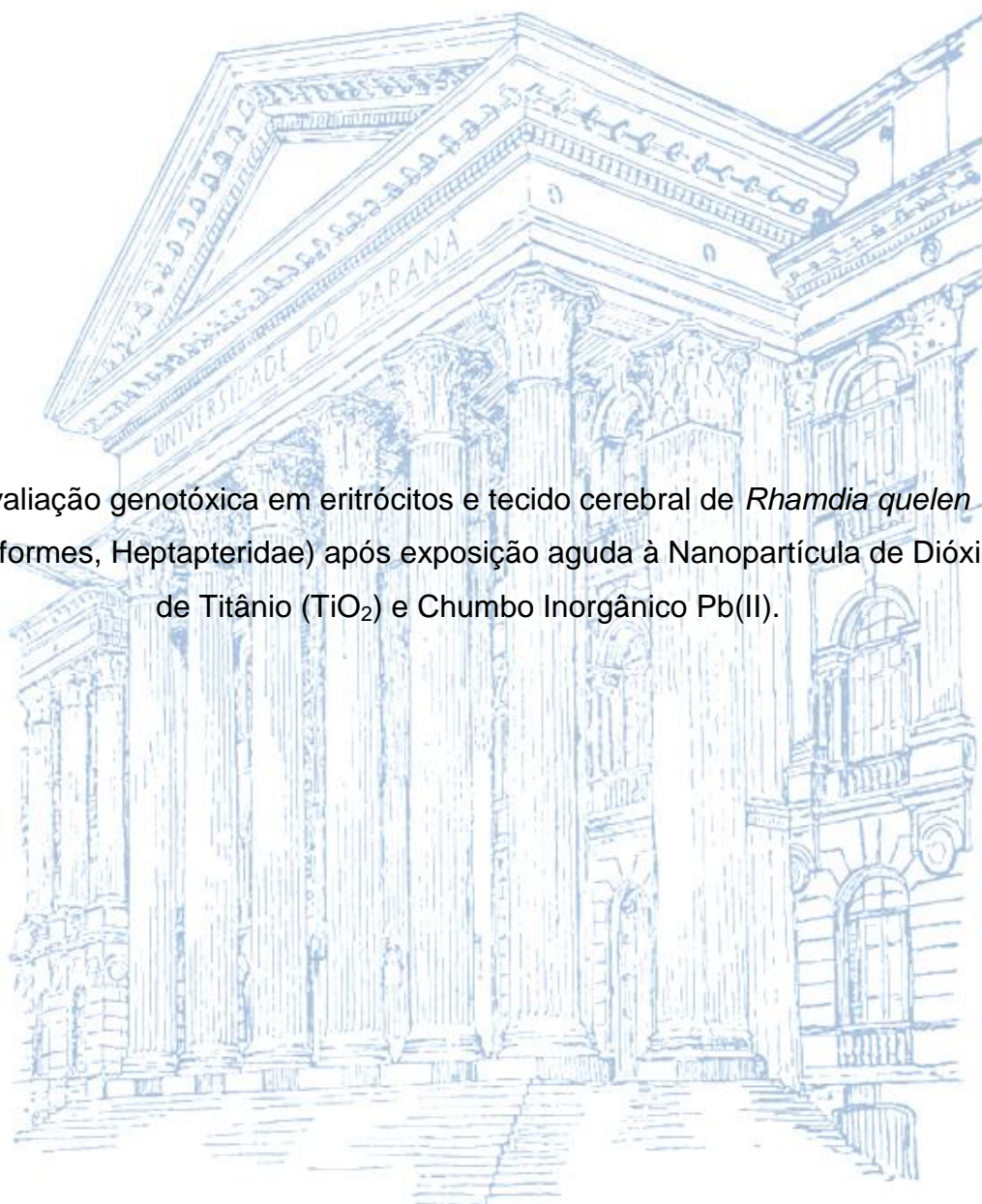


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAÍS FERNANDA OYA SILVA

Avaliação genotóxica em eritrócitos e tecido cerebral de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) após exposição aguda à Nanopartícula de Dióxido de Titânio (TiO₂) e Chumbo Inorgânico Pb(II).



CURITIBA

2013

LAÍS FERNANDA OYA SILVA

**Avaliação genotóxica em eritrócitos e tecido cerebral de *Rhamdia quelen*
(Siluriformes, Heptapteridae) após exposição aguda à Nanopartícula de
Dióxido de Titânio (TiO₂) e Chumbo Inorgânico Pb(II).**

Monografia apresentada à disciplina
BIO027 Estágio Supervisionado em
Biologia II como requisito parcial à
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Departamento de Genética,
Universidade Federal do Paraná.

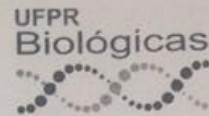
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Margarete Cestari
Co-orientadora: Tatiane Klingelfus

CURITIBA

2013



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 trinta e um dias do mês de julho de 2013 a Comissão de Avaliação da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, composta por Profa. Dra. WANESSA ALGARTE RAMSDORF, Prof. MS. LAERCIO DANTE STEIN PIANCINI e Profa. Dra. MARTA MARGARETE CESTARI, reuniu-se para proceder a avaliação da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada "Avaliação Genotóxica em eritrócitos e tecido cerebral de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) após exposição aguda à nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO₂) e Chumbo Inorgânico (PbII)" de autoria do(a)acadêmico(a) LAIS FERNANDA OYA SILVA.

A Comissão julgou o trabalho e atribui a nota 9,50 (Nobre e Airo)

Prof.(a) Orientador(a)
Marta Margarete Cestari

Membro da Comissão
Wanessa Algate Ramsdorf

Membro da Comissão
Laercio Dante Stein Piacini

Curitiba, 31 de julho de 2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elizabeth e Gilberto, que me apoiaram, incentivaram e proporcionaram condições para que eu abrisse mão do meu emprego e buscasse a minha realização pessoal na biologia.

À Profa. Dra. Marta Margarete Cestari, que me deu a oportunidade iniciar minha carreira científica no laboratório que desejei fazer parte desde o segundo ano da graduação. Obrigada pela orientação, confiança e investimento no meu trabalho.

À Profa. Wanessa Ramsdorf, que aceitou de prontidão o convite para participar da banca de avaliação. Obrigada, desde já, pelas contribuições que fez a este trabalho tanto com sua produção científica quanto com sua experiência na área na correção deste.

Aos mestrandos e doutorandos do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, que me ensinaram tudo sobre a rotina do laboratório, compartilharam seus conhecimentos comigo, me pressionaram para terminar as leituras de lâminas, me incluíram nas discussões sobre experimentos que contribuíram, e ainda contribuem, muito para o meu crescimento profissional. Obrigada por tornarem meus dias, até aqueles cinzas, mais coloridos!

Agradeço aos colegas estagiários, Helyandra, Ana Carol, Franco Luis, que me ajudaram nas minhas atividades, e que fizeram nossa relação ficar cada vez mais de companheirismo e amizade.

Em especial, agradeço à Mestre Tatiane Klingelfus que permitiu que eu fizesse parte do seu projeto. Obrigada pela confiança em meu trabalho, por me ensinar toda a parte prática e técnica de um experimento, por me “acudir” quando o desespero batia, e por tantas outras coisas que não caberiam nesta página. Obrigada por tudo o que fez, e continua fazendo, por mim!!!

Ao Laboratório de Toxicologia Ambiental, pela participação no trabalho.

Aos professores da banca de avaliação, que tenho confiança nas correções e melhoramento do trabalho.

RESUMO

Nanopartículas são potencialmente atrativas às indústrias devido as suas propriedades físico-químicas, porém as consequências da sua presença no ambiente aquático ainda são desconhecidas. O chumbo, outro elemento muito utilizado por indústrias, é tóxico e pode causar danos aos organismos em níveis histológicos, genéticos e bioquímicos. O trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos genotóxicos da Nanopartícula de Dióxido de Titânio (NPTiO₂) do Chumbo Inorgânico (PbII) e da associação destes xenobióticos, em sangue e tecido cerebral na espécie *Rhamdia quelen*. Esta espécie é nativa, onívora, reproduzida em pisciculturas e de fácil manutenção em laboratório. Foram realizados bioensaios agudos (96 horas) via injeção intraperitoneal, no qual os espécimes foram divididos em 10 grupos: 2 controles negativos, 5ng/g NPTiO₂, 50ng/g NPTiO₂, 500ng/g NPTiO₂, 21µg/g PbII, 5ng/g NPTiO₂ + 21µg/g PbII, 50ng/g NPTiO₂ +21µg/g PbII, 500ng/g NPTiO₂ +21µg/g PbII, Controle Positivo (Metil Metano Sulfonato na dose 0,5µg/g). Sangue e cérebro foram coletados para a realização do teste do micronúcleo pisco e alterações morfológicas nucleares e do ensaio cometa, respectivamente. Foi observado que grupo exposto ao PbII não apresentou toxicidade em tecido cerebral ou em eritrócitos quando comparado ao grupo controle negativo. Sabe-se que o chumbo é neurotóxico, e provavelmente não foi observada genotoxicidade em tecido cerebral devido ao curto tempo de exposição. O grupo contaminado com 5ng/g NPTiO₂ apresentou maiores danos tanto em cérebro quanto em eritrócito. Entre as alterações morfológicas nucleares mais observadas no grupo de 5ng/g NPTiO₂ destacou-se o tipo *vacuolated*. Todos os grupos de associação entre NPTiO₂ e PbII não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si, tanto no ensaio cometa em tecido cerebral, quanto na análise de alterações morfológicas totais em eritrócitos. A utilização de doses baixas de nanopartículas demonstrou que, provavelmente, sua capacidade de agregação pode ter sido reduzida, facilitando a distribuição no organismo e a entrada nas células, proporcionando assim a observação da genotoxicidade de NPTiO₂ em tecido cerebral e eritrócitos de *Rhamdia quelen*.

Palavras-chave: ensaio cometa, alterações morfológicas nucleares, nanopartículas, chumbo, peixe.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de <i>Rhamdia quelen</i>	9
Figura 2 - Caracterização da Nanopartícula de Dióxido de Titânio. (A) Gráfico com informações sobre tamanho médio de NPTiO ₂ em pó. (B) Eletromicrografias de NPTiO ₂	13
Figura 3 - Aplicação da injeção intraperitoneal.....	14
Figura 4 - Coleta de Sangue Periférico	15
Figura 5 - Extração do cérebro.....	16
Figura 6 - Confeção do Esfregaço Sanguíneo.....	17
Figura 7 - Modelo de Nucleóides.....	20
Figura 8 – Eritrócitos de <i>Rhamdia quelen</i>	22
Figura 9 - Danos ao DNA em tecido cerebral de <i>Rhamdia quelen</i>	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 BIOMARCADORES GENÉTICOS	2
1.1.1 Teste do micronúcleo Písceo	3
1.1.2 Ensaio Cometa.....	4
1.2 CHUMBO	5
1.3 NANOPARTÍCULAS	7
1.3.1 Nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO ₂)	7
1.3.2 Associação entre nanopartículas e metais.....	8
1.4 <i>Rhamdia quelen</i>	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE NPTiO ₂ e PbII	12
3.2 CARACTERIZAÇÃO DE NPTiO ₂	12
3.3 ORGANISMO UTILIZADO	13
3.4 COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS.....	13
3.5 TRATAMENTO DOS ANIMAIS	13
3.6 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DE MATERIAL PARA CADA BIOENSAIO.....	15
3.7 BIOMARCADORES GENÉTICOS	16
3.7.1 Teste do Micronúcleo Písceo (MNP)	16
3.7.2 Ensaio Cometa.....	18
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4. RESULTADOS	21
4.1 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS DE <i>Rhamdia quelen</i>	21
4.2 ENSAIO COMETA DE TECIDO CEREBRAL DE <i>Rhamdia quelen</i>	26
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	33
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

Um dos ecossistemas que mais sofrem impactos é o ambiente aquático, pois este é o destino final de vários produtos gerados através da atividade humana. Despejos de esgoto industrial e doméstico, uso excessivo de agrotóxicos, entre outros acidentes de derrame, contribuem para a geração de produtos persistentes que afetam este ecossistema (AKAISHI, 2003).

Segundo a *Chemical Abstract Service* (CAS), em outubro de 2013, o total de substâncias químicas catalogadas é de aproximadamente 72 milhões. Destas, 10 milhões estão disponíveis comercialmente, 80 mil são utilizadas cotidianamente, e de apenas 2 mil delas é conhecida a toxicologia.

A preocupação com a preservação e manutenção da qualidade do ecossistema aquático está em crescimento contínuo. Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de compreender a ação de elementos e substâncias químicas neste ecossistema, assim como suas interações com os seres vivos e seus efeitos sobre estes. Além de tornar conhecida a permanência destas substâncias no ambiente e seus possíveis destinos (AKAISHI, 2003).

Estudos sobre a citotoxicidade de substâncias e elementos químicos são de grande importância, pois permitem determinar as respostas de certo organismo à contaminação por estes, avaliar o impacto e os efeitos sobre as células, tecidos e órgãos (PANDRANGI *et al.*, 1995).

Peixes são os organismos mais susceptíveis a escolha como organismos de testes laboratoriais e biomonitoramentos. Os principais motivos estão na sua atuação em diversos níveis da cadeia trófica, capacidade de bioacumulação e respostas à presença de xenobióticos em baixas concentrações (GOKSOYR *et al.*, 1991; MINISSI *et al.*, 1996). Assim, peixes são escolhidos como organismos bioindicadores, ou seja, espécies que serão utilizadas como primeiros indicadores de efeito do estresse causado por contaminantes (ADAMS, 2002).

Para bioensaios de mutagenicidade e genotoxicidade, é preferível sempre o uso de organismos endêmicos. Um bioindicador ideal, além de sobreviver em ambientes saudáveis, deve apresentar uma resistência relativa

aos contaminantes a que está exposto, ser abundante no ambiente e adaptar-se bem aos ensaios de laboratório (PANDRANGI *et al.*, 1995; AKAISHI, 2003).

1.1 BIOMARCADORES GENÉTICOS

O impacto de substâncias e elementos tóxicos sobre a integridade e funcionamento do DNA dos organismos bioindicadores, tem sido muito investigado em diversas situações utilizando diversos biomarcadores. Estes são definidos como qualquer alteração biológica detectável que expresse uma resposta à exposição e/ou aos efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente. Também são consideradas ferramentas indispensáveis em programas de biomonitoramento, pois apresentam grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (McCARTHY e SHUGART, 1990; STEGEMAN *et al.*, 1992; BAINY, 1993).

Biomarcadores genéticos têm sido utilizados com frequência como ferramentas para detecção de exposição e avaliação dos efeitos de poluição utilizando análises de aberrações cromossômicas, adutos de DNA, quebras no DNA, frequência de formação de micronúcleo e de outras anomalias nucleares (BOMBAIL *et al.*, 2001).

A utilização de bioensaios em pesquisas de toxicologia é vantajosa no sentido de possibilitar o estudo dos efeitos tóxicos de contaminantes específicos, em organismos, de forma isolada ou associada (caso seja mais de uma substância a ser estudada), reduzindo a influência de variáveis ambientais. Desta forma, é possível fazer um estudo da especificidade relativa de alguns efeitos com os contaminantes utilizados (AKAISHI, 2003).

O uso de animais nos ensaios possibilitam várias vias de administração da substância em estudo, pode ser através de alimentos, da água ou de injeções. Ainda é possível avaliar seus efeitos através de órgãos ou tecidos específicos, em células germinativas ou somáticas, além de poder comparar contaminações crônicas ou agudas. Com todos estes recursos, é possível reproduzir, o mais próximo possível, as condições de uma exposição dos seres humanos a estas substâncias (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991).

1.1.1 Teste do micronúcleo Písceo

O teste do micronúcleo foi primeiramente desenvolvido por Schmid (1975), para células de medula óssea de camundongos e mais tarde foi adaptado por Hoofman e Raat (1982) para o estudo de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratórios. Esta técnica modificada passou a ser chamada de Piscine Micronucleus Test, ou Teste do Micronúcleo Písceo.

Micronúcleos são cromossomos, ou parte deles, que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular, e apresentam-se como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntica em aparência ao núcleo celular. Podem, também, ocorrer anomalias celulares, quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose, fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, e apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL *et al.*, 2001).

São considerados micronúcleos aqueles que são formados e estão visivelmente separados do núcleo principal da célula, e possuem um tamanho correspondente a 1/5 a 1/20 do tamanho deste núcleo, não ultrapassando 1/3 do tamanho do núcleo principal. Também devem possuir as bordas distinguíveis e com a mesma refringência do núcleo principal. Em peixes, devido ao tamanho reduzido dos cromossomos, esta proporção de tamanho fica, aproximadamente, entre 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo original (AL SABTI e METCALFE, 1995; AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000; GUSTAVINO *et al.*, 2001).

O teste de micronúcleo tem sido aplicado com sucesso por se tratar de um ensaio simples, de rápida execução, não dispendioso, seguro e sensível, e não depender da característica cariotípica da espécie em estudo (HOSE *et al.*, 1987; MINISSI *et al.*, 1996). Apesar disto, em diversos artigos utilizando peixes e comparando respostas entre o teste do micronúcleo písceo e o ensaio cometa em eritrócitos, observou-se que o MNP é menos sensível (CESTARI *et al.*, 2004, FERRARO *et al.*, 2004, RAMSDORF *et al.*, 2009).

Em peixes, os diferentes tipos de lesões nucleares ainda não apresentam sua origem completamente compreendida. Carrasco, Tylbury e Myers (1990) descreveram e fotografaram as alterações morfológicas em núcleos de eritrócitos de peixes. Essas lesões foram classificadas como:

- *Blebbled*: Núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). O tamanho destas evaginações varia desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas.
- *Lobbed*: Núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *blebbed*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns apresentam várias destas estruturas.
- *Vacuolated*: Núcleos apresentam uma região que lembra vacúolos em seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.
- *Notched*: Núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Estes cortes parecem não possuir material nuclear algum, e são delimitados por membrana celular.

1.1.2 Ensaio Cometa

O Ensaio cometa, SCGE (*Single-Cell Gel Electrophoresis*), avalia danos no DNA ao nível celular individual, através da medida da migração em gel do DNA de células após a corrida eletroforética (SINGH *et al.*, 1988). O nome cometa refere-se á formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL; GORDON; BATTY, 2001).

A técnica foi desenvolvida por Osteling e Johanson (1984), utilizando células misturadas em agarose de baixo ponto de fusão, depositadas sobre uma lâmina com agarose normal. Posteriormente, as células presentes na lâmina passariam por um processo de lise celular, por detergentes e soluções salinas concentradas. A lise permitiria a liberação do DNA. As lâminas eram submetidas à eletroforese em tampão neutro. Porém, haviam algumas limitações, pois só era capaz de detectar quebras de fita duplas de DNA, e que poderia ser confundido com o RNA ainda presente no núcleo (ROJAS; LOPES; VALVERDE, 1999).

Singh *et al.* (1988) fez uma variação da técnica descrita anteriormente, substituindo o tampão neutro utilizado na corrida eletroforética por um tampão

com pH superior a 13. Com esta modificação, foi possível detectar no DNA quebras de fita simples, sítios álcali-lábeis e sítios de reparo tardio.

A técnica baseia-se no fato de que o DNA da célula que não possuir dano migrará em conjunto, caracterizando-se como um círculo. As células que possuírem danos em seu DNA, durante a corrida eletroforética, formarão fragmentos diversos. Fragmentos menores tendem a migrar com mais velocidade que fragmentos maiores. Ocorrendo danos intensos, muitos fragmentos de tamanhos variados serão formados, e migrarão em velocidades diferentes, formando então a figura típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990).

Originalmente, a técnica do ensaio cometa foi desenvolvida para detectar defeitos genotóxicos, e hoje é muito empregada na área clínica em estudos de reparo do DNA no biomonitoramento ambiental e no monitoramento humano (COLLINS, 1997).

Uma das metodologias para avaliar o dano é realizada através da relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pelos fragmentos de DNA. Esta classificação varia entre Classe 0, onde não ocorreu dano, até a Classe 4, indicando a ocorrência de muitos danos ao DNA (COLLINS *et al.*, 1997).

Diversas publicações demonstram que o ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos no DNA, causados por diferentes classes de agentes mutagênicos em peixes (BELPAEME *et al.*, 1998). Uma das vantagens do ensaio cometa é que este não depende de proliferação celular para ser realizado, portanto pode ser utilizado com qualquer tipo celular nucleado. Uma vez que substâncias genotóxicas, com frequência, são tecido-específicas, é possível analisar diretamente os tecidos-alvo (PANDRANGI *et al.*, 1995; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

1.2 CHUMBO

O chumbo é um metal não essencial, altamente tóxico, sendo que todos os seus efeitos conhecidos em organismos vivos são deletérios. É um metal de coloração branca acinzentada, brilhante, dúctil, macio e resistente à corrosão.

Sua concentração no solo é de 1,6g por 100kg de solo, o que o torna um metal raro no ambiente (PAIN, 1995).

Existem duas formas de chumbo inorgânico: PbII e PbIV. A forma orgânica geralmente é encontrada em complexos com mais de quatro carbonos. A forma inorgânica é menos tóxica que a orgânica, pois esta atravessa a membrana plasmática com muito mais facilidade (PAIN, 1955). Ambas as formas de chumbo são amplamente utilizadas na indústria, para a fabricação de vernizes, explosivos, vidros coloridos, baterias, fósforos, tintas antioxidantes, manufatura de pesticidas, reagentes analíticos, entre outros (JOHNSON, 1998).

Nos corpos de água, a entrada de chumbo é oriunda de descargas industriais diretas, deposição de partículas aéreas, ou pela ação das chuvas nas estradas. As maiores concentrações de chumbo, em ambientes aquáticos, estão em regiões próximas a grandes centros urbanos (PAIN, 1995).

Trabalhos com peixes de água doce indicam que estes animais acumulam muito mais rapidamente, e em maior concentração, compostos orgânicos do chumbo do que os inorgânicos. Sob altas concentrações, destacam-se relatos de quadros anêmicos, redução na eclosão de ovos e curvatura da lateral da espinha. Em doses letais, o chumbo induz um incremento na produção de muco, conseqüentemente ocorre obstrução das brânquias, levando o animal à morte (CHAU *et al.*, 1980; PAIN, 1995).

Após a absorção pelos organismos, o chumbo inorgânico entra na corrente sanguínea e adere à superfície das hemácias. Em seguida, parte deste chumbo estará presente nas hemácias, e a outra parcela alcança diferentes órgãos, como fígado, rins ou ossos (EWERS *et al.*, 1991).

A forma de exposição, aguda ou crônica, influencia a localização do alojamento do chumbo nos órgãos. Na exposição aguda, grande parte do metal concentra-se em tecidos moles, e em baixas concentrações, nos ossos. Em exposições crônicas a concentração do metal nos ossos tende a ser maior (PAIN, 1995).

Estudos apontam o chumbo como um agente co-carcinogênico, devido a interferência do mesmo com os processos de reparo do DNA, desta forma, potencializando o efeito genotóxico de outros agentes, como por exemplo, a radiação UV (FRACASSO *et al.*, 2002).

1.3 NANOPARTÍCULAS

A presença de nanopartículas no meio aquático é seguida por inúmeras consequências, e estas imprevisíveis, devido à escassez de informações disponíveis até o momento (KRYSANOV *et al.*, 2010). Além disso, o desenvolvimento de nanotecnologias ainda apresenta dados variados e contraditórios de avaliação do impacto sobre o meio ambiente, plantas, animais e seres humanos (ANDRIEVSKY *et al.*, 2005; OBERDORSTER *et al.*, 2005a, 2005b; OBERDORSTER, 2007; KOLESNICHENKO *et al.*, 2008).

As nanopartículas apresentam dimensão entre 1 e 100 nm, e estão agrupadas de acordo com sua composição química, como nanomateriais de carbono (fulerenos e nanotubos), óxidos metálicos (por exemplo, TiO₂ e ZnO), nanomateriais metálicos (por exemplo, Au e Ag), semicondutores (*quantum dots*) e nanomateriais orgânicos poliméricos (White book on Nanotechnologies, 2008). Por sua singularidade em propriedades físico-químicas, como grande capacidade de penetração, grande área de superfície e atividade química, nanopartículas tornam-se potencialmente atrativas em tecnologias industriais e medicinais, porém, possuem elevado prejuízo para o ambiente e para os seres vivos (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005a; BORM *et al.*, 2006;. KREYLING *et al.*, 2006;. LAM *et al.*, 2006;. MAYNARD, 2007).

1.3.1 Nanopartículas de Dióxido de Titânio (NPTiO₂)

As nanopartículas de dióxido de titânio estão presentes em tintas, protetores solares, cosméticos, capacitores, materiais de construção, catalisadores, depuradores de ar, antibactericidas, antivirais, antifúngicos e anti-algas, revestimento de pisos e banheiras e equipamentos esportivos (The Project on Emerging Nanotechnologies, 2013).

Em estudos realizados com *Daphnia sp.*, mantidas em suspensões de nanopartículas por 48h, detectou-se acumulação no intestino (ZHU *et al.*, 2009), além de rápida acumulação de nanopartículas de dióxido de titânio, com permanência de parte considerável após 72h. Em exposição crônica, as

nanopartículas de dióxido de titânio inibiram o crescimento e a reprodução das *Daphnia sp.*, em baixas concentrações (ZHU *et al.*, 2010). Porém, em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) não foi detectada acumulação em órgãos internos (FEDERICI *et al.*, 2007; JOHNSTON *et al.*, 2010). Em carpa (*Cyprinus carpio*), houve acúmulo de titânio no músculo e no fígado quando mantidos em água contendo nanopartículas de dióxido de titânio (SUN *et al.*, 2007).

Tratamento agudo realizado com truta arco-íris, em concentração de até 1mg/L, não causou toxicidade, mas foram detectados efeitos subletais, como patologias de órgãos internos e alterações bioquímicas e respiratórias (FEDERICI *et al.*, 2007). Em ensaio trófico, adicionando nanopartículas de dióxido de titânio nas concentrações de 10 e 100 mg/kg no alimento de truta arco-íris juvenis por dois meses, não houve influência da nanopartícula de dióxido de titânio no crescimento da espécie de peixe, tampouco em suas características hematológicas (RAMSDEN *et al.*, 2009).

1.3.2 Associação entre nanopartículas e metais

A absorção de metais é mediada por transportadores de íons na membrana biológica (BURY *et al.*, 2003; HANDY e EDDY, 2004; BURY e HANDY, 2010), enquanto que o mecanismo utilizado para a captação de nanopartículas provavelmente é a endocitose, por serem partículas de maior tamanho (CAMPBELL e STOKES, 1985; CAMPBELL, 1995; ESCHER e SIGG, 2004).

Há evidências que nanopartículas podem carrear metais, ou seja, quando ocorre uma interação entre nanopartículas e metais, estes têm a capacidade de adsorção à superfície de algumas nanopartículas (HANDY *et al.*, 2008b). Em experimentos com carpa, foi realizada exposição com nanopartículas de TiO₂ e Cd, e os peixes acumularam 146% mais metal quando comparados aos peixes expostos com o cádmio somente (ZHANG *et al.*, 2007). O mesmo aconteceu com o metal arsênio, que na presença de nanopartículas de TiO₂, os peixes acumularam 132% mais metal comparados àqueles expostos na mesma concentração do arsênio sozinho (SUN *et al.*, 2007).

1.4 *Rhamdia quelen*

Rhamdia quelen (Figura 1), ou jundiá, pertence à família Heptapteridae (NELSON, 2006), é uma espécie de peixe com distribuição neotropical, encontrada do sul do México até o centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). É uma espécie nativa promissora para o cultivo, com rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, fácil adaptação ao manejo, boa produtividade em açudes e alto potencial de comercialização (GOMES *et al.*, 2000). É uma espécie resistente ao inverno e apresenta rápido crescimento no verão (BARCELLOS *et al.*, 2003).



Figura 1 - Exemplar de *Rhamdia quelen*.
FONTE: Tatiane Klingelfus (2013)

Em 1996, Silfvergrip realizou uma ampla revisão taxonômica do gênero baseada em caracteres da morfologia interna, e concluiu que o gênero *Rhamdia* é formado de apenas 11 espécies dentre 100 anteriormente descritas. Segundo o mesmo autor, *Rhamdia quelen* pertence a seguinte divisão taxonômica: Classe: Osteichthyes, Série: Teleostei, Ordem: Siluriformes, Família: Pimelodidae, Gênero: *Rhamdia*, Espécie: *Rhamdia quelen*.

A coloração do jundiá varia de marrom avermelhado claro a cinza ardósia. A pigmentação da parte inferior da cabeça é variável. Os barbilhões têm crescimento alométrico negativo e esta relação é provavelmente aumentada devido a grande possibilidade de dano dos barbilhões em exemplares grandes (SILFVERGRIP, 1996). *Rhamdia quelen* vive em lagos e

poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, a procura de alimento (GUEDES, 1980). Em experimentos com larvas e alevinos dessa espécie em cativeiro, observou-se uma acentuada aversão à luz e busca de locais escuros (PIAIA *et al.*, 1999).

Os organismos encontrados no conteúdo gastrintestinal de *Rhamdia quelen* não são restritos ao habitat bentônico, indicando que essa espécie é generalista com relação à escolha de alimento (GUEDES, 1980).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho propõe avaliar a toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) e chumbo inorgânico (PbII) em tecido cerebral e eritrócitos de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae), após contaminação aguda via injeção intraperitoneal, com ou sem a associação dos contaminantes.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar através de bioensaio agudo de 96h com única injeção intraperitoneal de 5ng/g (5NP), 50ng/g (50NP) e 500ng/g (500NP) de NPTiO_2 , de 21 $\mu\text{g/g}$ de PbII e da associação entre NPTiO_2 e PbII:

- A genotoxicidade em tecido cerebral através do ensaio cometa.
- A mutagenicidade em eritrócitos através do teste do micronúcleo piscoe e alterações morfológicas nucleares.
- A capacidade de associação com o metal PbII.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE NPTiO₂ e PbII

A NPTiO₂ anatase (Sigma-Aldrich®) foi pesada para ser diluída em água destilada, resultando em soluções com as concentrações de 0,5mg/L; 5mg/L e 50mg/L. Estas concentrações foram calculadas para possibilitar a administração via intraperitoneal, de um volume que não fosse excessivo para o animal. Assim, estas concentrações foram utilizadas na proporção de 0,01mL/g de peixe, fornecendo o contaminante em ng/g do peso do animal. Após a homogeneização em agitador magnético, as soluções foram homogeneizadas em banho-maria com ultrassom (sonicação) na frequência de 40 KHz, durante 6 horas. Antes da aplicação intraperitoneal nos animais, as soluções foram novamente sonicadas, por 30 minutos, na frequência de 80 KHz, para desagregar novamente as nanopartículas.

O PbII (Vetec®) foi diluído em água destilada, obtendo assim solução com concentração de 2,1g/L.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DE NPTiO₂

Apresenta-se em forma de pó e de coloração branca. O tamanho médio de dispersão foi de 45nm, e partículas agregadas com 107nm (Figura 2A). Através da microscopia eletrônica de transmissão, obteve-se a morfologia dos agregados de nanopartículas (Figura 2B).

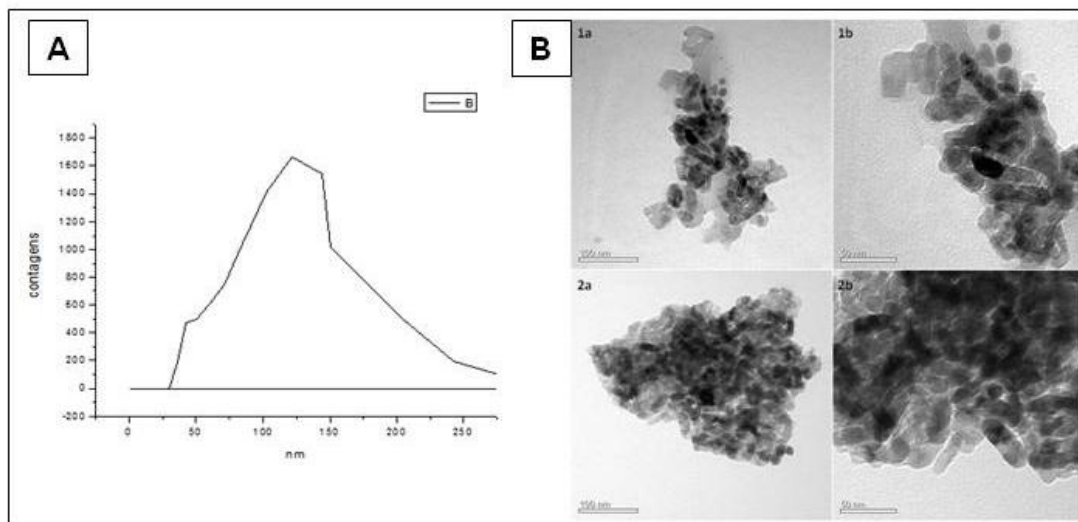


Figura 2 - Caracterização da Nanopartícula de Dióxido de Titânio. (A) Gráfico com informações sobre tamanho médio de NPTiO_2 em pó. (B) Eletromicrografias de NPTiO_2 - 1a e 2a em escala de 100nm; 1b e 2b em escala de 50nm.

3.3 ORGANISMO UTILIZADO

A espécie selecionada para este trabalho foi *Rhamdia quelen*. Também conhecido popularmente como Jundiá, esta espécie possui distribuição neotropical e de grande importância econômica para a piscicultura brasileira.

3.4 COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS

Foram obtidos aproximadamente 150 espécimes oriundos de piscicultura, a qual não possui histórico, ou possíveis fontes, de contaminações.

Os peixes foram aclimatados por 60 dias em tanques de 250 litros, com temperatura controlada em 28°C , pH 7,0 e aeração constante. Após o período de aclimação, os espécimes foram agrupados em 4 ou 5 indivíduos em recipientes plásticos de 20 litros.

3.5 TRATAMENTO DOS PEIXES

Após o período de aclimação, o ensaio foi realizado no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Genética. Foram realizadas três repetições do ensaio, devido à estrutura do laboratório disponível.

Os Jundiás foram separados em grupos de 5 indivíduos em aquários de 20 litros. No total, cada ensaio contará com 10 grupos, sendo eles: Controle Negativo 1, Controle Negativo 2, 5NP, 50NP, 500NP, PbII, 5NP+PbII, 50NP+PbII, 500NP+PbII, Controle Positivo.

O contaminante foi administrado através de injeção intraperitoneal (Figura 3). Cada exemplar foi pesado antes da aplicação, para saber exatamente a dose que iriam receber. As doses utilizadas foram:

- Nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO_2)
5ng/g (5NP), 50 ng/g (50NP) e 500ng/g (500NP)
- Chumbo Inorgânico (PbII) - 21 $\mu\text{g/g}$

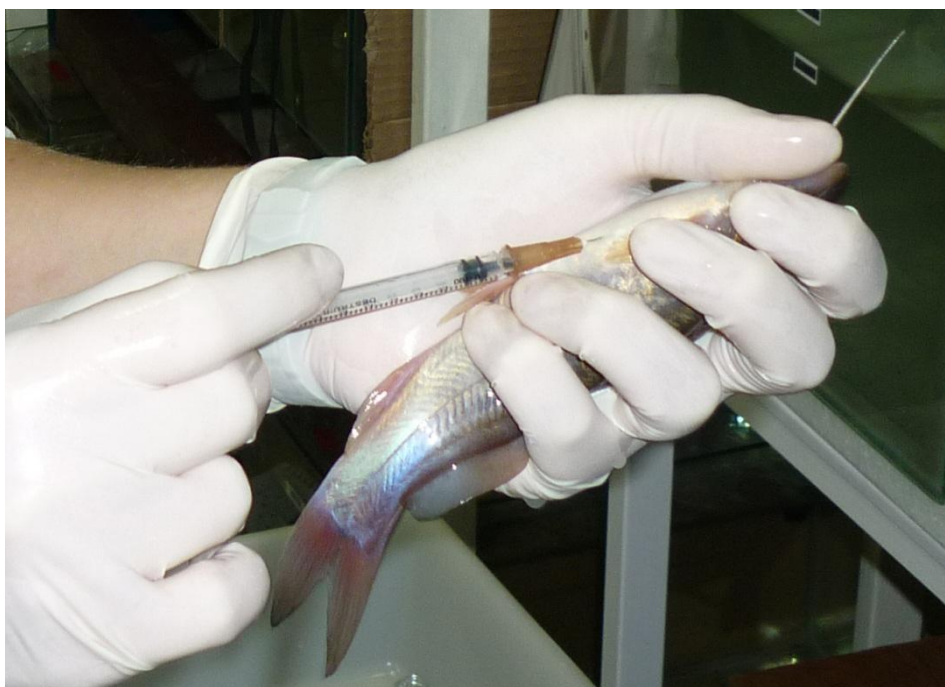


Figura 3 - Aplicação da injeção intraperitoneal
FONTE: Tatiane Klingelfus (2013)

Para o grupo de Controle Negativo 1 foi administrado uma injeção de 0,1ml/g de água destilada. Para o grupo de Controle Negativo 2, foi administrado 2 volumes de água, em duas injeções consecutivas de 0,1ml/g cada uma. Este segundo controle negativo foi utilizado para ser comparado com os grupos associados (NP + PbII).

O Controle Positivo foi tratado, via injeção intraperitoneal, com 0,5 $\mu\text{g/g}$ de Metil Metano Sulfonato (MMS), 24 horas antes de completar às 96 horas da aplicação dos contaminantes nos demais grupos, ou seja, um dia antes do sacrifício.

3.6 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Antes do sacrifício, os animais foram anestesiados com benzocaína a 10%, dissolvida em água. Com o auxílio seringa, previamente heparinizadas, foi inserida a agulha no animal com inclinação de 45° até atingir a veia que passa na porção ventral da coluna vertebral para retirar cerca de 0,1 ml de sangue periférico (Figura 4). Imediatamente após a coleta do sangue, foi pingado 10µL do sangue em uma lâmina limpa, e realizado o esfregaço padrão utilizado no teste de micronúcleo.



Figura 4 - Coleta de Sangue Periférico
FONTE: Tatiane Klingelfus (2013)

Após este procedimento, foi realizado o corte de secção medular, e a extração do cérebro do animal (Figura 5). O tecido cerebral foi conservado em 0,5ml de soro bovino fetal, refrigerado e na ausência de luz. Posteriormente, o material foi desagregado, em homogeneizador Potter®, e utilizado na confecção de lâminas do Ensaio Cometa.



Figura 5 - Extração do cérebro.
FONTE: Tatiane Klingelfus (2013)

3.7 BIOMARCADORES GENÉTICOS

3.7.1 Teste do Micronúcleo Písceo (MNP)

Com o intuito de verificar a frequência em hemácias periféricas, foi utilizada a técnica descrita por Heddle (1973) e Schmid (1975), com algumas modificações. A técnica consiste em:

- a) Lâminas foram limpas em álcool e identificadas.
- b) Após a coleta de sangue do animal, foi pingada uma gota (10 μ L) na superfície da lâmina.
- c) Com o auxílio de uma lamínula, foi realizado o esfregaço, espalhando o sangue sobre toda a superfície da lâmina, sempre em um único sentido (Figura 6).

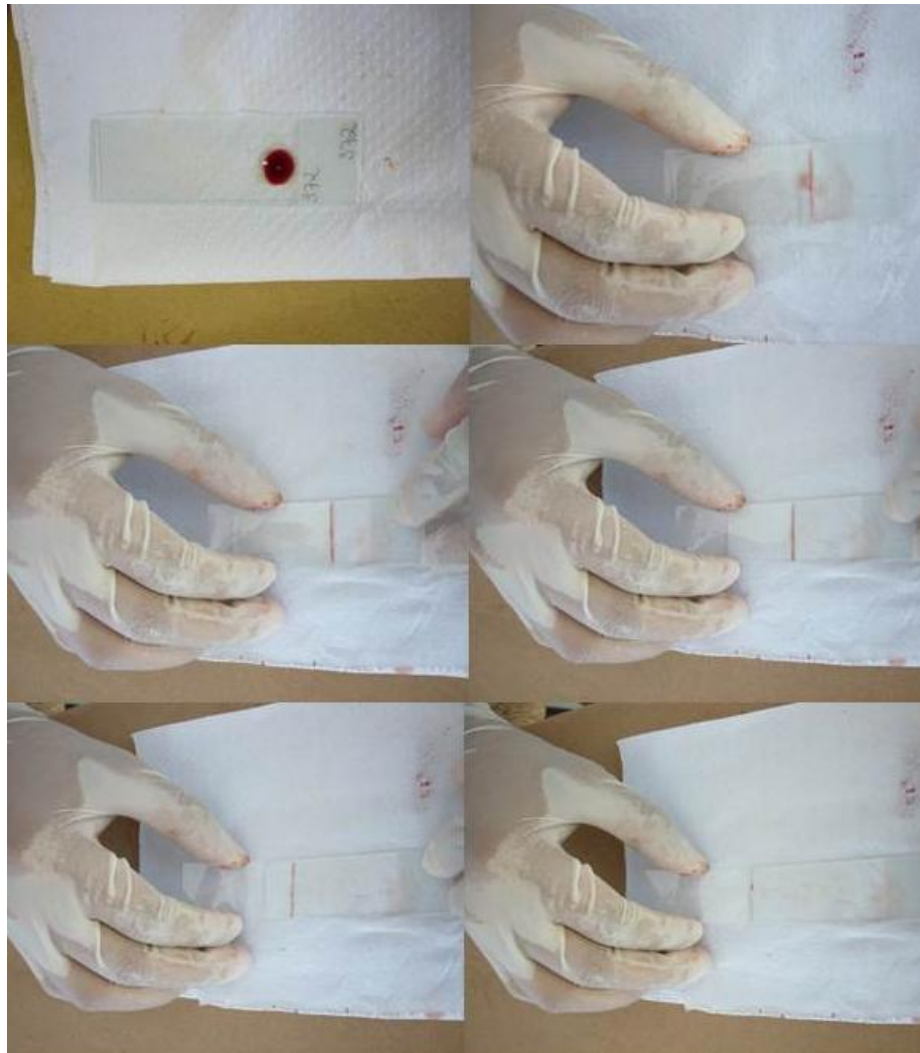


Figura 6 - Confeção do Esfregaço Sanguíneo
Fonte: Tatiane Klingelfus (2013)

- d) As lâminas, após secarem ao ar, foram fixadas em etanol 96% por 30 minutos. Decorrido este tempo, foram secas ao ar.
- e) As lâminas foram coradas com solução de Giemsa 10%, diluída em tampão fosfato (pH 6,8), por 15 minutos à temperatura ambiente.
- f) Após a secagem, as lâminas foram analisadas, em teste cego, totalizando 2000 células de cada animal. Na análise, foram consideradas apenas hemácias com membranas nuclear e citoplasmática intactas. Foram considerados como micronúcleo apenas as partículas que, em relação ao núcleo principal, não excederam 1/3 do seu tamanho, estiveram nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com a mesma cor e refringência do núcleo. As alterações na forma elíptica

normal dos núcleos das hemácias foram analisadas segundo Carrasco, Tilbury e Myers (1990) e computadas juntamente com MNP.

3.7.2 Ensaio Cometa

A técnica utilizada foi descrita por Singh *et al.* (1988) com algumas modificações realizadas por Ferraro (2003), e utilizadas para tecido renal em *Hoplias malabaricus* por Ramsdorf (2009). Antes da coleta do material para análise, foram preparadas as lâminas com cobertura de agarose, e também a agarose de baixo ponto de fusão (LMP), segundo as seguintes etapas:

- **Preparo das Lâminas com cobertura de agarose**

- a) Foi dissolvido 1,5g de agarose normal em 100ml de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas. Essa mistura foi então levada ao forno de microondas até sua fervura e completa dissolução.
- b) Após a primeira fervura, a agarose solidificou-se em temperatura ambiente. Quando completamente solidificada, foi picada, e novamente levada ao forno de microondas. Essa etapa foi repetida, pelo menos, três vezes. Ao final das fervuras, a mesma foi mantida em estado líquido em banho-maria a 70°C.
- c) As lâminas, previamente limpas em álcool, foram mergulhadas na agarose aquecida, sendo o lado da lâmina contendo a porção não esmerilhada limpa com um lenço de papel.
- d) As lâminas foram deixadas *overnight* em superfície plana e à temperatura ambiente, para solidificar a cobertura de agarose.

- **Preparo da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)**

- a) Foram dissolvidos 100mg de agarose LMP em 20 ml de PBS.
- b) Esta solução foi levada a fervura em forno de microondas somente uma vez.
- c) A agarose LMP foi mantida em geladeira até o momento do uso, quando então aquecida em banho-maria e mantida em 37°C.

- **Tecido Cerebral**

Para a realização do ensaio cometa em cérebro foi utilizada a metodologia segundo Ramsdorf (2009) que constitui as seguintes etapas:

- a) Após o sacrifício do animal, foi retirado o cérebro e o mesmo mantido em soro bovino fetal, resfriado e no escuro.
- b) O tecido foi homogeneizado em homogeneizador Potter® a 1500rpm, durante 30 segundos.
- c) Do homogeneizado obtido, foram coletados 40 μ l e então misturados com 120 μ l de agarose LMP a 37°C.
- d) A suspensão celular obtida foi depositada sob a lâmina previamente coberta com agarose.
- e) Sob esta lâmina foi colocada uma lamínula, de maneira que esta cobrisse totalmente a agarose normal, e espalhasse todo o material depositado na mesma. Em seguida, as lâminas foram refrigeradas.
- f) Após a refrigeração de 15 minutos, as lamínulas foram retiradas gentilmente.
- g) As lâminas, então, foram acondicionadas em cubetas contendo solução de lise por, pelo menos, 24 horas.
- h) Após o tempo de lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese, com refrigeração e tampão de eletroforese com pH maior que 13 e na ausência de luz.
- i) Antes de iniciar a corrida eletroforética, as lâminas permaneceram na solução de eletroforese por 30 minutos, para a desespiralização do DNA.
- j) Em seguida, a corrida de eletroforese foi realizada a 25V e 300mA, durante 25 minutos.
- k) Ao término da corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com um tampão de neutralização (pH 7,5). Este procedimento foi repetido 3 vezes por intervalos de 5 minutos.
- l) Após as lâminas secarem ao ar, estas foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos.
- m) Para análise das lâminas, foram depositados 20 μ l de brometo de etídio sobre as agaroses e colocada uma lamínula. A análise foi realizada imediatamente em microscópio de epifluorescência com aumento de 400x.

n) Foram analisados 100 nucleóides em cada Lâmina. Os mesmos foram classificados visualmente de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética conforme as classes: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano máximo) e 4 (núcleo em apoptose) (Figura 7). Foram realizadas as quantificações dos tipos de danos e a atribuição de escores em cada classe. Os escores foram obtidos através da multiplicação do número de cometas, encontrados em cada classe, pelo valor da classe.

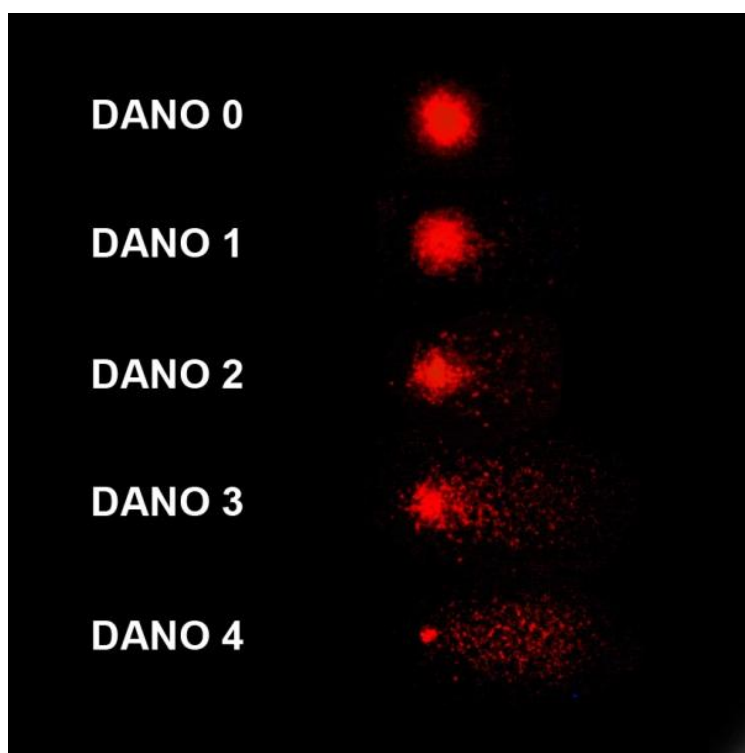


Figura 7 - Modelo de Nucleóides com danos de 0 a 4, utilizado na classificação na análise do ensaio cometa.

FONTE: Tatiane Klingelfus (2013)

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com o objetivo de facilitar a interpretação dos dados, a análise estatística das respostas obtidas pelos biomarcadores genéticos os tratamentos foram reagrupados da seguinte maneira: (A) Controle 1, Pb e MMS; (B) Controle 1, 5NP, 50NP, 500NP e MMS; (C) Controle 2, Pb+5NP, Pb+50NP, Pb+500NP e MMS; (D) Pb, Pb+5NP, 5NP e MMS; (E) Pb, Pb+50NP, 50NP e MMS; (F) Pb, Pb+500NP, 500NP e MMS.

A primeira análise realizada em todos os grupos foi através do teste de Kolmogorov-Smirnov, para testar sua normalidade e definir a utilização de um teste paramétrico ou não paramétrico

Em todos os grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls, para verificar se havia diferença entre os tratamentos dentro de cada grupo.

Os testes, de micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos, e do ensaio cometa em tecido cerebral, foram reconhecidos como significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

No total do experimento, foram utilizados 66 exemplares fêmeas e 69 exemplares machos de *Rhamdia quelen*. Os animais tiveram o comprimento total médio de $16,29 \pm 1,79$ cm, e peso médio de $31,33 \pm 10,37$ gramas. Não houve mortalidade durante o período de contaminação.

4.1 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM EITRÓCITOS DE *Rhamdia quelen*.

No Teste do Micronúcleo Písceo (MN) e Alterações Morfológicas Nucleares (AMN), foram analisados 2000 eritrócitos corados com giemsa. Não foram encontrados micronúcleos, porém foram observadas as seguintes alterações morfológicas nucleares: *blebbed*, *lobbed*, *notched* e *vacuolated* (Figura 8).

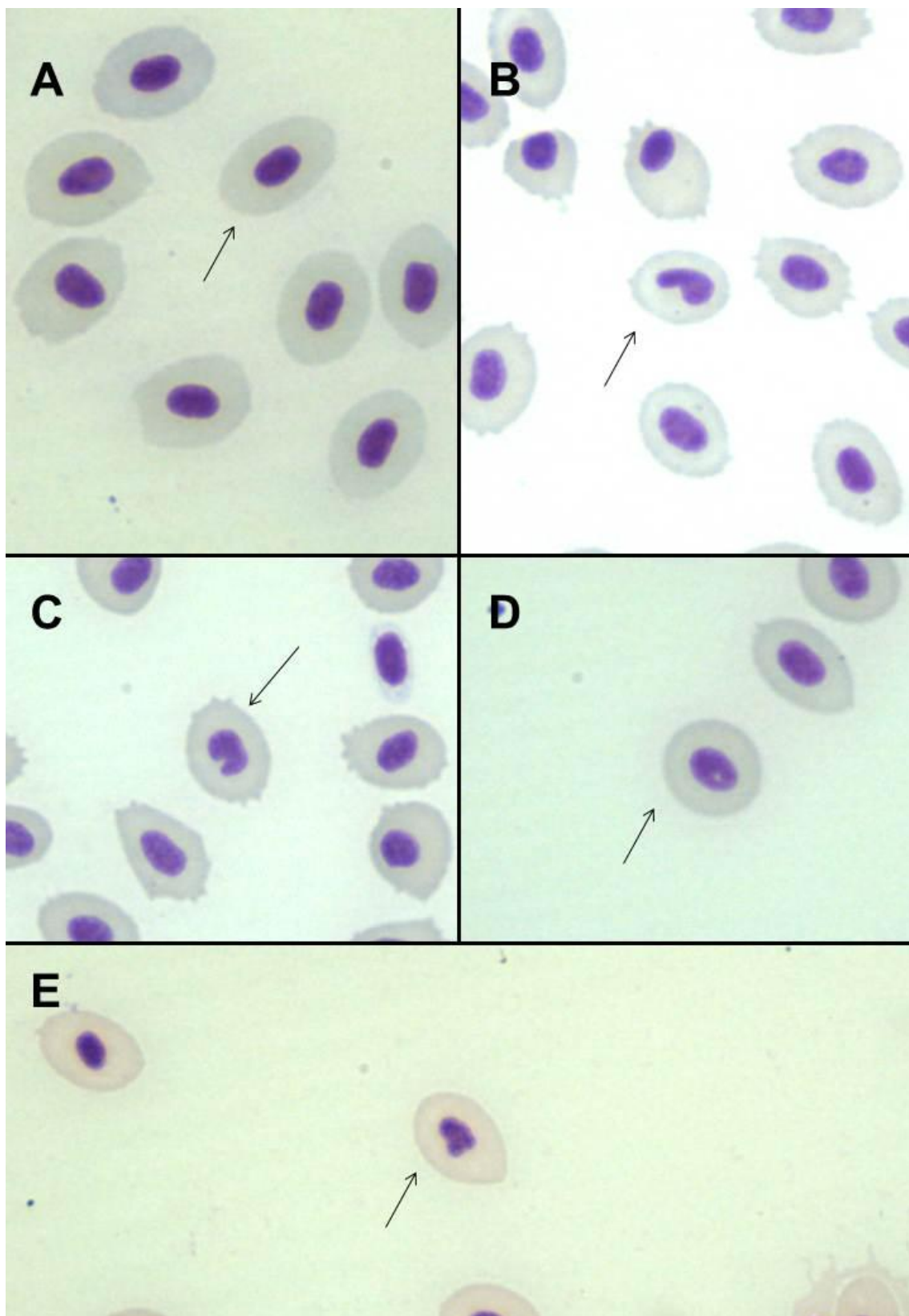


Figura 8 – Eritrócitos de *Rhamdia quelen* (Aumento de 1000x)

As setas indicam: (A) células com núcleo normal, (B) *Blebbed*, (C) *Notched*, (D) *Vacuolated* e (E) *Lobbed*.
FONTE: A Autora (2013)

Na Tabela 1, apresentamos os resultados obtidos no teste de AMN com os valores de média e erro padrão, que, neste caso, nos forneceram informações mais claras que mediana e quartis. As análises foram feitas por tipo de AMN e o seu total, para cada um dos seis grupos de análise.

No Grupo A, ao comparar as frequências totais de AMN do tratamento Pb com o controle 1 e o MMS, não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Porém o controle 1 apresentou menor frequência de AMN que o grupo tratado com o MMS ($p = 0,0019$). Para as comparações dos demais tipos de alterações, não houve diferença significativa entre os tratamentos (TABELA 1A). Mesmo não havendo diferença significativa para a análise de *Vacuolated*, podemos observar uma maior frequência na sua ocorrência no tratamento Pb, o que não ocorreu para as demais alterações.

O grupo B foi utilizado para comparar os três tratamentos de NPTiO₂, com os controles 1 e MMS. Considerando a frequência total de AMN, o tratamento de 5NP apresentou maior quantidade de AMN totais quando comparado ao controle Negativo ($p = 0,0003$), e às doses 50NP ($p = 0,0008$) e 500NP ($p = 0,0039$), mas 5NP não diferiu do tratamento com MMS (TABELA 1B).

Ainda analisando o mesmo grupo, para alterações do tipo *Vacuolated*, a frequência obtida pelo tratamento 5NP foi maior quando comparada com o controle 1 ($p = 0,0002$), e com as doses de 50NP ($p = 0,0015$), 500NP ($p = 0,0036$). No grupo B, não foi observada diferenças estatísticas ($p > 0,05$) para as alterações do tipo *Bebbed*, *Lobbed* e *Notched* (TABELA 1B).

O Grupo C, montado para comparar os tratamentos de associação de NP e Pb, não foram obtidas diferenças significativas para as análises das alterações: *Lobbed*, *Notched* e *Vacuolated*. Mas, ao comparar as frequências obtidas para AMN totais, tratamento Pb+5NP, não apresentou diferença estatística com nenhum outro tratamento do grupo. Porém, nos indivíduos expostos a Pb+50NP e Pb+500NP foram encontradas menores frequências de AMN quando comparadas ao Controle 2 ($p = 0,0094$ e $p = 0,0045$, respectivamente). Neste grupo de análise, os controles negativo e positivo não diferiram entre si ($p = 0,51$) (TABELA 1C).

Neste grupo C, a análise para a alteração do tipo *Blebbbed* não apresentou diferença estatística entre os grupos Pb+50NP e Pb+500NP, os

mesmos também não diferiram do tratamento MMS. Mas ambos apresentaram menor quantidade de dano quando comparado ao controle negativo ($p=0,0303$ e $p=0,016$, respectivamente), e também em relação ao tratamento de Pb+5NP ($p=0,0421$ e $p=0,0217$) (TABELA 1C).

No Grupo D, foram comparados os tratamentos Pb, Pb+5NP, 5NP e MMS. Apenas o tipo *Vacuolated* apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Os indivíduos expostos ao 5NP apresentaram maiores frequências de *Vacuolated* no formato de seu núcleo, diferindo dos tratamentos Pb ($p=0,0053$) e Pb+5NP ($p=0,0009$). Quando comparado ao controle positivo (MMS) não apresentou diferença estatística (TABELA 1D).

Para os Grupos E e F, quando comparados com o PbII, os grupos conjugados e isolados de NPTiO₂ nas concentrações de 50ng/g e 500ng/g não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$), no total de AMN (TABELA 1E,F).

TABELA 1 - Frequência média de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Rhamdia quelen*, separadas entre vacuolated, lobbed, notched, blebbed e AMN totais.

		Frequência de AMN em eritrócitos (Média ± Erro Padrão)					
Tratamentos	Blebbed	Lobed	Notched	Vacuolated	Total AMN		
A	Controle 1	0,0006 ± 0,0003	0,0053 ± 0,0002	0,0014 ± 0,0006	0,0031 ± 0,0010	0,0039 ± 0,0009	a
	Pb	0,0006 ± 0,0002	0,0004 ± 0,0002	0,0011 ± 0,0004	0,0036 ± 0,0006	0,0063 ± 0,0009	ab
	MMS	0,0007 ± 0,0003	0,0008 ± 0,0003	0,0020 ± 0,0007	0,0068 ± 0,0015	0,0114 ± 0,0024	b
B	Controle 1	0,0006 ± 0,0003	0,0053 ± 0,0002	0,0014 ± 0,0006	0,0031 ± 0,0010	0,0039 ± 0,0009	a d
	5NP	0,0006 ± 0,0002	0,0007 ± 0,0004	0,0015 ± 0,0005	0,0119 ± 0,0021	0,0148 ± 0,0025	b e
	50NP	0,0004 ± 0,0002	0,0001 ± 0,0000	0,0007 ± 0,0002	0,0031 ± 0,0009	0,0044 ± 0,0013	a d
	500NP	0,0006 ± 0,0003	0,0006 ± 0,0003	0,0024 ± 0,0013	0,0031 ± 0,0007	0,0050 ± 0,0012	ac d
	MMS	0,0007 ± 0,0003	0,0008 ± 0,0003	0,0020 ± 0,0007	0,0068 ± 0,0015	0,0114 ± 0,0024	bc e
C	Controle 2	0,0012 ± 0,0003	0,0005 ± 0,0002	0,0023 ± 0,0010	0,0105 ± 0,0023	0,0146 ± 0,0029	c
	Pb + 5NP	0,0011 ± 0,0002	0,0010 ± 0,0005	0,0023 ± 0,0008	0,0051 ± 0,0013	0,0095 ± 0,0022	cd
	Pb + 50NP	0,0004 ± 0,0001	0,0005 ± 0,0003	0,0010 ± 0,0004	0,0029 ± 0,0006	0,0049 ± 0,0011	d
	Pb + 500NP	0,0003 ± 0,0001	0,0002 ± 0,0001	0,0006 ± 0,0003	0,0030 ± 0,0006	0,0043 ± 0,0010	d
	MMS	0,0007 ± 0,0003	0,0008 ± 0,0003	0,0020 ± 0,0007	0,0068 ± 0,0015	0,0114 ± 0,0024	c
D	Pb	0,0006 ± 0,0002	0,0004 ± 0,0002	0,0011 ± 0,0004	0,0036 ± 0,0006	0,0063 ± 0,0009	a
	Pb + 5NP	0,0011 ± 0,0002	0,0010 ± 0,0005	0,0023 ± 0,0008	0,0051 ± 0,0013	0,0095 ± 0,0022	a
	5NP	0,0006 ± 0,0002	0,0007 ± 0,0004	0,0015 ± 0,0005	0,0119 ± 0,0021	0,0148 ± 0,0025	b
	MMS	0,0007 ± 0,0003	0,0008 ± 0,0003	0,0020 ± 0,0007	0,0068 ± 0,0015	0,0114 ± 0,0024	ab
E	Pb	0,0006 ± 0,0002	0,0004 ± 0,0002	0,0011 ± 0,0004	0,0036 ± 0,0006	0,0063 ± 0,0009	ab
	Pb + 50NP	0,0004 ± 0,0001	0,0005 ± 0,0003	0,0010 ± 0,0004	0,0029 ± 0,0006	0,0049 ± 0,0011	a
	50NP	0,0004 ± 0,0002	0,0001 ± 0,0000	0,0007 ± 0,0002	0,0031 ± 0,0009	0,0044 ± 0,0013	a
	MMS	0,0007 ± 0,0003	0,0008 ± 0,0003	0,0020 ± 0,0007	0,0068 ± 0,0015	0,0114 ± 0,0024	b
F	Pb	0,0006 ± 0,0002	0,0004 ± 0,0002	0,0011 ± 0,0004	0,0036 ± 0,0006	0,0063 ± 0,0009	ab
	Pb + 500NP	0,0003 ± 0,0001	0,0002 ± 0,0001	0,0006 ± 0,0003	0,0030 ± 0,0006	0,0043 ± 0,0010	a
	500NP	0,0006 ± 0,0003	0,0006 ± 0,0003	0,0024 ± 0,0013	0,0031 ± 0,0007	0,0050 ± 0,0012	a
	MMS	0,0007 ± 0,0003	0,0008 ± 0,0003	0,0020 ± 0,0007	0,0068 ± 0,0015	0,0114 ± 0,0024	b

Comparação entre os tratamentos (Controle 1, Controle 2, Pb, 5NP, 50NP, 500NP, 5NP+Pb, 50NP+Pb, 500NP+Pb e MMS) dentro de cada grupo (A, B, C, D, E e F). Valores expressos em média e erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

FONTE: A autora (2013)

4.2 ENSAIO COMETA DE TECIDO CEREBRAL DE *Rhamdia quelen*

No grupo A, ao comparar os danos do Controle 1, MMS e PbII, no Ensaio Cometa de tecido cerebral, não foi possível observar diferença de danos ao DNA causados pelo PbII, em relação ao controle negativo ($p>0,05$). Porém, o grupo tratado com PbII diferiu do escore de danos apresentada pelo grupo tratado com MMS ($p=0,0009$) (Figura 9A).

O grupo B comparou os tratamentos das três doses de nanopartículas com os controles 1 e MMS. A dose de 5ng/g de NPTiO₂ apresentou maiores danos ao DNA em relação ao controle negativo ($p=0,0413$), porém não apresentou diferença significativa em relação às doses de 50ng/g e 500ng/g, e também ao MMS ($p>0,05$) (Figura 9B).

As doses de 50ng/g e 500ng/g não diferiram do controle negativo ($p>0,05$), somente tiveram menores danos que o tratamento com MMS ($p=0,0041$ e $p=0,0328$; respectivamente) (Figura 9B).

No grupo C, foram analisadas as associações de Pb+NP e os controles 2 e MMS. As três doses de NPTiO₂ associadas ao PbII não diferiram quando comparadas ao controle negativo de duas injeções ($p>0,05$) (Figura 9C).

Na análise do grupo D, os tratamentos de PbII, 5ng/g de NPTiO₂ e a associação PbII+5ng/g NPTiO₂ não apresentaram diferenças entre si ($p>0,05$), porém 5ng/g não diferiu do controle positivo também (Figura 9D).

Para o grupo E, a comparação entre PbII, 50ng/g de NPTiO₂ e a associação PbII+50ng/g de NPTiO₂ não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$) (Figura 9E), o mesmo resultado foi obtido na análise do grupo F, onde a concentração de 500ng/g de NPTiO₂ também não diferiu com os tratamentos PbII e PbII+500ng/g de NPTiO₂ (Figura 9F).

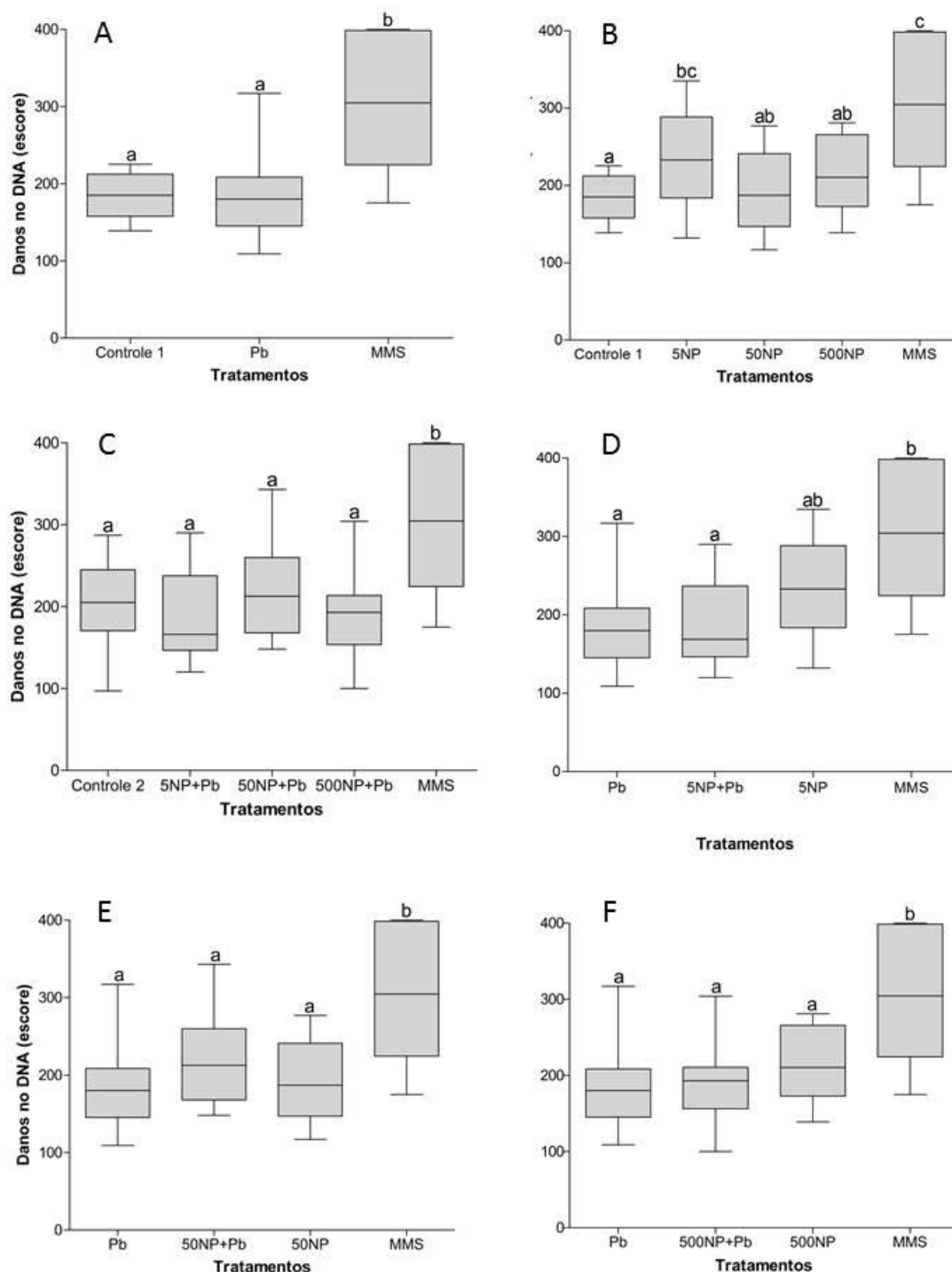


Figura 9 - Danos ao DNA em tecido cerebral de *Rhamdia quelen*, detectados por ensaio cometa. Comparação entre os tratamentos (Controle 1, Controle 2, Pb, 5NP, 50NP, 500NP, 5NP+Pb, 50NP+Pb, 500NP+Pb e MMS) dentro de cada grupo (Gráficos: A, B, C, D, E e F).

Tratamentos: Controle 1 = uma injeção intraperitoneal com água destilada; Controle 2 = duas injeções intraperitoneais com água destilada; Pb = 21µg/g de PbII; 5NP = 5ng/g de NPTiO₂; 50NP = 50ng/g de NPTiO₂; 500NP = 500ng/g de NPTiO₂; 5NP+Pb = 5ng/g de NPTiO₂ + 21µg/g de PbII; 50NP+Pb = 50ng/g de NPTiO₂ + 21µg/g de PbII; 500NP+Pb = 500ng/g de NPTiO₂ + 21µg/g de PbII e MMS como controle positivo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

FONTE: A autora (2013)

5. DISCUSSÃO

O constante crescimento da utilização de nanomateriais, em diferentes áreas, tem chamado atenção das comunidades científicas em relação à sua toxicidade, criando um novo campo de estudo, a nanotoxicologia. Uma grande parcela destes estudos tem como foco a genotoxicidade, e principalmente, a citotoxicidade de diferentes naturezas de nanopartículas.

Em relação às nanopartículas de Dióxido de Titânio já foram realizados estudos com *Daphnia magna* (LOVERN e KLAPER, 2006), cultivos de células epiteliais brônquicas humanas (GURR *et al.*, 2005), *Oncorhynchus mykiss* (FEDERICI *et al.*, 2007; SCOWN *et al.*, 2009 ; RAMSDEN *et al.*, 2009), camundongos (WANG *et al.*, 2007), *Carassius auratus* (REEVES *et al.*, 2008), entre outros organismos.

Saccharomyces cerevisiae foi utilizado para estudos de dano, reparo e mutagênese no DNA quando induzidas por nanopartículas de dióxido de titânio e radiação ultravioleta B. Foi realizado um estudo *in vitro*, com plasmídeos incubados com enzimas (Fpg, XthA, Nfo, Nth e T4 endonuclease V), e também *in vivo*, com estirpes selvagens e mutantes. Neste experimento, Pinto *et al.* (2010) observaram a potencialização do efeito oxidativo causado pela NPTiO₂ irradiada com UVB. Este efeito oxidativo gerou danos ao DNA, provavelmente através das reações de Fenton. Federici *et al.* (2007), em experimento com trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), observaram diversos distúrbios relacionados ao estresse oxidativo, causados pela exposição hídrica de NPTiO₂, que após 14 dias de exposição, houve aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em brânquias, intestino e cérebro. Porém, este aumento de TBARS não foi suficiente para esgotar a glutatona (antioxidante hidrossolúvel, age contra espécies reativas de oxigênio) nestes tecidos, apenas reduziu sua atividade contra espécies reativas de oxigênio (ROS) causadas pelo contaminante. Outra causa do estresse oxidativo neste experimento, foi associado à alteração na concentração de Cu e Zn nestes tecidos, especialmente no cérebro. Porém, os danos causados no tecido cerebral podem não ser efeitos diretos das Nanopartículas, pois segundo Handy *et al.* (2011) pode ser decorrente de uma toxicidade secundária, devido a produção de ROS por outros órgãos do animal.

Em outro trabalho com truta arco-íris, a contaminação com 100 μ g de NPTiO₂ por espécime, ao final de 90 dias por administração via injeção intravenosa, o rim continha entre 10 e 19% do TiO₂ (SCOWN *et al.*, 2009). Ramsden *et al.* (2009), também trabalharam com a mesma espécie de peixe, e através da contaminação trófica contendo 0, 10 e 100 mg/kg de TiO₂, observaram que ocorreu acumulação de Ti em vários órgãos, e também a redução da atividade da Na⁺-K⁺-ATPase no cérebro.

As concentrações utilizadas nos experimentos com nanopartículas de dióxido de titânio variam muito entre os trabalhos, foram observadas concentrações de 0,1mg/L até 500mg/L de NPTiO₂, por diferentes vias de contaminação. No atual trabalho, foram utilizadas três doses menores, na proporção de nanogramas pelo peso do peixe em gramas.

A dose que apresentou maiores danos ao DNA foi a menor, 5ng/g de NPTiO₂. Tanto em tecido cerebral, quanto no total de alterações morfológicas nucleares o efeito genotóxico apresentou-se maior quando comparado aos demais grupos. Uma possível explicação para este resultado é a concentração da solução. A força iônica da solução pode favorecer a agregação das nanopartículas (PATRI *et al.*, 2009), quanto mais concentrada a solução, maior será a força iônica entre as partículas e, conseqüentemente, seus agregados serão maiores. Podemos supor que isto se deu devido ao tamanho e quantidade das moléculas. Na menor concentração de NPTiO₂ (0,5mg/L), dose de 5ng/g, a agregação possivelmente foi menor, tornando assim os aglomerados muito pequenos ou quase inexistentes, o que facilitou a entrada destas moléculas nas células e no núcleo, causando dano ao DNA.

Também podemos complementar a discussão, sobre o transporte das NPTiO₂ para os tecidos, através da maior agregação destas partículas devido à força iônica do meio. Como a contaminação foi via injeção intraperitoneal, as soluções mais concentradas possuem maior quantidade de nanopartículas, e isto pode facilitar sua aglomeração. E, ao entrarem em contato com o fluido corporal do animal, podem se agregar com maior facilidade devido a maior força iônica do meio. Esta explicação foi utilizada por Patri *et al.* (2009), justificando a força iônica maior em fluidos corporais de camundongos.

O chumbo é um elemento conhecidamente tóxico, podendo causar danos em tecido cerebral e renal, sistema cardiovascular e hematológico

(ATSDR, 2007). Os danos que o chumbo pode causar no DNA estão associados à sua capacidade de inibir o sistema de reparo do DNA, sendo então responsável por mutações, aberrações cromossômicas, cânceres, teratogênias, entre outros (JOHNSON, 1998; OBE *et al.*, 2002).

Ramsdorf *et al.* (2009) fizeram estudos com *Hoplias malabaricus* nas concentrações de 7, 21, 63 e 100 µg de PbII por grama de peixe. Após 96 horas da contaminação com injeção intraperitoneal, as concentrações de 21 µg/g e 63 µg/g apresentaram danos no DNA de eritrócitos observados pelo ensaio cometa. Outros estudos onde o PbII foi utilizado na concentração de 21 µg/g, em ensaio subcrônio via trófica, demonstraram, através de ensaio cometa e aberrações cromossômicas, que longos períodos de contaminação promovem danos ao DNA (CESTARI *et al.*, 2004; FERRARO *et al.*, 2004). Baseado nestes trabalhos, foi determinada a concentração única de PbII (21 µg/g) utilizada no atual trabalho.

Foi detectado no teste de alterações morfológicas nucleares, em eritrócitos, que os danos apresentados pelo grupo tratado com PbII, foi sutilmente maior que o grupo controle negativo, e menor que o grupo tratado com MMS (Tabela 1A), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa para ambas as comparações. No Ensaio Cometa de tecido cerebral, o grupo tratado com chumbo não diferiu do grupo de controle negativo (Figura 9A). O fato de danos no DNA serem mais frequentes em eritrócitos pode ser devido a via de administração (injeção intraperitoneal) e pela exposição aguda (96 horas). O chumbo pode não ter causado grandes danos ao DNA de tecido cerebral devido ao curto tempo de exposição, o contaminante provavelmente estava em processo de metabolização, dificultando sua ação tóxica no período de 96 horas. Como o tecido sanguíneo é um dos primeiros a entrar em contato com o contaminante, foi possível verificar um pequeno aumento na frequência de anomalias nucleares, principalmente no tipo *vacuolated*.

Devido à propriedade físico-química da NPTiO₂ de adsorção de metais (HANDY *et al.*, 2008), o chumbo, que já possui efeitos conhecidos, foi utilizado para testar esta interação entre ele e três concentrações diferentes de NPTiO₂.

Os grupos tratados em associação, para as três concentrações de NPTiO₂ (5ng/g, 50ng/g e 500ng/g), não apresentaram diferenças entre si e nem com o controle negativo em tecido cerebral (Figura 9C). Porém, para o teste do micronúcleo písceo no tecido sanguíneo apenas a dose de 5ng/g de NPTiO₂ apresentou-se estatisticamente significativa com relação ao controle 1 e os três grupos associados apresentaram-se diferentes ao controle 2. Não foi possível observar uma dose resposta nesta análise, nem inferir se esta associação favoreceu a entrada do chumbo nos tecidos ou se facilitou sua eliminação.

Este controle 2 apresentou alto índice de danos tanto na somatória das anormalidades, quanto na mal formação *vacuolated*, que pode ser explicada pela via de exposição intraperitoneal que pode causar este efeito secundário, ao invés da genotoxicidade direta. Esta observação também foi destacada por Grisolia (2002) ao utilizar em peixes, *Tilapia rendalli*, os contaminantes mitomicina C, ciclofosfamida e sete pesticidas diferentes.

Assim, no presente trabalho, quando foram realizadas duas injeções intraperitoneais no jundiá, o perfil hematológico dos animais pode ter sido alterado, causando uma maior frequência de danos. Por este ser um dos primeiros, se não o primeiro, relato de contaminação via injeção intraperitoneal, em *Rhamdia quelen*, há a necessidade de maiores estudos a respeito da via utilizada nesta espécie. Apesar disto, esta via contaminação por injeção intraperitoneal é vantajosa pela certeza da dose administrada e absorvida pelo animal, ao contrário do que acontece com vias trófica e hídrica.

Ao comparar os grupos associados (NPTiO₂ + PbII) com o grupo de chumbo e dos grupos associados (NPTiO₂ + PbII) com o da NPTiO₂, não foi observado sinergia, ou seja, a associação não favoreceu o aumento no dano de DNA no cérebro, nem no sangue. Estas análises também não diferiram do controle negativo. Porém, o tratamento de 5ng/g de NPTiO₂ apresentou maiores danos ao DNA de tecido cerebral do que a sua associação com PbII (5ng/g de NPTiO₂ + PbII), mas não foi estatisticamente diferente com esta associação e também não apresentou diferença com os grupos controles (negativo e positivo).

A espécie *Rhamdia quelen* apresentou-se como um bom bioindicador para testes de genotoxicidade, pois respondeu à contaminação aguda, tanto para eritrócitos quanto para cérebro. A espécie já foi utilizada em testes

genéticos, histológicos e bioquímicos, para ensaios com diversos contaminantes: Fibronil, naftaleno e nitrato de chumbo (RAMSDORF, 2011), dipirona (PAMPLONA *et al.*, 2011), cobre (MELA *et al.*, 2013). Porém, este trabalho é o primeiro relato de contaminação via injeção intraperitoneal em *Rhamdia quelen*, e a espécie mostrou sensibilidade por responder a concentrações baixas dos contaminantes.

Segundo Handy *et al.* (2011) os dados de toxicidade aguda, até o momento, sugerem que nanomateriais tem uma baixa toxicidade para peixes, em comparação com muitos produtos químicos tradicionais. Porém, para Federici *et al.*(2007), a aparente baixa toxicidade, das nanopartículas de dióxido de titânio, não reduz a preocupação toxicológica, pois em ensaios agudos é possível relatar efeitos subletais como distúrbios bioquímicos, e estes efeitos podem ocorrer sem haver a acumulação de Ti nos órgãos internos em experimentos a curto prazo. Dados a respeito de contaminações crônicas, como exposição alimentar, ainda são escassos até o momento, como afirmou Handy *et al.* (2011) em seu trabalho de revisão, no qual analisou diferentes nanomateriais e seus métodos de contaminação em peixes.

O presente trabalho teve como preocupação as questões do crescente e descontrolado uso de nanomateriais pela indústria, e a falta de informação sobre seus efeitos e interações com outras substâncias químicas. Não há legislação que controle a utilização e o tratamento de resíduos de nanomateriais. E, como agravante, a escassez de dados científicos para estes contaminantes resulta em trabalhos com resultados muito divergentes entre si, sendo necessário, cada vez mais, criar novos desenhos experimentais buscando dirimir possíveis falhas na execução.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível demonstrar que as nanopartículas de dióxido de titânio, em baixas concentrações, são capazes de causar danos ao DNA em células cerebrais e em eritrócitos em *Rhamdia quelen*.

A espécie *Rhamdia quelen* mostrou sensibilidade suficiente para responder a estas baixas doses do contaminante NPTiO₂ em ensaio agudo. Porém, com relação ao PbII, o tempo de contaminação pode não ter sido suficiente para causar danos ao tecido cerebral possivelmente devido ao metabolismo hepático. Ainda assim, a espécie apresentou-se como um bom bioindicador na resposta a contaminações por injeções intraperitoneais.

Devido às propriedades físico-químicas das nanopartículas de dióxido de titânio e a produção de muitos trabalhos controversos, há a necessidade de maiores estudos abrangendo um conjunto de diferentes áreas como: genética, química, bioquímica e física.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. American Fisheries Society, Bethesda , Maryland, USA, 2002.

AKAISHI, F.M. **Aplicação de Biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Curitiba, 2003.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p. 121-135, 1995.

ANDRIEVSKY, G.V., KLOCHKOV, V.K., DEREVYANCHENKO, L.I., Is C60 Fullerene Molecule Toxic?!, **Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostructures**, vol. 13, no. 4, pp. 363–376, 2005.

ATSDR. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**. Toxicological Profile for Lead. Atlanta, Georgia, USA: ATSDR; 2007.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinusphoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, v. 467, p. 177-186, 2000.

BAINY, A. C. D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. **Ciência e Cultura**, v.45, p.10-11, 1993.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; RODRIGUES, L. B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R. M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A. B.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, 34: 1565-1469, 2003.

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 (3), p. 167-184, 1998.

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

BORM, P., ROBBINS, D., HAUBOLD, S., The Potential Risks of Nanomaterials: A Review Carried out for ECETOC Particle. **Fibre Toxicology**, vol. 3, no. 1, pp. 1743–8977, 2006.

BURY, N.R.; WALKER, P.A.; GLOVER, C.N. Nutritive metal uptake in teleost fish. **Journal of Experimental Biology**; 206: 11–23, 2003.

BURY, N.R., HANDY, R.D. Copper and iron uptake in teleost fish. In: Bury NR, Handy RD, editors. Surface chemistry, bioavailability and metal homeostasis in aquatic organisms: An integrated approach. **Essential Reviews in Experimental Biology**, vol. 2, Society for Experimental Biology Press, London, UK, pp. 107–127, 2010.

CAMPBELL, P.G.S.; STOKES, P.M. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.42: 2034 – 49, 1985.

CAMPBELL, P.G.S. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: Tessier A, Turner DR, editors. **Metal speciation and bioavailability in aquatic systems**. New York, USA: Wiley; p. 45-102, 1995.

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.

CAS.Disponível em: www.cas.org. Acesso em: 05/10/2012.

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

CHAU, Y. K.; WONG, P. T. S.; KRAMER, O.; BENGERT, G. A.; CRUZ, R. B.; KINDARE, J. O.; LYE, J.; VAN LONN, J. C. Occurrence of tetraalkyllead compounds in the aquatic environment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 24, p. 265, 1980.

COLLINS A. R.; DOBSON V. L.; DUSINSKA M.; KENNEDY G.; STETINA R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research** 376:183–193, 1997.

ESCHER, B.I., SIGG L. Chemical speciation of organics and of metals at biological interfaces. In: van Leeuwen HP, Köster W, editors. **Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces**. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd; p. 205–69, 2004.

EWERS, V.; SCHLIPKÖTER, H. W. LEAD. IN: MERIAN, E. (Ed). **Metals and their compound in the environment: occurrence, analysis and biological relevance**. New York: VCH, Cap. II, 1991.

FEDERICI, G., SHAW, B.J., HANDY, R.D., Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles Next Term to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill Injury,

Oxidative Stress, and Other Physiological Effects, **Aquatic Toxicology**, vol. 84, no. 4, pp. 415–430, 2007.

FRACASSO, M.E.; PERBELLINI, L.; SOLDÀ, 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**, 515, 159–169, 2002.

FERRARO, M.V.M. **Avaliação do efeito mutagênico do tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (PbII) em *Hoplias malabaricus* (Pisces) através dos ensaios: Cometa, Micronúcleo e de Aberrações Cromossômicas**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, C.O.; CESTARI, M.M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration testes. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n. 1, p. 103-107, 2004.

GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdiaspp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. Santa Maria – RS, 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1980.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen*(TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, 30 (1): 179-185, 2000.

GOKSOYR, A.; ANDERSON, T.; BUHLER, D.R.; STEGEMAN, J.J.; WILLIAMS, D.E.; FORLIN, L. Immunochemical cross-reactivity of β -naphthoflavone – inducible cytochrome P450 in liver microsomes from different fish species and rat. **Fish Physiology**, v. 9, p. 1-13, 1991.

GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 518, pp. 145-150, 2002.

GURR, J.R.; WANG, A.S.S.; CHEN, C.H.; JAN, K.Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicology**, v. 213, pp.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.

HANDY, R.D.; AL-BAIRUTY, G.; AL-JUBORY, A.; RAMSDEN, C.S.; BOYLE, D.; SHAW, B.J.; HENRY, T.B. Effects of manufactured nanomaterials on fishes: a target organ na body systems physiology approach. **Jornal of Fish Biology**.79 : 821-853, 2011.

HANDY, R.D.; EDDY, F.B. Transport of solutes across biological membranes in eukaryotes: an environmental perspective. In: van Leeuwen HP, Köster W, editors. **Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces**. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd; p. 337–56, 2004.

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: 396–409, 2008b.

HEDDLE, J.A.A rapid in vivo test for chromosome damage.**Mutation Research**, v.18, p.187-192, 1973.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate.**Mutation Research**, v.104, p.147–152, 1982.

HOSE, J.E.; CROSS, J.; SMITH, S.G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminates sites of Southern California. **Marine Environmental Research**, v.22, p. 167-176, 1987.

JOHNSON, F. M.The genetic effects of environmental lead.**Mutation Research, Reviews in Mutation Research**, 410: 123-140, 1998.

JOHNSTON, B.D., SCOWN, T.M., MOGER, J. Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to Fish. **Environmental Science Technology**, v.44, no.3, pp. 1144 – 1151, 2010.

KOLESNICHENKO, A.V., TIMOFEEV, M.A., and PROTOPOPOVA, M.V., Toxicity of Nanomaterials: 15 Years of Studies. **Ros.NaNotekhnol.**, vol. 3, no. 34, pp. 54–61, 2008.

KREYLING, W., SEMMLER BEHNKE, M., MULLER, W., Health Implications of Nanoparticles.**Journal of Nanoparticles Research**, v 8, no. 5, pp. 543–562, 2006.

LAM, C.W., JAMES, J.T., McCLUSKEY, R. A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks.**Critical Reviews in Toxicology**, vol. 36, no. 3, pp. 189–217, 2006.

LOVERN, S.B.; KLAPER, R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C-60) nanoparticles.**Environmental Toxicology and Chemistry**, v.25, pp.1132-1137, 2006.

MAYNARD, A.D., Nanotechnology: The Next Big Thing, or Much Ado About Nothing? **The Annals of Occupational Hygiene**, vol. 51, no. 1, pp. 1–12, 2007.

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

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, v. 367, p. 245-251, 1996.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4 ed., John Wiley & Sons, 2006.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A., DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation research**, v. 504, 17–36, 2002.

OBERDORSTER, G., MAYNARD, A., DONALDSON, K. Principles for Characterizing the Potential Human Health Effects from Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy. **Particle Fibre Toxicology**, v. 2, pp. 1–8, 2005a.

OBERDORSTER, G., OBERDORSTER, E., OBERDORSTER, J., Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles, **Environmental Health Perspective**, v.113, no. 7, pp. 823–839, 2005b.

OBERDORSTER, G. **Biokinetics and Effects of Nanoparticles, in Nanotechnology—Toxicological Issues and Environmental Safety**, Simeonova, P.P., Opopol, N., and Luster, M.I., Eds., pp. 15–51, 2007.

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.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.123, n°1, p.291-298, 1984.

PAIN, D.J. Lead in the environment. In: HOFFMAN, D.J. *et al.* (Ed). **Handbook of Ecotoxicology**, Boca Raton, Lewis, cap.16, 1995.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 345-356, 1995.

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

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: **Revista Brasileira de Genética**, 1991.

RAMSDEN, C.S., SMITH, T.J., SHAW, B.J., HANDY, R.D., Dietary Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): No Effect on Growth, but Subtle Biochemical Disturbances in the Brain. **Ecotoxicology**, vol. 18, no. 7, pp. 939–951, 2009.

RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A; COSTA, J. R. M; CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environ Monit Assess.** 158(1-4):77-85, 2009.

REEVES, J.F.; DAVIES, S.J.; DODD, N.J.F.; JHA, A.N. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂)nanoparticle induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. **Mutation Research**, v.640, pp. 113-122, 2008.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 225-254, 1999.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

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

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.

SCOWN, T.M., VAN AERLE, R.; JOHNSTON, B.D.; CUMBERLAND, S.; LEAD, J.R.; OWEN, R.; TYLER, C.R. High doses of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles accumulate in the kidneys of rainbow trout but with no observable impairment of renal function. **Toxicological Sciences**, v.109, pp. 372-380, 2009.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle, P.M. Jr.; Bergman, H.L. Biomarkers. **Biochemical, Physiological, and Histological markers of antropogenic stress**.Eds. Lewis Publishers, p.235-334, 1992.

SUN, H., ZHANG, X., NIU, Q., Enhanced Accumulation of Arsenate in Carp in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles, **Water, Air and Soil Pollution**, v. 178 P, pp. 245–254, 2007.

The Project on Emerging Nanotechnologies. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/>>. Acesso em 17/03/2013.

WANG, J.; ZHOU, G.; CHEN, C.; YU, H.; WANG, T.; MA, Y.; JIA, G.; GAO, Y.; LI, B.; SUN, J.; LI, Y.; JIAO, F.; ZHAO, Y.; CHAI, Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. **Toxicology Letters**, v. 168, pp. 176-185, 2007.

White Book on Nanotechnologies. Studies in Nanoparticles, Nanostructures and Nanocomposites in the Russian Federation, in Mater. Pervogo vseris. Soveshch. Uchenykh, inzhenerov i proizvoditelei v oblasti nanotekhnologii (Proc. First All Russia Congress of Scientists, Engineers, and Manufacturers in Nanotechnology), Moscow: LKI, p. 344, 2008.

ZHANG X, HONGWEN S, ZHANG Z, NIU Q, CHEN Y, CRITTENDEN JC. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. **Chemosphere**, 67:160–6, 2007.

ZHU, X., CHANG, Y., CHEN, Y. Toxicity and Bioaccumulation of TiO₂ Nanoparticle Aggregates in *Daphnia magna*. **Chemosphere**, vol. 78, no. 3, pp. 209–215, 2010.

ZHU, X., ZHU, L., CHEN, Y., TIAN, S. Acute Toxicities of Six Manufactured Nanomaterial Suspensions to *Daphnia magna*. **Journal of Nanoparticle Research**, v.11 P, pp. 67–75, 2009.