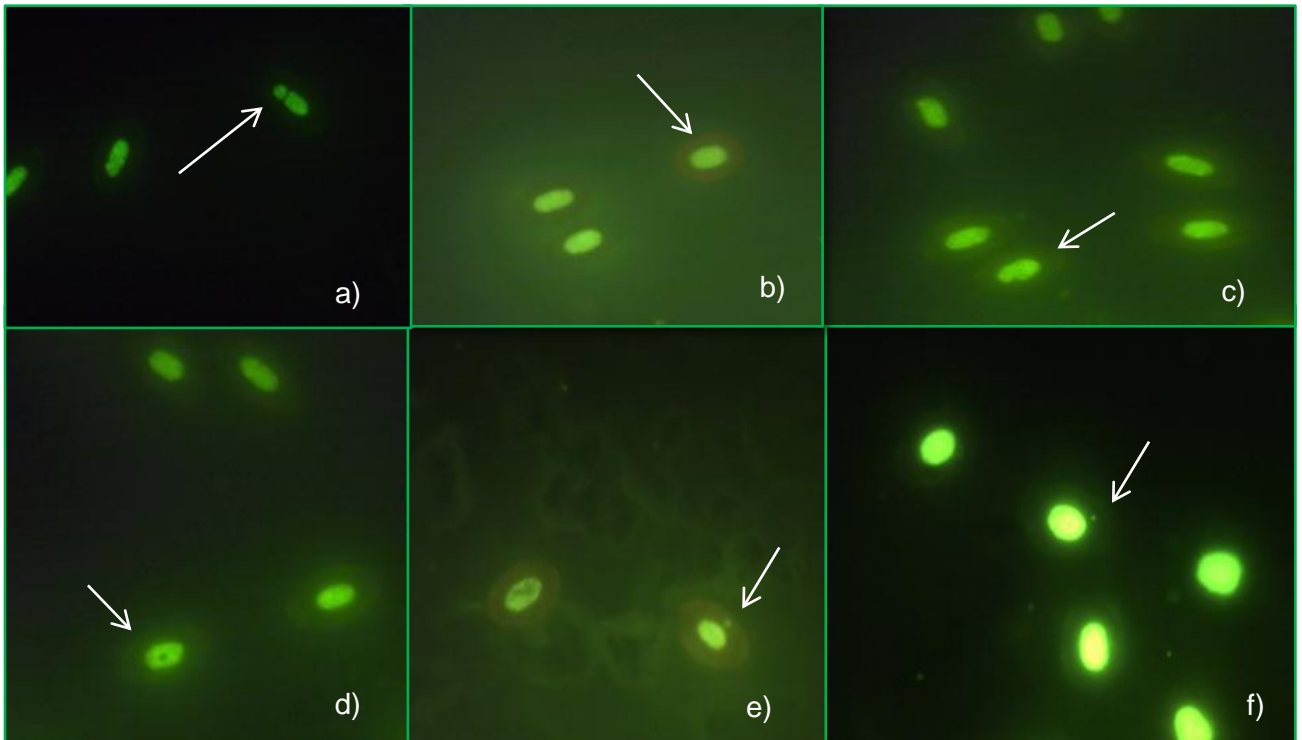


FIGURA 5. Lâminas coradas com Laranja de Acridina para análise do Teste de Micronúcleo Písceo, incluindo Alterações Morfológicas Nucleares (AMN) e Frequência de Eritrócitos Imaturos. Seta indica, em a) eritrócito Binucleado (BN), b) Eritrócito Imaturo Normal, c) Eritrócito maduro com a AMN *notched*; d) Eritrócito maduro apresentando a AMN do tipo *vacuolated*; e) Eritrócito imaturo apresentando micronúcleo, f) eritrócito maduro apresentando micronúcleo, nas proximidades, eritrócitos normais.

Fonte: A autora.

1.4.2 Biomarcadores bioquímicos

Enzimas anti-oxidantes

Por substância antioxidante pode-se entender uma substância química que inibe o processo de oxidação; do ponto de vista biológico antioxidantes podem ser definidos como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Assim, em um conceito mais amplo, o sistema de defesa antioxidante do organismo compreende uma gama de substâncias que atuam em diferentes níveis. O sistema de defesa primário é constituído de uma primeira linha de defesa, formada por substâncias que impedem a geração de espécies reativas, ou sequestram-nas, de forma a impedir sua

interação com alvos celulares, neste conceito estão incluídas as enzimas antioxidantes. (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

As espécies reativas de oxigênio (ERO), apesar de serem essenciais a diversos processos fisiológicos na resposta celular, em algumas ocasiões, o aumento na produção dessas espécies pode resultar em danos ao organismo. Assim, o equilíbrio entre a formação e a remoção de ERO deve ser regulado; em uma situação de desequilíbrio, decorrente da diminuição de antioxidantes endógenos, devido tanto a menor ou maior formação quanto ao maior consumo, favorece lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, que em casos extremos resulta em morte celular (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Os sistemas biológicos têm desenvolvido durante a sua evolução, mecanismos antioxidantes, enzimáticos ou não, adequados para proteger componentes celulares de danos oxidativos. O desequilíbrio entre a geração e neutralização de ERO em um organismo é chamado de estresse oxidativo (VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

As espécies reativas de oxigênio são geradas no citoplasma, mitocôndrias, retículo endoplasmático, membrana celular e núcleo de todas as células aeróbicas. Dentre as ERO se destacam o ânion-radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-) (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A molécula de DNA é uma estrutura susceptível a danos oxidativos por ERO, a natureza polianiónica do DNA proporciona um substrato favorável para a infiltração através das membranas e aderência de íons metálicos facilitando a formação de radicais hidroxila. Além disso, a heterogeneidade do DNA, permite o ataque de radicais OH^- incluindo bases nitrogenadas e grupo açúcar-fosfato, esses radicais reagem 5 vezes mais com as bases nitrogenadas do que com a estrutura do ácido nucléico (VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Espécies reativas de oxigênio induzem quebras de fita simples e dupla no DNA, além de modificação de bases (formação de adutos 8-hidroxideoxiguanosina) e cross-link, todos esses danos, se não reparados tem o potencial de iniciar e promover carcinogênese (SINGH *et al.*, 2009)

A oxidação de proteínas envolve várias ERO e o resultado são modificações oxidativas de cadeias laterais de aminoácidos, clivagem de peptídeos, reação de peptídeos com lipídeos e produtos oxidados de carboidratos, além da formação de derivados carbonil de proteínas. Proteínas oxidadas se acumulam durante o tempo e

em situações de patologias como a Arteriosclerose (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

O ambiente aquático recebe substancialmente cargas diárias de poluentes que tem o potencial de causar estresse oxidativo em organismos aquáticos, frente a isso, estudos que façam uso de biomarcadores enzimáticos como forma de monitoramento de ambientes aquáticos são essenciais e necessários (COGO *et al.*, 2009).

Compostos metálicos como o Pb são conhecidamente capazes de induzir estresse oxidativo (DAGGETT *et al.*, 1998), estudos recentes revelam também a potencialidade de nanopartículas, devido a sua alta reatividade, provocar danos à molécula de DNA principalmente pelo mecanismo de estresse oxidativo (VEVERS e JHA, 2008), estes estudos tem se baseado, dentre outros biomarcadores, na avaliação dos níveis de enzimas antioxidantes principalmente no fígado (órgão do metabolismo, inclusive de xenobióticos) antes e após exposição a um agente genotóxico (DAGGETT *et al.*, 1998; PRAKASH, NAIR e CHOI, 2011)

Os mecanismos de defesa contra agentes tóxicos nos organismos é baseado na biotransformação desses compostos, alterando assim sua toxicidade e impedindo que interajam com as membranas celulares e biomoléculas. Esse metabolismo de detoxificação possui diversos sistemas enzimáticos que atuam em inúmeros tipos de substratos, grande parte destas enzimas tem em comum a função de converter substâncias tóxicas em menos tóxicas e converter químicos lipofílicos em hidrofílicos de modo a facilitar sua excreção (GOGO *et al.*, 2009).

A biotransformação de compostos químicos é dividida em duas partes, as reações de Fase I e II, que geralmente ocorrem sequencialmente. Primeiro têm-se as reações catabólicas (oxidação, redução, hidrólise) que podem obter produtos ainda mais tóxicos que os originais, um radical hidroxila pode ser inserido nessa fase e atuará como ponto de ataque para a reação de conjugação da Fase II. A Fase II consiste em reações anabólicas que envolvem a conjugação de alguns grupos de moléculas resultando em compostos inativos na maioria dos casos (VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

As espécies reativas de oxigênio produzidas pelo metabolismo celular são mantidas em baixas concentrações intracelulares pela ação das enzimas Glutathione peroxidase (Glutathione- S-transferase), Catalase e Superóxido dismutase (SOD). Em situações de exposição à metais a enzima antioxidante Metalotioneína desempenha

um importante papel na detoxificação desses compostos (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

GST-transferase

A enzima glutationa S-transferase (GST) é essencial na defesa contra danos de compostos potencialmente reativos, conjugando-os para posteriormente serem eliminados do organismo pertencente à fase II do metabolismo. Nesse processo a glutiona atua como cofator se ligando à substratos hidrofóbicos lipofílicos durante a Fase II da biotransformação (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008) A glutationa (GSH) é um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico, possuindo um radical sulfidrila na sua estrutura e se apresenta na forma reduzida de tiol (GSH) e na oxidada (GSSG) A glutationa é um sequestrador de radical hidroxila, sendo que deficiências na síntese dessa proteína nas células animais acarretam em consequências graves, como a lise de eritrócitos (COGO *et al.*, 2009).

As enzimas GST são caracterizadas pela sua alta especificidade a substratos com pouca afinidade, tendo, portanto, baixa eficiência catalítica. Tal propriedade confere a GST um importante papel como agente desintoxicante de amplo espectro de compostos tanto endógenos quanto exógenos. A atividade desta enzima possui relação direta com o estresse oxidativo já que utiliza a GSH como cofator e que também participa da degradação do H_2O_2 através da enzima GPx, (glutaciona peroxidase) sendo um importante biomarcador. A molécula de GPx é um tetrâmero, contendo um átomo de selênio por unidade, nas células cerca de 2/3 da sua atividade encontra-se no citoplasma e 1/3 nas mitocôndrias, sendo o fígado o órgão mais ativo, seguido do rim, pâncreas e cérebro (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

Catalase

A enzima Catalase é um componente de defesa antioxidante primário, e exerce duas funções importantes: a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água e oxigênio ($H_2O + O_2$) e a oxidação de compostos hidrogenados, como

metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis, com o consumo de um mol de peróxido (COGO *et al.*, 2009).

A Catalase está localizada nos peroxissomos do fígado e rins e em microperoxissomos em outras células. Esta enzima tem especificidade pelo peróxido de hidrogênio não atuando sobre peróxidos orgânicos. Pelo fato de estar compartimentalizada nos peroxissomos, exceto nos eritrócitos, e ter baixa afinidade pelo H_2O_2 , a catalase é importante em condições nas quais ocorre a formação de altas concentrações de peróxido de hidrogênio. A catalase ocorre em alta afinidade no fígado e em baixa atividade no cérebro (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

Alterações na atividade da Catalase têm sido aplicadas como um importante biomarcador em estudos de contaminação aquática, principalmente pelo fato de que mediante estresse oxidativo a atividade dessa enzima aumenta consideravelmente (VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

Superóxido dismutase

A função da Superóxido dismutase foi descoberta em 1969 por McCord & Fridovich, o que permitiu um grande avanço das pesquisas na área de toxicidade do oxigênio. A SOD está presente em todos os organismos aeróbicos, principalmente no fígado, e catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-) (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

A reação da SOD se inicia com a redução da enzima pelo ânion superóxido resultando na formação de oxigênio, a enzima então reduzida reage novamente com outro íon superóxido formando como produto, o peróxido de hidrogênio, que na sequência, sofre dismutação pela catalase ou outra peroxidase, originando água e oxigênio molecular (COGO *et al.*, 2009).

Metalotineína

As Metalotineínas são proteínas de baixo peso molecular encontradas no citoplasma e no núcleo celular, principalmente no fígado, rins e intestino. Essas proteínas são ricas em cisteína e têm a capacidade de ligar íons metálicos como

zinco (Zn^{2+}), Cobre (Cu^{2+}), Chumbo (Pb^{2+}) e Mercúrio (Hg^{2+}), pela associação destes íons com os grupos tiol (-SH) da cisteína. A síntese de Metalotineínas pode ser estimulada por metais como o cádmio, zinco, chumbo e cobre e por compostos não metálicos como o etanol, agentes alquilantes e quelantes (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

Dentre as funções propostas para Metalotineínas incluem o armazenamento de metais pesados sob a forma não tóxica, a regulação do metabolismo celular de cobre e zinco, assim como a absorção intestinal destes metais. As ações antioxidantes das Metalotineínas se baseiam na quelação de íons cobre, liberação de zinco o que pode contribuir para inibição de peroxidação lipídica, e ao alto conteúdo de grupos tiol da proteína que interagem com radicais superóxido e radicais hidroxila (JURCZUK, MONIUSZKO-JAKONIUK e BRZÓSKA, 2006)

1.5 Genotoxicidade em peixes

A Genotoxicidade é o setor da genética que estuda os processos que alteram a base genética da vida, quer seja em sua estrutura físico-química, o DNA (ácido desoxirribonucleico), processo este classificado de mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético ao nível celular ou orgânico, identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese. Estas três especialidades são agrupadas em uma área de estudo porque um mesmo processo ou produto pode produzir os três efeitos, a mutagênese, a carcinogênese e a teratogênese (EDDTMANN, 2003).

Efeitos genotóxicos podem ser definidos como efeitos potencialmente prejudiciais ao material genético que ocorrem como consequência de um dano induzido ao DNA. Esses danos podem ser endógenos, devido ao ataque de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, gerados a partir de produtos de processos metabólicos normais ou os danos ao DNA podem ser exógenos, por exposição à radiação, toxinas naturais e químicos antropogênicos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

Entre os agentes externos, os compostos químicos capazes de causar dano ao DNA podem ser agrupados em quatro classes de acordo com o tipo de dano produzido: (1) químicos que agem diretamente no DNA; (2) químicos nos quais o

seu metabólito causa dano ao DNA; (3) químicos que aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio e (4) químicos que inibem a síntese e o reparo do DNA (LEE e STEINERT, 2003).

As genotoxinas dos tipos 1, 2 e 3 podem gerar danos no DNA seguindo as seguintes etapas, primeiro com a formação de adutos de DNA (ligação covalente de um elemento ou composto químico com as bases nitrogenadas), depois, alterações secundárias no DNA via produção de espécies reativas de oxigênio, e por último, alteração da atividade celular o que pode provocar mutações, proliferação celular levando ao desenvolvimento de doenças como o câncer (MONSERRAT *et al.*, 2007).

Como exemplos de lesões produzidas por agentes químicos e físicos, Lee e Steinert (2003) citam as bases modificadas, ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteína. Ainda de acordo com os autores, as quebras na fita do DNA podem ser introduzidas diretamente por compostos genotóxicos através da indução de apoptoses ou necroses, secundariamente por meio da interação com espécies reativas de oxigênio ou outros intermediários reativos ou ainda como consequência da inativação de enzimas de reparo.

Quando uma lesão no DNA não sofre reparo ela pode desencadear uma cascata de consequências biológicas à nível celular, tecidual, atingindo o organismos como um todo alcançando comunidades e até populações (LEE e STEINERT, 2003).

Danos no DNA em organismos aquáticos podem estar associados à redução do crescimento, desenvolvimento anormal e diminuição da sobrevivência de embriões e adultos (BARBOSA *et al.*, 2010). Vários estudos tem relacionado a indução de aberrações cromossômicas, quebras na fita de DNA e eritrócitos micronucleados com atraso no desenvolvimento embrionário e mudanças na estrutura e função do sistema endócrino-reprodutivo em peixes (HAGGER *et al.*, 2005; LINEY *et al.*, 2006). Tais mudanças podem levar à diminuição do tamanho populacional ou até mesmo à extinção da espécie (LINEY *et al.*, 2006).

Análises físico-químicas são frequentemente utilizadas a fim de detectar a presença de produtos químicos potencialmente prejudiciais ao ambiente aquático e à saúde humana. No entanto, segundo a identidade química de muitas substâncias liberadas na natureza, bem como os seus metabólitos, ainda não são bem

caracterizados, fazendo-se necessário avaliar o impacto causado pela exposição a esses agentes químicos nos organismos aquáticos e consumidores de água.

Os procedimentos químicos por si só não são suficientes para caracterizar as consequências biológicas da exposição a produtos tóxicos, devido ao fato de serem limitados para prever efeitos sinérgicos e antagônicos de contaminantes em misturas complexas ambientais (BARBOSA *et al.*, 2010). Os ensaios biológicos são capazes de caracterizar os efeitos de contaminantes ambientais causados pela exposição aguda ou crônica, sem o conhecimento prévio dos componentes químicos presentes na água (OHE *et al.*, 2004).

Nesse contexto, Frenzili *et al.* (2009) afirmam que análises de genotoxicidade em organismos aquáticos são métodos adequados e sutis para avaliar a contaminação de genotóxicos no ambiente, sendo capazes de detectar os efeitos desses compostos em uma grande variedade de espécies mesmo em baixas concentrações. Muitos biomarcadores genéticos têm sido utilizados como ferramentas para a detecção de exposição e para avaliação dos efeitos de poluição em peixes, dentre eles se destacam quebras de DNA, frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares além da identificação de aberrações cromossômicas. (BARBOSA *et al.*, 2010).

Frequentemente pesquisadores têm recorrido a experimentos laboratoriais a fim de compreender os efeitos tóxicos de xenobiontes. O uso de bioensaios em estudos de toxicologia é interessante por permitir estudar os efeitos de determinados contaminantes em organismos de forma isolada ou associados, minimizando a influência das variáveis ambientais e possibilitando o estudo da especificidade relativa de algumas respostas com os contaminantes. Apesar dos resultados obtidos através de bioensaios não poderem ser extrapolados diretamente para o ambiente, eles cooperam com uma base de dados que auxilia na compreensão de fatores que interferem na saúde dos organismos, e/ou alterem as condições do próprio ambiente em que vivem (AKAISHI, 2004).

Nesse sentido, ensaios com animais vivos possibilitam várias vias de administração da substância em estudo, quer seja trófica, hídrica ou até mesmo através da injeção direta do contaminante no animal. Os bioensaios com organismos vivos permitem a detecção de alterações de comportamento frente a exposição a um contaminante além da avaliação dos efeitos em órgãos ou tecidos específicos, em células germinativas ou somáticas, assim como diferenças entre contaminações

crônicas ou agudas. Estas possibilidades de comparações fornecem uma gama de resultados que reproduzem, o mais próximo possível, as condições de uma exposição dos seres humanos a estas substâncias (RABELO-GAY, RODRIGUES e MONTELEONE-NETO, 1991).

O gênero *Astyanax* – (*Astyanax serratus*)

Peixes do gênero *Astyanax* pertencem à família Characidae e à ordem Characiformes. Seguem as respectivas posições taxonômicas (FINK e FINK 1981):

CLASSE - Osteichthyes

SUBCLASSE - Actinopterygii

INFRACLASSE - Teleostei

SUPERORDEM - Osthariophysi

SÉRIE - Otophysi

SUBSÉRIE - Characiphysi

ORDEM - Characiformes

FAMÍLIA – Characidae:

A ordem Characiformes contempla um dos maiores grupos de peixes de água doce, com pelo menos 1674 espécies já identificadas em 270 gêneros (NELSON, 2006), no entanto esse número pode ser subestimado (MOREIRA, 2007). A família Characidae é a maior e mais complexa dentre as famílias da ordem Characiformes, compreendendo cerca de 30 subfamílias e aproximadamente 250 gêneros (BRITSKI; SATO e ROSA, 1988). Espécies pertencentes a esta família são amplamente distribuídas em praticamente todos os ambientes de água doce e sendo encontradas nos continentes americano e africano (LUCENA, 1993)

O gênero *Astyanax*, no qual estão inclusos os lambaris ou piabas, é considerado o maior grupo de peixes da subfamília Tetragonopterinae e é um gênero dominante na América do Sul. Eigenmann (1927) identificou 74 espécies vivendo em águas continentais brasileiras. Muitas espécies do gênero *Astyanax* são morfologicamente similares e sua separação tem sido historicamente difícil (Melo, 2001), formando um complexo do ponto de vista taxonômico (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004).

Em um estudo recente, Garavello e Sampaio (2010) identificaram cinco novas espécies de peixes do gênero *Astyanax* na bacia do Rio Iguaçu na fronteira dos estados do Paraná e Santa Catarina. As espécies se diferenciam das demais, por características como forma dos dentes, número de cúspides, distância entre o terceiro infraorbital e o pré-opérculo, contagens de escamas da linha lateral, séries longitudinais de escamas, rastros branquiais e diferenças morfométricas na cabeça e tronco. Algumas espécies do gênero *Astyanax* presentes na bacia do Rio Iguaçu são consideradas endêmicas, não ocorrendo nos rios da bacia do Rio Paraná. Os autores acreditam que o elevado endemismo dessas espécies nessa bacia hidrográfica estaria relacionado ao longo período de isolamento causado pelas Cataratas do Iguaçu, evento que separou o Rio Iguaçu do Rio Paraná no passado geológico diversificando assim a ictiofauna de Characiformes e diferenciando-a em relação à da bacia do Rio Paraná.

Dentre as espécies identificadas, está *Astyanax serratus*, que se diferencia das demais do gênero *Astyanax* por características de dentição, estrutura e localização das nadadeiras, coloração prateada pendendo para um ligeiro tom amarelado, mancha humeral escura e arredondada com um prolongamento vertical fraco e estreito. As fêmeas são maiores que os machos. O nome *serratus*, do Latim *serra*, *serratilis* = *serrae* foi escolhido em alusão às várias estruturas que lembram serras na nadadeira pélvica de machos (GARAVELO e SAMPAIO, 2010) (FIGURA 3).

Lambaris são altamente utilizados para consumo humano, porém apresentam médio valor comercial devido ao seu pequeno tamanho. Por outro lado, possuem grande valor ecológico como espécie forrageira, tendo papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas. Esses peixes são considerados transformadores de partículas orgânicas em proteína, que por sua vez deverá alimentar aves e peixes pertencentes a níveis tróficos superiores, como os piscívoros (GODOY, 1975 citado por RAMSFORF, 2007).

Em todo caso lambaris são de grande importância devido ao seu volume de captura e relevância na pesca esportiva além de servirem como fonte alimentar às populações ribeirinhas. Esses peixes são considerados relativamente tolerantes frente à degradação ambiental e juntos, esses motivos fazem dos lambaris bastante relevantes enquanto bioindicadores de contaminação (BARBIERI *et al.*, 1992).



Figura 6. Exemplos de *Astyanax serratus*, (Characidae).
Fonte: A autora.

2. JUSTIFICATIVA

A biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente. A fonte de toda essa contaminação é muito diversa, indo desde efluentes industriais, processos agrícolas, derrames acidentais e não acidentais de lixos químicos (metais tóxicos, compostos orgânicos e inorgânicos) além de resíduos domiciliares que acabam por chegar a rios e mares, gerando a contaminação dos ecossistemas aquáticos.

Com a introdução de novas substâncias químicas nos corpos hídricos, utilizadas principalmente no melhoramento de processos industriais, a dimensão do impacto ao meio ambiente e os possíveis danos provocados aos ecossistemas, populações e indivíduos se torna imensurável.

Nesse sentido a nanotecnologia surge como um dos mais promissores avanços industriais contribuindo para a melhoria dos padrões de vida da sociedade, e gerando expectativas na solução de problemas ambientais além do tratamento de doenças, sendo muito útil na medicina. Apesar dessas contribuições, os riscos ao ambiente e à saúde humana da presença de materiais em nanoescala na natureza causam preocupação e são pouco conhecidos.

Existe a possibilidade de que nanopartículas de óxidos de metais possam interferir no transporte de outros metais tóxicos coexistindo no mesmo ambiente, seja este externo ou no interior de organismos. E assim, produtos químicos que em condições naturais não seriam capazes de atravessar membranas biológicas passem a fazê-lo na presença de nanopartículas, interagindo com membranas, organelas, proteínas e ácidos nucleicos.

Apesar do uso controlado, o metal Chumbo ainda é muito utilizado na indústria sendo encontrado em relativa abundância na natureza. Assim, a partir da propriedade conhecida das nanopartículas de óxidos de metais em se associar à metais tóxicos e da genotoxicidade já conhecida do Chumbo, o risco da presença desses produtos nos ambientes aquáticos é real e alvo de preocupação por parte de especialistas.

Diante do uso intenso e da conseqüente geração de resíduos contendo nanopartículas, os ambientes aquáticos inevitavelmente atuam como depósito desses produtos, sendo os efeitos de exposição de animais aquáticos pouco

conhecidos. A genotoxicidade do Chumbo em peixes tem sido amplamente divulgada na literatura, por outro lado, pouco se sabe a respeito dos mecanismos pelos quais nanopartículas induzem genotoxicidade nesses animais. Estudos em mamíferos relatam danos ao DNA induzidos principalmente por estresse oxidativo.

Assim, em estudos de avaliação de genotoxicidade, o uso de biomarcadores genéticos associados à biomarcadores bioquímicos são ferramentas úteis permitindo uma compreensão ampla das respostas dos organismos.

Em conformidade com esses fatos, estudos que busquem avaliar respostas de organismos frente à exposição à nanopartículas e também da associação desses materiais com outras substâncias químicas são relevantes e emergentes, podendo contribuir para a regulamentação do uso de nanopartículas e nanomateriais e assim amenizar os riscos ao ambiente e à saúde humana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os danos à molécula de DNA induzidos por Chumbo inorgânico (PbII), Nanopartículas de Dióxido de Titânio e a associação destes em tecido sanguíneo e hepático de *Astyanax serratus*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência de danos ao DNA em *Astyanax serratus* após exposição aguda (96h) via injeção intraperitoneal de Pb (NO₃)₂ na dose de 40 mg/kg através do Ensaio Cometa nos eritrócitos circulantes e nas células do tecido hepático e do Teste de Micronúcleo Písceo nos eritrócitos circulantes.

- Comparar a frequência de danos ao DNA em *Astyanax serratus* após exposição aguda (96h) via injeção intraperitoneal de nanopartículas de dióxido de titânio nas doses de 50µg /kg, 5µg/kg e 0,5µg/kg através do Ensaio Cometa nos eritrócitos circulantes e nas células do tecido hepático e do Teste de Micronúcleo Písceo nos eritrócitos circulantes.

- Avaliar a resposta no DNA em *Astyanax serratus* após exposição aguda (96h) via injeção intraperitoneal da associação dos dois contaminantes em todas as doses, através do Ensaio Cometa nos eritrócitos circulantes e nas células do tecido hepático e do Teste de Micronúcleo Písceo nos eritrócitos circulantes.

-Avaliar a citotoxicidade dos xenobióticos, 40 mg/kg de Pb (NO₃)₂ e de 0,5µg/kg, 5µg/kg e 50µg/kg de Nanopartículas de Dióxido de Titânio, isolados e em associação através da frequência de apoptose e necrose nos eritrócitos circulantes e no tecido hepático e da relação de eritrócitos policromáticos e normocromáticos da circulação periférica.

-Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes GST S-transferase, Superóxido Desmutase, Catalase e Metalotineína, em *Astyanax serratus* após exposição aguda (96h) via injeção intraperitoneal a 40 mg/kg de Pb (NO₃)₂, 0,5µg/kg, 5µg/kg e 50µg/kg de nanopartículas de dióxido de titânio e às associações dos contaminantes.

- Quantificar e comparar a quantidade de chumbo bioacumulado no tecido sanguíneo dos animais contaminados via injeção intraperitoneal a 40 mg/kg de Pb II e daqueles contaminados com as associações de Pb (NO₃)₂ e as três concentrações de nanopartículas.

- Avaliar se há aumento nos danos do DNA e nos danos citológicos quando os peixes foram contaminados com os xenobióticos em associação e apenas com o Pb (NO₃)₂.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão apresentados em capítulo, o qual corresponde a um artigo científico em fase de construção para publicação.

As referências bibliográficas citadas tanto na introdução geral como no capítulo, estão descritas no final do trabalho.

CAPÍTULO I

GENOTOXICIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO EM *Astyanax serratus*
(CHARACIDAE) EXPOSTOS AO CHUMBO INORGÂNICO (Pb II) E
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO₂) ISOLADOS E EM
ASSOCIAÇÃO.

Introdução

O uso de nanopartículas de óxidos de metais cresce de forma muito rápida; as de dióxido de titânio em especial são amplamente aplicadas em diversos setores, como catalisadores na decomposição de matéria orgânica presente na água, (ZHANG *et al.*, 2007), na medicina como fotossensibilizadores em terapias fotodinâmicas e como veículo de drogas para células e tecidos específicos (ZHANG e SON, 2004). A indústria de cosméticos, filtros-solares, aditivos para combustível, tintas, e corantes alimentícios também tem explorado intensamente as propriedades do TiO₂ em nanoescala (AITKEN, CHAUDHRY e BOXALL, 2006; SCOWN, 2009). Nanopartículas manufaturadas são definidas como materiais propositalmente produzidos para atividades humanas na escala de 100 nm ou menos (BAALOUSHA *et al.*, 2008).

As diversas aplicações de nanopartículas além do uso intensivo de produtos que as contenham indicam a inevitável exposição humana e ambiental, sendo dessa forma absolutamente justificável a preocupação sobre os possíveis riscos ao ambiente e à saúde humana (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

O ambiente aquático é conhecido como um receptor natural de poluentes provenientes do solo, da atmosfera e do despejo de efluentes industriais e domésticos, isto faz com que esse ambiente seja particularmente vulnerável à contaminação por nanopartículas (SCOWN, 2009). Nesse contexto, a absorção de nanopartículas por animais aquáticos é alvo de preocupação por parte dos cientistas. As potenciais rotas de absorção incluem a ingestão direta ou entrada através de barreiras epiteliais como brânquias, órgãos olfatórios ou epitélio corporal (MOORE, 2006).

A dimensão em nanoescala confere novas características supramoleculares às nanopartículas, o que permite que sejam internalizadas nas células, resultando em interações diretas com componentes celulares como membranas, transportadores de membrana, citoesqueleto, organelas e até mesmo proteínas e ácidos nucleicos, tais interações dependem de características físicas e químicas próprias de cada nanopartícula (MOORE, 2006).

Os efeitos da exposição à nanopartículas de dióxido de titânio, têm revelado que elas podem interagir com o DNA tanto de forma direta quanto indireta. Como mecanismo de ação indireta, os estudos trazem o estresse oxidativo, a partir da

geração de espécies reativas de oxigênio, e a interação com proteínas envolvidas no ciclo celular (RAHMAN *et al.*, 2002; WARHEIT *et al.*, 2007). Por outro lado, vários autores tem demonstrado resultados de interação direta de NpTiO_2 com a molécula de DNA, induzindo alterações na conformação da molécula e quebras em doses maiores (PARK *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2010). Espécies reativas de oxigênio podem indiretamente induzir danos no DNA, provocando quebras de fita dupla e simples, modificações de bases e formação de cross-link de DNA (ligações cruzadas), sendo que tais alterações, se não reparadas, tem o potencial de promover carcinogênese (SINGH *et al.*; 2009).

A possibilidade da liberação de metais da superfície da nanopartícula é outro risco associado à disposição de nanopartículas de óxidos de metais no ambiente, no entanto, no caso do metal titânio, não é possível estabelecer as possíveis consequências biológicas, devido à escassez de estudos de sua toxicidade em espécies de peixes (HANDY *et al.*, 2008). Por outro lado, o TiO_2 é capaz de absorver outros metais tóxicos em sua superfície reduzindo assim a disponibilidade desses elementos na água, ou ainda facilitando sua entrada no ambiente celular (BARAKAT, 2005).

O risco representado pela presença do metal Chumbo coexistindo no mesmo meio que nanopartículas de dióxido de titânio é real, uma vez que esse metal ainda é bastante utilizado em diversas aplicações industriais (CAPARETO, 1999). Estudos a partir de diferentes sistemas biológicos têm sido publicados fazendo referência aos efeitos da exposição ao Chumbo, sendo apresentado como neurotóxico, nefrotóxico e responsável por causar danos no sistema cardíaco (RABITTO, 2004; PATRICK, 2006). Além de efeitos carcinogênicos, teratogênicos, aberrações cromossômicas, citotoxicidade e genotoxicidade (JHONSON, 1998; FERRARO *et al.*, 2004; CESTARI *et al.*, 2004; RAMSDORF *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2011).

Peixes são bons bioindicadores de poluição do ambiente aquático, pois seu sistema orgânico possui semelhanças fisiológicas e histológicas com o de outros vertebrados, o que possibilita que esses animais respondam aos xenobióticos por vias semelhantes às de mamíferos. Essa possibilidade permite aos especialistas testarem as propriedades de agentes químicos e físicos como genotóxicos, citotóxicos, carcinogênicos e teratogênicos (VILLELA *et al.*, 2003).

Efeitos genotóxicos e citotóxicos em peixes podem ser avaliados por várias técnicas, dentre elas se destacam o Teste do Micronúcleo Písceo, Aberrações Cromossômicas, Ensaio Cometa e Ensaio de Difusão do DNA.

Compostos metálicos como o Pb são conhecidamente capazes de induzir estresse oxidativo (DAGGETT *et al*, 1998), estudos recentes revelam também a potencialidade de nanopartículas, devido a sua alta reatividade, de provocar danos á molécula de DNA principalmente pelo mecanismo de estresse oxidativo (VEVERS e JHA, 2008), estes estudos tem se baseado, dentre outros biomarcadores, na avaliação dos níveis de enzimas antioxidantes principalmente no fígado (órgão do metabolismo, inclusive de xenobióticos) antes e após exposição a um agente genotóxico (DAGGETT *et al*, 1998; PRAKASH, NAIR e CHOI, 2011). As espécies reativas de oxigênio produzidas pelo metabolismo celular são mantidas em baixas concentrações intracelulares pela ação das enzimas Glutathione- S-transferase, Catalase e Superóxido dismutase (SOD). Em situações de exposição a metais a proteína Metalotineína desempenha um importante papel na detoxificação desses compostos (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

A partir da realidade do crescente e contínuo uso e disposição de nanopartículas na natureza, e tendo como agravante a presença de compostos persistentes como os metais tóxicos, estudos que avaliem os riscos de exposição a esses compostos são emergenciais e necessários. A literatura revela que peixes são mais susceptíveis aos efeitos de estresse oxidativo do que células de mamíferos, justificando assim o uso de testes *in vivo* para a obtenção de resultados mais realísticos (SKOCAJ *et al.*, 2011).

Nesse sentido, esse estudo se propôs a avaliar os efeitos genotóxicos, citotóxicos e estresse oxidativo de nanopartículas de dióxido de titânio e do Pb (NO₃)₂ administrados isoladamente e em associação, a partir de injeções intraperitoneais em peixes da espécie *Astyanax serratus* em um ensaio agudo de 96h.

Material e Métodos

Design experimental

Foram adquiridos 120 peixes da espécie *Astyanax serratus* (Characiformes, Characidae) em uma piscicultura comercial sem histórico de contaminação ou fonte capaz de fazê-lo. O estabelecimento é devidamente licenciado pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP) apresentando o número de licença 14722.

Os peixes foram transportados até o Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, no Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, aonde se seguiu um período de aclimatação de 30 dias. As condições de luminosidade, temperatura e aeração foram devidamente controladas e os animais alimentados diariamente.

Uma semana antes de ser dado início ao experimento os animais foram transferidos aleatoriamente para aquários de 108 litros de capacidade mantendo o controle das mesmas condições anteriormente mencionadas. Cada aquário representou um grupo experimental, contendo 15 animais cada.

As contaminações foram através de injeções intraperitoneais. Os grupos foram subdivididos em: grupo controle negativo, grupo contaminado com Pb (NO₃)₂ na dose de 40 mg/kg, grupos contaminados com Nanopartículas de Dióxido de titânio (NpTiO₂) nas doses de 50 µg/kg, 5 µg/kg e 0,5 µg/kg, três grupos contaminados em associações de 40 mg/kg de Pb (NO₃)₂ com as doses de Nanopartículas, 50 µg/kg, 5 µg/kg, 0,5 µg/kg, totalizando 8 grupos.

Os grupos dos contaminantes associados foram submetidos à injeções intraperitoneais de 40 mg Pb (NO₃)₂ e após 24h, à injeções de Nanopartículas nas respectivas doses de cada grupo, 50 µg/kg, 5 µg/kg e 0,5 µg/kg. O período total de exposição foi de 96h, ao fim desse tempo, os animais foram anestesiados e sacrificados para a retirada dos tecidos necessários ao experimento. No período de 24h que antecederam o sacrifício dos animais a alimentação foi suspensa.

O sangue foi coletado por punção cardíaca com o auxílio de um hematócrito heparinizado, parte do volume foi destinado à realização do Ensaio Cometa e Ensaio de Difusão do DNA, e o restante (com exceção dos grupos de nanopartículas isoladas) foi utilizado para a análise química de quantificação de Chumbo. O tecido

hepático foi extraído e utilizado para a realização do Ensaio Cometa e para a análise de atividades de enzimas antioxidantes.

Preparo das soluções

Foi preparada uma solução de Chumbo na concentração de 2mg/L a partir do composto nitrato de chumbo $Pb(NO_3)_2$ diluído em água destilada.

Foram utilizadas nanopartículas de dióxido de titânio (Sigma-Aldrich) com as seguintes especificações: estrutura cristalina de anatase < 25 nm, pureza de 99.7% de metal traço. Por não haver especificação do tempo de sonicação ideal, a solução estoque de nanopartículas (5mg/L) foi preparada segundo Federici, Shaw e Handy (2007). A solução foi processada em um sonicador tipo banho-maria (40 Khz de Frequência, Unique - UCS 800A), em um ciclo total de 6 horas. Esta solução foi utilizada para as injeções na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e diluída para as concentrações de 0,5 mg/ml e 0,05 mg/ml utilizadas para as demais doses (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Imediatamente antes de serem injetadas nos animais, as soluções passaram por mais um ciclo de sonicação de 30 minutos utilizando uma caneta sonicadora.

As doses administradas de $NpTiO_2$ não foram referenciadas por trabalhos anteriores, tendo em vista que a maioria dos estudos de genotoxicidade em peixes com $NpTiO_2$ são *in vitro* ou via exposição hídrica (FEDERICI, SHAW E HANDY; ZHANG *et al.*, 2007; VEVERS E JHA, 2008).

A dose administrada de 40 mg/kg de $Pb(NO_3)_2$ foi baseada no estudo de Ramsdorf *et al.* (2009), a qual é intermediária entre as doses que induziram danos ao DNA utilizadas pelos autores.

Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio

Á critério de caracterização, uma amostra em pó das nanopartículas ($NpTiO_2$) foi analisada no Laboratório de Superfícies e Interfaces do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná para a identificação da química da superfície e do tamanho médio das partículas antes e após a dispersão. A técnica utilizada foi a Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X.

A dispersão foi verificada em microscopia eletrônica de transmissão (MET), no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (FIGURA 9).

A estrutura cristalina foi identificada por Difração de Raios X (DRX), no Laboratório de Ópticas de Raios X e Instrumentação, do Departamento de Física da Universidade Federal do Paraná.

Ensaio Cometa

A técnica utilizada para o Ensaio Cometa foi a descrita por Singh *et al.*, (1988) com modificações segundo Ferraro *et al.*, (2004) e Cestari *et al.*, (2004).

Os tecidos hepático e sanguíneo foram armazenados ao abrigo da luz em soro bovino fetal. As lâminas previamente limpas com etanol absoluto foram imersas em agarose normal (NMP -1,5%), de forma que fosse produzida sobre elas uma camada fina de agarose. Para o preparo das lâminas com tecido sanguíneo, foi utilizado 10µl de sangue adicionados a 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMP-0,5%). Para a confecção das lâminas do tecido hepático, o fígado foi desagregado com a ajuda de um homogeneizador Potter à 1500 rpm. O preparo das lâminas do tecido hepático foi segundo Ramsdorf *et al.* (2009), aonde 15 µl da suspensão celular foi adicionada à 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMP-0,5%). Os passos seguintes foram semelhantes para ambos os tecidos.

A suspensão celular foi depositada sobre as lâminas cobertas com agarose normal e em seguida cobertas com lamínula e levadas à refrigeração; após aproximadamente 30 minutos, as lamínulas foram gentilmente retiradas e as lâminas imersas em uma solução de lise por 24 horas. A solução de lise é composta por uma alta concentração de sais e detergentes que possibilitam que as membranas celulares sejam rompidas e todo o conteúdo celular seja liberado, permanecendo apenas o material genético. Completado o período de exposição à solução de lise as lâminas foram dispostas uma ao lado da outra, em uma cuba de eletroforese e imersas em uma solução tampão alcalina (pH >13), por 30 minutos. Essa etapa é necessária para que ocorra a desnaturação do DNA, que mesmo após exposto à solução de lise, mantém-se condensado por proteínas não-histônicas. Em seguida foi iniciada a corrida de eletroforese por 25 minutos, nesse processo uma corrente

elétrica (25 volts e 300 mA) atravessa as lâminas permitindo que o DNA possa migrar no sentido da corrente. Se houverem quebras elas migrarão em velocidades diferentes dependendo de seu tamanho; a diferença na velocidade de migração possibilita que os nucleóides com danos formem uma estrutura de calda semelhante a um cometa. Para cada peixe foram analisados 100 nucleóides usando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA da seguinte forma: classe 0 (sem dano aparente), classe 1 (dano pequeno), classe 2 (dano médio), classe 3 (dano extenso) e classe 4 (dano máximo). Os escores foram calculados pela soma obtida após a multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo número da classe.

Ensaio de Difusão do DNA

A técnica utilizada para o Ensaio de difusão do DNA foi a descrita por Singh (2000). O Ensaio de difusão permite a detecção e diferenciação de células em processo de apoptose e necrose. Apoptose, do grego, “deixar cair fora”, é a morte celular programada em tecidos de um organismo. Por outro lado, a necrose, do grego “morte”, está associada a inflamações.

A metodologia do Ensaio de Difusão é semelhante ao Ensaio Cometa, com exceção da etapa de eletroforese. Após a desnaturação do DNA em tampão alcalino, prossegue-se com a neutralização das lâminas e a coloração com brometo de etídio para a análise em microscópio de epifluorescência.

Na diferenciação entre núcleos apoptóticos e necróticos são observados os seguintes parâmetros: o núcleo em apoptose possui um contorno indefinido, sem qualquer fronteira clara devido ao tamanho nucleossomal do DNA em difusão. Núcleos de células necróticas são maiores e mal definidos, com uma clara delimitação externa do DNA. As células apenas com DNA danificado, sem terem iniciado um processo de necrose ou apoptose, são facilmente identificadas, apresentando um núcleo em tamanho maior e com uma projeção de DNA em volta.

Teste do Micronúcleo Písceo

Para realização do Teste do Micronúcleo Písceo a partir do corante fluorescente Laranja de Acridina (LA), foi empregada a técnica descrita Ueada *et al.* (1992). Com essa análise foi identificada a frequência de micronúcleos (MN), alterações morfológicas nucleares (AMN) e a frequência de eritrócitos imaturos (EI). O sangue foi coletado do animal previamente anestesiado com Benzocaína (10%) com o auxílio de um hematócrito heparinizado e diluído em 1 ml de soro bovino fetal. Em sequência pingou-se uma gota da solução de sangue em uma lâmina limpa e com o auxílio de uma lamínula foram realizadas as extensões. Após, as lâminas foram secas ao ar livre por 24 horas; passado esse tempo foram então fixadas com etanol absoluto por 15 minutos. Com as lâminas secas, procedeu-se a coloração com 15 µl do corante Laranja de Acridina, a 0,003% em tampão Sorenson's com pH 6,8 por 2 a 3 minutos para posterior análise em microscopia de epifluorescência, em aumento de 1000x. Foram analisadas 2000 células por lâmina. Foi computado como indicativo de genotoxicidade a presença de MN e AMN além da Frequência de Eritrócitos Imaturos. As AMN foram classificadas conforme proposto por CARRASCO *et al.* (1990).

Frequência de eritrócitos imaturos (EI)

Foram analisados 2000 eritrócitos por lâmina e diferenciados em eritrócitos maduros (EM) e eritrócitos imaturos (EI). Os resultados foram apresentados em frequência relativa resultante da expressão (GUILHERME *et al.*, 2008):

$$\text{Frequência de E.I.} = \frac{\text{EI}}{\text{(EI+EM)}} \times 100$$

O critério utilizado para a distinção entre eritrócitos maduros (EM) e eritrócitos imaturos (EI) foi o descrito por Çavas e Ergene-Gosukara (2005). Na presença do corante laranja de acridina ambos os eritrócitos, maduros e imaturos, emitem uma coloração fluorescente verde-amarela no núcleo. Os eritrócitos imaturos ou policromáticos são distinguidos dos maduros ou normocromáticos, por emitirem uma

coloração avermelhada no citoplasma devido a alta incidência de RNA nessas células.

Enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes, Glutathione S-transferase (GST), Superóxido-dismutase (SOD), Catalase e quantificação de Metalotioneína no tecido hepático de *Astyanax serratus* foram avaliadas a fim de ser verificado estresse oxidativo induzido pela exposição aos contaminantes. Para a atividade de GST a técnica utilizada foi a descrita por Keen *et al.*, 1976, a partir da conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno com a GSH pela ação da GST, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância, a qual é verificada em espectrofotômetro. A atividade de SOD foi avaliada pelo método proposto por Crouch *et al.*, 1981, cujo princípio é a inibição da redução do nitrobluetetrazólio (NBT) para azul pela SOD, através do O_2^- gerado, esse processo é medido em espectrofotômetro. Quanto à atividade de Catalase, a técnica utilizada foi descrita por Aebi, 1984, a qual se baseia no consumo de peróxido de hidrogênio exógeno pela catalase, gerando oxigênio e água. Esses produtos finais são mensurados em espectrofotometria. A análise da quantificação de Metalotioneína foi segundo Viarengo *et al.*, 1997, com algumas modificações. O método consiste em avaliar o conteúdo de resíduos – SH utilizando o reagente de Ellman a 412 nm, uma vez que as metalotioneínas são caracterizadas por um alto conteúdo de cisteínas quando comparadas a outras proteínas presentes nos extratos etanólicos.

Análise química - Quantificação de Chumbo no tecido sanguíneo

O Chumbo foi quantificado na corrente sanguínea de *Astyanax serratus* após exposição aos tratamentos de 40mg/kg Pb (NO₂)₃ e das associações do Chumbo com as doses de 0,5 µg/kg e 50 µg/kg de nanopartículas de dióxido de titânio. Para o grupo de Pb + 5 µg/kg NpTiO₂ não foi obtido o volume suficiente de sangue.

A análise química para a quantificação de chumbo foi realizada no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (CEPPA-UFPR), através de Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma de

Argônio Indutivamente Acoplado (ICP-OES). Devido ao volume de sangue necessário para as quantificações (5 gramas), foram realizados *pools* de tecido sanguíneo dos peixes pertencentes aos grupos de cada tratamento.

Análise Estatística

Para comparação entre os tratamentos para os biomarcadores genéticos e bioquímicos foi empregado o teste Kruskal-Wallis. A comparação de resposta entre os tecidos hepático e sanguíneo foi feita a partir do Teste de Mann Withney. A ANOVA foi empregada para a verificação da relevância biológica dos resultados observados na análise química de quantificação de Chumbo no tecido sanguíneo. As análises estatísticas foram realizadas pelo pacote estatístico BIOESTAT 5.0[®] e os gráficos no programa GRAPHPAD PRISM 5[®].

Resultados

Não foram constatadas mortes e nenhum tipo de alteração de comportamento, como padrão de natação, permanência na superfície dos aquários e recusa de alimentação durante os bioensaios. O comprimento médio dos animais em experimento foi de 10,4 cm ($\pm 1,1$) sendo o peso médio 11,7 g ($\pm 3,5$) e a proporção de machos e fêmeas, foi de aproximadamente 10 fêmeas para cada 5 machos.

Biomarcadores Genéticos

O Ensaio Cometa nos eritrócitos apresentou diferença em relação ao controle negativo nos grupos tratado com 40 mg/kg de Chumbo ($p= 0,0002$), com 50 μ g/kg de Np TiO₂ ($p= 0,0003$) e nos grupos das associações de Pb + 5 μ g/kg Np TiO₂ ($p= 0,0373$), e Pb + 50 μ g/kg Np TiO₂ ($p= 0,0022$) (GRÁFICO 1).

As nanopartículas na dose de 5 μ g/kg não induziram danos ao DNA em eritrócitos, no entanto quando em associação com 40mg/kg de Pb o Ensaio Cometa revelou um aumento de danos no material genético em relação ao controle negativo. Quando é feita a comparação com o grupo tratado com Pb não foi observada diferença estatística, $p= 0,1364$ (GRÁFICO 1).

A dose de 50 μ g/kg Np TiO₂ induziu danos ao DNA tanto isolada quanto em associação com 40 mg/kg de Pb em relação ao controle negativo, no entanto quando comparada com o grupo tratado com Pb, não foi observada diferença estatística para nenhum dos tratamentos (para 50 μ g/kg Np TiO₂ $p= 0,618$ e para Pb + 50 μ g/kg Np TiO₂ $p= 0,533$) (GRÁFICO 1).

O Ensaio Cometa com as células hepáticas (GRÁFICO 2) não evidenciou diferença de danos entre o grupo tratado com Chumbo e o controle negativo. Houve diferença estatística entre o controle negativo e o grupo de 50 μ g/kg NpTiO₂ ($p=0,041$), e entre o CN e o grupo da associação de Pb + 5 μ g/kg NpTiO₂ ($p=0,0219$).

Não foi observado diferença no escore de danos entre o tratamento com 40 mg/kg de Pb e os demais tratamentos, e de modo análogo ao que foi observado para o sangue, a dose de 50 μ g/kg de NpTiO₂ apresentou mais danos na comparação com as demais doses de nanopartículas. Por outro lado, essa dose

quando associada ao Pb não provocou danos ao material genético. Ainda com relação ao que foi observado no tecido sanguíneo, a dose de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de NpTiO_2 induziu danos ao DNA apenas quando administrada em associação com 40 mg/kg de Pb (GRÁFICO 2).

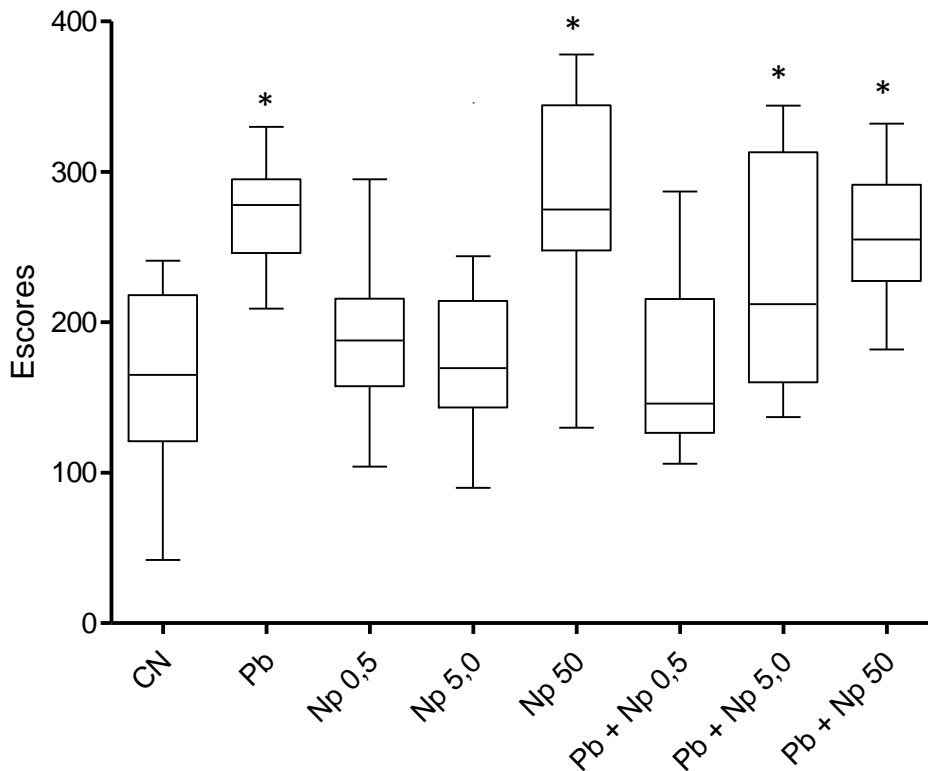


GRÁFICO 1. Comparação das Medianas dos escores no Ensaio Cometa em eritrócitos entre o grupo controle negativo (CN) e os contaminantes Chumbo (Pb), Nanopartículas (Np) e associação (Pb + Np). (* significância estatística em relação ao CN, $p < 0,05$).

Com a finalidade de comparação da resposta entre os dois tecidos para o Ensaio Cometa foi aplicado o teste de Mann Withney, o qual demonstrou mais danos ao DNA no tecido sanguíneo nos tratamentos de 40 mg/kg de Pb ($p=0,0002$), 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Np TiO_2 isolado e em associação com o Pb ($p=0,0025$ e $p= 0,0007$, respectivamente). As Medianas e os quartis bem como as médias e os desvios dos escores de cada tratamento (Pb, Np TiO_2 e Pb + Np TiO_2) analisado constam na TABELA 1.

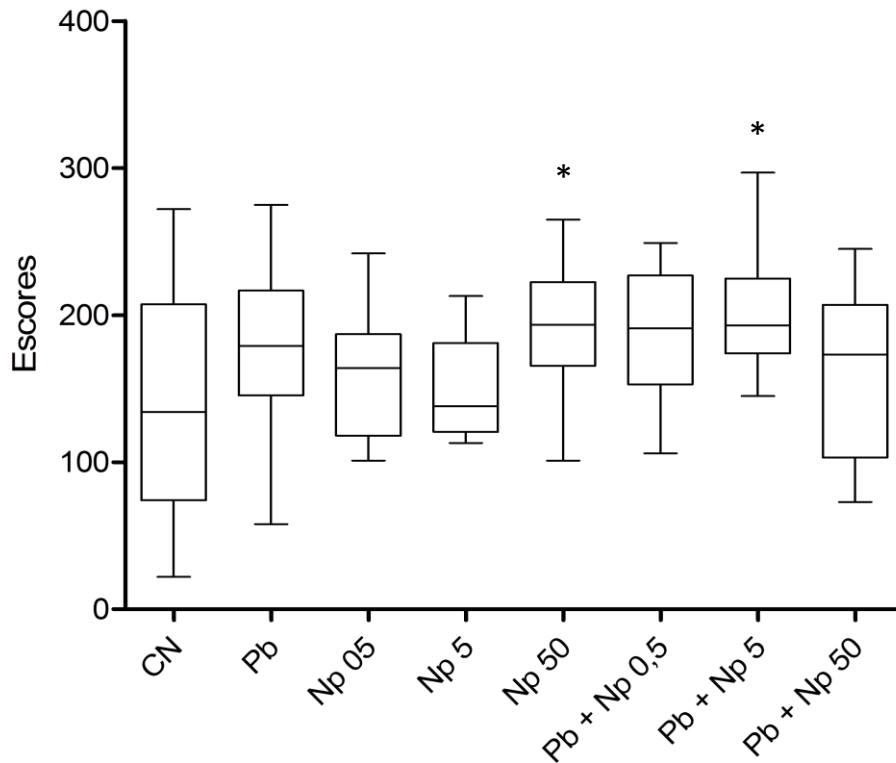


GRÁFICO 2. Comparação das Medianas dos escores do Ensaio Cometa em células hepáticas entre os grupos controle negativo (CN), e os contaminados com Pb, Nanopartículas (Np) e as associações (Pb + Np)
 * $p < 0,05$ significância estatística em relação ao controle negativo (CN).

A frequência de apoptose a partir do Ensaio de Difusão do DNA em eritrócitos não aumentou em nenhum dos grupos tratados quando comparados com o controle negativo ($p = 0,7818$). Por outro lado foi observado um aumento significativo de necrose no grupo associado de $40\text{mg/kg Pb} + 5\mu\text{g/kg NpTiO}_2$ quando comparado aos demais tratamentos, $p < 0,05$ (TABELA 2).

TABELA1. Comparação de resposta entre os tecidos sanguíneo e hepático de *A. serratus* frente à exposição aos contaminantes, analisados pelo Ensaio Cometa. Os valores estão expressos em Mediana, q1 (quartil 1), q2 (quartil 2), Média e Erro padrão.

Tratamento	Tecido	Mediana (q1- q3)	Média ± EP
Pb 40 mg/kg	Sangue *	278 246-295	270 ± 8.6
	Fígado	188 147-223	185 ± 14.14
Np TiO ₂ 0,5 µg/kg	Sangue	190 (156-295)	226.6 ± 19.65
	Fígado	171.5 (119.5-201.8)	167.6 ± 9.43
Np TiO ₂ 5 µg/kg	Sangue	169.5 (143.5- 214.3)	179.7± 19.89
	Fígado	138 (120.5-181.0)	150.3 ± 10.22
Np TiO ₂ 50 µg/kg	Sangue *	275 (247.8 - 344.3)	277.6 ± 20.15
	Fígado	193.5 (165.5- 222.5)	194.9 ± 12.12
Pb + Np TiO ₂ 0,5 µg/kg	Sangue	193.5 (140.8 - 225.5)	188.6 ± 14.76
	Fígado	188.0 (132.3 - 222.8)	179.5 ± 13.19
Pb + Np TiO ₂ 5 µg/kg	Sangue	212.0 160.0 - 313.0	233.0 ± 23.48
	Fígado	193.0 174.0 - 225.0	203.9 ± 13.50
Pb + Np TiO ₂ 50 µg/kg	Sangue *	255.0 (227.5 - 332.0)	256.7 ± 12.60
	Fígado	173.0 (103.0 - 207.0)	160.7 ± 19.23

Asteriscos indicam diferença estatística com maior indução de danos na comparação entre os tecidos sanguíneo e hepático em cada grupo de exposição, $p < 0,05$.

TABELA 2. Frequências de Apoptose e Necrose observadas em *A. serratus* através do Ensaio de Difusão. Os valores estão expressos em Média e Erro padrão (EP) e Mediana, quartil 1 (q1) e quartil 3 (q3).

Ensaio de Difusão	Tratamentos							
	Controle	Pb 40 mg/kg	NpTiO ₂ 0,5 µg/kg	NpTiO ₂ 5 µg/kg	NpTiO ₂ 50 µg/kg	Pb + NpTiO ₂ 0,5 µg/kg	Pb + NpTiO ₂ 5 µg/kg	Pb + NpTiO ₂ 50 µg/kg
Apoptose	0.66 ± 0.33	0.90 ± 0.73	2.4 ± 1.12	0.57 ± 0.37	0.45 ± 0.19	1.70 ± 0.80	3.15 ± 1.44	0.58 ± 0.39
Necrose	0.0 ± 0.0	0.54 ± 0.31	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	6.6 ± 3.0 [*]	0.0 ± 0.0
Apoptose	0.0 (0.0/1.0)	0.0 (0.0/0.0)	0.0 (0.0/3.5)	0.0 (0.0/0.25)	0.0 (0.0/1.0)	0.0 (0.0/3.7)	0.0 0.0/5.0	0.0 0.0/1.0
Necrose	0.0 0.0/0.0	0.0 0.0/1.0	0.0 0.0/0.0	0.0 0.0/0.0	0.0 0.0/0.0	0.0 0.0/0.0	1.0 [*] 0.0/9.5	0.0 0.0/0.0

* Asteriscos indicam diferença estatística.

TABELA 3. Frequência de alterações morfológicas nucleares (AMN) e micronúcleos (MN) no sangue periférico de *Astyanax serratus* para todos os grupos de tratamentos.

Tratamento	AMN (EM +EI) M ± EP						
	BL	LB	VC	NT	BN	MN	Total AMN
Controle negativo	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-2.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	1.0 (0.0-4.0)
Pb (40 mg/kg)	0.0 (0.0-0.5)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	1.00 (0.0-4.5)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	1.5 (0.0-8.0)
NpTiO ₂ (0,5µg/kg)	1.0 (0.0-3.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	2.0 (0.0 - 8.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	7.5 [*] (2.25-14.5)
NpTiO ₂ (5µg/kg)	2.0 (0.0- 4.0)	0.0 (0.0-1.0)	0.0 (0.0-0.0)	6.0 [*] (0.0- 12.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	12.0 ^{**} (5.0-17.0)
NpTiO ₂ (50µg/kg)	0.0 (0.0-5.0)	0.0 (0.0 - 1.0)	0.0 (0.0-0.0)	3.0 (0.0 -9.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	16.0 ^{**} (6.5- 22.5)
Pb + NpTiO ₂ 0,5µg/kg	2.0 (1.25- 2.7)	0.0 (0.0 - 0.25)	0.0 (0.0-0.0)	3.0 [*] (2.0-10.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	8.0 ^{**} (6.0-15.0)
Pb + NpTiO ₂ 5µg/kg	1.0 (0.0-6.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-1.0)	7.5 ^{**} (0.5-15.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	17 ^{**} (8.0-21.0)
Pb + NpTiO ₂ 50 µg/kg	0.0 (0.0-1.25)	0.0 (0.0 - 0.25)	0.0 (0.0-0.0)	7.0 ^{**} (1.5-15.75)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.25)	7.0 ^{**} (2.0- 17.0)

Os valores estão expressos em Medianas, quartil 1 (q1) e quartil 3 (q3).

Alterações morfológicas nucleares: BL (Blebbbed), Lobed (LB), Vacuolated (VC), Notched (NT), Binúcleo (BN), Micronúcleo.

* Indica diferença estatística em relação ao Controle Negativo, ** Indica diferença estatística em relação ao Controle Negativo e ao Chumbo, p <0,05.

Os resultados observados para o Teste de Micronúcleo, incluindo a frequência de alterações morfológicas nucleares (AMN) e micronúcleos (MN) estão discriminados na TABELA 3.

O Teste do Micronúcleo Písceo revelou que não houve diferenças estatísticas na frequência de micronúcleos (MN) entre os grupos tratados e o controle. Apenas foram observados MN nos grupos tratados com nanopartículas, seja isoladamente ou em associação, e, apesar do total de observações não ter significância estatística, foram identificados MN em Eritrócitos Imaturos nos tratamentos de Np TiO₂ na dose de 50 µg/kg e nas associações de Pb e nanopartículas nas doses de 0,5 µg/kg e 5 µg/kg.

Quanto ao total de alterações morfológicas nucleares (AMN) somadas ao MN, foi observada diferença significativa entre o controle negativo e o tratamento com NpTiO₂ nas doses de 0,5 µg/kg ($p= 0,0276$), 5 µg/kg ($p= 0,001$), 50 µg/kg ($p= 0,0007$), Pb + 0,5 µg/kg Np TiO₂ ($p= 0,0057$), Pb + 5 µg/kg Np TiO₂ ($p<0.0001$) e Pb + 50 µg/kg Np TiO₂ ($p= 0,0103$). Os grupos que mais induziram a formação de AMN foram os tratados com 50µg/kg Np TiO₂, e Pb + 5 µg/kg Np TiO₂ (GRÁFICO 3 e TABELA 3). O tratamento apenas com Pb não apresentou diferenças estatísticas em relação ao controle negativo ($p=0,7324$).

Quando foi feita a comparação entre os grupos tratados apenas com Np TiO₂ e os grupos de Pb + Np TiO₂, não foi observada diferença estatística, evidenciando que a presença do Pb não influenciou na indução de AMN na dose em que os contaminantes foram administrados.

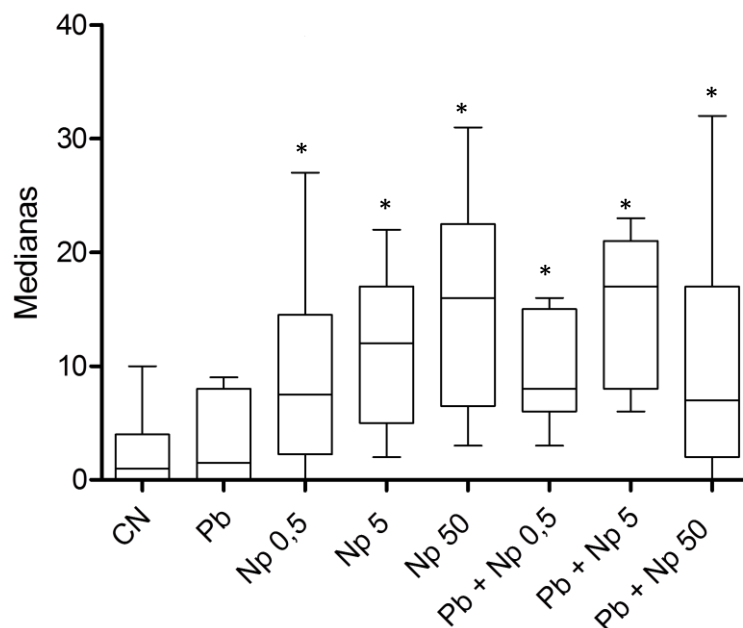


GRÁFICO 3. Medianas do Total de Alterações Morfológicas Nucleares.

*Significância estatística em relação ao Controle Negativo. $p<0.05$.

A frequência da AMN do tipo *Notched* foi a única que revelou diferença estatística quando comparamos os grupos de Pb + Np TiO₂ com o controle ($p = 0.0187$ para 0,5 µg/kg; $p = 0.0066$ para 5 µg/kg e $p = 0.0119$ para 50 µg/kg). Entre os grupos tratados com Np TiO₂ isoladas apenas a dose de 5 µg/kg evidenciou diferença estatística ($p=0,0478$) (TABELA 3).

Além das AMN normalmente encontradas, foram identificadas outras alterações na morfologia dos núcleos, sendo tais alterações observadas apenas nos grupos tratados com nanopartículas, seja isoladamente ou em associação com Pb. As células visualizadas possuíam núcleos com uma aparente fragmentação do DNA, além de citoplasmas pouco corados e contendo vacúolos. Xu *et al.*, (1998) e Jin *et al.*, (2008) encontraram alterações semelhantes em células expostas á NpTiO₂ e as descreveram como indicativos de morte celular via necrose. Além das características visuais determinantes de células necróticas (fragmentação inespecífica do DNA, citoplasma descorado, danificação de membranas citoplasmática e nuclear), a pouca afinidade do corante Laranja de Acridina por células apoptóticas contribuiu para que os autores afirmassem que as alterações morfológicas observadas representavam apenas células em necrose. Os autores confirmaram suas observações em microscopia eletrônica (FIGURA 4).

A frequência de Eritrócitos Imaturos (EI) foi aumentada nos grupos tratados com Chumbo ($p= 0, 0167$), Np TiO₂ 0,5 µg/kg ($p= 0,0017$), e nas três associações de Pb com nanopartículas, Pb + Np TiO₂ 0,5 µg/kg ($p= 0,0008$), Pb + Np TiO₂ 5 µg/kg ($p= 0,0583$), Pb + Np TiO₂ 50 µg/kg ($p= 0,0002$). A TABELA 4 contém as medianas das frequências relativas de eritrócitos imaturos em cada grupo.

TABELA 4. Frequências relativas de Eritrócitos Imaturos no sangue periférico de *Astyanax serratus* em todos os grupos de tratamento. Valores expressos em Medianas, quartil 1 (q1), quartil 3 (q3).

Tratamentos	Normais	Alterados
	Medianas (q1-q3)	
Controle Negativo	0.0 (0.0 - 0.3) ^a	Não foi observado
Pb (40 mg/kg)	1.22 (0.0 – 14.8) ^{bce}	Não foi observado
NpTiO ₂ 0,5 µg/kg	0.8 (0.6 – 3.7) ^{bce}	Não foi observado
NpTiO ₂ 5 µg/kg	0.15 (0.0 – 4.6) ^{abde}	0.0 (0.0 - 0.0)
NpTiO ₂ 50 µg/kg	0.0 (0.0 – 3.9) ^{abe}	0.0 (0.0 – 0.0)
Pb + NpTiO ₂ 0,5 µg/kg	0.9 (0.72 – 4.6) ^{cbef}	0.0 (0.0 – 1.0)
Pb + NpTiO ₂ 5 µg/kg	0.15 (0.0 – 7.6) ^{cbeg}	0.0 (0.0- 0.0)
Pb + NpTiO ₂ 50 µg/kg	1.00 (0.4 – 12.7) ^{cbh}	0.0 (0.0- 0.0)

Letras diferentes indicam diferença estatística na comparação da frequência de Eritrócitos Imaturos entre os diferentes grupos de exposição, $p < 0,05$.

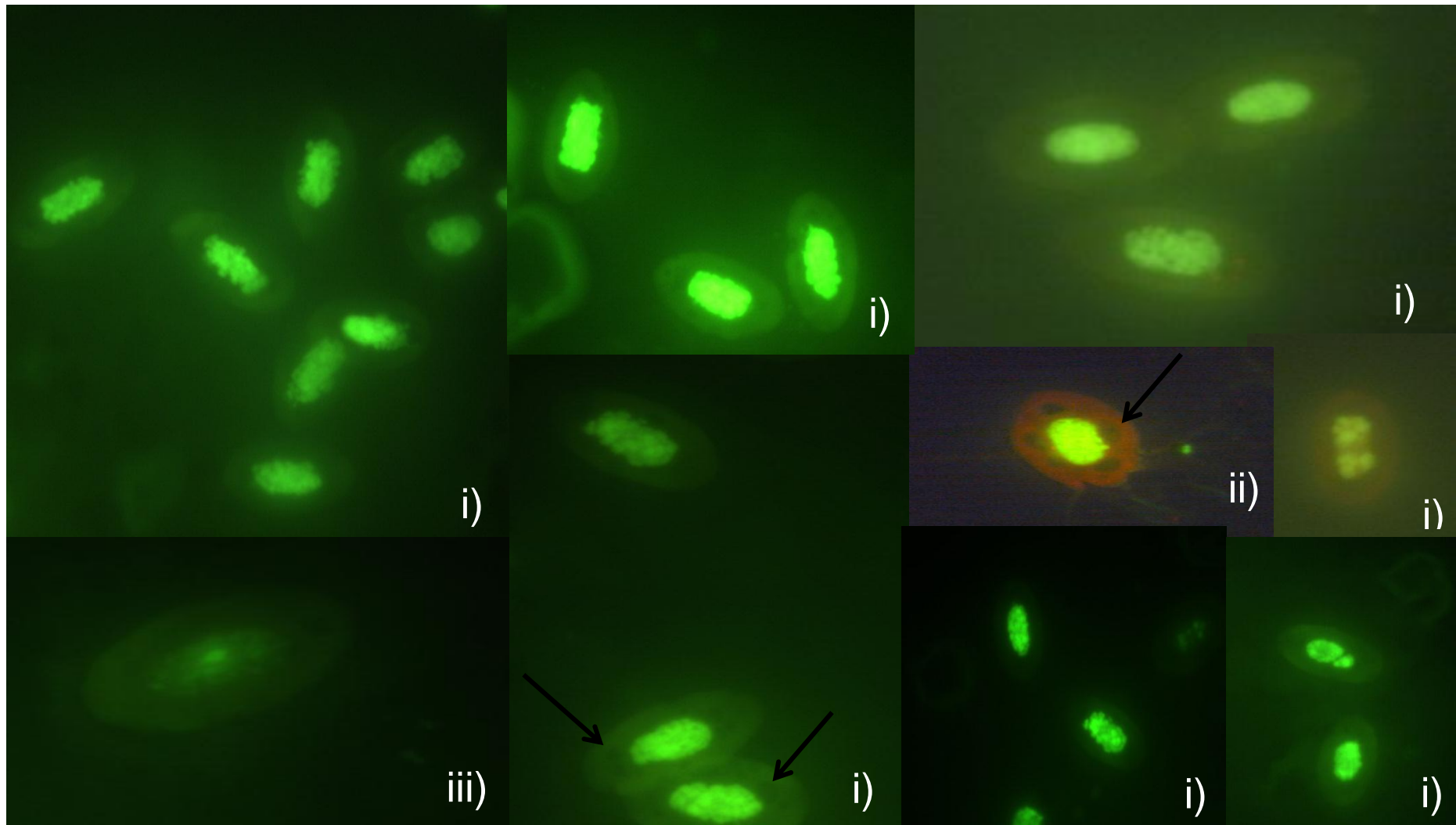


FIGURA 7. Eritrócitos de *A. serratus* tratados com NpTiO_2 e $\text{Pb} + \text{NpTiO}_2$ apresentando fragmentação de cromatina (i), vacúolos no citoplasma (ii), citoplasma pouco corado com cromatina desaparecendo (iii), setas indicam vacúolos no citoplasma.
Fonte: A autora.

Biomarcadores bioquímicos GST, SOD, Catalase e Metalotineína

A enzima antioxidante GST teve sua atividade aumentada no grupo tratado com Chumbo ($p= 0,01$) e nos grupos das associações de nanopartículas com Chumbo, Pb + Np TiO₂ 0,5 µg/kg ($p= 0,001$), Pb + Np TiO₂ 5 µg/kg ($p=0,0005$), Pb + Np TiO₂ 50 µg/kg ($p= 0,0007$). As nanopartículas administradas isoladamente não induziram a atividade de GST, $p > 0,05$. (GRÁFICO 4).

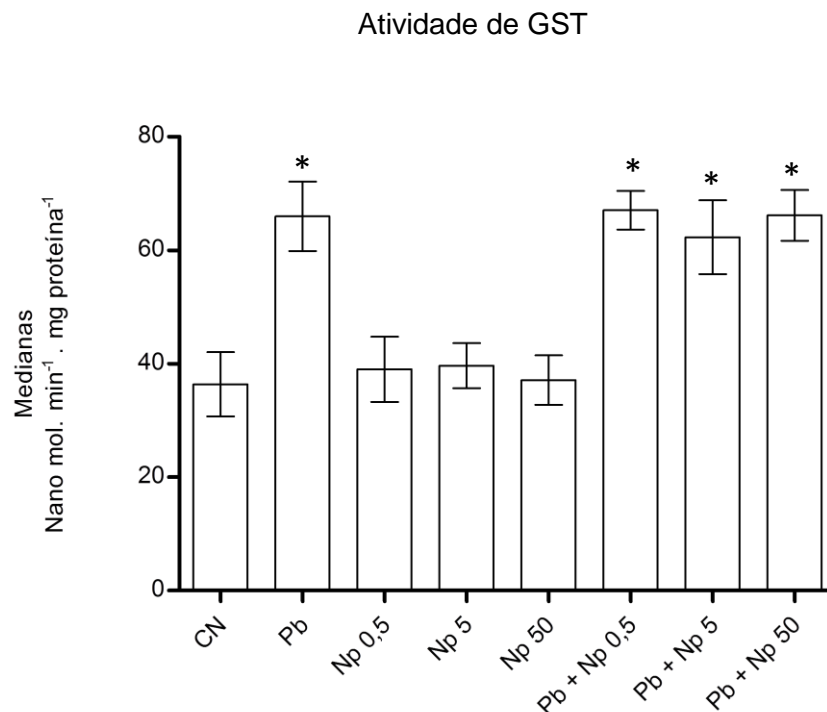


GRÁFICO 4. Atividade da enzima Glutaciona S-transferase (GST) em *A. serratus* após tratamento com Pb, Nanopartículas de dióxido de Titânio (NpTiO₂) e Pb + NpTiO₂.
* Significância estatística em relação ao controle; $p < 0,05$.

A atividade de SOD não foi alterada no grupo tratado com Chumbo, quando comparado com o controle negativo ($p=0,88$). Enquanto que nos grupos tratados com NpTiO₂ isoladas a atividade da enzima foi inibida ($p < 0,05$). Nos tratamentos com NpTiO₂ + Pb, a atividade da enzima foi inibida no grupo tratado com a dose de 5µg/kg e 50 µg/kg de NpTiO₂ ($p= 0,0014$ e $p= 0,0018$, respectivamente), a dose de 0,5µg/kg de NpTiO₂ apesar de demonstrar tendência à inibição da atividade de SOD, não apresentou diferença estatística ($p= 0,06$) (GRÁFICO 5).

Ao ser feita a comparação entre as doses de nanopartículas administradas isoladamente com as respectivas doses na presença de Pb, foi observado que a dose de 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ NpTiO_2 isolada contribuiu para uma maior inibição enzimática quando comparada com a associação desta dose com o Pb ($p= 0,027$). Para as demais doses não foi observada diferença estatística. Entre os grupos das associações dos contaminantes, o tratamento de Pb + 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ NpTiO_2 foi responsável por uma maior inibição de SOD quando em comparação com o grupo tratado com Pb+0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ NpTiO_2 ($p= 0,025$) (GRÁFICO 5).

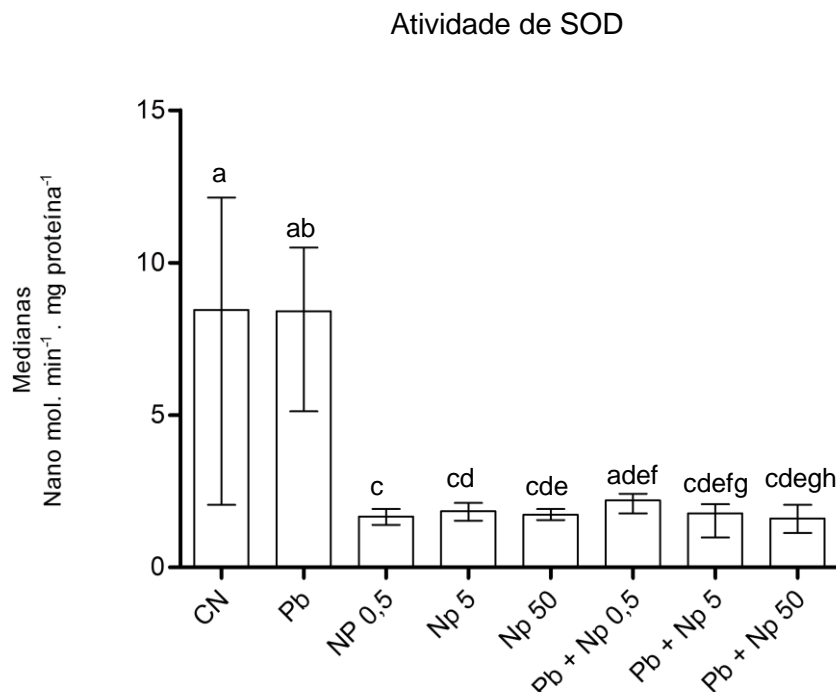


GRÁFICO 5. Atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) em *A. serratus* após tratamento com Pb, Nanopartículas de dióxido de Titânio (NpTiO_2) e Pb + NpTiO_2 . Letras diferentes indicam ausência de significância estatística entre os grupos e tratamento, $p < 0,05$.

De modo semelhante ao observado para SOD, a atividade da Catalase não foi alterada na presença de Chumbo. No entanto foi observado um aumento da atividade da enzima nos grupos tratados com nanopartículas nas doses de 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $p= 0,0045$ e $p= 0,0425$, respectivamente. Apesar do grupo tratado com 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ NpTiO_2 não influenciar na atividade de Catalase, a associação dessa dose de nanopartículas com 40 mg/kg de Pb induziu a atividade da enzima em relação ao controle negativo, $p= 0,0018$ (GRÁFICO 6).

Quando foi feita a comparação entre os tratamentos com nanopartículas isoladas e os grupos de Pb + NpTiO₂ não foi observado diferenças estatísticas na atividade de Catalase (GRÁFICO 6).

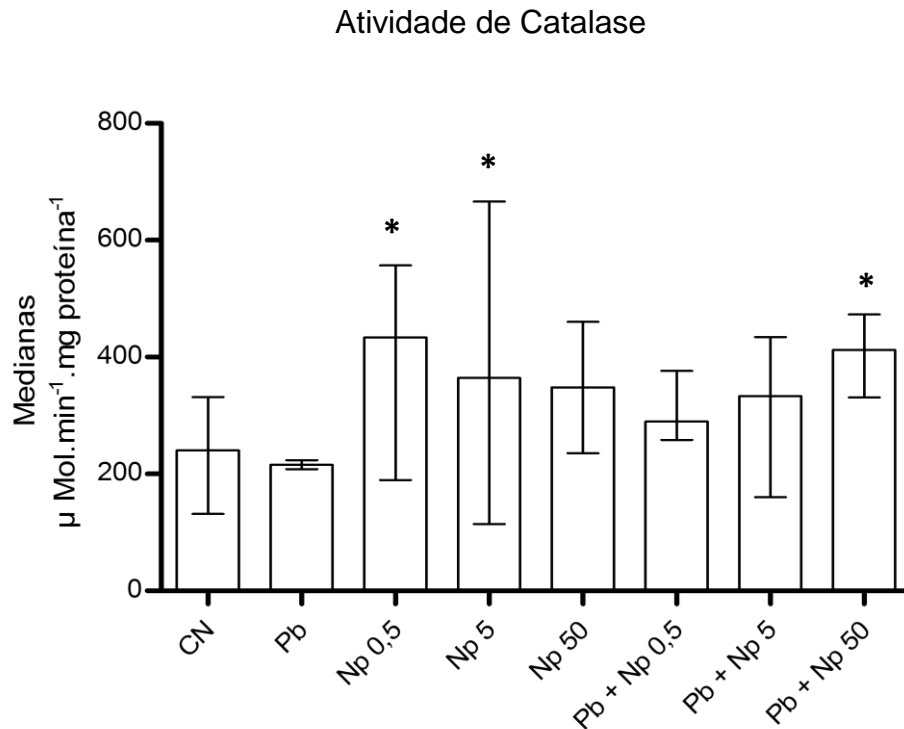


GRÁFICO 6. Atividade da enzima Catalase em *A. serratus* após tratamento com Pb, Nanopartículas de dióxido de Titânio (NpTiO₂) e Pb + NpTiO₂.

* Significância estatística em relação ao controle negativo, $p < 0,05$.

A proteína Metalotineína foi quantificada nos grupos tratados com Chumbo ($p = 0,0052$), e nos grupos tratados com nanopartículas, nas doses de 0,5 μg/kg ($p = 0,0006$) e 5 μg/kg ($p = 0,0166$), quando comparados com o controle negativo. Ainda em relação ao controle, foi observado um aumento da proteína também no grupo da associação de Pb e Np TiO₂ na dose de 0,5 μg/kg ($p < 0,0001$) (GRÁFICO 7).

A comparação entre as doses de nanopartículas revelou que a dose menor (0,5 μg/kg) induziu uma maior produção de Metalotineína quando comparada com a dose de 50 μg/kg ($p = 0,0401$). A mesma tendência foi observada na comparação entre os grupos das associações dos contaminantes, na associação com a dose menor de Np TiO₂ (0,5 μg/kg) a proteína foi quantificada em maior volume quando em comparação com o grupo de Pb + 50 μg/kg NpTiO₂. No entanto, quando foram comparados os grupos de nanopartículas isoladas com os grupos em associação

com o Pb, não foram observadas diferenças na quantificação de Metalotneína (GRÁFICO 7).

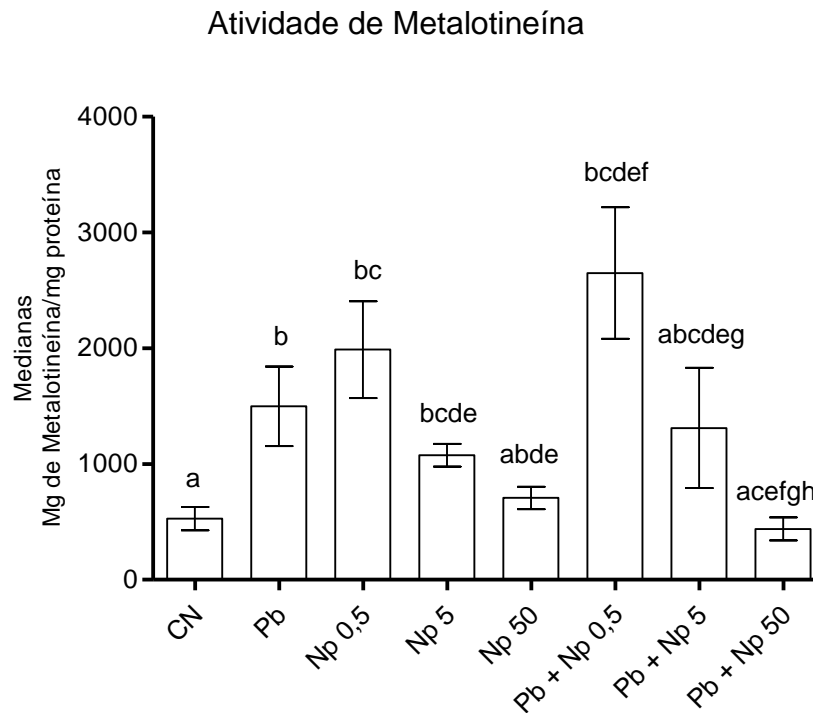


GRÁFICO 7. Atividade da enzima Metalotneína em *A. serratus* após tratamento com Pb, NpTiO₂ e Pb + NpTiO₂. Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos de tratamento, p<0,05.

Caracterização das Nanopartículas de Dióxido de Titânio

A análise de Difração de Raio X (DRX) revelou que o tamanho da dispersão das nanopartículas de dióxido de titânio utilizadas para o preparo da solução estoque é de 45 nm e o tamanho médio das partículas de 107 nm (Figura 17). A DRX também descreveu a composição das partículas, sendo de 28,2% de titânio e 71,58% de oxigênio. As partículas utilizadas nesse estudo são 100% de estrutura cristalina Anatase.

A dispersão foi confirmada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Foram identificados agregados de 200 nm e o máximo de dispersão alcançada foi de 50 nm (FIGURA 8).

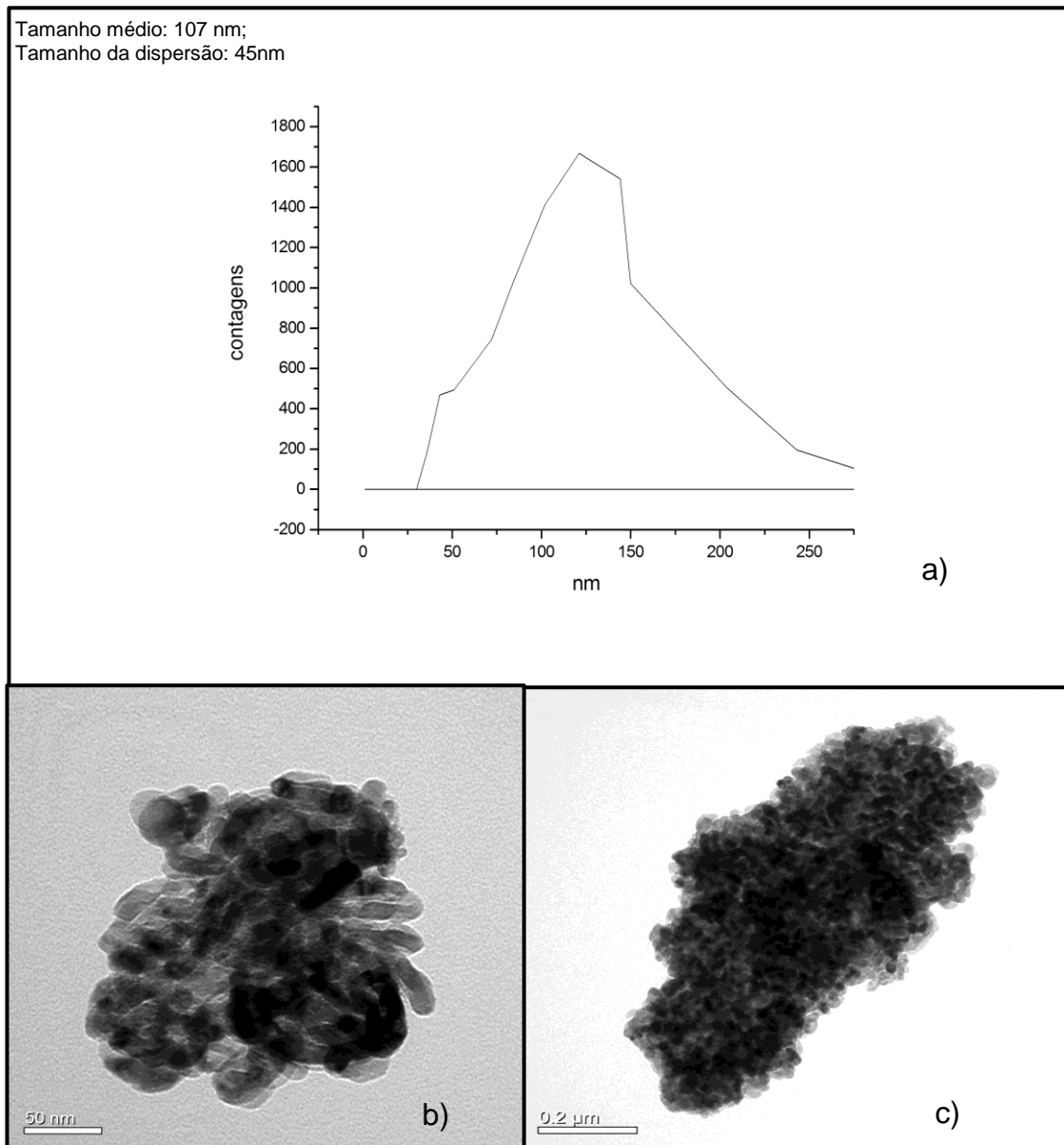


FIGURA 8. Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio. a) Gráfico obtido por Difração de Raios X, tamanho médio das partículas 107nm, tamanho da dispersão 45nm. b) Fotomicrografia Eletrônica (MET) de nanopartículas de dióxido de titânio após dispersão (50nm).c) Fotomicrografia Eletrônica (MET) de um agregado de nanopartículas de dióxido de titânio de 200nm

Análise química de quantificação de Pb no tecido sanguíneo

Os resultados da quantificação de Chumbo no tecido sanguíneo de *Astyanax serratus* estão descritos na (TABELA 5). O grupo de 40mg/kg de Pb + 5µg/kg NpTiO₂ não ofereceu resultado devido ao reduzido volume de sangue extraído dos peixes. Foram obtidas pseudo-réplicas das amostras, uma vez que foi realizado um pool de tecido sanguíneo para cada grupo de tratamento.

TABELA 5. Quantificação média de Chumbo no tecido sanguíneo de *A. serratus* para as exposições de 40 mg/kg de Pb e Pb + 0,5 µg/kg NpTiO₂ e Pb + 50 µg/kg NpTiO₂.

Amostra	Resultado (mg/kg)
Controle negativo	<0,10
Tratamento com Chumbo (40mg/kg)	<0,10
Tratamento com Pb + 0,5 µg/kg NpTiO ₂	10,4
Tratamento com Pb + 50 µg/kg NpTiO ₂	9,11

Análise realizada pelo Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), UFPR.

Discussão

O intenso uso de NpTiO_2 é acompanhado do aumento da produção de resíduos contaminados com essas partículas, os quais representam um grave risco de exposição para organismos vivos, incluindo o homem. Associado a esse fato, a presença no ambiente de compostos altamente persistentes como o Chumbo representa mais do que nunca um alto risco ambiental (ZHANG *et al.*, 2010).

Nanopartículas de óxidos de metais podem interagir com outros compostos metálicos que estejam coexistindo no mesmo ambiente, muito embora o potencial dessas partículas de influenciar o destino e a transferência de outros compostos é pouco conhecido (ZHANG *et al.*, 2007).

As propriedades genotóxicas do chumbo já têm sido amplamente estudadas e danos ao DNA a partir do Ensaio Cometa foram reportados por vários autores. (FERRARO *et al.*; CESTARI *et al.*, 2004; RAMSDORF *et al.*, 2009; GÁRCIA-LÉSTON *et al.*, 2010). Neste estudo, apesar de não ter sido observado danos no tecido hepático após contaminação com Pb, danos foram identificados no tecido sanguíneo, o que pode ser justificado pelo bioensaio agudo.

Estudos revelam que íons de Chumbo podem interagir diretamente com o DNA (HONG *et al.*, 2007) ou podem ainda causar danos ao DNA por ação indireta, induzindo estresse oxidativo ao aumentar compostos oxidantes e radicais livres na célula. Em acréscimo a esses fatores, o chumbo possui afinidade por grupos sulfidrila (-SH) presentes em proteínas e se ligam mais fortemente ao DNA do que grupos fosfato. Essas propriedades fazem com que esse metal impeça mecanismos de reparo do DNA, formando *cross-links* DNA-proteína e DNA-amino ácidos (HONG *et al.*, 2007).

Os resultados observados nesse estudo para o biomarcador bioquímico Glutathione S-transferase, revelam que o chumbo induziu um aumento da atividade dessa enzima. A GST-transferase é uma enzima que atua no processo de detoxificação celular amenizando efeitos deletérios de xenobióticos. Nesse processo participa o tripeptídeo glutathione, composto por um radical sulfidril; essa proteína conjuga xenobióticos e a GST-transferase catalisa esse processo, hidrofílicando o composto e facilitando sua excreção (COGO *et al.*, 2009).

No caso específico de metais, a resistência à degradação biológica desses compostos permite que sejam acumulados nos tecidos induzindo danos

continuamente. Assim o aumento da atividade da GST revela que no fígado o chumbo foi conjugado pela glutathione e frente a isso a produção de GST foi aumentada. Mediante a esse fato, a já estabelecida afinidade do chumbo por grupos sulfidrilas pode estar relacionada com a interação deste metal com a glutathione reduzida. A indução de aumento da atividade de GST associada à depleção de glutathione após exposição ao chumbo tem sido amplamente relatada (NAKAGAWA, 1991; DAGGETT *et al.*, 1998; PRAKASH, NAIR e CHOI, 2011).

As demais enzimas antioxidantes SOD e Catalase não tiveram alteração da sua atividade na presença de chumbo, o que sugere que o Chumbo em um ensaio agudo na dose em que foi administrado (40 mg/kg) não induziu estresse oxidativo na espécie em estudo, ao menos não a partir da formação de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Contudo, apesar de os mecanismos bioquímicos e moleculares pelos quais o chumbo induz genotoxicidade em peixes não serem completamente elucidados, pode-se inferir a partir dos resultados obtidos com o Ensaio Cometa que os danos ao material genético foram possivelmente induzidos por uma interação direta do chumbo com o material genético ou ainda com proteínas, se ligando a radicais sulfidrilas ou substituindo outros metais como cálcio e zinco em enzimas responsáveis pelo reparo do DNA (GARCÍA – LÉSTON *et al.*, 2010; COMPANY *et al.*, 2011).

Mediante a infinidade de estudos que relatem processos pelos quais o chumbo pode induzir genotoxicidade em peixes *in vivo*, pouco tem sido reportado para nanopartículas. Os trabalhos trazem principalmente estudos *in vitro*, e os poucos publicados com organismos vivos, fazem uso de ratos e camundongos como organismos teste. Nesse trabalho foram administradas injeções intraperitoneais em peixes com nanopartículas de dióxido de titânio a fim de serem verificados os possíveis efeitos genotóxicos dessas partículas isoladamente e na presença de Chumbo.

Sabe-se que o tamanho conferido aos materiais em nano escala é determinante para sua absorção pelas membranas biológicas. Sendo assim, uma vez dentro do organismo, as nanopartículas devem ser de tamanho suficientemente pequeno para atravessar as membranas celulares e interagir com biomoléculas desestabilizando desta forma o funcionamento normal das células (SINGH *et al.*, 2009). Outro fator a ser considerado ao se avaliar a toxicidade de nanopartículas é a interação dessas partículas com o meio no qual foram dissolvidas. Tem sido

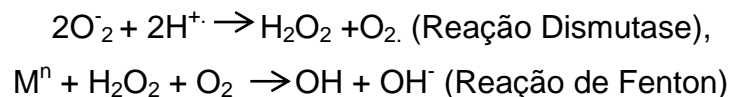
estabelecido que o potencial de toxicidade de nanopartículas dependa em grande parte do método de preparo das soluções (HANDY *et al.*, 2008).

Nanopartículas podem atravessar a membrana celular por diferentes mecanismos, e sendo assim são capazes também, dependendo de seu tamanho, de serem internalizadas no núcleo. Estudos mostram que nanopartículas de dióxido de titânio podem estar presentes no compartimento nuclear e interagir diretamente com a molécula de DNA ou se agregar à proteínas provocando inibição da replicação, transcrição e proliferação celular (SINGH *et al.*, 2009). Resultados apresentados em fígados de camundongos por Li *et al.* (2010), após administrarem injeções intraperitoneais de Np TiO₂ (anatase) em várias doses, revelam a possibilidade de uma interação física das Np TiO₂ ou ainda do metal titânio com o DNA. Isso porque o titânio foi quantificado no tecido hepático e os autores observaram que o conteúdo do metal aumentou gradativamente com o aumento da dose administrada, assim como os danos no DNA comprovados pelo Ensaio Cometa. Outro estudo realizado por Kirsch-Volders (2003) relata que metais podem ser liberados da superfície das nanopartículas e competir com íons como Mg²⁺ reduzindo a eficiência de enzimas de reparo. Os mecanismos de reparo do DNA são essenciais para evitar que danos ao material genético sejam fixados como mutações permanentes.

Os resultados obtidos nesse estudo pelo Ensaio Cometa concordam parcialmente com o observado pelos autores outrora citados uma vez que danos significativos ocorreram apenas para a maior dose de nanopartículas (50µg/kg) em ambos os tecidos, sanguíneo e hepático. No entanto não é possível afirmar que o metal titânio tenha sido responsável pelos danos observados neste estudo, primeiramente pelo fato de que este metal não foi quantificado nos tecidos dos animais, e assim sendo faltam dados concretos para que seja sugerida sua liberação da superfície das nanopartículas.

Acrescido a esses fatores, existe a possibilidade de que em maiores doses a capacidade de agregação de nanopartículas aumente (CHOWDHURY, HONG e WALKER, 2010). Desta forma, pode ser sugerido que a dose de 50µg/kg por conter partículas mais agregadas, com a superfície menos exposta, estivesse menos reativa. O que poderia justificar a não quantificação de Metalotineína nessa dose, sendo essa proteína quantificada apenas nas doses menores, 0,5 e 5 µg/kg de NpTiO₂. No entanto, na dose de 50µg/kg de NpTiO₂ o oxigênio reativo presente na superfície foi suficiente para induzir estresse oxidativo, o que foi comprovado pela

inibição da atividade de SOD. A depleção da atividade de SOD indica que o sistema de defesa antioxidante está sobrecarregado com espécies reativas de oxigênio. Dentre as enzimas antioxidantes, a Superóxido Dismutase (SOD) é a primeira enzima que reage com radicais de oxigênio, sendo as alterações em sua atividade utilizadas como sinal de estresse oxidativo e alerta precoce de poluição ambiental (LINHUA, ZHENYU e BAOSHAN, 2009). A SOD na presença de ânions superóxido (O_2^-) é ativada reduzindo-os à oxigênio molecular. Esses radicais de oxigênio podem ser gerados tanto por processos metabólicos quanto pela ativação de oxigênio resultando em uma molécula nucleofílica (O_2^-). Uma vez gerados, os radicais superóxido prosseguem a reação de Fenton, aonde M representa um metal de transição (Cobre, Ferro, Zinco e Titânio) (SINGH *et al.*, 2009).



Apesar de ter ocorrido uma alteração da atividade de SOD na dose de 50µg/kg de NpTiO₂, o mesmo não foi observado para a Catalase; essa enzima antioxidante reage com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), solubilizando esse composto e impedindo que se estabeleça estresse oxidativo. Assim, pode ser sugerido que a dose de 50µg/kg induziu estresse oxidativo a partir da geração de ânions superóxido, inibindo a atividade de SOD, e os radicais H₂O₂ produzidos não foram solubilizados pela Catalase dando então o prosseguimento da reação de Fenton com a produção de radicais hidroxila. A produção final desses radicais refletiu na indução de danos ao material genético. Os ânions superóxido não reagem diretamente com polipeptídios ou DNA, ao invés disso interagem com metais de transição ou enzimas resultando na formação de grupos OH⁻ que dentre as espécies reativas de oxigênio são os principais mediadores de danos ao DNA (SINGH *et al.*, 2009). Desta forma, com os dados apresentados até agora, pode ser sugerido que nanopartículas de dióxido de titânio nas doses administradas induzem genotoxicidade ao DNA de peixes por um mecanismo indireto, a partir de estresse oxidativo. Corroborando com os resultados observados em vários trabalhos, de que estresse oxidativo seja o principal mecanismo de genotoxicidade induzido por nanopartículas de dióxido de titânio (FEDERICI, SHAW e HAND, 2007; REEVES *et al.*; VEVERS e JHA, 2008; SYCHEVA *et al.*, 2011).

As menores doses de nanopartículas de TiO_2 (0,5 e $5\mu\text{g}/\text{kg}$) induziram a atividade de Catalase e a produção de Metalotineína, além de inibirem a atividade de SOD. Esse resultado confirma a hipótese de que em menores concentrações as nanopartículas expõem mais ativamente a sua superfície assim como os seus compostos titânio e oxigênio, de forma a permitir uma alta produção de ânions superóxido, que ao reagirem com grupos H^+ produzem peróxido de hidrogênio como produto. A enzima Catalase foi ativada e catalisou a degradação do peróxido de hidrogênio impedindo que íons hidroxila fossem produzidos em um volume suficiente para danificar o DNA, o que foi evidenciado pela ausência de danos a partir do Ensaio Cometa nestas doses.

Se a hipótese de que na dose de $50\mu\text{g}/\text{kg}$ de NpTiO_2 ocorreu uma tendência à formação de agregados for condizente, a possibilidade de que nanopartículas possam gerar respostas biológicas mesmo sem atravessar a membrana celular é sustentada por muitas observações. Primeiramente produtos de peroxidação lipídica podem permear através das células causando uma cascata de reações oxidativas dando prosseguimento a reação de Fenton e como produto gerarem radicais hidroxil. Estes radicais por sua vez reagem com membranas celulares alterando sua permeabilidade e permitindo que partículas maiores sejam absorvidas ao interior das células e do núcleo (VEVERS e JHA, 2008).

A produção de radicais hidroxila na dose maior de nanopartículas pode ter sido inferior, ao menos a partir da degradação de peróxido de hidrogênio, como foi evidenciado pela não indução de aumento da atividade de Catalase. No entanto, provavelmente com o aumento da permeabilidade das membranas essas partículas foram internalizadas no núcleo aonde induziram estresse oxidativo e contribuíram para o aumento de dano ao DNA. Relatos de que NpTiO_2 podem ser absorvidas através da membrana nuclear são encontrados na literatura (GEISER *et al.*, 2005). Uma das vias pelas quais a genotoxicidade pode ter sido induzida é a partir da formação de adutos de DNA (8-hidroxi-2 deoxiguanosina, 8-OHdG,) ou ainda pela inibição de reparo, uma vez que espécies reativas de oxigênio podem se ligar a enzimas de reparo inativando-as. Nas doses mais baixas o aumento da atividade da Catalase pode ter amenizado a formação de radicais OH^{\cdot} e com isso não houve interferências no sistema de reparo. O Ensaio Cometa é um ensaio altamente sensível que detecta quebras no material genético passíveis de serem reparadas, em conformidade com essa informação danos podem ter sido reparados nas doses

inferiores antes mesmo de serem detectados pelo Ensaio Cometa (BELPAEME, COOREMAN e KIRSCH-VOLDERS, 1998)

Outra possibilidade de internalização de nanopartículas no ambiente nuclear é durante a Mitose. Em uma das fases da divisão celular a membrana nuclear é desintegrada para ao final da divisão ser novamente reconstituída dando origem a duas células filhas; nessa circunstância, as nanopartículas presentes no citoplasma podem ser integradas no núcleo e então interagirem diretamente com o material genético ou formar agregados com proteínas essenciais aos processos de reparo, replicação, transcrição e proliferação celular (CHEN e MIKECZ, 2005).

Quanto à influência na genotoxicidade da associação dos contaminantes, Chumbo e Nanopartículas de Dióxido de Titânio, o Ensaio Cometa não evidenciou diferença estatística no sangue, até mesmo porque ambos os contaminantes induziram danos ao DNA quando administrados separadamente, a dose maior de nanopartículas (50µg/kg) apresentou danos ao DNA tanto isolada quanto em associação. No tecido hepático apenas a dose de 50 µg/kg de NpTiO₂ isolada induziu danos ao DNA. No entanto o aumento da atividade de GST em todos os grupos das associações de Pb + NpTiO₂ além dos resultados da quantificação de Chumbo no sangue de *A. serratus* revela que o Pb se ligou às nanopartículas, uma vez que a GST foi ativada no grupo tratado apenas com chumbo e o mesmo não ocorreu em nenhum dos grupos de nanopartículas isoladas.

No fígado o Ensaio Cometa revelou que a associação de Pb e nanopartículas na dose intermediária (5 µg/kg) provocou danos ao DNA, ao contrário da sua respectiva dose isolada, evidenciando assim que no tecido hepático a ligação do chumbo à superfície das NpTiO₂ potencializou o efeito dos dois contaminantes. A atividade de Catalase foi induzida nos tratamentos apenas com nanopartículas nas doses de 0,5 e 5 µg/kg, no entanto a presença de chumbo associado a essas doses de alguma forma inibiu a atividade dessa enzima, o que poderia explicar o aumento de danos ao DNA no tecido hepático revelados pelo Ensaio Cometa no grupo de Pb +5 µg/kg de Np, além de uma tendência de aumento no grupo de Pb + Np 0,5 µg/kg. Já a associação de chumbo com a maior dose de nanopartículas (50 µg/kg) provocou aumento da atividade de Catalase, o que possivelmente impediu danos ao DNA por estresse oxidativo nesta dose. Esses resultados concordam com o observado para SOD, pois em todos os grupos tratados com nanopartículas, isoladas ou em associação com o Pb, a atividade de SOD foi inibida, evidenciando

estresse oxidativo e uma saturação de radicais superóxido não transformados em peróxido de hidrogênio. O grupo de Pb+ Np 50 µg/kg foi responsável pela maior inibição de SOD dentre os grupos das associações dos contaminantes, o que tornou maior a atividade de Catalase.

Com respeito à indução de Metalotineína apenas no grupo de Pb + 0,5 µg/kg de Np, este resultado concorda com a hipótese de que doses menores são menos passíveis de sofrer agregação, podendo assim expor mais facilmente metais da sua superfície. Vale ressaltar que muito embora sejam feitas suposições, a ausência de detalhes acerca dos mecanismos reais do processo de liberação de titânio da superfície das nanopartículas e, uma vez liberado, quais seriam os riscos da presença desse metal no ambiente celular, torna limitada quaisquer outras discussões.

Ao ser feita a comparação entre os danos observados nos dois tecidos foi revelado que o tecido sanguíneo apresentou mais danos em relação ao tecido hepático. Apesar de o fígado ser um dos órgãos alvo para deposição e acúmulo de nanopartículas (HANDY *et al.*, 2008), o fato desse tecido conter intensa atividade de enzimas antioxidantes, as quais mitigam efeitos de espécies reativas de oxigênio (VALAVANIDIS *et al.*, 2006) aliado ao bioensaio agudo (96h) pode explicar esse resultado.

A observação de Micronúcleos (MN) depende de que o ciclo celular tenha sido concluído e no caso de eritrócitos da circulação periférica a frequência observada de MN e outras alterações morfológicas nucleares (AMN) refletem eventos que ocorreram durante o tempo de vida dos eritrócitos circulantes. Tem sido relatado na literatura que o pico de eritrócitos micronucleados em peixes ocorra de 1 a 5 dias após exposição a um xenobiótico, no entanto acredita-se que para a maioria das espécies esse pico ocorra depois de 2 a 3 dias (UDROIU, 2006). Em peixes a frequência basal e espontânea de MN é geralmente muito baixa variando bastante entre as espécies dependendo da dinâmica eritropoiética (UDROIU, 2006).

Foram observados micronúcleos nas doses de 0,5 e 50µg/kg de NpTiO₂ e também nas associações dos contaminantes nas três doses de nanopartículas. Na dose de 50µg/kg e em todos os tratamentos que receberam os dois contaminantes foram identificados micronúcleos em eritrócitos policromáticos indicando uma formação recente proveniente das contaminações durante o experimento. No entanto a análise estatística não revelou diferença entre os tratamentos e o controle.

Esse resultado concorda com o observado por Vevers e Jha (2008) aonde os autores identificaram danos no DNA a partir do Ensaio Cometa na maior dose e não foram observadas diferenças estatísticas entre as frequências de MN em nenhum dos tratamentos. A formação de MN é uma evidência de danos ao material genético que não foram reparados, sendo, no caso específico de nanopartículas, necessárias altas doses para promovê-los (SINGH *et al.*; TROUILLER *et al.*, 2009).

Concernente ao grupo tratado com Chumbo, Ramsdorf *et al.* (2007) observaram resultado similar ao contaminarem *Hoplias malabaricus* através de injeções intraperitoneais com chumbo em diferentes doses; os autores não identificaram micronúcleos em nenhum dos tratamentos.

Apesar da frequência de MN não ser significativa, alterações morfológicas nucleares (AMN) foram observadas nos grupos tratados com nanopartículas e nas associações com Pb. Em concordância com os resultados do Ensaio Cometa, os grupos 50µg/kg de NpTiO₂ e Pb+ 5 µg/kg NpTiO₂ induziram uma maior frequência de AMN. Existem poucas explicações para a origem das AMN, uma das mais aceitas foi sugerida por Shimizu *et al.*, (1998), aonde os autores afirmam que ao ser detectada uma região com dano é iniciado um processo de reparo e eliminação da cromatina. A região alterada é movida para a periferia do núcleo e então eliminada por exocitose, e antes que esse processo seja concluído a membrana nuclear naturalmente apresenta algumas imperfeições as quais caracterizam as alterações morfológicas nucleares. A visualização de AMN e MN indicam, no entanto, mecanismos de exocitose interrompidos. Seriani *et al.* (2011), apontam que estresse oxidativo pode ser responsável pela formação de MN e AMN principalmente a partir do aumento da permeabilidade da membrana nuclear como resultado de peroxidação lipídica, o que torna o núcleo mais susceptível à alterações. Tal afirmação explica a não indução de AMN no grupo tratado com Pb, uma vez que esse tratamento não induziu estresse oxidativo.

A AMN mais frequentemente observada foi a do tipo *notched*. Existem divergências quanto à origem de formação desses núcleos, alguns autores acreditam que problemas de segregação aliados a união cromossômica ou amplificação gênica por meio de ciclos de quebra-fusão-ponte poderiam causar núcleos *notched*, que incluiriam os núcleos *lobed* e *blebbed*, durante a eliminação de DNA amplificado a partir do núcleo (SHIMIZU *et al.*, 1998, 2000). Vários autores tem demonstrado uma relação positiva entre a frequência de núcleos *notched* e

micronúcleos, sugerindo assim que a identificação dessas AMN pode ser útil como uma análise complementar em estudos de genotoxicidade em peixes (FERRARO *et al.*, 2004; ERGENE *et al.*, 2006, RAMSDORF *et al.*, 2007, VICARI, 2009). Sendo assim, a não significância estatística para as observações de células micronucleadas não refletem ausência de genotoxicidade.

Por outro lado, Carrasco, Tilbury e Myers (1990), associaram a formação de núcleos *notched* com vacúolos, uma vez que as fendas presentes indicam ausência de material genético, apresentando profundidade similar ao diâmetro de vacúolos. Os autores sugerem que *notched* e vacúolos possam estar relacionados com aneuploidias. A incidência de vacuolizações está associada à processos inflamatórios que culminam em morte celular via necrose (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003). Um estudo realizado em fibroblastos de ratos expostos á NpTiO₂ demonstrou que o estresse oxidativo gerado pelas nanopartículas induziu morte celular via necrose. Os autores observaram células com cromatina fortemente fragmentada ou desaparecendo (JIN *et al.*, 2008).

Um aumento da frequência de necrose no grupo tratado com Pb + 5 µg/kg NpTiO₂ foi observado, sendo notado também nesse grupo um aumento significativo da presença de núcleos *notched*. Associado à esses resultados, a identificação de AMN com intensa fragmentação de cromatina corroboram com o relatado em estudos anteriores que NpTiO₂ ao induzirem estresse oxidativo são responsáveis por citotoxicidade provocando morte celular principalmente via necrose (XU *et al.*, 1998, JIN *et al.*, 2008, HAN, NEWSOME e HENNIG, 2013).

A frequência de Eritrócitos Imaturos (EI) foi avaliada e demonstrou que houve um aumento do número de EI no grupo tratado com chumbo, nanopartículas na menor dose (0,5 µg/kg), e nos grupos das associações dos contaminantes. Esse resultado informa que a proliferação celular foi induzida nesses grupos, o que contradiz a maioria das observações de estudos anteriores em que NpTiO₂ e Pb foram responsáveis pela inibição do ciclo celular (CUI *et al.*; MÁRQUEZ-RAMÍRES *et al.*, 2012). Segundo Udrou (2006), alterações na dinâmica hematopoiética podem gerar conflitos em resultados, pois diversos agentes genotóxicos, em certas concentrações, podem ocasionar redução da eritropoiese, por outro lado em animais manipulados em laboratório vários fatores podem contribuir para sua indução resultando em uma “inundação” de eritrócitos policromáticos. Considerando o fato de que neste estudo os contaminantes foram administrados com injeções

intraperitoneais, pode-se supor que esteja então justificada a incidência elevada de eritrócitos jovens nesses grupos. A determinação da frequência de eritrócitos policromáticos fornece informações importantes sobre a dinâmica hematológica, mas a sua análise isolada não permite uma identificação precisa das causas, uma vez que reflete o equilíbrio entre uma variedade de fatores, tais como a entrada de células imaturas versus a remoção esplênica das células, bem como a taxa de maturação celular. Outro fator a ser considerado é o mecanismo de eliminação de eritrócitos maduros com lesões nucleares via baço, o que pode elevar a frequência de EI na corrente sanguínea (PACHECO e SANTOS, 2002). Estudos mais detalhados da expressão de genes envolvidos nos processos de eritropoiese e proliferação celular em peixes seriam necessários para ampliar a compreensão da relação de Pb e NpTiO₂ nesses eventos.

Conclusões

A espécie *Astyanax serratus* se mostrou sensível, oferecendo respostas satisfatórias frente aos contaminantes administrados.

O Pb (40 mg/kg) induziu danos ao DNA em eritrócitos de *A. serratus*, enquanto que no tecido hepático o Ensaio Cometa não revelou danos.

A dose maior de NpTiO₂ (50 µg/kg) foi responsável por indução de danos ao DNA em *A. serratus* para ambos os tecidos e pelo aumento de Alterações Morfológicas Nucleares.

A associação de 40 mg/kg de Pb + 5µg/kg de NpTiO₂ influenciou na genotoxicidade nos tecidos hepático e sanguíneo de *A. serratus* em relação à respectiva dose isolada de nanopartículas.

Como indicativo de Citotoxicidade foram identificados, a partir do Ensaio de Difusão, eritrócitos em processo de necrose no grupo tratado com o Pb + 5 µg/kg NpTiO₂.

Efeitos citotóxicos também foram observados com o aumento da frequência de Alterações Morfológicas Nucleares, principalmente do tipo *Notched* nos grupos de NpTiO₂ isoladas e em associação com o Pb.

Nanopartículas de dióxido de titânio na presença de Chumbo podem se ligar a esse metal influenciando na sua distribuição dentro do organismo e, dependendo do tecido e da dose, potencializar efeitos genotóxicos e citotóxicos.

Foram observados danos ao DNA por estresse oxidativo após exposição às NpTiO₂ isoladas e em associação com o Pb, identificados no Ensaio Cometa, Ensaio de Difusão e Alterações Morfológicas Nucleares e pela alteração da atividade das enzimas antioxidantes (GST, SOD, Catalase) e a quantificação de Metalotineína.

A utilização de enzimas antioxidantes como biomarcadores enzimáticos de exposição é uma ferramenta útil quando se deseja conhecer de forma mais abrangente os mecanismos pelos quais um agente genotóxico pode induzir danos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, S. M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. **Americas Fishers Society**, v. 3, p. 104-112, 2002.
- ADHIKARI, S.; GHOSH, L.; GIRI, B.S.; AYYAPPAN, S. Distributions of metals in the food web of fishponds of Kolleru Lake, India. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.1242-1248, 2009.
- AITKEN, R. J.; CHAUDHRY, M. Q.; BOXALL, A. B. A.; HUL, M. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. **Occupational Medicine**, v. 56, p. 300–306, 2006.
- AKAISHI, F. M.; DE ASSIS, H. C.; JAKOBI, S. C.; EIRAS-STOFELLA, D. R, ST-JEAN, S. D.; COURTENAY, S. C.; LIMA, E. F.; WAGENER, A. L.; SCOFIELD, A. L.; RIBEIRO, C. A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Atyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research – Genetic Toxicology**, v. 343, p.121-135, 1995.
- AMARAL, Y.T.; SOUZA, M.C.; NOVELLI, R.; SILVA, H. J. T.; ALMEIDA, M. G.; SOUZA, C. M. M. Biologia da traíra (*Hoplias malabaricus*) na Lagoa do Campelo, RJ. **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**. São Lourenço, MG. 2009.
- ASHARANI, P. V., MUN, G. L. K., HANDE, M. P., VALIYAVEETTIL, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. **ACS NANO**, 2009.
- ASHWOOD, P.; THOMPSON, R. P. H., POWELL, J. J. Fine Particles That Adsorb Lipopolysaccharide Via Bridging Calcium Cations May Mimic Bacterial Pathogenicity Towards Cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 107-117, 2007.
- BAALOUSHA, M.; MANCIULEA, A.; CUMBERLAND, S.; KENDALL, K.; LEAD, J.R. Aggregation and surface properties of iron oxide nanoparticles: influence of ph and natural organic matter. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 1875–1882, 2008.
- BAIRD, C. CANN, M. **Química ambiental**. 4ed. Ed. Bookman. PORTO ALEGRE, 2011.
- BARAKAT, M. A. Adsorption behavior of copper and cyanide ions at TiO₂-solution interface. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 291, p.345–352, 2005.
- BARBIERI, G. M. Biologia de *Astyanax scabripinnis paranae* (Characiformes, Characidae) do ribeirão do Fazzari. São Carlos. Estado de São Paulo. II. Aspectos quantitativos da reprodução. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, n.1, p. 589-596, 1992.

BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S. R. B. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73. p. 320–325, 2010.

BARRY, P. S. A Comparison of concentrations of lead in human tissues. **British Journal of Industrial Medicine**, v.32, p.119-139, 1975

BELPAEME, K. COOREMAN, K. KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v. 415, p. 167-184, 1998.

BERMUDEZ, E.; MANGUM, J. B.; WONG, B. A.; ASGHARIAN, B.; HEXT, P. M.; WARHEIT, D. B.; EVERITT, J. I. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. **Toxicology Science**, v. 77, p. 347–357, 2004.

BHABRA, G.; SOOD, A.; FISHER, B.; CARTWRIGHT, L.; SAUNDERS, M.; EVANS, W. H.; SURPRENANT, A.; LOPEZ-CASTEJON, G.; MANN, S.; DAVIS, S. A.; HAILS, L. A.; INGHAM, E.; VERKADE, P.; LANE, J.; HEESOM, K.; NEWSON, R.; CASE, C. P. Nanoparticles may cause DNA damage across a cellular barrier. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 12, p. 876-883, 2009.

<<http://www.nature.com/nano/journal/v4/n12/full/nnano.2009.313.html>>, acesso em 30/01/2013.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p.826–833, 2011.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronuclei assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, p. 383-392, 2001.

BOTKIN, D. B.; KELLER, E. A. Environmental science: earth as a living planet. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.

BRACK, W.; KLAMER, H. J.C.; ALDA, M. L.; BARCELÓ, D. Effect-Directed Analysis of Key Toxicants in European River Basins A Review. **Environment Science Pollution Research**, v 14, n 1, p.30 – 38, 2007.

BRAYNER, R.; FERRARI-ILIOU, R.; BRIVOIS, N.; DJEDIAT, S.; BENEDETTI, M. F.; FIEVET, F. Toxicological Impact Studies Based on *Escherichia coli* Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. **Nano Letters**, v. 6, n. 4, p. 866-870, 2006.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. Brasília: CODEVASF, 1988.

BRUNNER, T. J.; MANSER, P. W. P.; SPOHN, P. GRASS, R.N.; LIMBACH, L.K.; BRUININK, A. STARK, W.J. In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility. **Environmental Science Technology**, v.40, p. 4374-4381, 2006.

BUGGY, C. J., TOBIN, J. M. Seasonal and spatial distribution of metals in surface sediment of an urban estuary. **Environmental Pollution**, .v.155, p 308-319, 2008.

BURATINI, S. V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**, 2.ed. Editora Rima. 2006, p. 54-86.

CAPITANI, E. M.; PAOLIELLO, M. M. B.; ALMEIDA, G. R. C. **Fontes de exposição humana ao chumbo no Brasil**. Simpósio: Chumbo e a saúde humana, Capítulo VI, Ribeirão Preto, v.42, n. 3, p.311-8, 2009.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. 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, p. 2123 -2136, 1990.

ÇAVAS, T.; ERGENE- GOZÜKÄRA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v.74, p. 264-271, 2005.

CENTI, G., CIAMBELLI, P., PERATHONER, S., RUSSO, P. Environmental catalysis: trends and outlook. **Catalysis Today**, v.75, p. 3-15, 2002.

CESTARI, M.M.; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. O.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E. FERRARO, M. V. M.; MANTOVANI, M. S.; FENOCCHIO, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p.270-274, 2004.

CHEN, M. MIKECZ, A. V. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. **Experimental Cell Research**, v. 51, p. 305:51–62, 2005.

CHITHRANI, B. D.; CHAN, W. C. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. **Nano Letters**, v. 6, p.1542-1050, 2007.

CHOI, H. STATHATOS, E., DIONYSIOU, D.D. Sol–gel preparation of mesoporous photocatalytic TiO₂ films and TiO₂/Al₂O₃ composite membranes for environmental applications. **Applied Catalysis Environmental**, v. 63, p 60-67, 2006.

CHOWDHURY, I.; HONG, Y.; WALKER, S. L. Container to characterization: Impacts of metal oxide handling, preparation, and solution chemistry on particle stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 368,p. 91–95, 2010.

COELHO, V. M. B., FONSECA, M. R. M. B. Projeto regional sobre avaliação e controle do lançamento de substâncias tóxicas em águas superficiais. Estudo de caso do Rio Paraíba do Sul. **CETESB**. 1986.

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, M. A. Z. SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v. 7, n.1, p.37-42, 2009.

COMPANY, R.; SERAFIM, A.; LOPES, B.; CRAVO, A.; KALMAN, J.; RIBAC, I.; DELVALLS, T. A.; BLASCOB, J.; DELGADO, J.; SARMIENTO, A. M.; NIETO, J. M.; SHEPHERDE, T. J.; NOWELL, G.; BEBIANNO, M. J.; Source and impact of lead contamination on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in several marine bivalve species along the Gulf of Cadiz. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 146–154, 2006.

CUI, Y.; LIU, H.; ZE, H.; ZHANG, Z.; HU, Y.; CHENG, Z.; CHENG, J.; HU, R.; GAO, G.; WANG, L.; TANG, M.; HONG, F. Gene Expression in Liver Injury Caused by Long-term Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles in Mice. **Toxicological Sciences**, v. 128, n.1, p.171–185, 2012.

DAGGETT, D. A.; OBERLEY, T. D.; NELSON, S. A.; WRIGHT, L. S.; KORNGUTH, S. E.; SIEGEL, F. L. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. **Toxicology**, v.128, p.191–206, 1998.

DAVIES, J. C. EPA and Nanotechnology: Oversight for the 21st century. **Project on Emerging Nanotechnologies**, 2007.

DÍAZ, A.; CARRO, S.; SANTIAGO, L.; ESTÉVEZ, J.; GUEVARA, C.; BLANCO, J.; SÁNCHEZ, L.; SÁNCHEZ, L.; LÓPEZ, N.; CRUZ, D.; LÓPEZ, R.; CUETARA, E. B.; FUENTES, J. L. Estimates of DNA strand breakage in bottlenose dolphin (*Tsiops urtruncatus*) leukocytes measured with the Comet and DNA diffusion assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 367-372, 2009.

DOWLING, A.I.; Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. **The Royal Academy of Engineering**, Inglaterra, 2004.

DUFFUS, J.H. Heavy metals - a meaningless term? **Pure and applied Quemistry**, IUPAC Technical Report, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.

DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A. H.; GESSNER, M. O.; KAWABATA, Z.; KNOWLER, D. J.; LÉVÊQUE, C.; NAIMAN, R. J.; PRIEUR-RICHARD, A.; SOTO, D.; STIASSNY, M. L. J.; SULLIVAN, C. A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biol. Rev**, v. 81, p. 163–182, 2006.

DURÁN, N., MARCATO, P. D. , ALVES, O. L., DE SOUZA, G.I.H., ESPOSITO, E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* . **Journal of Nanobiotechnology** , 2005.

DUNFORD, R., SALINARO, A., CAI, L., SERPONE, N., SERPONE, S., HIDAKA, H., KNOWLAND, J. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen Ingredients. **Letters**, v. 418 , p. 87-90, 1997.

DUSEK, L.; SVOBODOVA, Z.; JANOUSKOVA, D.; VYKUSOVA, B.; JARKOVSKY, J.; SMÍD, R.; PAVLIS, P. Bioaccumulation of mercury in muscle tissue of fish in the Elbe River (Czech Republic): multispecies monitoring study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.61, p. 256–267, 2005.

EDDTMANN, B. A Genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**, Porto Alegre: Alcance. p. 1-15, 2003.

EIGENMANN, C. H. The American Characidae. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology (Harvard College). v. 43, n. 3, p. 209-310, 1921. In: AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 1997.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; CELIK, A.; KOLELI, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, v. 16, p.385–391, 2007.

ESTEVEES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. FINEP. Ed Interciência. Rio de Janeiro. p. 575-1988.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**. v. 84, p. 415–430, 2007.

FELLENBERG, G. Introdução aos problemas de poluição ambiental. Ed. Pedagógica Editora Springer Ltda. São Paulo, 1980.

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, v. 205, p.223-240, 2004

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). Ed. Hereditas. v. 141, p. 1-5, 2004.

FERNÁNDEZ, B.; CAMPILLO, J.A.; MÁRTINEZ-GÓMEZ, C.; BENEDICTO, J. Micronuclei and other nuclear Abnormalities in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) as Biomarkers of Cyto-genotoxic Pollution in Mediterranean Waters. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52, p. 479-491, 2011.

FINK, S. V.; FINK, W. L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). Zoological. **Journal of the Linnean Society**, v. 72, n. 4, p. 297-353, 1981.

FRACASSO, M. E.; PERBELLINI, L.; SOLDA, S.; TALAMINI, G.; FRANCESCHETTI, P. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. **Mutation Research**, v. 515, p. 159– 169, 2002.

FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.S.F.; ARIAS, A.R.L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n.3, p.347-354, 2008.

FRENZILLI, G., NIGRO, M., LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v.681, p. 80–92, 2009,

GARAVELLO, J. C., SAMPAIO, F.A.A., Five new species of genus *Astyanax* (Baird & Girard) 1854 from Rio Iguaçu, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). **Brazilian Journal Biology**, vol. 70, n. 3, p. 847-865, 2010.

GARCÍA-LESTÓN, J.; MÉNDEZ, J.; PÁSARO, E.; LAFFON, B. Genotoxic effects of lead: An updated review. **Environment International**, v. 36, p.623–63, 2010.

GEISER, M.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; KAPP, N.; SCHURCH, S.; KREYLING, W.; SCHULZ, H. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. **Environmental Health Perspect**, v. 60, p.113:155, 2005.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. **Chemosphere**, v. 81, p.1253–1262, 2010.

GICHNER, T.; MUKHERJEE, A.; WAGNER, E. D.; PLEWA, M. J. Evaluation of the nuclear DNA Diffusion Assay to detect apoptosis and necrosis. **Mutation Research**, v.586, p. 38–46, 2005.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. **Chemosphere**, v. 81, p.1253–1262, 2010.

GRATTON, S. E.; ROPP, P. A.; POHLHAUS, P. D.; LUFT, J. C.; MADDEN, V. J.; NAPIER, M. E. The effect of particle design on cellular internalization pathways. **Proc Natl Acad Sci**, USA, v.105, n. 33, p.1613–1618, 2008.

GULLEDGE, W. P. Letter to the Editor. **Mutation Research**, v. 634, p. 241–242, 2007.

GURR, J.; ALEXANDER, S. S.; WANG, B.; CHEN, C.; JAN, K. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicology**, v. 213, p. 66–73, 2005.

GUSTAVINO, B.; SCORNAJJENGI, K. A.; MINISSI, S.; CICCOTTI, E. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X- Ray and colchicine. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.494, p.151-159, 2001.

HAGGER, J. A.; ATIENZAR, F. A.; JHA, A. N. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p.205–217, 2005.

HANA, S. G.; NEWSOMEA, B.; HENNIGA, B. Titanium dioxide nanoparticles increase inflammatory responses in vascular endothelial cells. **Toxicology**. v. 306, p.1– 8, 2013.

HANDY, R. D.; HENRY, T. B.; SCOWN, T. M.; JOHNSTON, B. D.; TYLER, C. R. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 396–409, 2008.

HANDY, R. D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. **Ecotoxicology**, v.17, p.315–325, 2008.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, PH.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as a index of Cytogenetic Damage: past, present and future. **Environment Molecular Mutagenicity**, v. 18, p. 277 – 291, 1991.

HOET, P. H. M., BRÜSKE-HOHLFELD, I., SALATA, O. V. Nanoparticles – known and unknown health risks. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 2, 2004.

HONG, F.; WU, C.; LIU, C.; WANG, L.; GAO, F.; YANG, F.; XU, J.; LIU, T.; XIE, Y.; LI, X. Direct evidence for interaction between lead ions and kidney DNA from silver crucian carp. **Chemosphere**, v, 68. p.1442–1446, 2007.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Uso de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

JIN, C., ZHU, B., WANG, X.; LU, Q. Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. **Chem. Res. Toxicol.** v. 21, p. 1871–1877, 2008.

JOHNSON, F.M. The genetic effects of environmental lead. **Mutation Research**, v. 410, p.123–140, 1998.

JUNIOR, R. G. S. L.; ARAUJO, F. G.; MAIA, M. F.; PINTO, A. S. S. B. Evaluation of Heavy Metals in Fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research Section**, v. 89, p.171-179, 2002.

KIRSCH-VOLDERS, B. M.; LISON, D. M. Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. **Mutation Research**, v. 533, p.135–52, 2003.

LACERDA, L.D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ambientes aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos Avançados**, v. 22, n.63. p.173-190. 2008.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 544, p. 43–64, 2003.

LEITE, E. M. A.; AMORIM, L. C. A. Noções Básicas de Toxicologia. **Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas**, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. 2006.

LEMOS, C. T.; IRANÇO, F. A.; OLIVEIRA, N. C. D.; SOUZA, G. D.; FACHEL, J. M. G. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. **Science of the total environment**, v. 399, p. 186–192, 2008.

LI, N.; LINGLAN, M.; WANG, J.; ZHENG, L.; IU, J.; DUAN, Y.; LIU, H.; ZHAO, X.; WANG, S.; WANG, H.; HONG, F.; XIE, Y. Interaction Between Nano-Anatase TiO₂ and Liver DNA from Mice *In Vivo*. **Nanoscale Res Lett**, v. 5, p.108–115, 2010.

LI, X., WANG, Y., LI, B., FENG, C., CHEN, Y., SHEN, Z. Distribution and speciation of heavy metals in surface sediments from the Yangtze estuary and coastal areas. **Environmental Earth Science**, 2012.

LINDBERG, H. K., FALCK, G. C. M., SUHONEN, S., VIPPOLA, M., VANHALA, E., CATALÁN, J., SAVOLAINEN, K., NORPPA, H. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. **Toxicology Letters**, v.186, p.166–173, 2009.

LINEY, K. E.; HAGGER, J. A.; TYLER, C.R.; DEPLEDGE, M. H.; GALLOWAY, T. S.; JOBLING, S. Health Effects in Fish of Long-Term Exposure to Effluents from Wastewater Treatment Works. **Environmental Health Perspectives**, v. 11, 2006.

LINHUA, H.; ZHENYU, W.; BAOSHAN, X. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 1459–1466, 2009.

LINNIK, P. M.; ZUBENKO, I. B. Role of bottom sediments in the secondary pollution of aquatic environments by heavy-metal compounds. **Lakes and Reservoirs: Research and Management**, v.5, p.11–21, .2000.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para o monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais. Curitiba**, v. 8, n.4, p. 469-484, 2010.

LIU, L.; TAKENAKA, T.; ZINCHENKO, A. A.; CHEN, N.; INAGAKI, S.; ASADA, H. Cationic silica nanoparticles are efficiently transferred into mammalian cells. **Human Science**, v.5, p.2:281, 2005.

LUCENA, C. A. S. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Telestei, Ostariophysii, Characiformes)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 125p, 1993.

MALIK, N.; BISWAS, A. K.; QURESHI, T. A.; BORANA, K.; VIRHA, R. Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bhopal. **Environmental and Monitoring Assessing**, v. 160, p. 267–276, 2010.

MÁRQUEZ-RAMÍREZ, S. G.; DELGADO-BUENROSTROC, N. L.; CHIRINOC, Y. I.; IGLESIAS, G. G.; LÓPEZ-MARUREA, R. Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. **Toxicology**, v. 302, p. 146–156, 2012.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. **Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do Tibagi**. In: MEDRI, M.E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. A bacia do rio Tibagi. Cap.29, p.551-577,. Londrina, 2002.

MAYNARD, A. D. Nanotechnology: The Next Big Thing, or Much Ado about Nothing? **The Annals of Occupational Higyene**, v. 51, n. 1, p. 1–12, 2007.

MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. **Biomarkers of environmental contamination**, Lewis, Boca Raton, USA, 1990.

MIRANDA, A. L. C. **Bioacumulação de poluentes organoperistentes (POPs) em traíra (*Hoplias malabaricus*) e seus efeitos *in vitro* em células do sistema imune de carpa (*Cyprinus carpio*)**. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

MOHAN, M.; DEEPA, M.; RAMASAMY, E. V.; THOMAS, A. P. Accumulation of mercury and other heavy metals in edible fishes of Cochin backwaters, Southwest India. **Environmental and Monitoring Assessment**, 2011.

MOORE, M. N.; Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**, v. 32, p. 967–976.,2006.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 370-374, 2002.

MOREIRA, O. F.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax sacabripinnis* (PISCES, CHARACIDAE): A species complex. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, n. 2, p. 331-357, 1991.

MONSERRAT, J. M.; MARTINEZ, P. E.; GERACITANO, L. A.; AMADO, L. L.; MARTINS, C. M.; PINHO, G. L.; CHAVES, I. S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 221-34, 2007.

MONTEIRO, V. CAVALCANTE, D.G.S.M., VILÉLA, M. B. F. A. SOFIA, S. H. MARTINEZ, C. B. R. *In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v.104, p.291-298, 2011.

NAN, A.; BAI, X.; SON, S. J.; LEE, S. B. GHANDEHARI, H. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Silica Nanotubes. **Nano Letters**, v. 8, n. 8, p. 2150-2154, 2008.

NAWAZ, S.; NAGRA, S. A.; SALEEM, Y.; PRIYDARSHI, A. Determination of heavy metals in fresh water fish species of the River Ravi, Pakistan compared to farmed fish varieties. **Environmental and Monitoring Assessment**, v.167, p.461–471, 2010.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. New York: John Wiley, 1984.

NEWMAN, M. D.; STOTLAND, M.; ELLIS, J. I. The safety of nanosized particles in titanium - dioxide and zinc - oxide based sunscreens. **The American Academy of Dermatology**, 2009.

NIGRO, M.; FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; GORBIB, S.; REGOLIB, F. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 517–520, 2002.

NUNES, E.A.; LEMOS, C.T.; GAVRONSKI, L.; MOREIRA, T.N.; OLIVEIRA, N.C.D.; SILVA, J. Genotoxic assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**, v.84, p.47-53, 2011.

OBERDÖRSTER, G.; FERIN, J.; GELEIN, R.; SODERHOLM, S. C.; FINKELSTEIN, J. Role of the alveolar macrophage in lung injury—Studies with ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, v. 97, p.193–199, 1992.

OBERDÜRSTER, G. Toxicology of ultrafine particles: *in vivo* studies. **Royal society**, 2000.

OBERDÖRSTER, E. Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stress in the brain of Juvenile Largemouth Bass. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n.10, 2004.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. 3ed, Ed. Atheneu, São Paulo, 2008.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v. 567, p.109-149, 2004.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiation Research**, v. 122, p. 86 – 94, 1990.

OLIVEIRA, M.; AHMADA, I; MARIAB, V. L.; FERREIRA, C. S. S.; SERAFIMB, A.; BEBIANNOB, M. J.; PACHECOA, M.; SANTOS, M. A. Evaluation of oxidative DNA lesions in plasma and nuclear abnormalities in erythrocytes of wild fish (*Liza aurata*) as an integrated approach to genotoxicity assessment. **Mutation Research**, v. 703, p. 83–89, 2010.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Induction of liver EROD and eritrocitic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, p. 71-76, 1998.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.53, p. 331–347, 2002.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.55, p. 329–347, 2003.

PARK, E.J.; YI, J.; CHUNG, K. H.; RYU, D.Y.; CHOI, J.; PARK, K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. **Toxicology Letters**, v.180, p. 222–229, 2008.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. J. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p.421- 430. 2010.

PATRICK, L. N. D. Lead Toxicity, A Review of the Literature. Part I: Exposure, Evaluation, and Treatment. **Alternative Medicine Review**, v. 11, n. 1, p. 2-22, 2006.

PEREIRA, J. C. **Estudo do comportamento de nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes suspensões**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2010.

PLANQUETTE, P.; KEITH, P.; LE BAIL, P. Y. Atlas des poissons d'eau douce de Guyane. **Collection du Patrimoine Naturel**, INRA, CSP, Ministerial. Environment Paris. v. 22, p. 166, 1996.

PIMENTEL, L. C. F.; CHAVES, C. R.; FREIRE, L. A. A.; AFONSO, J. C. O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. **Química Nova**, v. 29, n.5, p.1138-1149, 2006.

POMPEU, S.P.; ALVES, M. B. C.; CALLISTO, M. The Effects of Urbanization on Biodiversity and Water Quality in the Rio das Velhas Basin, Brazil. **American Fisheries Society Symposium**, v.47, p.11–22, 2005.

PORTO, J.I.R.; ARAÚJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**, v.97, p.287-292, 2005.

POSGAI, R., CIPOLLA-MCCULLOCH, C. B. MURPHY, K.R., HUSSAIN, S. M., ROWE, J.J., NIELSEN, M. G. Differential toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles on *Drosophila melanogaster* development, reproductive effort, and viability: Size, coatings and antioxidants matter. **Chemosphere**, v. 85, p 34–42, 2011.

PRAKASH, M.; NAIR, G.; CHOI, J. Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to

cadmium and silver nanoparticles exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 550–560, 2011.

QUINA, F., K. Nanotecnologia e o Meio Ambiente: Perspectivas e Riscos. **Química Nova**. v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004

QUITÉRIO, S. L.; MOREIRA, F. R.; DA SILVA, C. R. S.; ARBILLA, G.; ARAÚJO, U. C.; MATOS, R. C. O. C. Avaliação da poluição ambiental causada por particulado de chumbo emitido por uma reformadora de baterias na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 22, n. 9, p. 1817-1823, 2006.

RABELLO-GAY, M. N. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto – SP. **Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética**, 1991.

RABITTO, I.S.; COSTA, J.R.M.A.; ASSIS, H. C.S.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F.M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; RIBEIRO, C. A. O. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p.147-156, 2005.

RAHMAN, Q., LOHANI, M., DOPP, E., PEMSEL, H., JONAS, L. WEISS, D. G., SCHIFFMANN, D. Evidence That Ultrafine Titanium Dioxide Induces Micronuclei and Apoptosis in Syrian Hamster Embryo Fibroblasts. **Environmental Health Perspectives**, v.110,n 8 , 2002.

RAMSDORF, W.A.; FERRARO, M.V.M.; RIBEIRO, C.A.O.; COSTA, J.R.M.; CESTARI.M.M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental and Monitoring Assessment**, v.158, p. 77-85, 2009.

REEVES, J. F.; DAVIES, S. J.; DODD, N. J.F.; JHA, A.N. Hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) are associated with titanium dioxide (TiO_2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. **Mutation Research**, v. 640, p. 113–122, 2008.

REJMAN, J.; OBERLE, V.; ZUHORN, I. S.; HOEKSTRA, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. **Biochemical Journal**, v.377, p.159–69, 2004.

RIBEIRO, V.E. **Avaliação da qualidade da água do Rio São Francisco no segmento entre Três Marias e Pirapora – MG: metais pesados e atividades antropogênicas**. Belo Horizonte - MG, 2010. Dissertação de Mestrado- Curso de pós-graduação em Geografia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à química ambiental**. 2 ed. Ed. BOOKMAN. 2009.

ROTHEN-RUTISHAUSER, B. M.; SCHÜRCH, S.; HAENNI, B.; KAP, N.; GEHR, P. SCHIMID, W. Interaction of Fine Particles and Nanoparticles with Red Blood Cells Visualized with Advanced Microscopic Techniques. **Environmental Science Technology**, v.40, p. 4353-4359, 2006.

SCHIMID, W. The micronúcleos test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SCOWN, T. **Uptake and Effects of Nanoparticles in Fish**. Tese (Doutorado em Filosofia em Ciências Biológicas)- University of Exeter. Exeter, Inglaterra, 2009.

SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T.; NAPOLEÃO, S. R. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 1, p. 107-112, 2011.

SERPONE, N.; SALINARO, A.; EMELINE, A. Deleterious effects of sunscreen titanium dioxide nanoparticles on DNA: efforts to limit DNA damage by particle surface modification. **Nanoparticles and Nanostructured Surfaces: Novel Reporters with Biological Applications**, v. 4258, p.86-98, 2001.

SHAW, B. J.; HANDY, R.D. Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. **Environment International**, 2011.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S-phase. **J. Cell. Biol**, v.140, p.1307–1320, 1998.

SHIMIZU, N.; SHIMURA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutation Research**, v. 448, p. 81–90, 2000.

SILVA, B. C. E. Brasil. **Balanço mineral brasileiro. Chumbo**. In: DNPM, editor: DNPM-MME, 2001.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N. P. A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 328–337, 2000.

SINGH, N., MANSHIAN, B., JENKINS, J. S., GRIFFITHS, S. M., WILLIAMS, P. M., MAFFEIS, T.G.G., WRIGHT, C. J., DOAK, S.H. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v.30, p. 3891–3914, 2009.

SKOCAJ, M.; FILIPIC, M.; PETKOVIC, J.; NOVAK, S. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? **Radiol Oncol**, v. 45, n.4, p. 227-247, 2011.

SMITH, C. J.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 82, p. 94 –109, 2007.

SOARES, M.G.M.; ALMEIDA, R. G. E.; TUNK, W.T. The trophic status of the fish fauna in Lago Camaleao, a macrophyte dominated floodplain lake in the middle Amazon. **Amazoniana**, v.4, p. 511 – 526, 1986

SPIRO, T. G.; STIGLIANI, W.M. **Química Ambiental**. 2 ed, Ed. Prentice Hall, p. 300-313, 2011.

SUZUKI, T.; MORIMURA, S.; DICCIANNI, M.B.; YAMADA, R.; HOCHI,S.; HIRABAYASHI, M.; YUKI, A.; NOMURAI, K.; KITAGAWAI, T.; IMAGAWA, M.; MURAMATSU, M. Activation of Glutathione Transferase P Gene by Lead Requires Glutathione Transferase P Enhancer I. **The journal of Biological Chemistry**,. v. 271, n.3, .p. 1626-1632, 1996.

SYCHEVAA, L. P.; VJACHESLAV, S.; ZHURKOVA, V.; IURCHENKOA, N.; DAUGEL-DAUGEB, O.; KOVALENKOA, M. A.; DURNEV, A. D. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. **Mutation Research**, v, 726, p. 8-14, 2011.

TICE, R.R. The single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D. H.; VENITT, S. **Environmental Mutagenesis**. **Bios Scientific Publishers**, Oxford, p.315-339, 1995.

TROUILLER, B.;RELIENE, R.; WESTBROOK, A.; SOLAIMANI, P.; SCHIESTL, R. H. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability In vivo in Mice. **Cancer Research**, 2009.

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

TANAN, C. T.; VENTURA, D. F.; SOUZA, J. M.; GROTZNER, S.R.; GOUVEIA JR, S. R.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A. Effects of mercury intoxication on the response of horizontal cells of the retina of thraira fish (*Hoplias malabaricus*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 987-995, 2006.

UCHINO H, MINAMIKAWA-TACHINO R, KRISTIA'N T, PERKINS G, NARAZAKI M, SIESJO" BK, SHIBASAKI F. Differential neuroprotection by cyclosporine A and FK506 following ischemia corresponds with differing abilities to inhibit calcineurin and the mitochondrial permeability transition. **Neurobiology Disease**, v.10, p.219-33. 2002.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v.79, p.201-204, 2006.

UEDA, T.; HAYASHI, M.; KOIDE, N.; SOFUNI, T., KOBAYASHI, J. A preliminary study of the micronucleus teste by acridine orange fluorescent staining compared with cromossomal aberration teste using fish erythropoietic and embrionic cells. **Water Science and Technology**, v. 25, p. 235-240, 1992.

VALAVANIDISA, A.; VLAHOGIANNIA, T.; DASSENAKISB, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178–189, 2006.

VEVERS, W.F.; JHA, A. N. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells *in vitro*. **Ecotoxicology**, v. 17, p.410–420, 2008.

VILLELA, I.; LAU, A.; SILVEIRA,J.; PRÁ, D.; ROLLA, H.; SILVEIRA, J. Bioensaios para o monitoramento de Genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**, Ed. Alcance. Porto Alegre, Cap.7, p.147-160, 2003.

XU, M., HUANG, M., XIAO, Z., LU, Z. Photoexcited TiO₂ nanoparticles through OH⁻ radicals induced malignant cells to necrosis. **Supramolecular Science**, v. 5, p.449-451, 1998.

ZAGATTO, P.; A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2 ed. Editora Rima. 2006.

ZHANG A. P.; SUN, Y. P. Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. **World Journal Gastroenterology**, v.10, p. 3191–3, 2004.

ZHANG, X.; HONGWEN, S.; ZHANG, Z.; NIU, Q.; CHEN, Y.; CRITTENDEN, J. C. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. **Chemosphere**, v. 67, p. 160–166, 2007.

ZHANG, R.; NIUA,Y.; LI, Y.; ZHAOC, C.; SONGA, B.; LI, Y.; ZHOUB, Y. Acute toxicity study of the interaction between titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 52–60, 2010.

WANG, J. G.; ZHOU, G. K.; CHEN, C.Y. YU, H.W.; WANG, T.C.; JIA, Y. X.; GAO, B.; LI, J.; SUN, Y. F.; LI, F.; JIA, Y. L.; ZHASO, Z .F. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. **Toxicology Letters**, v.168, p.176–185, 2007.

WARHEIT, D. B.; BROCK, W. J.; LEE, K. P.; WEBB, T. R.; REED, K. L.; Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. **Toxicology Science**, v. 88, p.514–524, 2005.

WARHEIT D. B.; WEBB, T.R.; SAYES, C. M.; COLVIN, V. L.; REED, K. L.; Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. **Toxicology Science**, v. 91, p. 227–236, 2006.

WARHEIT, D. B.; WEBB, T. R.; REED, K. L.; FRERICHS, S.; SAYES, C. M. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine- TiO₂ particles:

differential responses related to surface properties. **Toxicology**, v. 230, p.90–104, 2007.

WHO. **Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace**. World Health Organization, Geneva, 1996.

APÊNDICES

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio Cometa

A técnica utilizada foi a descrita por Singh *et al.* (1988) com algumas modificações realizadas por Ferraro (2003).

Preparações prévias

Previamente à coleta do material para análise são preparadas lâminas cobertas com agarose de ponto de fusão normal (NMP), uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e todos os demais reagentes necessários, segundo as etapas descritas a seguir:

Lâminas com cobertura de agarose

- a) Dissolver 1,5 g de agarose normal em 100 ml de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas.
- b) Prossegue-se ao aquecimento da solução, após fervura, deixar solidificar em temperatura ambiente.
- c) Picar a agarose em pedaços e voltar a ferver.
- d) Repetir as etapas “b” e “c”.
- e) Levar para banho-maria a 70°C, o banho deve ficar no nível da agarose.
- f) Mergulhar as lâminas, previamente limpas com etanol, na agarose até alcançar a parte esmerilhada. Procurar fazer uma camada fina de agarose.
- g) Retirar a lâmina e limpar com papel o lado oposto da parte esmerilhada.
- h) Secar a lâmina “overnight” em temperatura ambiente na horizontal. Estas lâminas podem ser estocadas por várias semanas.

Preparo da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)

- a) Dissolver 0,1 g de agarose de baixo ponto de fusão em 20 ml de PBS;
- b) Colocar para aquecer com agitação constante;
- c) Desligar o aquecedor quando levantar fervura e manter a agitação até diminuir a temperatura da agarose;
- d) Desligar o agitador e deixar solidificar a temperatura ambiente;
- e) Manter na geladeira até o momento do uso.

PBS

- 0,2 g de cloreto de potássio – KCl (PM 74,55).
 - 0,2 g de fosfato de potássio monobásico – KH_2HPO_4 (PM 136,09).
 - 8 g de cloreto de sódio - NaCl (PM 58,44).
 - 1,15 g de hidrogênio fosfato disódico anidro - NaHPO_4 (PM 141,96).
 - 1000 ml de água deionizada.
- a) Preparar em balão volumétrico de 1000 ml;
 - b) Acrescentar água até alcançar a marca do balão volumétrico;
 - c) Acertar o pH para 7,4;
 - d) Estocar em refrigerador;

Solução de Lise – Estoque

Para 1000 ml:

- 890 ml de água destilada.
 - 146,1 g de Cloreto de Sódio - NaCl (2,5 M).
 - 37,2 g de Ácido Etilenodiaminotetracético - EDTA (100 mM; PM 372,24).
 - 1,2 g TRIS 10 mM (PM 121,14).
 - 8 g de Hidróxido de Sódio sólido (NaOH PM 40,0).
- a) Dissolver os reagentes em 890 ml de água;
 - b) Acertar o pH com NaOH até atingir pH 10,

c) Adicionar 10 g de lauril sarcosinato de sódio e misturar bem lentamente para evitar a formação de grumos.

Solução de Lise –Uso

Para 100 ml:

1 ml de Triton X – 100.

10 ml DMSO.

89 ml solução estoque.

- a) Adicionar todos os reagentes em uma proveta de 100 ml e misturar bem;
- b) Durante e após o preparo manter a solução no escuro.

Solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) (300 mM):

- 21,6 g de NaOH;
- 54 ml de água deionizada;

a) Agitar os reagentes;

Ácido Etilenodiaminotetracético - EDTA (200 Mm) – Estoque

- 14,89 g de EDTA.
- 200 ml de água deionizada.

- a) Acertar o pH para 10 com pastilhas de NaOH;
- b) A solução pode ser estocada *ad eternum*.

Tampão de Eletroforese

- 1800 ml de água destilada gelada (4°C).
- 9 ml de EDTA (200 Mm).
- 54 ml da solução de NaOH.

- a) Agitar os reagentes;
- b) Acertar o pH para maior que 13 com pastilhas de NaOH

Tampão de Neutralização

- 51,04 g de TRIS.
- 1000 mL de água deionizada.

- a) Agitar os reagentes;
- b) Acertar o pH para 7,5 com Ácido clorídrico (HCl).

Solução de Coloração – Estoque

- 10 mg de Brometo de Etídio.
- 50 ml de água deionizada.

Solução de Coloração – Uso

- 1 ml de solução estoque.
- 9 ml de água deionizada

Descontaminação das lâminas

- Deixar as lâminas expostas à luz por aproximadamente uma semana;
- Após este período, colocar de molho na solução de descontaminação por 24 horas;
- Neutralizar a solução com bicarbonato de sódio (NaHCO₃);

Lavar as lâminas utilizando luvas.

Solução de descontaminação:

- a) 1L de água;
- b) 13,6 g de nitrito de sódio (NaNO₂);
- c) 67 ml de ácido hipofosforoso (H₃PO₂).

Ensaio Cometa com eritrócitos

O sangue coletado de cada animal foi armazenado em tubos tipo *ependorf* contendo 1 ml de soro bovino fetal (o soro bovino mantém a integridade das células) e mantido sob refrigeração e ao abrigo da luz, a fim de evitar danos adicionais ao DNA;

Uma suspensão celular com 10 μ l da solução de sangue e 120 μ l de agarose LMP foi preparada e depositada sobre uma lâmina previamente coberta com uma fina camada de agarose normal (NMP);

A lâmina foi coberta com uma lamínula e mantida em geladeira por 15 minutos;

Após esse tempo, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas imersas em uma solução de lise no interior de cubetas de acrílico, e mantidas em refrigeração (4°C) por 24h;

Completado esse tempo, as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese horizontal e agregadas de forma a se evitar espaços entre as mesmas, permitindo assim que a corrente elétrica atravessasse todas com igual intensidade;

O tampão alcalino (pH>13) foi adicionado na cuba, cobrindo todas as lâminas. Foram aguardados 30 minutos antes de ser iniciada a eletroforese para que nesse tempo o DNA fosse desnaturado;

A eletroforese foi então conduzida com a cuba imersa em gelo a uma temperatura média de 4°C, à 25 V e 300 mA por 25 minutos;

Concluída a eletroforese as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e tiveram seu pH neutralizado com 5 mL de tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos; esse procedimento foi repetido por mais duas vezes;

As lâminas foram mantidas em posição inclinada para secagem, e após, fixadas com etanol absoluto por 5 minutos;

As lâminas foram estocadas até o momento da análise, quando foram coradas com 15 μ L de brometo de etídeo, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio de fluorescência com aumento de 400x em teste cego sendo contabilizados 100 nucleóides por lâmina;

Os nucleóides foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a eletroforese. Foram estabelecidas 4 classes

distintas de classificação: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano grande) e 4 (dano máximo);

Os escores foram calculados através da multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo respectivo valor da classe:

Escore = [(0 x no dano 0)+(1 x no dano 1)+(2 x no dano 2)+(3 x no dano 3)+(4 x no dano 4)].

Ensaio Cometa com tecido hepático

Parte do fígado foi removido dos animais e acondicionado sob as mesmas condições descritas para o tecido sanguíneo;

O tecido foi então desagregado em homogeneizador Potter a 1500 rpm por cerca de 30 segundos;

Foi realizada uma suspensão celular com 13 μ l do tecido homogeneizado e 120 μ l de agarose de baixo ponto de fusão (LMP);

Os processos seguintes de montagem das lâminas, análise e classificação de danos são semelhantes aos descritos para o tecido sanguíneo;

Ensaio de Difusão

O Ensaio de Difusão foi realizado segundo Singh (2000). A análise foi realizada com o tecido sanguíneo e as etapas se assemelham ao Ensaio Cometa, com exceção da corrida de eletroforese.

As soluções preparadas para a realização do Ensaio Cometa foram utilizadas também para o Ensaio de Difusão.

Após as lâminas terem sido mantidas em solução tampão de pH alcalino (pH>13) para a desnaturação do DNA, foram então neutralizadas, não ocorrendo a etapa de eletroforese;

Os procedimentos de neutralização e coloração foram os mesmos do Ensaio Cometa;

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência, com aumento de 400x em teste cego, contabilizando 100 nucleóides por lâmina;

Os nucleóides foram diferenciados entre normais (com danos ou não), apoptóticos e necróticos. Os nucleóides que não resultaram em apoptose ou

necrose são maiores e com projeções de DNA em todos os lados. Os nucleóides em apoptose possuem um gradiente circular de DNA granular com uma zona central densa e mais clara, tendo uma região externa nebulosa dando a aparência de uma auréola. Ao contrário, os núcleos em difusão em processo de necrose mostram um contorno externo bem definido e uma aparência clara. O contorno acentuado em células necróticas pode ser devido ao maior tamanho de fragmento do DNA, em células apoptóticas ocorre a difusão de fragmentos menores.

Teste de Micronúcleo Písceo com coloração fluorescente Laranja de Acridina

O Teste do Micronúcleo Písceo com coloração fluorescente de laranja de acridina em eritrócitos foi realizado de acordo com Ueada *et al.*, (1992) e utilizado para a determinação da frequência de micronúcleos (MN), de alterações morfológicas nucleares (AMN) e verificação do efeito do contaminante no processo de eritropoiese através da análise da frequência de eritrócitos policromáticos ou imaturos.

O sangue coletado dos animais foi diluído em 1 ml de soro bovino fetal e uma gota dessa solução foi utilizada para a extensão em uma lâmina previamente limpa.

As lâminas foram secas em temperatura ambiente, e posteriormente fixadas em etanol absoluto por 15 minutos. Depois de secas, foram então coradas com 15µl do corante laranja de acridina 0,003% em tampão Sorenson's com pH 6,8 por 2 a 3 minutos e analisadas em microscópio de epifluorescência, em aumento de 1000x.

Foram analisadas 2000 células por peixe em teste cego.

Para a identificação de MN em eritrócitos maduros e jovens foi empregada a técnica descrita por ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA (2005). A laranja de acridina cora seletivamente eritrócitos imaturos ou policromáticos. Sob microscópio fluorescente, micronúcleos e os principais núcleos apresentam forte fluorescência verde-amarelo e entre todas as células, os eritrócitos imaturos puderam ser facilmente identificados pelo seu conteúdo de RNA citoplasmático, apresentando fluorescência vermelha no citoplasma.

O critério para a identificação de MN em ambos os tipos de células (jovens ou maduras) foi o seguinte:

- a) O micronúcleo não ultrapassou um terço do tamanho do núcleo principal.

- b) O micronúcleo estava claramente separado do núcleo principal.
- c) O micronúcleo estava no mesmo plano de foco e apresentava mesma cor e refringência do núcleo principal.

As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, também foram analisadas, sendo descritas como alterações morfológicas nucleares (AMN). (CARRASCO *et al.*, 1990).

Quantificação de Metalotineína

A análise foi realizada segundo Viarengo *et al.*, 1997 com algumas modificações.

O método consiste em avaliar o conteúdo de resíduos de -SH utilizando o reagente de Ellman (DTNB) a 412 nm, uma vez que as metalotioneínas são caracterizadas por um alto conteúdo de cisteínas (aproximadamente 20-30%) quando comparadas a outras proteínas presentes nos extratos etanólicos.

As amostras de fígado foram descongelados, homogeneizadas em tampão com gelo (5 mM de phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), 0.01% de β -mercaptoethanol, 20 mM Tris-HCl, 500 mM sucrose, pH 8.6), e centrifugadas a 15000 rpm por 40 minutos à 0 °C.

Em seguida, 300 μ L de sobrenadante (tampão para o ensaio em branco) e 342 μ L de etanol-clorofórmio (13:1; à temperatura de -20 ° C) foram misturadas e centrifugadas a 6000 rpm durante 10 min, a 0 °C. Um volume de 490 μ L do sobrenadante foi misturado com 1502 mL de etanol-HCl (45:1; à temperatura de -20 °C) e mantida a -20 °C durante 1 h. Após este período, os tubos foram centrifugados (6000 g durante 10 min, e 0 °C) e as proteínas sedimentadas foram suspensas com 50 mL de solução de NaCl 250 mM.

Após, 50 μ L de solução de EDTA (4 mM de EDTA-2Na, 1 M HCl) e 1000 mL de solução de Ellman (2 mM DTNB (ácido 5,5 '-ditio-bis (2-nitrobenzóico), fosfato de sódio 0,2 M, 2 M NaCl) foram adicionados aos tubos, misturadas e centrifugadas (3000g durante 5 min), para determinação da absorbância a 412 nm. O conteúdo de sulfidril foi determinado por comparação com uma curva de glutathione (GSH), e a concentração de Metalotioneína foi calculado considerando o teor de cisteína em Metalotioneína (30%) descrito para mexilhões.

Atividade de Catalase

A atividade da catalase foi avaliada segundo o método proposto por Aebi (1984), que se baseia no consumo do peróxido de hidrogênio exógeno pela catalase, gerando oxigênio e água, o que pode ser mensurado por espectrofotometria.

As amostras de fígado foram descongeladas e diluídas na proporção de 1:5 (ou 5% V/V) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Em cubetas de quartzo foram pipetados 990 µl de solução reação (Tampão Tris 1M / EDTA 5 mM pH 8,0, peróxido de hidrogênio 20 mM e água MilliQ), seguido de 10 µl de amostra. Foi monitorada a absorbância de três réplicas para cada amostra, em espectrofotômetro ULTROSPECT 4300 PRO, com comprimento de onda a 240 nm, por 1 minuto e 30 segundos. A atividade foi expressa em µmol.min⁻¹.mg.proteína⁻¹.

Atividade de Glutathione S-transferase

As amostras de fígado foram descongeladas e diluídas na proporção 1:10 (V/V) em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5. Em microplaca foram pipetados 20 µl de amostra, em 4 réplicas, seguido de 180 µl da solução reação, composta por CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 3,0 mM e GSH (glutathione reduzida) 3,0 mM.

O método foi proposto por Keen *et al.* (1976), e seu princípio é a conjugação do CDNB com a GSH pela ação da GST, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância. A leitura foi feita em espectrofotômetro SYNERGY HT, a 340 nm e a atividade foi expressa em µmol.min⁻¹.mgproteína⁻¹.

Atividade da Superóxido dismutase (SOD)

Para a análise da atividade da SOD foi utilizado o método proposto por Crouch *et al.* (1981), cujo princípio é a inibição da redução do nitrobluetetrazólio (NBT) para azul pela SOD, através do O²⁻ gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, sendo esta redução medida espectrofotometricamente, a 560 nm, em espectrofotômetro SYNERGY HT.

Na microplaca foram pipetados 20 µl de cada amostra (com 25% de etanol), seguidos de 70 µl da solução de NBT e 110 µl de tampão carbonato de sódio (182

mM, pH 10,2) com hidroxilamina 67mM. A leitura foi realizada durante uma hora com intervalos de cinco minutos. Os resultados foram expressos em U.mL.mgproteína⁻¹.min⁻¹.

Análise Estatística

Considerando que os dados obtidos não possuem distribuição normal e as amostras são independentes, ou seja, não apresentam qualquer grau de irmandade ou parentesco conhecido, os dados foram analisados por testes estatísticos não paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparações entre mais de duas amostras independentes, e Mann-Whitney, quando foram comparadas duas amostras independentes, como quando foram comparadas as respostas entre os tecidos. As análises foram feita com o programa computacional BioEstat 5.0[®] e os gráficos pelo programa GraphPad Prism 5[®].