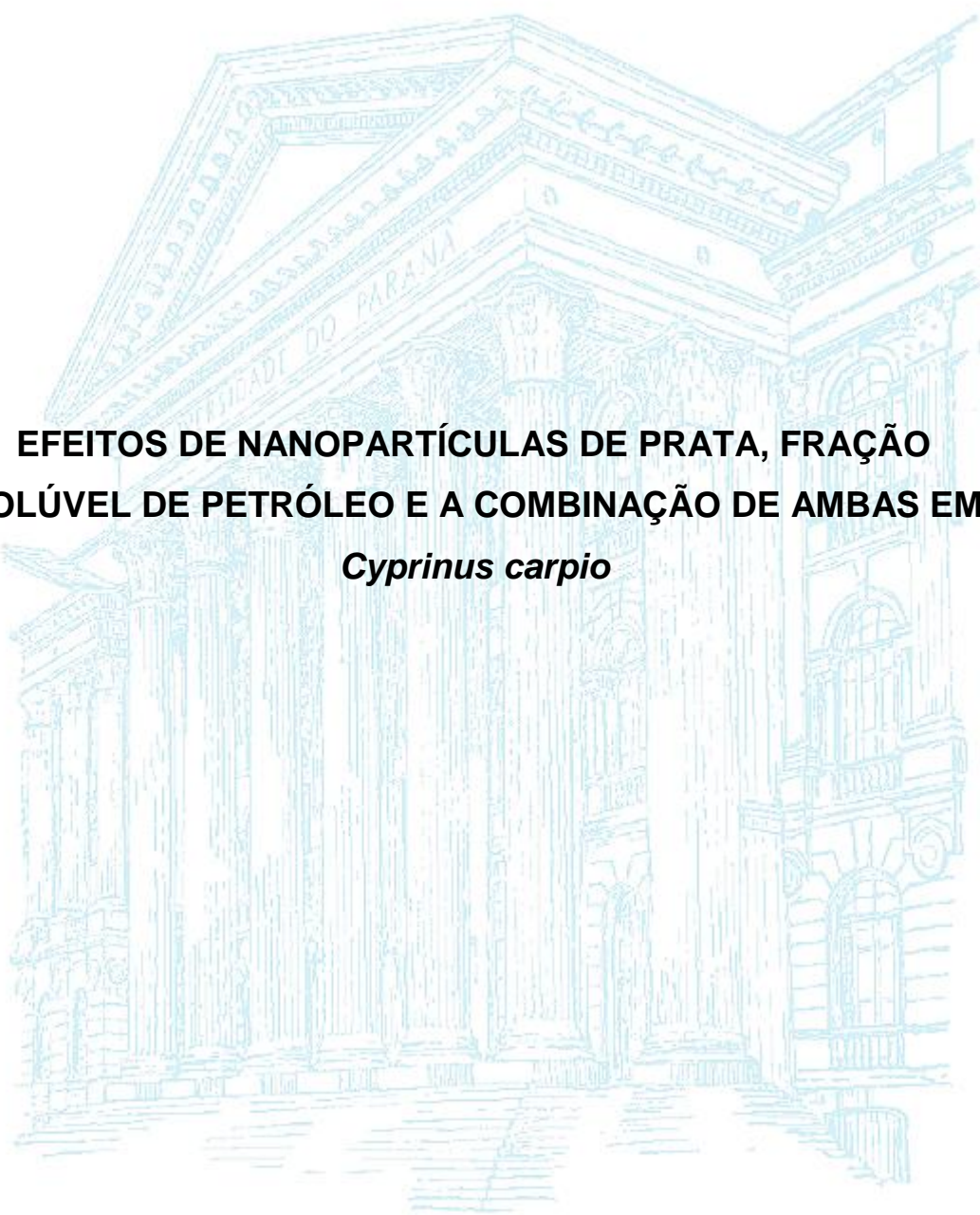


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA GLINSKI



**EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA, FRAÇÃO  
SOLÚVEL DE PETRÓLEO E A COMBINAÇÃO DE AMBAS EM  
*Cyprinus carpio***

CURITIBA  
2011

**ANDRESSA GLINSKI**

**EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA, FRAÇÃO  
SOLÚVEL DE PETRÓLEO E A COMBINAÇÃO DE AMBAS EM  
*Cyprinus carpio***

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Biologia Celular como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA  
2011



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas



**PARECER DA COMISSÃO DE AVALIAÇÃO  
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DA DISCIPLINA  
DE ESTÁGIO CURRICULAR**

Aos 07 dias do mês de Julho de 2011 a Comissão de Avaliação da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, composta por Prof. FRANCISCO FILIPAK NETO, Profa. SONIA REGINA GROTZNER e Prof. DANIEL BUSSOLARO, reuniu-se para proceder a avaliação da Monografia intitulada **Efeito de nanopartículas de prata, fração solúvel de petróleo e a combinação de ambas em *Cyprinus carpio***, de autoria da acadêmica ANDRESSA GLINSKI.

A Comissão julgou o trabalho e atribui a nota 9,7.

Francisco Filipak Neto  
Prof.(a) Orientador(a)

[Assinatura]  
Membro da Comissão

[Assinatura]  
Membro da Comissão

Curitiba, 07 de Julho de 2011.

*Dedico este trabalho a Darci Afonso Moreira,  
(in memoriam) exemplo de sabedoria, fé e superação.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos e a cada um que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, permitindo-me um aprendizado gratificante.

Em especial, sou grata

Ao Meu Orientador, Francisco Filipak Neto, pela confiança, pelo incentivo, apoio, disponibilidade e paciência não apenas na realização deste trabalho, mas em todos os momentos em que precisei.

À Professora Dra. Sonia Regina Grotzner e ao Dr. Daniel Bussolaro que prontamente aceitaram fazer parte da banca avaliadora desta monografia e que muito contribuíram para meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao Professor Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro por oportunizar o ingresso nesse conceituado grupo de pesquisa.

À Rô, secretária da coordenação do curso de Ciências Biológicas, e muitas vezes mãe de todos os aspirantes a Biólogos dessa Universidade, por toda a ajuda, paciência, conselhos e cuidados conosco.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Celular, em especial, Ana Luisa, Dandie, Daniele, Izabela e Samuel, pela ajuda no processamento do material e nas análises deste trabalho e por todos os momentos de descontração marcando eppendorfs e plaqueando amostras.

De uma maneira particular ao Daniel, Rodrigo, Dandie, Samuel e Daniele, pela amizade, pelo aprendizado, por compartilhar tantos sorrisos e brincadeiras, tornando esse ambiente de laboratório a nossa segunda casa.

Aos amigos da faculdade, pelos momentos de descontração e estudo sem os quais seria praticamente impossível concluir essa graduação. Um especial agradecimento à Valdirene e ao Flávio pelo agradável convívio que tivemos;

Ao Meu Namorado Diogo, por estar ao meu lado dando apoio e força para superar os desafios. Pela compreensão, incentivo, e pela paciência diante de tantas ocasiões neste período de graduação;

À Minha Família, fonte de sabedoria. Obrigada pelo apoio e estímulo. Sozinha eu não conseguiria chegar até aqui.

Sobretudo a Deus, pelo dom da vida, pela saúde, pela paz que me conforta nos momentos difíceis, pelo amor que me sustenta, pelas

oportunidades que me trouxeram até aqui, fato que me incluiu em uma minoria privilegiada da sociedade, num mundo onde poucos têm a alegria de estar próximo à arte do saber.

## RESUMO

Recentemente, a nanotecnologia tem ocupado lugar de destaque na economia e na ciência devido às propriedades específicas que possibilitam sua múltipla aplicação na indústria têxtil, cosmética, farmacêutica, médica etc. Entretanto, estudos já demonstraram que algumas nanopartículas representam risco aos organismos, principalmente por suas características potencializadoras dos efeitos tóxicos de poluentes devido ao seu diminuto tamanho e sua capacidade de adsorver substâncias químicas diversas como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e carregá-los para o interior das células. Dessa forma, os rejeitos nanotecnológicos podem ser nocivos para a biota. No presente trabalho, os efeitos isolados e associados de nanopartículas de prata e da Fração Solúvel de Petróleo foram avaliados em peixes da espécie *Cyprinus carpio* (carpa) através de bioensaio. Após exposição durante 24, 72, 120, e 120 h seguida de depuração por mais 120 h. Amostras de bile, músculo e cérebro foram coletadas para quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e determinação da atividade da acetilcolinesterase muscular e cerebral e da peroxidação lipídica. Houve um aumento da concentração de HPAs na bile após a exposição à FSA e uma posterior redução desta concentração após a depuração, embora esta última não tenha sido completa, e ao contrário do esperado, as nanopartículas de prata não aumentaram os níveis de HPAs na bile. Contudo, a redução da atividade da acetilcolinesterase cerebral após 120 h na presença de nanopartículas e FSA associadas pode refletir uma possível facilitação da entrada de HPAs no sistema nervoso central pelas nanopartículas, embora isto precise ser comprovado.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de Prata. Fração Solúvel de Petróleo. *Cyprinus carpio*. Acetilcolinesterase. Toxicologia.

## ABSTRACT

Recently, nanotechnology has become an important field in economy and science due to its specific properties that allow multiple applications in the textile, cosmetic, pharmaceutical, medical industries etc. However, some nanoparticles can affect the health of organisms, mainly due to their high area to volume ratio and ability to adsorb various chemicals such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and carry them into cells. Then, nanotechnology wastes can be harmful to biota. In this study, the isolated and associated effects of silver nanoparticles and the soluble fraction of petroleum were evaluated in the fish species *Cyprinus carpio* (carp) through a bioassay. After exposure for 24, 72, 120 h and 120 h followed by depuration over 120 h, samples of bile, muscle and brain were collected for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons and determination of acetylcholinesterase activity in the muscle and brain, as well as lipid peroxidation in the brain. An increased concentration of PAHs in the bile after exposure to FSA and a further reduction of this concentration after depuration were observed, although the latter was not complete. Also, contrary to expectations, the silver nanoparticles did not increase the levels of PAHs in the bile. Finally, the entry of PAHs in the central nervous system may be eased by nanoparticles, so that a reduction of the cerebral acetylcholinesterase activity was observed after 120 h of exposure.

**Keywords:** silver nanoparticles. Soluble Fraction of petroleum. *Cyprinus carpio*. Acetylcholinesterase. Toxicology.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
1.1 Nanopartículas.....	9
1.2 Petróleo.....	11
1.3 Ensaio toxicológicos .....	14
1.4 Biomarcadores.....	15
1.5 Modelo biológico .....	17
1.6 Justificativa.....	18
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos .....	19
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 Desenho Experimental.....	20
3.1.1 Preparo da Fração Solúvel de Petróleo .....	20
3.1.2 Preparo das nanopartículas de prata .....	21
3.2 Exposição dos peixes.....	21
3.3 Coleta do material biológico .....	21
3.4 Concentração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) na Bile .....	22
3.5 Atividade da acetilcolinesterase .....	22
3.6 Peroxidação Lipídica .....	23
3.7 Quantificação de proteínas totais.....	24
3.8 Tratamento estatístico dos dados .....	24
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
4.1 Concentração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	25
4.2 Atividade da acetilcolinesterase .....	24
4.3 Peroxidação lipídica.....	26
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>32</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos sofrem intenso impacto de vários produtos gerados pela atividade humana. Os esgotos, derramamentos de petróleo e óleo, agrotóxicos, despejos industriais e várias outras atividades humanas cotidianas afetam importantes ecossistemas naturais como rios, lagos, reservatórios e oceanos. Desde a revolução industrial até os dias atuais, os contaminantes antropogênicos vêm tornando-se mais diversificados, abundantes e dispersos no ambiente aquático, o que aumenta a preocupação em preservar e manter a qualidade dos ecossistemas naturais. Devido a isso, vários estudos têm sido realizados visando o aprimoramento e o desenvolvimento de metodologias para uma melhor compreensão do potencial tóxico de contaminantes no ambiente aquático, uma vez que estes podem levar a perturbações metabólicas e ao comprometimento de processos fisiológicos vitais, como respiração, reprodução e crescimento (STEGEMAN *et al.*, 1992). Além disso, muitas das substâncias poluidoras causam problemas particulares para o ambiente aquático dulcícola ou marinho, visto que apresentam ao mesmo tempo toxicidade, persistência e bioacumulação na cadeia alimentar. Desse modo, a ingestão de organismos contaminados pode funcionar como importante veículo para animais predadores, com riscos inclusive para a população humana.

### 1.1 Nanopartículas

Atualmente, uma nova e ampla classe de contaminantes produzidos pelo homem, as nanopartículas, são cada vez mais comuns nos ambientes naturais, visto que as atividades industriais envolvendo a nanotecnologia apresentam-se num crescimento acelerado. Dessa forma, rejeitos industriais tendem a atingir facilmente os corpos d'água e é inevitável que rejeitos nanotecnológicos também alcancem com facilidade o ambiente aquático (HOWARD, 2004; ROYAL SOCIETY e ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004).

Apesar de a nanotecnologia ser uma das mais inovadoras e crescentes áreas da ciência, da economia e da medicina, inclusive no diagnóstico e terapia do câncer, seus produtos podem representar riscos ao ambiente e à saúde humana. As propriedades específicas e o pequeno tamanho das nanopartículas (~1 a 100 nm) podem torná-las tóxicas aos seres vivos. Existem várias evidências que apontam efeitos danosos da combustão derivada de nanopartículas que, quando inaladas, podem causar um grande número de patologias pulmonares em humanos e outros mamíferos (BUSSOLARO, 2010).

Estudos têm demonstrado que o tamanho das nanopartículas é crucial para sua internalização (LIMBACH *et al.*, 2005), que ocorre normalmente por endocitose, e, deste modo, a toxicidade também está relacionada a esta característica (FUJIWARA *et al.*, 2008; CARLSON *et al.*, 2008). As nanopartículas têm uma grande relação entre área de superfície e volume, e também um grande número de átomos na superfície do material; Enquanto menos de 1% dos átomos ocupam a superfície em micropartículas, em torno de 10 a 40% ocupam esta região em uma nanopartícula de metal de 10 nm de diâmetro (NEL *et al.*, 2006; GRAINGER e CASTNER, 2008). Isso faz com que as características físico-químicas como reatividade sejam diferentes das da micro e macroescala. Além disso, esta superfície pode apresentar grande afinidade por compostos químicos orgânicos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (CHENG *et al.*, 2004), fornecendo rotas potenciais para a entrada destes contaminantes em locais onde eles normalmente não chegariam (BERRY *et al.*, 2004). Por isso, os estudos de risco envolvendo nanopartículas não devem focar unicamente na toxicidade inerente às nanopartículas, mas também considerar as possíveis interações das mesmas com poluentes já existentes no ambiente (BAUN *et al.*, 2008). Além disso, pode haver a formação direta de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem danificar estruturas como proteínas e membranas celulares (BROWN *et al.*, 2001).

Os pulmões, brônquias e intestino são importantes vias de absorção de nanopartículas, e através de fenestrações, essas nanopartículas podem ser transportadas pela circulação, atingindo assim diversos tecidos e órgãos incluindo o fígado, rins e cérebro (ARTELT *et al.*, 1999; TAKENAKA *et al.*, 2001; NEMMAR *et al.*, 2002; SHIMADA *et al.*, 2006).

Dentre os diversos tipos de nanopartículas já desenvolvidos pela ciência, destacam-se as nanopartículas de prata, que, devido às suas notáveis propriedades antimicrobianas, estão sendo utilizadas em vários produtos. As aplicações típicas deste tipo de nanopartículas incluem o revestimento de roupas e tecidos, dispositivos médicos, armazenamento de alimentos, cosméticos, máquinas de lavar roupas (JUNG *et al.*, 2007), curativos e ataduras (ARORA *et al.*, 2008), filtros para tratamento de água (LI *et al.*, 2008), sensores (SCHRAN *et al.*, 2008) e produtos farmacêuticos (CHEN e SCHLUESENER, 2008; SUN *et al.*, 2008).

Produtos contendo nanopartículas como máquinas de lavar, roupas e produtos de higiene e cuidado pessoal provocam a liberação de nanopartículas diretamente nos esgotos das fábricas onde são produzidos e, por conseguinte, nos ecossistemas aquáticos, contaminando os organismos que vivem nestes locais. Nos últimos anos, as nanopartículas de prata tornaram-se assunto de grande preocupação no que se refere à nanotoxicologia aquática (FARRÉ *et al.*, 2009), pois é uma tarefa difícil monitorar estas partículas no ambiente aquático e ter acesso aos seus efeitos em organismos que vivem nestes locais (DOMINGOS *et al.*, 2009). O destino das nanopartículas no ambiente aquático, suas interações com os componentes bióticos e abióticos e seu potencial em causar danos são pouco entendidos e estas incertezas estão gerando preocupações em relação aos riscos que estas nanopartículas impõe à saúde humana e ao ambiente (SCOWN *et al.*, 2010).

## 1.2 Petróleo

A descoberta dos benefícios do uso do petróleo e suas vantagens para o desenvolvimento da indústria, de refinarias voltadas à produção de combustíveis e derivados, e da sociedade em geral, fez com que houvesse um aumento exorbitante no consumo do mesmo, de modo que hoje o petróleo tornou-se indispensável para garantir a qualidade de vida do homem. Por outro lado, o beneficiamento do petróleo trouxe também problemas de ordem ambiental e social, os quais têm se agravado com o aumento da demanda em função do crescimento da atividade industrial, do consumo de derivados e da

frota de veículos dependentes desta fonte de combustíveis. O crescente aumento do consumo mundial tem acarretado a sua introdução principalmente no ambiente marinho, pois nesse ambiente processam-se a maior parte do transporte e desembarque do petróleo do mundo, atividades essas que aumentam a possibilidade de acidentes com tais produtos.

Embora haja um esforço para minimizar tais impactos, o aumento da atividade petrolífera e a ocorrência de acidentes durante a carga e descarga, transporte ou produção de seus subprodutos, cada vez mais frequentes nos últimos anos em rios, lagos e oceanos, têm preocupado a comunidade científica no sentido de desenvolver metodologias mais eficientes no diagnóstico dos efeitos sobre o ambiente natural e dos riscos para a saúde humana (AKAISHI, 2003). A compreensão do comportamento dos diferentes componentes do petróleo no solo, água e ar é muito importante para a avaliação dos efeitos à saúde e à biota decorrente dessa exposição, constituindo hoje um grande desafio para os ecotoxicologistas (PEDROZO *et al.*, 2002).

Após atingir o ambiente aquático, o petróleo pode passar por diferentes processos, como evaporação, dissolução, oxidação, sedimentação, biodegradação e absorção pela biota (PEDROZO *et al.*, 2002). Esses processos, coletivamente, determinam o destino destes produtos e os seus impactos sobre os ambientes naturais. Particularmente, o processo de dissolução na água, que ocorre logo após o contato tem uma importância especial do ponto de vista toxicológico.

Embora dependa da turbulência do corpo d'água, a quantidade de óleo dissolvido na água geralmente é pequena. No entanto, essa fração solúvel do petróleo (FSA) difunde-se além da mancha de óleo, podendo ocasionar impactos mais imediatos aos organismos aquáticos. Assim, a FSA é considerada um importante determinante de toxicidade do petróleo e seus derivados em acidentes (SAEED e MUTAIRI, 1999)

O petróleo assim como seus óleos derivados são misturas complexas de compostos orgânicos. De acordo com Neff (1978), 75% dos constituintes do petróleo são hidrocarbonetos de cadeias longas e curtas. Os hidrocarbonetos de cadeias curtas (dois ou três anéis na estrutura) são voláteis e permanecem menos tempo no ambiente aquático, apresentam toxicidade significativa,

enquanto que os hidrocarbonetos pesados, de quatro a seis anéis são potencialmente carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (WITT, 1995; NEFF, 1979), demoram para serem degradados e são depositados nas camadas mais superficiais do sedimento (KODO, 2006). Apesar desses compostos altamente tóxicos serem voláteis, a literatura relata que os peixes podem absorver parte da fração solúvel do petróleo e seus derivados muito rapidamente, com consequências adversas para a saúde dos mesmos (COLLIER *et al.*, 1996). Esses efeitos levaram o Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos (1985) a considerar que a exposição de organismos aquáticos ao petróleo e seus derivados como fatores que causam prejuízo aos recursos pesqueiros de muitas maneiras, incluindo a redução dos estoques de peixes.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos semivoláteis formados em processos de combustão a alta temperatura (MIGUEL *et al.*, 2001) e abundantes na fração solúvel do petróleo. Os HPAs constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados (PEREIRA NETTO *et al.*, 2000). Estas substâncias, bem como seus derivados, têm ampla distribuição e são encontrados como constituintes de misturas complexas no ambiente (WISE *et al.*, 1993; HLAVAY *et al.*, 1997). Os HPAs podem ser produzidos durante a queima de biomassa em florestas e erupções vulcânicas, ou durante a queima de combustível fóssil em processos industriais, nos motores de automóveis, sistemas de aquecimento doméstico, incineração de resíduos domésticos e industriais, fumaça de cigarros e refinarias de petróleo (WISE *et al.*, 1993; PELTONEN *et al.*, 1995; LOPES *et al.*, 1996; VASCONCELLOS *et al.*, 1998; PEREIRA NETTO *et al.*, 2000). A exposição do homem aos HPAs pode ocorrer pela alimentação, água, ar, solo e contato direto com materiais que contenham os hidrocarbonetos (PELTONEN *et al.*, 1995). Em regiões altamente urbanizadas e industrializadas, os HPAs são frequentemente encontrados associados ao particulado atmosférico e aos ambientes aquáticos devido à exaustão de veículos e a emissão de poluentes pelas indústrias. (STEFENS, 2006)

Das formas de exposição, uma grande importância é dada à alimentação (FOUCHÉCOURT *et al.*, 1999). Como os HPAs são lipofílicos,

adsorvem em partículas em suspensão e depositam-se no sedimento, a alimentação é uma importante via de exposição, tanto para os animais da coluna d'água quanto para os bentônicos, que ingerem parte do sedimento durante a alimentação e tendem a absorver mais HPAs que os demais organismos, mesmo com a baixa concentração desses compostos normalmente encontrada na água e sedimento (ERICKSON *et al.*, 2008). Além disso, os HPAs podem ser absorvidos pela pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo.

Os peixes podem entrar em contato com HPAs por diferentes vias. HPAs dissolvidos e suspensos na coluna d' água são absorvidos principalmente através das brânquias, enquanto que a via trófica é importante para os compostos adsorvidos ao sedimento (para organismos de fundo) ou presentes no alimento. Uma vez dentro dos organismos, vários HPAs são capazes de reagir com o DNA após bioativação<sup>1</sup> ou fotoativação, tornando-se mutagênicos<sup>2</sup> e carcinogênicos<sup>3</sup> (LOPES *et al.*, 1996; PEREIRA NETTO *et al.*, 2000; FANG *et al.*, 2004). Além disso, os HPAs e as espécies reativas geradas durante sua biotransformação podem interagir com lipídeos e proteínas. No primeiro caso, pode ocorrer a desorganização estrutural e funcional das membranas devido à peroxidação de lipídeos (PEDROZO *et al.*, 2002). Já no segundo caso, alterações funcionais em proteínas alteram importantes atividades biológicas, como a comunicação sináptica dependente da atividade colinesterásica (AKAISHI *et al.*, 2004; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005).

### 1.3 Ensaios toxicológicos

O uso de ensaios toxicológicos (bioensaios) em ecotoxicologia é interessante por permitir estudar os efeitos tóxicos de determinados

---

<sup>1</sup> **Bioativação:** mecanismo de biotransformação que produz metabólitos com atividade igual ou maior do que o precursor.

<sup>2</sup> **Mutagênicos:** é todo agente físico, químico ou biológico que, em exposição às células, pode causar mutação que não é reparada no momento da replicação celular, e é passada para as gerações seguintes.

<sup>3</sup> **Carcinogênico:** refere-se a qualquer substância, isótopo, radiação ou outro agente físico ou biológico que provoque, agrave ou sensibilize o organismo para o surgimento de um câncer.

contaminantes de forma isolada ou associados em organismos modelos, minimizando a influência das variáveis ambientais e possibilitando o estudo das relações entre exposição e o efeito. Assim, as simulações em laboratório podem contribuir para a formação de uma base de dados que venham a ajudar a entender os fatores que estão interferindo na saúde dos organismos ou alterando as condições do próprio ambiente em que vivem. Por outro lado, os resultados obtidos através de bioensaios não podem ser extrapolados para o ambiente sem os devidos cuidados e validações (AKAISHI, 2003).

Os peixes são modelos biológicos valiosos do ponto de vista ecotoxicológico, de modo que têm sido amplamente selecionados e utilizados para a análise de respostas biológicas e bioquímicas após exposição a contaminantes (BUSSOLARO *et al.*, 2010; MIRANDA *et al.*, 2008; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002 e 2005). Isso se deve à ampla distribuição dos peixes, geograficamente e nos diferentes níveis tróficos, tendo, portanto, um papel importante no transporte energético e de contaminantes entre os diferentes níveis da cadeia trófica em variados ecossistemas. Além disso, peixes e demais organismos que ocupam níveis mais altos da cadeia alimentar funcionam como excelentes integradores dos poluentes presentes na água, sedimento e biota, através dos processos de bioacumulação<sup>4</sup> e biomagnificação<sup>5</sup> (VAN DER OOST *et al.*, 2003; RABITTO, *et al.*, 2011).

#### 1.4 Biomarcadores

Vários biomarcadores<sup>6</sup> podem ser empregados na avaliação dos efeitos de compostos potencialmente tóxicos, como nanopartículas e HPAs.

---

<sup>4</sup> **Bioacumulação:** é a absorção e retenção do composto pelo organismo do meio abiótico ou biótico, podendo ou não a concentração exceder a da fonte. (LEBLANC, 1995; D'AMATO *et al.*, 2002):

<sup>5</sup> **Biomagnificação:** é o aumento da concentração do composto ao longo da cadeia alimentar, influenciada pela posição trófica do organismo, devido à elevada absorção e baixa eliminação do composto. Ocorre biomagnificação quando as concentrações do composto nos tecidos de um organismo excedem as concentrações do nível trófico adjacente inferior em mais de 100%.(LEBLANC, 1995; D'AMATO *et al.*, 2002):

<sup>6</sup> **Biomarcadores:** qualquer resposta biológica a um agente químico ambiental ao nível subindividual, medido dentro de um organismo ou em seus produtos (urina, fezes, cabelo, penas etc), que indica um desvio do estado normal, o qual não pode ser detectado no organismo intacto. (VAN GESTEL e VAN BRUMMELEN, 1996).



Destes, geralmente são priorizados aqueles que permitem informar sobre os distúrbios que podem comprometer o bom funcionamento celular e do organismo, como a manutenção do ambiente oxidorreduzidor, danos em biomoléculas, comprometimento dos mecanismos de defesa e da estrutura celular em células-alvo etc.

Os biomarcadores podem ser divididos em três grupos (VAN DER OOST *et al.*, 2003):

- a) Biomarcadores de exposição: referentes a quaisquer alterações biológicas que detectam e quantificam a substância exógena, seus metabólitos e os produtos da interação do xenobiótico<sup>7</sup> com o organismo;
- b) Biomarcadores de efeito: são aqueles que mostram o efeito tóxico associado à exposição do organismo ao poluente;
- c) Biomarcadores de suscetibilidade: aqueles que indicam uma capacidade adquirida ou inerente do organismo em responder à exposição a determinado xenobiótico de modo que altere a suscetibilidade do organismo a uma dada exposição

No presente estudo, três biomarcadores (de exposição e efeito) merecem atenção: a determinação de HPAs na bile, a atividade específica da enzima acetilcolinesterase e a peroxidação de lipídeos.

A principal rota de excreção de HPAs é pela bile, onde são armazenados após serem biotransformados no fígado e posteriormente liberados para o intestino (AAS *et al.*, 2000). A vesícula biliar é esvaziada a cada período alimentar, aumentando o seu volume nos períodos intermediários e, após alcançar seu volume máximo, a bile torna-se mais concentrada pela reabsorção de água (HURK, 2006). O volume da vesícula biliar varia de acordo com estado alimentar, alterando assim a concentração de seus componentes, podendo gerar interpretações equivocadas. Assim, após a detecção de HPAs na bile por mensuração da fluorescência emitida por estes compostos (ARIESE *et al.*, 1997; AAS *et al.*, 2000; MENICONI, 2007), torna-se mais confiável a expressão da concentração destes compostos em relação à concentração de proteínas presentes na bile (ARIESE *et al.*, 1997).

---

<sup>7</sup> **Xenobiótico:** compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico. Compreendem compostos de ocorrência natural, drogas, agentes ambientais, carcinógenos, inseticidas.

A peroxidação de lipídeos (LPO) é um importante dano causado por diversos contaminantes e pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo as membranas celulares os locais mais suscetíveis a essas reações de oxidação. Em consequência da peroxidação das membranas, pode haver a perda da integridade da membrana com aumento de sua permeabilidade, alteração no fluxo de íons através da membrana, disfunção no transporte de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , influxo excessivo de cálcio e ativação de enzimas como as proteases, fosfolipases e nucleases (OLIVEIRA, 1999; MEAGHER e FITZGERALD, 2000; BARREIROS *et al.*, 2006).

A acetilcolinesterase (AChE) é encontrada no músculo, cérebro e eritrócitos de peixes e é responsável por hidrolisar a acetilcolina, um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso autônomo (KLEMZ, 2002). A inibição da AChE por poluentes é amplamente estudada, como é o caso dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAYNE *et al.*, 1996; AKAISHI *et al.*, 2004). A AChE é muito importante na manutenção e no equilíbrio da transmissão dos estímulos nervosos por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e acetato (ADAMS, 1992; KLEMZ, 2002). Com a inibição da atividade da AChE pode ocorrer um bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos, paralisando algumas funções vitais do organismo afetado (STENESH, 1998). A severidade depende da quantidade relativa da AChE que fica bloqueada. Uma inibição de 10 a 20% resulta em sintomas leves, já em uma inibição de 50% sintomas graves são desencadeados, e uma inibição de mais de 90% é fatal para o organismo (BOELSTERLI, 2007).

### 1.5 Modelo biológico

A espécie *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) (Fig. 1) é um teleósteo dulcícola nativo da Europa e da Ásia. Sendo uma espécie onívora, alimenta-se de matéria orgânica e microrganismos associados à lama do fundo de lagos e margens de rios, onde nanopartículas devem precipitar após sua agregação. É um peixe de grande potencial para a piscicultura por apresentar boa capacidade de acomodação aos diferentes ambientes aquáticos, manejo,

regime alimentar, crescimento e resistência. Essa espécie foi selecionada devido à facilidade em sua obtenção e manutenção, bem como seu amplo emprego como modelo biológico em estudos disponíveis na literatura.



**Figura 1** - *Cyprinus carpio*

## **1.6 Justificativa**

Existem muitos dados disponíveis na literatura com relação aos efeitos de HPAs na biota. Contudo, os dados sobre efeitos de nanopartículas de prata são muito recentes e escassos, e não há dados referentes ao efeito combinado destas nanopartículas e de compostos que podem ser adsorvidos a sua superfície como HPAs. Diante disso, o presente estudo visa investigar os efeitos da associação de nanopartículas de prata com a fração solúvel de petróleo através de ensaio toxicológico empregando *Cyprinus carpio* (carpa) juvenis como modelo biológico, e como biomarcadores, a determinação de HPAs na bile, a atividade específica da enzima acetilcolinesterase no cérebro e músculo e a peroxidação de lipídeos no cérebro.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos das nanopartículas de prata, da fração solúvel de petróleo e da combinação de ambas em *Cyprinus carpio* juvenis após exposição por via hídrica em laboratório.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Expor *Cyprinus carpio* juvenis à nanopartículas de prata, fração solúvel de petróleo e a combinação de ambas por via hídrica durante 24 h, 72 h e 120 h.
- Verificar a eficiência da depuração/recuperação de 120 h após a exposição de 120 h.
- Quantificar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes na bile dos peixes de acordo com o número de anéis.
- Avaliar a peroxidação de lipídeos no cérebro de *Cyprinus carpio*.
- Avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro e músculo de *Cyprinus carpio*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho Experimental

Para a realização do ensaio toxicológico, peixes juvenis da espécie *Cyprinus carpio* (9,7 cm  $\pm$  1,5 cm / 13,6 g  $\pm$  4,7 g) foram obtidos de uma piscicultura em Araucária, região metropolitana de Curitiba, PR. No laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular (Setor de Ciências Biológicas, UFPR), os peixes foram aclimatados em tanques de 80 L contendo água desclorada sob aeração constante e alimentação diária com ração comercial para alevinos. Após aclimação, os peixes foram separados em lotes de 30 animais e acondicionados em aquários de 30 L (10 peixes por aquário) contendo água reconstituída (0,0065 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0,1335 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0,0004 g/L KCl, e 0,0105 g/L NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,2 – 7,3) e mantidos sob alimentação constante, fotoperíodo de 12 h e temperatura ambiente. Ao todo, 16 grupos experimentais, com 30 animais cada, compunham o bioensaio (Quadro 1).

Controle	nAg	FSA	nAg + FSA
24 h	24 h	24 h	24 h
72 h	72 h	72 h	72 h
120 h	120 h	120 h	120 h
Depuração	Depuração	Depuração	Depuração

**Quadro 1** – Desenho experimental. Grupos: controles, expostos à nanopartículas de prata (nAg), expostos à fração solúvel do petróleo (FSA) e expostos a combinação de nanopartículas de prata e fração solúvel do petróleo (nAg+FSA). Tempos de exposição de 24, 72 e 120 h. Depuração de 120 h após exposição de 120 h.

##### 3.1.1 Preparo da Fração Solúvel de Petróleo

A FSA do petróleo foi preparada colocando uma parte do petróleo para 10 partes de água reconstituída. Essa mistura foi mantida em movimento

durante 10-14 h através do uso de agitador magnético, tendo o cuidado de manter o recipiente protegido da luz e vedado para minimizar a evaporação dos hidrocarbonetos mais voláteis. Após o período mencionado, a mistura foi separada usando a torneira do recipiente, que permite a retirada da água sem a fração insolúvel do petróleo. Essa solução de água contendo apenas a fração solúvel foi considerada a solução 100%. As amostras de Petróleo utilizadas nesse estudo foram gentilmente cedidas pela Refinaria da Petrobrás de Araucária (REPAR) – Araucária – PR, tendo como origem a Bacia Petrolífera de Campos, Campos – RJ.

### **3.1.2 Preparo das nanopartículas de prata**

Nanopartículas comerciais de prata (<100 nm, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, cod. 576832) foram desagregadas em ácido Nítrico 1% na concentração de 20 mg/L através de ciclos em ultra-som (10 x 20 min).

### **3.2 Exposição dos peixes**

Após o estabelecimento dos grupos experimentais, foram adicionadas à água dos aquários as nanopartículas de prata ([nAg] final = 10 µg/L; grupos nAg), a fração solúvel do petróleo ([FSA] final = 15%; grupos FSA) e ambas ([nAg] final = 10 µg/L; [FSA] final = 15%; grupos nAg+FSA). A partir de então, os peixes ficaram expostos pelos períodos de 24, 72 e 120 h, sem alimentação. Nos grupos que passaram por um período de *depuração*, os peixes foram expostos durante 120 h e então a água foi completamente substituída por água reconstituída sem nanopartículas ou FSA. Não foram realizadas trocas periódicas de água no decorrer do experimento.

### **3.3 Coleta do material biológico**

Ao término do experimento, os indivíduos foram anestesiados com benzocaína<sup>8</sup> (0.2% em água) e sacrificados por secção medular. As amostras de cérebro e músculo foram separadas em tubos e congeladas a -76 °C até o momento do processamento. A extração da bile ocorreu por punção da vesícula biliar e uma mistura da bile de três indivíduos foi utilizada para a quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. As amostras de bile foram armazenadas em recipientes de vidro âmbar a -76 °C até o momento da análise.

### **3.4 Concentração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) na Bile**

Alíquotas de 5 µl de bile foram diluídas em 1495 µl de metanol 48% (Merck®). Então, 200 µl da amostra diluída foram adicionados a microplacas pretas de 96 poços para leitura em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 288/330 nm, 267/309 nm, 334/376 nm, 364/406 nm e 380/422 nm, que correspondem, respectivamente, aos hidrocarbonetos de dois, três, quatro, cinco e seis anéis. Em paralelo, uma mistura de HPAs com concentrações conhecidas para cada um dos grupos de anéis mencionados foi empregada a fim de se determinar as curvas-padrão (com sete pontos: 0 a 3000 ng/ml e  $r^2 > 0.99$ ) e os respectivos coeficientes angulares necessários para o cálculo das concentrações de HPAs das amostras.

### **3.5 Atividade da acetilcolinesterase**

A técnica baseia-se na hidrólise da acetiltiocolina (substrato) pela AChE em acetato e tiocolina, e reação desta com o 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoato (DTNB) gerando o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato que absorve luz a 405 nm (ELLMAN *et al.*, 1961).

---

<sup>8</sup> Após a realização deste trabalho, estudos sugeriram o uso de outro anestésico (por exemplo MS222) devido à indícios de que a Benzocaína não anestesia eficientemente o organismo;

As amostras foram descongeladas em gelo e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5 para músculo e pH 8,0 para cérebro). Os homogenatos de cérebro e músculo foram centrifugados a 12.000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 ml e congelado a -76 °C para as análises. Posteriormente, as amostras foram normalizadas para concentração de proteínas totais de 1,0 mg/ml em tampão fosfato de potássio 0,1 M. Então, 20 µl da amostra foram pipetados em microplacas de 96 poços (tampão fosfato no caso do branco) seguidos de 130 µl de solução de DTNB a 0,75 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M. Por fim, 50 µl de iodeto de acetilcolina a 9 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M foram adicionados para iniciar a reação, que foi monitorada espectrofotometricamente em intervalos de 52 s durante 260 s a 405 nm, imediatamente após a adição do substrato da enzima. O coeficiente de extinção molar de  $13.6 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o 5-mercapto-2-nitrobenzoato foi empregado para o cálculo da atividade enzimática.

### 3.6 Peroxidação Lipídica

A Peroxidação Lipídica (LPO) foi determinada pelo ensaio oxidação de ferro-xilenol (FOX) (Jiang et al.,1991;1992). O método baseia-se na rápida oxidação do  $\text{Fe}^{+2}$  mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo  $\text{Fe}^{+3}$  - laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a 550-570 nm.

As amostras de cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 8.0, centrifugadas a 12.000 g por 20 min a 4 °C, e 200 µl do sobrenadante foi congelado a -76 °C. Para a análise, 800 µl da solução de reação (xilenol laranja 0,1 mM,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 mM, butil hidroxitolueno (BHT) 4,0 mM e sulfato ferroso amoniacal ( $\text{FeSO}_4 \cdot \text{NH}_4$ ) 0,25 mM em metanol puro, adicionados nesta respectiva ordem para o preparo da solução) foram adicionados a tubos de 2 ml contendo 200 µl de amostra (tampão fosfato no caso do branco) e o conteúdo do tubo foi misturado. Após incubação por 20 min a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 9000 g por 10 min e 250 µl do sobrenadante foi pipetado em microplacas de 96 poços para leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm. O coeficiente de extinção



molar para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperóxido de cumeno ou butila de  $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi empregado para o cálculo da concentração de hidroperóxidos.

### 3.7 Quantificação de proteínas totais

As proteínas totais nas amostras foram quantificadas através do método de Bradford (1976), com modificações dos volumes para microplacas. Os sobrenadantes das amostras e a bile foram diluídos em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5 para bile e músculo, e pH 8,0 para cérebro), conforme necessário para não haver extrapolação da curva-padrão de BSA (albumina de soro bovino) empregada como referência ([BSA] de 0, 0.125, 0.500, 1.00, 1.400 mg/ml). Então, 10 µl do sobrenadante diluído foram pipetados em microplacas de 96 poços, seguidos de 250 µl de reativo de *Bradford* (Sigma-Aldrich®). Após, 5 min de incubação a temperatura ambiente, as absorbâncias foram determinadas a 595 nm em espectrofotômetro. Para a bile foram empregados dois brancos, tampão fosfato acrescido do reativo de *Bradford* e bile acrescida de água; para os sobrenadantes do cérebro e músculo empregou-se apenas o tampão fosfato acrescido do reativo de *Bradford*.

### 3.8 Tratamento estatístico dos dados

Os dados obtidos foram avaliados separadamente considerando apenas uma variável por vez, isto é, tempo e tipo de contaminante(s) ao(s) qual(is) os peixes foram expostos. Empregou-se, para estes fins, a Análise de Variância de uma Via (*one way ANOVA*) seguida, do pós-teste de *Tukey* para comparar uma mesma situação de exposição em diferentes tempos (caracteres minúsculos nos gráficos e tabelas) e do pós-teste de *Dunnnett* para comparações entre diferentes situações de exposição, mas durante o mesmo período de tempo (caracteres maiúsculos). Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

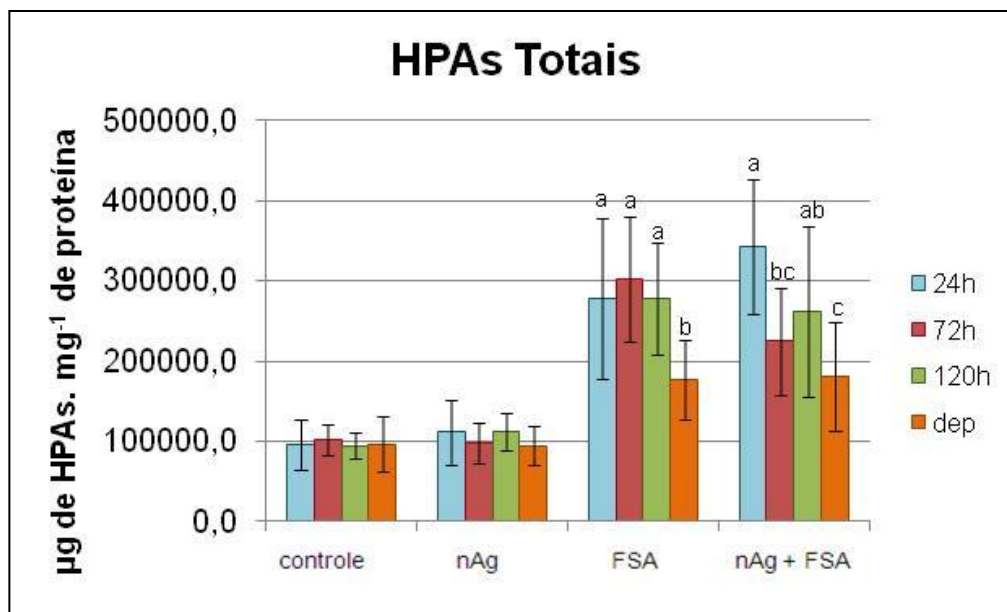
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Concentração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

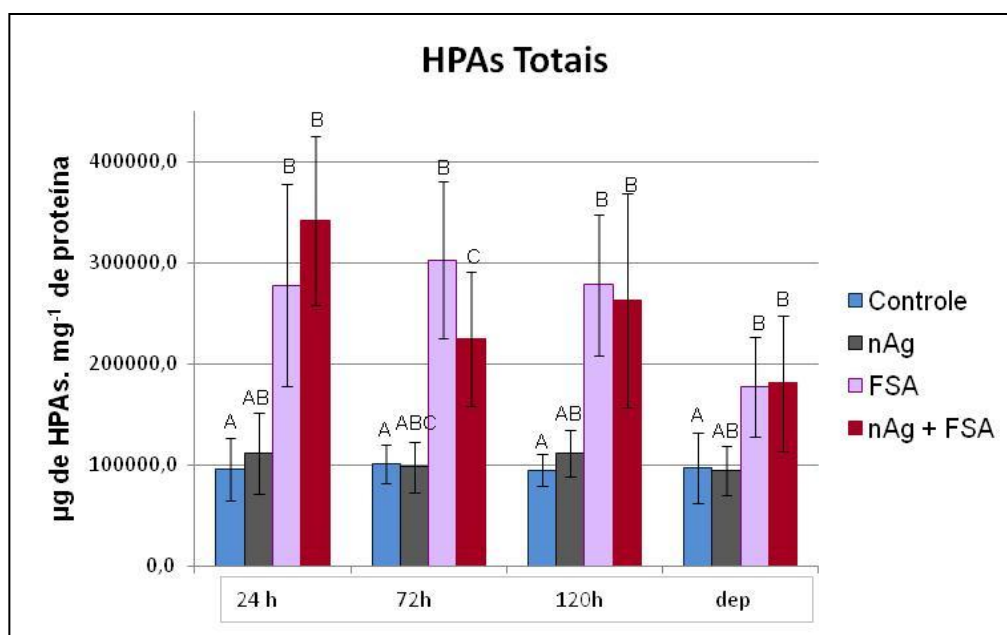
Houve um aumento significativo das concentrações de HPAs após a exposição à FSA e FSA associada às nanopartículas de prata (Figura 3), para compostos de 2, 3, 4, 5 e 6 anéis em relação ao grupo controle (Quadro 2). Os HPAS de 2 e 3 anéis foram os mais abundantes em todos grupos, inclusive no grupo controle (Quadro 2), o que indica a presença de moléculas endobióticas capazes de absorver luz e emitir fluorescência nos comprimentos de onda empregados para quantificação destes grupos de HPAs.

No período de exposição de 72 h, houve um decréscimo significativo da concentração de HPAs no grupo exposto a associação das nanopartículas com FSA, em relação ao grupo exposto apenas ao FSA (Figura 3); este mesmo comportamento não foi observado para os tempos de exposição de 24 e 120 h.

O grupo que passou por um período de depuração detém uma concentração significativamente menor em relação aos períodos de 24, 72 e 120 h de exposição (Figura 2). Entretanto, 120 h de depuração não foram suficientes para que os níveis de HPAs chegassem ao níveis observados no grupo controle (Quadro 2).



**Figura 2** - Concentração total dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na bile de *C. carpio*, em  $\mu\text{g}$  de HPAs por  $\text{mg}$  de proteína (média  $\pm$  desvio padrão). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes com relação ao período de exposição ( $p < 0,05$ ).



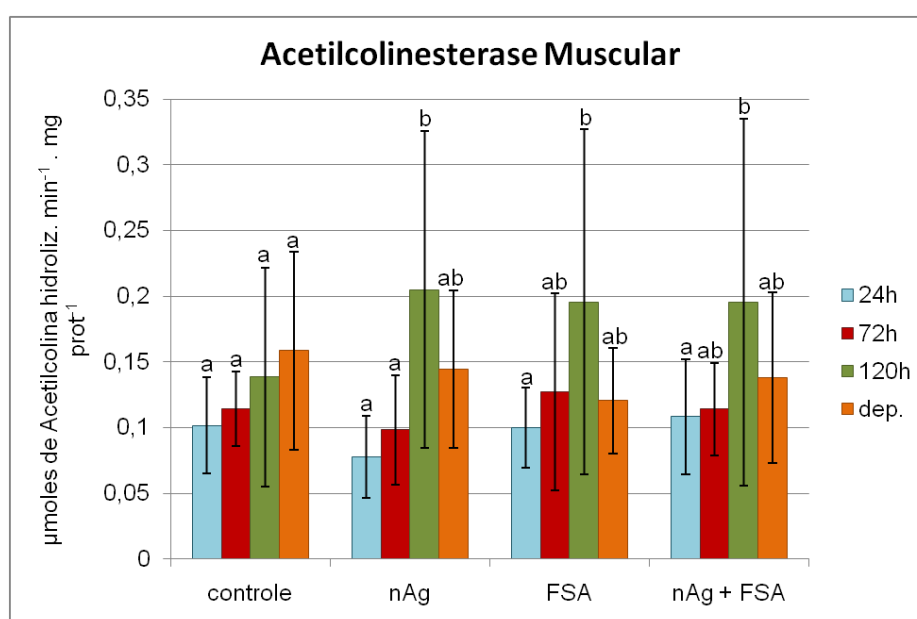
**Figura 3** - Concentração total dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na bile de *C. carpio*, em  $\mu\text{g}$  de HPAs por  $\text{mg}$  de proteína (média  $\pm$  desvio padrão). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes com relação ao grupo de exposição ( $p < 0,05$ ).

		24h	72h	120h	Depuração
Controle	2 anéis	54,46±19,48 <b>Aa</b>	64,05 ± 11,62 <b>Aa</b>	59,74 ± 10,11 <b>Aa</b>	53,54 ± 20,72 <b>Aa</b>
	3 anéis	34,77± 15,29 <b>Aa</b>	30,71 ± 6,08 <b>Aa</b>	26,71 ± 4,64 <b>Aa</b>	34,68 ± 18,87 <b>ABa</b>
	4 anéis	8,58 ± 2,83 <b>Aa</b>	7,65 ± 2,73 <b>Aa</b>	6,44 ± 0,98 <b>Aa</b>	6,47 ± 2,94 <b>Aa</b>
	5 anéis	2,10 ± 0,75 <b>Aa</b>	2,23 ± 0,86 <b>Aa</b>	1,72 ± 0,25 <b>Aa</b>	1,65 ± 0,76 <b>Aa</b>
	6 anéis	0,48 ± 0,15 <b>Aa</b>	0,52 ± 0,10 <b>Aa</b>	0,41 ± 0,08 <b>Aa</b>	0,40 ± 0,19 <b>Aa</b>
	Total	95,52 ± 31,20 <b>Aa</b>	101,12 ± 19,14 <b>Aa</b>	94,47 ± 15,85 <b>Aa</b>	96,73 ± 34,82 <b>Aa</b>
nAg	2 anéis	61,24 ± 24,21 <b>ABab</b>	57,49 ± 16,73 <b>ABCab</b>	70,54 ± 14,29 <b>ABa</b>	55,11 ± 13,33 <b>ABb</b>
	3 anéis	36,36 ± 12,07 <b>ABa</b>	32,17 ± 7,24 <b>ABCa</b>	31,15 ± 7,99 <b>ABa</b>	32,51 ± 10,44 <b>ABa</b>
	4 anéis	10,85 ± 4,46 <b>ABa</b>	6,21 ± 1,89 <b>ABCb</b>	7,40 ± 1,48 <b>ABb</b>	7,94 ± 2,51 <b>ABb</b>
	5 anéis	2,53 ± 0,98 <b>ABa</b>	1,73 ± 0,52 <b>ABCb</b>	1,99 ± 0,37 <b>ABab</b>	1,65 ± 0,54 <b>ABb</b>
	6 anéis	0,58 ± 0,21 <b>ABa</b>	0,42 ± 0,13 <b>ABCab</b>	0,49 ± 0,09 <b>ABa</b>	0,36 ± 0,12 <b>ABb</b>
	Total	111,56 ± 40,23 <b>ABa</b>	98,02 ± 25,01 <b>ABCa</b>	111,57 ± 23,13 <b>ABa</b>	94,13 ± 24,37 <b>ABa</b>
FSA	2 anéis	111,79 ± 39,68 <b>Bab</b>	136,99 ± 40,82 <b>Ba</b>	126,54 ± 28,20 <b>Ba</b>	92,30 ± 25,75 <b>Bb</b>
	3 anéis	58,81 ± 19,30 <b>Ba</b>	59,20 ± 12,65 <b>Ba</b>	57,76 ± 12,12 <b>Ba</b>	42,72 ± 10,90 <b>ABb</b>
	4 anéis	93,95 ± 36,41 <b>Ba</b>	94,71 ± 33,73 <b>Ba</b>	85,11 ± 20,07 <b>Ba</b>	35,96 ± 11,98 <b>Bb</b>
	5 anéis	11,17 ± 4,33 <b>Ba</b>	14,27 ± 4,89 <b>Ba</b>	11,68 ± 3,22 <b>Ba</b>	5,20 ± 1,68 <b>Bb</b>
	6 anéis	1,90 ± 0,73 <b>Ba</b>	2,05 ± 0,70 <b>Ba</b>	1,82 ± 0,46 <b>Ba</b>	0,80 ± 0,26 <b>ABb</b>
	Total	277,62 ± 100,03 <b>Ba</b>	302,65 ± 77,64 <b>Ba</b>	278,08 ± 70,15 <b>Ba</b>	176,99 ± 49,21 <b>Bb</b>
nAg + FSA	2 anéis	137,64 ± 32,33 <b>Ba</b>	107,50 ± 33,92 <b>Cab</b>	120,89 ± 47,56 <b>Bab</b>	93,59 ± 33,05 <b>Bb</b>
	3 anéis	71,48 ± 16,25 <b>Ba</b>	47,89 ± 14,78 <b>Cb</b>	53,46 ± 20,98 <b>Bb</b>	44,14 ± 14,92 <b>ABb</b>
	4 anéis	116,21 ± 30,91 <b>Ba</b>	61,78 ± 19,45 <b>Cbc</b>	77,14 ± 36,32 <b>Bb</b>	36,42 ± 17,33 <b>Bc</b>
	5 anéis	14,51 ± 3,95 <b>Ba</b>	9,87 ± 3,51 <b>Cb</b>	9,80 ± 3,61 <b>Bb</b>	5,76 ± 2,61 <b>Bc</b>
	6 anéis	2,34 ± 0,64 <b>Ba</b>	1,45 ± 0,52 <b>Cb</b>	1,70 ± 0,87 <b>Bb</b>	0,81 ± 0,35 <b>Bc</b>
	Total	342,18 ± 83,61 <b>Ba</b>	224,64 ± 66,26 <b>Cbc</b>	262,32 ± 105,97 <b>Bab</b>	180,71 ± 67,03 <b>Bc</b>

**Quadro 2** - Concentração dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de 2, 3, 4, 5 e 6 anéis na bile de *C. carpio*, em µg de HPAs por mg de proteína (média ± desvio padrão). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Caracteres maiúsculos (em azul) são referentes à comparação dos diferentes grupos num mesmo período de tempo; caracteres minúsculos (em vermelho) são referentes à exposição aos mesmos contaminantes, mas durante diferentes períodos de tempos.

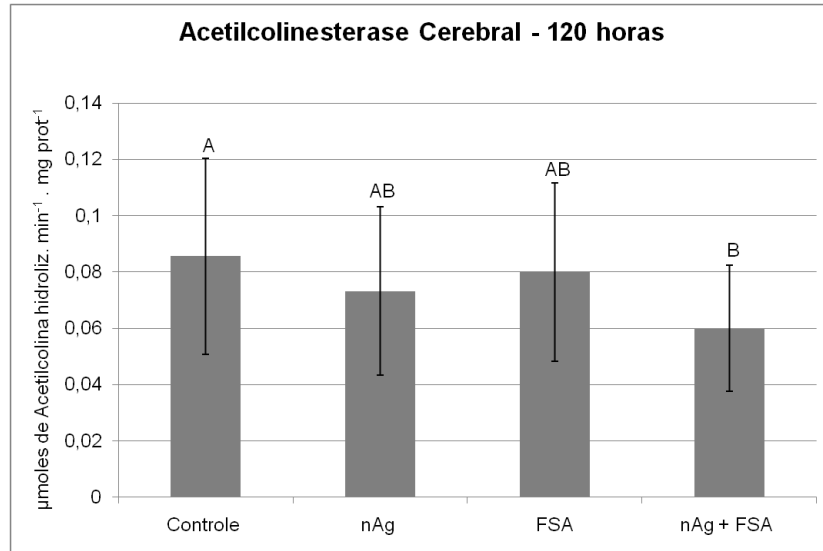
## 4.2 Atividade da acetilcolinesterase

A atividade enzimática da AChE no músculo apresentou um aumento significativo nos peixes expostos às nanopartículas de prata, FSA e à combinação de ambas durante 120 h em relação aos grupos expostos aos mesmos contaminantes durante 24 h. Após o período de depuração, a atividade da AChE retornou aos níveis observados no controle e nos grupos expostos durante 24 h (Figura 4).



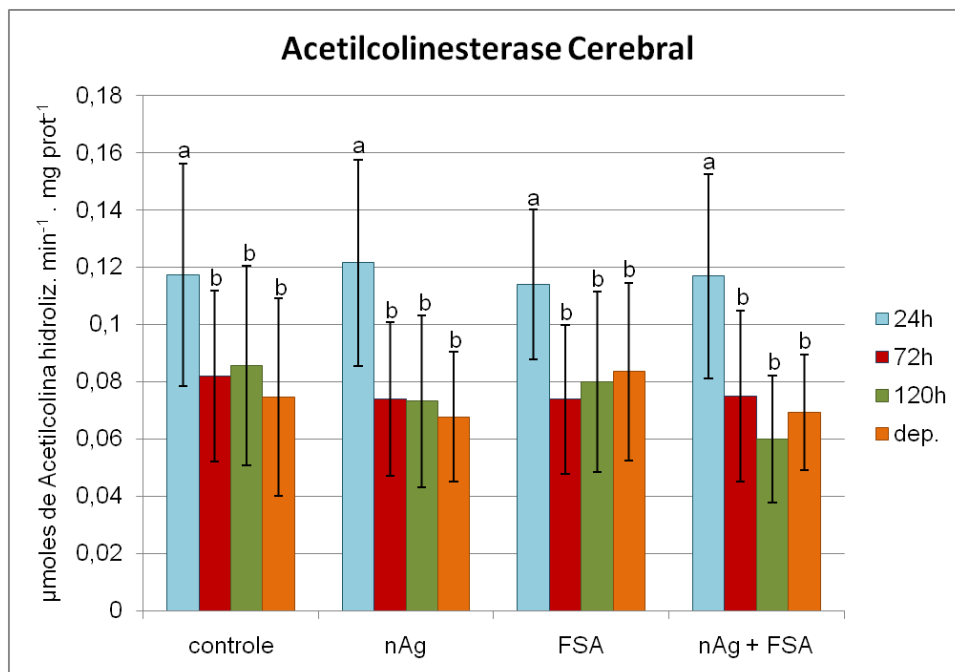
**Figura 4** - Atividade específica da AChE muscular em *C. carpio*, em µmoles de acetilcolina hidrolisada por min por mg de proteínas (médias ± desvio padrão). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes com relação ao período de exposição ( $p < 0,05$ ).

No cérebro, a atividade enzimática da AChE apresentou um decréscimo significativo de 30% nos peixes expostos à associação entre nanopartículas e FSA durante 120 h em relação ao grupo controle (Figura 5).



**Figura 5** - Atividade específica da AChE no cérebro em *C. carpio*, em µmoles de acetilcolina hidrolisada por min por mg de proteínas (médias ± desvio padrão). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes com relação ao grupo de exposição ( $p < 0,01$ ).

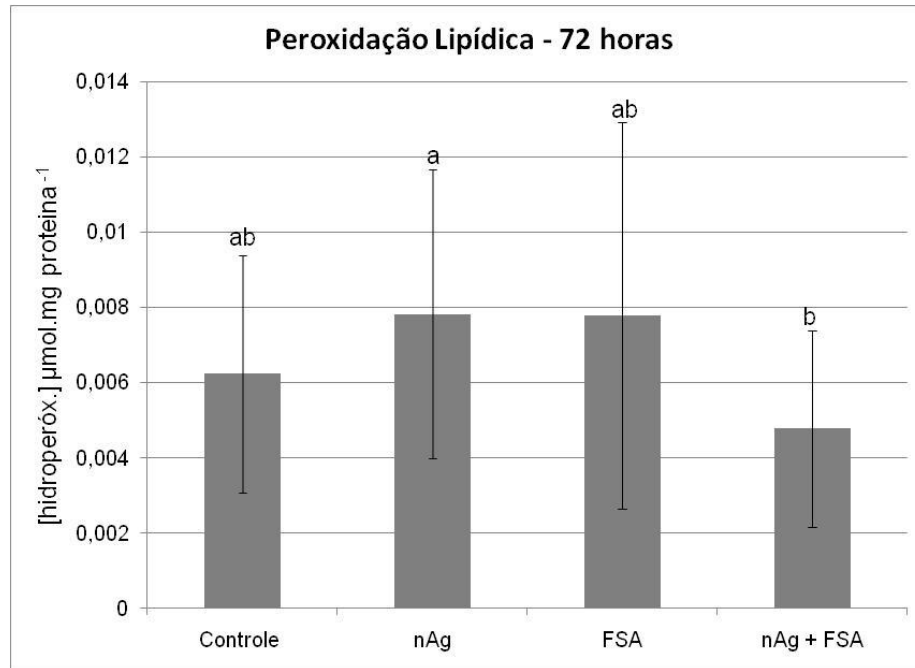
Comparando-se os diferentes tempos de exposição, observa-se uma redução da atividade da AChE após 72 h, 120 h e depuração, em relação ao período de 24 h em todos os grupos, inclusive no grupo controle (Figura 6)



**Figura 6** - Atividade específica da AChE Cerebral em *C. carpio* em µmoles de acetilcolina hidrolisada por min por mg de proteínas (médias ± desvio padrão). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes com relação ao período de exposição ( $p < 0,01$ ).

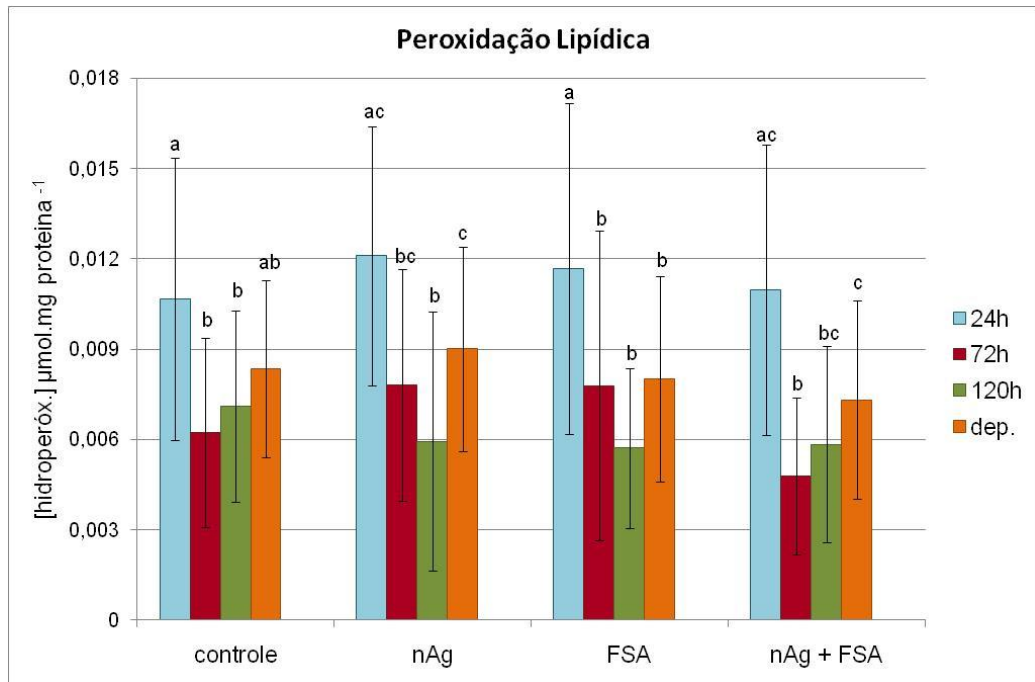
### 4.3 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica apresentou uma diminuição significativa ( $p= 0.0053$ ) de 23% entre o grupo exposto à mistura nAg + FSA em relação ao grupo exposto apenas à nanopartículas de prata (Figura 7).



**Figura 7** - Peroxidação Lipídica em *C. carpio* em  $\mu\text{moles}$  de hidroperóxidos por mg de proteínas (médias  $\pm$  desvio padrão). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes com relação ao grupo de exposição ( $p < 0,01$ ).

Em relação aos grupos em diferentes tempos de exposição, houve uma diminuição significativa entre 24 h e os demais tempos (72h, 120h, dep.) de exposição para todos os grupos, inclusive para o grupo controle (Figura 8).



**Figura 8** – Peroxidação Lipídica em *C. carpio* em μmoles de hidroperóxidos por mg de proteínas (médias ± desvio padrão). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes com relação ao período de exposição ( $p < 0,05$ ).



## 5. DISCUSSÃO

Uma questão difícil nos estudos toxicológicos é estabelecer uma relação clara entre a exposição aos xenobióticos e os efeitos destes nos organismos, devido à interferência de muitas variáveis, incluindo às ambientais e evolutivas.

Com relação às nanopartículas, há poucos estudos *in vivo* com organismos aquáticos como peixes. Contudo, existem evidências de toxicidade após exposição a concentrações não realísticas de alguns tipos de nanopartículas (NPs). Até o presente momento, a maioria dos estudos têm focado em embriões de *zebrafish* nos quais há mortalidade e anormalidades cardíacas (ASHARANI *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2007; YEO e KANG, 2008). Da mesma forma, existem poucos dados disponíveis na literatura sobre a internalização e distribuição de nanopartículas de prata nos órgãos internos ou do potencial de toxicidade das mesmas em peixes provenientes de ambientes naturais (SCOWN *et al.*, 2010).

Resultados provenientes de estudos sobre a cinética de absorção e eliminação de nanopartículas de prata em peixes relataram que este metal sob a forma nanoparticulada é absorvido após 6 h de exposição por via hídrica. De forma semelhante, as análises revelaram que os mesmos animais foram capazes de eliminar as nanopartículas ao longo de 11 dias, embora a capacidade de eliminação das nanopartículas tenha sido maior nas primeiras 24 h (BUSSOLARO, 2010).

Almofti *et al.* (2003) observaram que a toxicidade da prata em mitocôndrias de fígado de rato ocorreu por um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial seguida pela liberação do citocromo c, gerada pela interação entre íons  $Ag^+$  e os grupos sulfidril de proteínas da membrana mitocondrial. NPs de prata também foram associadas a danos mitocondriais em células hepáticas de rato, principalmente por alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial (PALMEIRA, 2008). Farkas *et al.* (2009) observaram que NPs de prata em baixas concentrações foram extremamente citotóxicas para hepatócitos de truta arco-íris em cultura como consequência da redução da atividade metabólica e integridade da membrana.

Em contrapartida, experimentos relacionados aos compostos solúveis do petróleo são bem caracterizados e geralmente utilizam a metodologia da obtenção da fração solúvel do petróleo para realizar os estudos de toxicidade (THOMAS e BUDIANTARA, 1995; AL-YAKOOB *et al.*, 1996; LOCKHART *et al.*, 1996; ESCARTIN

e PORTE, 1999; POLLINO e HOLDWAY, 2002, AKAISHI, 2003; AKAISHI *et al.*, 2004; RAMACHANDRAN *et al.*, 2004; INUNZA *et al.*, 2006). Esta metodologia é simples, eficaz, e de fácil reprodução.

Para quantificar os hidrocarbonetos que são liberados na água ou em outro tipo de ambiente ou biota, diferentes métodos são utilizados (cromatografia gasosa, espectrometria de massa, cromatografia líquida, espectrometria de absorção atômica), mas alguns estudos têm utilizado a espectrofluorimetria para quantificar a concentração de hidrocarbonetos do petróleo em áreas marinhas e dulcícolas contaminadas (PICER, 1998; HAMACHER, 1996). De acordo com Hamacher (1996), a espectrofluorimetria é altamente sensível para a detecção de hidrocarbonetos, mas tal técnica não permite caracterizar a composição das amostras. Como no presente estudo o interesse foi verificar se a concentração de hidrocarbonetos absorvida pelos organismos era alterada na presença de nanopartículas de prata, o resultado foi bastante satisfatório. Altas concentrações de HPAs com dois e três anéis foram encontradas nos organismos submetidos à FSA ou à associação desta fração com as nanopartículas. Isso está de acordo com Tolosa *et al* (1996) que afirma que os resíduos de derivados do petróleo contêm concentrações relativamente mais elevadas de compostos de dois e três anéis, tais como o naftaleno, fenantreno e antraceno. Entretanto, parte dessa fluorescência também pode ser proveniente de moléculas endobióticas que absorvem luz e emitem fluorescência no espectro utilizado para os HPAs em questão, uma vez que essas altas concentrações também aparecem no grupo controle.

Uma hipótese para o fato da concentração de HPAs na bile diminuir quando associado às nanopartículas em 72 h de exposição, é devido à possibilidade das NPs se adsorverem ao FSA. Já é conhecido que nanomateriais agregados acumulam-se no fundo do aquário/tanque em situações de exposição hídrica (JOHNSTON *et al*, 2010). Dessa forma, podemos considerar que as nanopartículas se depositaram no fundo do aquário agregadas à FSA, diminuindo a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos para os organismos.

Tal suposição pode ser apoiada pela diminuição da peroxidação lipídica em 72 h no grupo exposto à nAg + FSA em relação ao grupo exposto somente à nanopartículas, se considerarmos que as nanopartículas desencadeiam algum mecanismo de defesa intracelular. Para tal situação ocorrer, deve acontecer um pico de estresse em 72 h, que diminui após esse período, por simples ajuste fisiológico,

de modo que a peroxidação lipídica retornou a valores semelhantes entre todos os grupos em 120 h de exposição e após a exposição seguida de depuração. Além disso, deve-se considerar que a peroxidação lipídica, quando em baixos níveis, possui papel fisiológico.

Contudo, variações nos níveis de peroxidação lipídica vêm sendo apresentadas como uma resposta eficiente na avaliação da exposição a poluentes em organismos aquáticos (THOMAS e WOFFORD, 1993; REMEO e GNASSIA-BARELLI, 1997; SRIDEVI *et al.*, 1998). Vários estudos demonstraram que o aumento da peroxidação lipídica em organismos aquáticos está associado a elevadas concentrações de xenobióticos. COSSU *et al.* (1997) observaram danos oxidativos em *Unio tumidus* expostos a contaminantes como HPAs em rios poluídos da França. Shi *et al.* (2005) observaram um aumento significativo nos índices de peroxidação lipídica em *C. auratus* exposto ao naftaleno, demonstrando a estreita relação entre HPAs e a elevação das taxas de peroxidação. Barron *et al.* (2005) descreveram um aumento significativo na peroxidação lipídica em fígado de *Onchorhynchus gorbuscha* expostos ao óleo cru. Os dados da literatura afirmam que os HPAs podem interagir com as membranas, levando a desestruturação das membranas celulares e alteração de características como permeabilidade e fluidez (PEDROZO *et al.*, 2002).

A quantificação de hidrocarbonetos corroborou ainda com a conjectura inicial de que as nanopartículas associadas à FSA causam maior toxicidade do que isoladas. No presente trabalho, houve um decréscimo da atividade da acetilcolinesterase no cérebro dos peixes apenas quando expostos à associação das nanopartículas com a FSA em comparação ao grupo controle.

A acetilcolinesterase é uma importante enzima para o perfeito funcionamento do sistema nervoso, e sua atividade está envolvida na degradação do neurotransmissor acetilcolina. Em peixes e outros organismos aquáticos têm sido utilizada como biomarcador de contaminação em peixes em programas de monitoramento (STURM *et al.*, 1999; MONSERRAT E BIANCHINI, 2001; RODRIGUEZ-FUENTES E GOLD-BOUCHOT, 2000; MONSERRAT *et al.*, 2002; VENTURA *et al.*, 2002; AKAISHI 2003; CORSI *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2005; BINELLI *et al.* 2006; TORTELLI *et al.*, 2006). Isto porque sua atividade representa um eficiente biomarcador para detectar efeitos subletais de xenobióticos, principalmente os pesticidas organofosforados e carbamatos, e alguns metais

pesados (STURM *et al.*, 1999; MONSERRAT E BIANCHINI, 2001; SILVA DE ASSIS *et al.* 2005; RABITTO *et al.*, 2005); estes compostos que são reportados na literatura como inibidores da colinesterase.

Esses dados são legitimados por Akaishi (2003) que observou que policíclicos aromáticos da FSA nas concentrações de 15 e 33% do estoque de FSA<sup>9</sup> também podem alterar a atividade da colinesterase em peixes, como visto na espécie *Astyanax sp.* Tal fato sugere que a mistura nAg e FSA é mais deletéria ao organismo quando comparada a exposição aos poluentes isolados e que as nanopartículas possivelmente possuem a capacidade de carrear outras substâncias para locais onde esses não chegariam de forma isolada. Com relação a este último ponto, deve-se ressaltar que a FSA teria dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica devido a grande expressão de transportadores do sistema de defesa a multixenobióticos (MXR). Assim, uma possibilidade para justificar este resultado seria a ação combinada da associação entre nAg e FSA, na qual os HPAs adsorvidos poderiam entrar por endocitose das NPs e, desta forma, teriam acesso ao Sistema Nervoso Central. Outro achado intrigante refere-se à observação de diferenças na atividade da acetilcolinesterase cerebral e peroxidação lipídica entre os grupos expostos durante 24 h com relação aos demais grupos. Essa diferença pode ser explicada por uma situação experimental tendo em vista que antes do experimento os peixes foram mantidos em água filtrada e durante a exposição eles foram acondicionados em água reconstituída. Essa mudança pode ter gerado um estresse e desta forma interferido na atividade da enzima nas primeiras horas.

O desafio atual e futuro no ramo da toxicologia é a interação entre pesquisas de laboratório (bioensaio) e a aplicação prática, ligando biomarcadores aos altos níveis de organização biológica (WESTER *et al.*, 1994; MOORE, 2002). Dessa forma, a investigação das injúrias celulares associadas com aspectos bioquímicos em peixes pode ser considerada uma importante ferramenta, que quando somada aos parâmetros ambientais podem indicar de forma mais qualificada o grau de impacto sobre um determinado ecossistema (AKAISHI, 2003).

---

<sup>9</sup> O estoque de FSA foi preparado a partir da agitação do petróleo em água, na proporção volumétrica de 10% de petróleo e 90% de água.

## 6. CONCLUSÕES

- O método de quantificação de HPAs na bile demonstrou que a presença de HPAs foi maior nas exposições que continham FSA.
- Nanopartículas de prata podem reduzir os níveis de HPAs na bile se adsorvendo à FSA, diminuindo desta forma sua disponibilidade para o organismo.
- O processo de depuração mostrou-se eficiente, principalmente para compostos de 5 e 6 anéis aromáticos de HPAs, porém o período de 120 h não foi suficiente para que os níveis chegassem aos níveis dos organismos controle.
- O nível de peroxidação lipídica é significativamente menor no grupo exposto à associação entre nanopartículas e FSA em relação ao grupo exposto somente às nanopartículas de prata.
- Nanopartículas de prata associadas com a FSA resultou em redução da atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro de *Cyprinus carpio* expostos durante 120 h.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, E., BAUSSANT, T., BALK, L., LIEWENBORG, B., ANDERSEN, O.K. PAH metabolites in bile, cytochrome P450 1A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. **Aquat. Toxicol.** v. 51, p. 241–258, 2000.

AKAISHI, F.M. **Avaliação do potencial tóxico da fração solúvel do petróleo em água (FSA) em *Astyanax sp.* utilizando biomarcadores de contaminação.** 141 f. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2003

AKAISHI, F. M., SILVA DE ASSIS, H. C., JAKOBI, S. C. G., EIRAS-STOFELLA, D. R., ST-JEAN, S., COURTENEY, S. C., LIMA, E. F., WAGENER, A. L., SCOFIELD, A. L., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax 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.

ALMOFTI, M.R., ICHIKAWA, T., YAMASHITA, K., TERADA, H., SHINOHARA, Y. Silver ion induces a cyclosporine a-sensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome c. **J. Biochem.** v.134, p.43-49, 2003.

AL-YAKOOB, S.M.; GUNDERSEN, D.; CURTIS, L. Effects of the water-soluble fraction of partially combusted crude oil from Kuwait's oil fires (from Desert Storm) on survival and growth of the marine fish *Menidia beryllina*. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v. 35, p. 142-149, 1996.

ARIESE, F.; BURGERS, I.; OUDHOFF, K.; RUTTEN, T.; STROOMBERG, G.; VETHAAK, D. Comparison of analytical approaches for PAH metabolites in fish bile samples for marine and estuarine monitoring. Vrije Universiteit, **Institute for Environmental Studies**, 40 p, 1997.

ARKAS, J.; CHRISTIAN, P.; URREA J. A. G.; ROOS, N.; HASSELLOV, M., TOLLEFSEN, K. E.; THOMAS, K. V. Effects of Silver and Gold Nanoparticles on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatocytes. **Aquatic Toxicology**, v.96, p. 44-52, 2010.

ARORA, S., JAIN, J., RAJWADE, J.M., PAKNIKAR, K. M. Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies. **Toxicol. Lett.** v.179, p.93–100, 2008.

ARTELT, S.; CREUTZENBERG, O.; KOCK, H.; LEVSEN, K.; NACHTIGALL, D.; HEINRICH, U.; RUHLE, T.; SCHLOGL, R. Bioavailability of fine dispersed platinum as emitted from automotive catalytic converters: a model study. **Sci. Total Environ.**, v.228, p.219–242, 1999.

ASHARANI, P. V., WU, Y. L., GONG, Z., VALIYAVEETIL, S. **Toxicity** of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, v.19, p.2255102 - 2255107, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova.** 29: 113-123. 2006.

BARRON, M.G., CARLS, M.G., SHORT, J.W., RICE, S.D., HEINTZ, R.A., RAU, M., DIGIULIO, R.,. Assessment of the phototoxicity of weathered Alaska North Slope crude oil to juvenile pink salmon. **Chemosphere**, v.60, p.105–110, 2005.

BAUN, A.; SORENSEN, S. N.; RASMUSSEN, R. F.; HARTMANN, N. B.; KOCH, C. B. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. **Aquatic Toxicology**, v. 86, p.379-387, 2008.

BERRY C.C, WELLS S., CHARLES S., AITCHISON G., CURTIS A.S.G. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalization. **Biomaterials**, v.25, p.5405–13, 2004.

BINELLI, A., RICCIARDI, F., RIVA, C., PROVINI, A. New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Chemosphere**. v. 62, n. 4, p. 510-519, 2006.

BOELSTERLI, U. A.; **Mechanistic Toxicology – The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets** – 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

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

BROWN D. M., WILSON M. R, MACNEE W, STONE V, DONALDSON K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.175, p.191–9, 2001.

BUSSOLARO, D. **Diferentes abordagens para avaliação da exposição ao MeHg, PCBs, pesticidas organoclorados e nanopartículas de prata em peixes de água doce**. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal, do Paraná. 2010.

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

CHEN, X., SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. **Toxicol. Lett.** v.176, p.1–12, 2008.

CHENG X.K, KAN A.T, TOMSOM M.B. Naphthalene adsorption and desorption from aqueous C-60 fullerene. **J Chem Eng Data**, v.49, p.675–83, 2004.

COLLIER, T.K.; KRONE, C.A.; KRAHN, M.M.; STEIN, J.E.; CHAN, S-L.; VARANASI, U. Petroleum exposure and associated biochemical effects in subtidal fish after the Exxon Valdez oil spill. **American Fisheries Society Symposium**, v. 18, p. 671 – 683, 1996.

COSSU, C., DOYOTTE, A., JACQUIN, M.C. Glutathione reductase, selenium dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers contamination in field studies. Ecotoxicol. **Environ. Safety**, v. 38, p. 122–131, 1997.

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Quim Nova**, v.25, p.995-1002, 2002.

DOMINGOS, R.F. BAALOUSHA, M. JU-NAM, Y. REID, M.M., TUFENSKJI, N. LEAD J.R., WILKINSON K.J. Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particles sizes. **Environmental Technology and Chemistry**, v.43, p. 7277-7284, 2009.

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

ESCARTÍN, E.; PORTE, C. Assessment of PAH pollution in coastal areas from the NW Mediterranean through the analysis of fish bile. **Marine Pollution bulletin.** v. 38, p. 1200-1206. 1999.

ERICKSON, R.J., NICHOLS, J.W., COOK, P.M., ANKLEY, G.T. Bioavailability of chemical contaminants in aquatic systems, em: Di Giulio, R., Hinton, D. **Toxicology of fishes.** CRC Press, Boca Raton, pp. 55-153, 2008.

FARRÉ, M., GAJDA-SCHRANTZ K., KANTIANI L., BARCELÓ, D. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v.393, p.81-95, 2009.

FOUCHÉCOURT, M. O.; ARNOLD, M.; BERNY, P.; VIDEMANN, B.; RETHER, B.; RIVIERE, J. L. Assessment of the bioavailability of PAHs in Rats exposed to a polluted soil by natural routes: induction of EROD activity and DNA adducts and PAH burden in both liver and lung. **Environmental Research,** v. 80: p. 330-339, 1999.

FUJIWARA, K., SUEMATSU, H., KIYOMIYA, E., AOKI, M., SATO, M., MORITOKI, N., Size-dependent toxicity of silica nano-particles to *Chlorella kessleri*. **J. Environ. Sci. Health,** v.43, p.1167-1173, 2008.

GRAINGER, D.W.; CASTNER, D.G. Nanobiomaterials and nanoanalysis: opportunities for improving the science to benefit biomedical technologies. **Adv. Mater.,** v.20, p.867–877, 2008.

HAMACHER, C. **Determinação de Hidrocarbonetos em Amostras de água e sedimento da Baía de Guanabara.** p 101, Dissertação de Mestrado em Química Analítica. PUC – Rio de Janeiro, 1996.

HLAVAY, J.; KISS, G.; GELENCSEÉR, A.; KRIVÁSCSY, Z. Occurrence and determination of organic pollutants in aerosol, precipitation, and sediment samples collected at Lake Balaton. **Journal of Chromatography A, Finland,** n. 774, p. 349-361, 1997.

HOWARD C. V. **Small particles - big problems.** Int Lab News, v.2, p. 28–9, 2004.

HURK, P.V. Bile fluorescence, heme oxygenase induction, and increased biliverdin excretion by mixtures of environmental toxicants. **Aquatic Toxicology.** v.77, p. 202-209, 2006.

INUNZA, B.; ORREGO, R.; PEÑALOSA, M.; GAVILÁN, J. F.; BARRA, R. Analysis of CYP450A1, PAHs metabolites in bile, and genotoxic damage in *Oncorhynchus mykiss* exposed to Biobío River sediments, Central Chile. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v. 65, p. 242-251, 2006.

JOHNSTON, B. D., SCOWN, T. M., MOGER, J., CUMBERLAND, S., BAALOUSHA, M., LINGE, K., VAN AERLE, R., JARVIS, K., LEAD, J. R., TYLER, C. R. Bioavailability of nanoscale metal oxides, TiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub>, and ZnO to fish. **Environ. Sci. Technol.** v.44, p.1144–1151, 2010.



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

JUNG, W. K., KIM, S. H., KOO, H. C., SHIN, S., KIM, J. M., PARK, Y. K., HWANG, S. Y., YANG, H., PARK, Y. H. Antifungal activity of the silver ion against contaminated fabric. **Mycoses**, v.50, p.265–269, 2007.

KLEMZ, C. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus sp* (cascudo)**. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná. 2002.

KODO, A.K.F. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce**. Dissertação de mestrado em Ecologia e Conservação. Universidade Federal do Paraná. 2006.

LEBLANC, G.A. Trophic-level differences in the bioconcentration of chemicals: Implications in assessing environmental biomagnification. **Environ. Sci. Technol.**, v.29, p.154–160, 1995.

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

LI, Q. L., MAHENDRA, S., LYON, D. Y., BRUNET, L., LIGA, M. V., LI, D., ALVAREZ, P. J. J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. **Water Res.** v.42, p.4591–4602, 2008.

LIMBACH, K.L., LI, Y., GRASS, R.N., BRUNNER, T.J., HINTERMANN, M.A., MULLER, M., GUNTHER, D., STARK, W.J. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblast: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. **Environ. Sci. Technol.** v.39, p.9370-9376, 2005.

LOCKHART, W.L.; DUNCAN, D.A.; BILLECK, B.N.; DANELL, R.A.; RYAN, M.J. Chronic toxicity of the 'water-soluble fraction' of norm wells crude oil to juvenile fish. **Spill Science e Technology Bulletin.** v. 3, n. 4, p. 259-262. 1996.

LOPES, W.A.; ANDRADE, J.B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 5, 1996.

MEAGHER, E.A.; FITZGERALD, G.A., **Indices** of lipid peroxidation *in vivo*: Strengths and limitation. **Free Radic. Biol. Med.** v. 26, p. 202–226, 2000.

MENICONI, M.D. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente: diferenciação de fontes em sedimentos e metabólitos em bile de peixe**. Tese de doutorado em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2007.

MIGUEL, A. H.; EIGUREN-FERNANDEZ, A.; JAQUES, P. A.; FROINES, J. R.; GRANT, B. L.; MAYO, P.; SIOUTAS, C. Seasonal variation of the particle size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and of major aerosol species in Claremont, California. **Atmospheric Environment, California**, v. 38, p. 3241-3251, 2001.

MIRANDA, A. L.; ROCHE, H.; RANDI, M. A. F.; MENEZES, M. L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. **Environ. Int.**, v. 34, p. 939-949, 2008.

MONSERRAT, J. M., BIANCHINI A., BAINY, A. C. D. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. **Marine Environmental Research**. v. 54, n. 3-5, p. 781-785. 2002.

MONSERRAT, J. M., BIANCHINI, A. Anticholinesterase effect of eserine (physostigmine) in fish and crustacean species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 44, n. 1, p. 63-68. 2001.

MONTEIRO, M., QUINTANEIRO, C., MORGADO, F., SOARES, A.M.V.M., GUILHERMINO, L. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 62, n. 3, p. 341-347. 2005.

MOORE, M.N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, v. 59, p.1-15, 2002.

NEFF, H.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment sources, fates and biological effects. **Applied Science Publishers Ltd. Essex UK**, 1978.

NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel, **Science**, v. 311, p.622–627, 2006.

NEMMAR, A.; HOET, P.H.M.; VANQUICKENBORNE, B.; DINSDALE, D.; THOMEER, M.; HOYLAERTS, M.F.; VANBILLOEN, H.; MORTELMANS, L.; NEMERY, B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. **Circulation** v. 105, p.411–414, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; BELGER, L.; PELLETIER É.; ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environ. Res.**, v. 90, p. 217-225, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquat. Toxicol.**, v. 4, p. 53-69, 2005.

PALMEIRA, C. M. **In vitro assessment of silver nanoparticles toxicity in hepatic mitochondrial function**. EOARD Grand FA8655-07-3047. Final Report. IMAR-Mitochondrial Research Group. Coimbra, Portugal, 2008.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L. Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollut Bull.** v. 32, p. 225-23. 1996.

PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M.; CORSEUIL, H.X.; SCHENEIDER, M.R.; LINHARES, M.M. **Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo**. Série Cadernos de Referência Ambiental, v.12, p.229, Salvador/BA, 2002.

PELTONEN, Kimmo; KULJUKKA, Terhi. Air sampling and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Chromatography A**, Finlang, n. 710, p. 93-108, 1995.

PEREIRA NETTO, A. D.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n. 6, 2000.

PICER, M. Simple spectrofluorometry methods for estimating petroleum hydrocarbons levels em various sea benthic organism. **Chemosphere**. V 37 p 607-617, 1998.

POLLINO, C.A.; HOLDWAY, D.A. Toxicity testing of crude oil and related compounds using early life stages of the Crimson-Spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 52, p. 180-189. 2002.

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

RABITTO, I. S.; BASTOS, W. R.; ANJOS, R. A., A.; HOLANDA, Í. B. B.; GALVÃO, R. C. F.; FILIPAK NETO, F.; MENEZES, M. L.; SANTOS, C. A. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environ. Int.**, v.37, p. 56-65, 2011.

RAMACHANDRAN, S.D.; HODSON,P.V.; KHAN,C.W.; LEE,K. Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 59, p. 300-308. 2004.

REMEO, M., GNASSIA-BARELLI, M., Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean Clam *Ruditapes decussatus*. **Comp.Biochem. Physiol.** 118, 33–37, 1997.

RODRIGUEZ-FUENTES, G., GOLD-BOUCHOT, G. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition *in vitro*. A case study in two Mexican lagoons. **Marine Environmental Research**. v. 50, p. 357-360. 2000.

ROYAL SOCIETY e ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. RS policy document 19/04. **London: The Royal Society**; p. 113, 2004.

SAEED, T., MUTAIRI M. Chemical composition of the water soluble fraction of leaded gasolines em sea water. **Environ.Int.** 25: 117-129, 1999.

SCHRAND, A. M., BRAYDICH-STOLLE, L. K., SCHLAGER, J. J., DAI, L., HUSSAIN, S. M. Can silver nanoparticles be useful as potential biological labels? **Nanotechnology**, v.19, p.104-135, 2008.

SCOWN, T. M.; SANTOS,E. M.; JOHNSTON,B. D.; GAISER, B.; BAALOUSHA, M.; MITOV, S.; LEAD, J. R.; STONE, V.; FERNANDES, T. F.; JEPSON, M.; VAN AERLE, R.; TYLER, C. R. Effects of Aqueous Exposure to Silver Nanoparticles of Different Sizes in Rainbow Trout. **Toxicological Sciences**, v.115, p. 521-534, 2010.

SHI, H., SUI, Y., WANG, X., LUO, Y, JI, L. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 140, p. 115–121, 2005.

SHIMADA, A.; KAWAMURA, N.; OKAJIMA, M.; KAEWAMATAWONG, T.; INOUE, H.; MORITA, T. Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse. **Toxicol. Pathol.**, v.34, p.949–957, 2006.

SILVA DE ASSIS, H.C., SÁNCHEZ-CHARDI, A., REIS, R. C., NICARETTA, L., MENCINAUSKI, C., JAKOBI, S. C. G., SILVA, P. H., ZAMPRONIO, A. R., PELLETIER, E., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Subchronic toxic effects of 114 tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 19, n. 1, p. 113-120. 2005.

SRIDEVI, B., REDDY, K.V., REDDY, S.L.N. Effect of trivalent and hexavalent chromium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 61, p. 384–390, 1998.

STEFENS, J.L.; **Caracterização molecular de compostos orgânicos biogênicos e antropogênicos em sedimentos da lagoa Rodrigo de Freitas – Rio de Janeiro (RJ) –** Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Molecular responses to enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget, R. J.; Kimerle, R. A.; Mehrle J. R. e Bergman, H. L. (Eds.) **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress**. Chelsea: SETAC/Lewis Publishers, p. 235-335. 1992.

STENESH, J. **Biochem Plen.** New York, EUA. p 596. 1998.

STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H. C., HANSEN, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**. v. 47, p. 1-10. 1999.

SUN, L., SINGH, A. K., VIG, K., PILLAI, S. R., SINGH, S. R. Silver nanoparticles inhibit replication of respiratory syncytial virus. **J. Biomed. Nanotechnol.** v.4, p.149–158, 2008.

TAKENAKA, S.; KARG, E.; ROTH, C.; SCHULZ, H.; ZIESENIS, A.; HEINZMANN, U.; SCHRAMMEL, P.; HEYDER, J. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. **Environ. Health Perspect.**, v.109, p.547–551, 2001.

THOMAS, P., BUDIANTARA, L. Reproductive life history stages sensitive to oil and naphthalene in atlantic croaker. **Marine Environmental Research**. v. 39, p.147-150. 1995.

THOMAS, P., WOFFORD, H.W. Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. **Aquat. Toxicol.** v. 27, p.159–178, 1993.

TOLOSA, J., BAYONA, J.M., ALBAIGÉS, J. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons and sulfur/oxygen derivatives in northwestern Mediterranean sediments: spatial and temporal variability, fluxes, and budgets. **Environ. Sci. Technol.**v. 30, p. 2495–2503, 1996.

TORTELLI, V., COLARES, E. P., ROBALDO, R. B., NERY, L. E. M., PINHO, G. L. L., BIANCHINI, A., MONSERRAT, J. M. Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish. **Chemosphere**. v. 65, p. 560-566. 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.13, p.57-149. 2003.

VAN GESTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T.C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v.5, 217-225, 1996.

VASCONCELLOS, P. C.; ARTAXO, P.E.; CICCIOLO, P.; CECINATO, A.; BRANCALEONI, E.; FRATTONI, M. **Química Nova**, São Paulo, v. 21. n. 4, p.385-393, 1998.

VENTURA, E. C., GAELZER, L. R., ZANETTE, J., MARQUES, M. R. F., BAINY, A. C. D. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three estuaries of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research**. v. 54, p. 775-779. 2002.

WESTER, P. W.; VETHAAK, A. D. & MUISWINKEL, W.B. Fish as biomarkers in immunotoxicology. **Toxicology**, v.86, p. 213-232, 1994.

WISE, S. A.; SANDER, L. C.; MAY, W. E. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography. **Journal of Chromatography, Gaithersburg**, n. 642, p. 329-349, 1993.

WITT G., Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of the Baltic Sea, **Mar. Pollut. Bull.**, v.31, p. 237–248, 1995.

YEO, M. K., AND KANG, M. Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity during zebrafish embryogenesis. **Bull. Korean Chem. Soc.** v.29, p.1179–1184, 2008.