

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

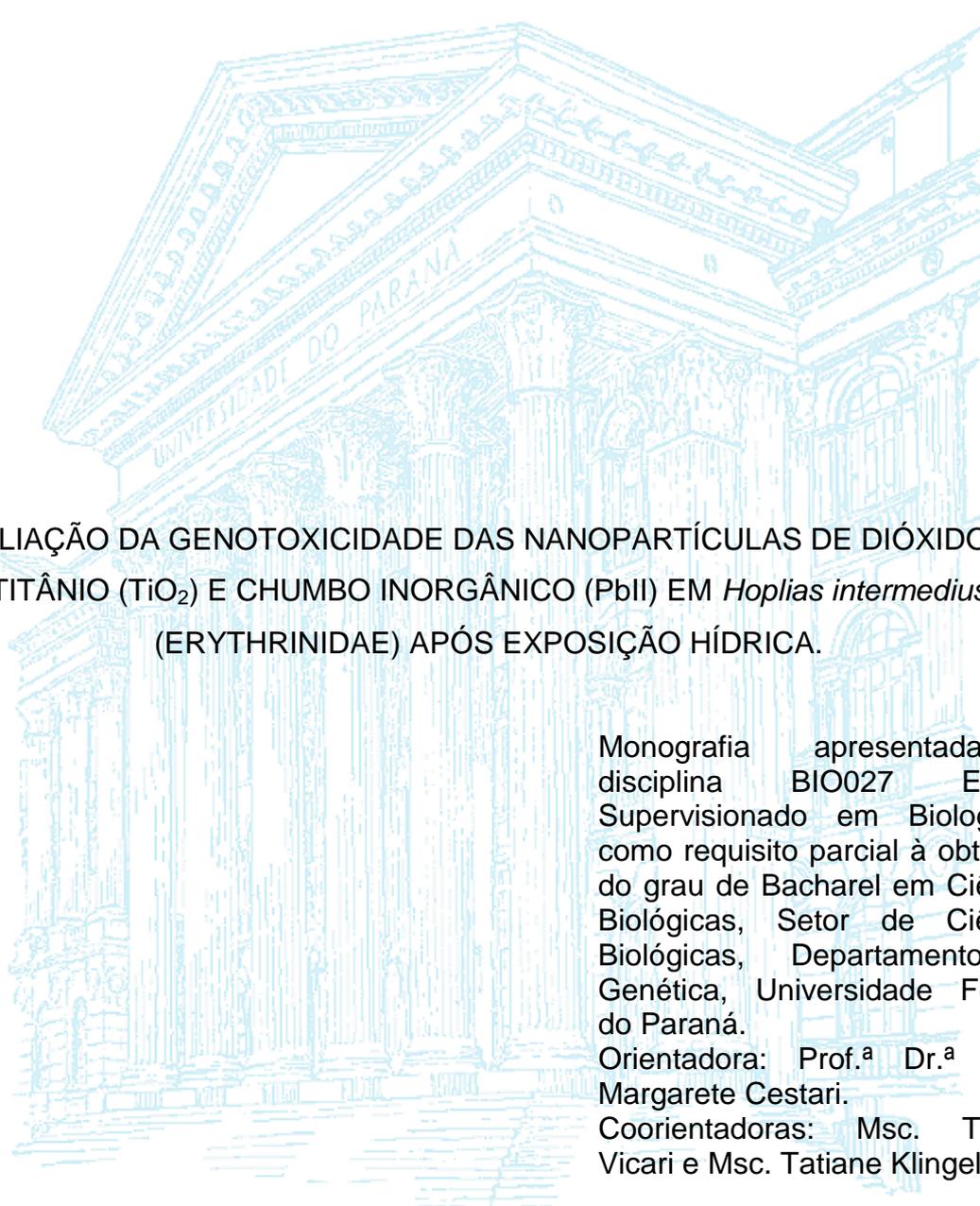
ANA CAROLINA DAGOSTIM

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE  
TITÂNIO (TiO<sub>2</sub>) E CHUMBO INORGÂNICO (PbII) EM *Hoplías intermedius*  
(ERYTHRINIDAE) APÓS EXPOSIÇÃO HÍDRICA.

CURITIBA

2014

ANA CAROLINA DAGOSTIM



AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO<sub>2</sub>) E CHUMBO INORGÂNICO (PbII) EM *Hoplias intermedius* (ERYTHRINIDAE) APÓS EXPOSIÇÃO HÍDRICA.

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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Margarete Cestari.

Coorientadoras: Msc. Taynah Vicari e Msc. Tatiane Klingelfus

CURITIBA

2014

*“Tem coisas que tem seu valor  
Avaliado em quilates, em cifras e fins  
E outras não têm o apreço  
Nem pagam o preço que valem pra mim.”*

*Luiz Marengo*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida, pelo aprendizado nos momentos difíceis e pela proteção.  
Aos meus pais Valmor Dagostim e Ivete Adamy Dagostim por me amarem mesmo com as crises de mau humor, pelos lanchinhos entre um estudo e outro, pelos puxões de orelha e pelos incentivos.

Ao meu amigo e parceiro Thiago Colturato por todo o carinho, pelos conselhos, por ser mais que um namorado e por me tirar de casa de vez em sempre.

Aos meus avós por todo carinho, orações e ensinamentos.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Marta Margarete Cestari pela oportunidade de estágio, realização desta monografia e orientação.

A minha coorientadora Msc. Taynah Vicari por iniciar todo este sonho, pela doação de peixes, pela presença constante, mesmo quando em outro continente, pela orientação e principalmente pela amizade.

A coorientadora Msc. Tatiane Klingelfus pela ajuda nas estatísticas e cálculos.

Ao Msc. Laercio Piancini e a Prof. Dra. Wanessa Ramsdorf por aceitarem participar da minha banca de avaliação. Queria agradecer desde já pelas contribuições, experiências compartilhadas e críticas neste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, estagiários, mestrandos e doutorandos, que me ensinaram desde a limpar uma lâmina até o processo final de escrita dos resultados, pela ajuda durante os experimentos, pela amizade, bullyings, risadas, comidas, viagens e festas inesquecíveis.

Aos meus amigos da faculdade, por todas as risadas, ajudas e histórias.

A minha cadela Pandora, por todo o carinho e companheirismo mesmo sem dizer uma palavra.

E a todos amigos, colegas e familiares por dividirem as ansiedades, os momentos de descontração, a fé e os conhecimentos.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                        | 8  |
| 1.1. Contaminação hídrica .....                   | 8  |
| 1.2. A toxicidade das nanopartículas .....        | 9  |
| 1.2.1. Nanopartículas de dióxido de titânio ..... | 11 |
| 1.3. A toxicidade dos metais .....                | 12 |
| 1.3.1. Chumbo .....                               | 13 |
| 1.4. Organismo-teste .....                        | 14 |
| 1.5. Biomarcadores .....                          | 16 |
| 1.6. Genotoxicidade .....                         | 17 |
| 1.6.1. Teste de Micronúcleo Písceo .....          | 18 |
| 1.6.2. Ensaio Cometa .....                        | 19 |
| 1.7. Justificativa .....                          | 19 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                         | 20 |
| 2.1. Objetivo geral .....                         | 20 |
| 2.1.1. Objetivos específicos .....                | 20 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                | 21 |
| 3.1. Organismo teste .....                        | 21 |
| 3.2. Aclimação .....                              | 21 |
| 3.3. Preparo das soluções .....                   | 23 |
| 3.3.1. Chumbo inorgânico .....                    | 23 |
| 3.3.2. Nanopartículas de dióxido de titânio ..... | 23 |
| 3.4. Tratamento .....                             | 24 |
| 3.5. Amostragem .....                             | 25 |
| 3.5.1. Amostras hídricas .....                    | 25 |
| 3.5.2. Amostras teciduais .....                   | 25 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.6. Teste do Micronúcleo Písceo .....  | 27        |
| 3.7. Ensaio Cometa .....  | 29        |
| 3.7.1.Ensaio cometa para eritrócitos .....                                      | 29        |
| 3.7.2.Ensaio cometa para tecidos hepático e cerebral .....                      | 30        |
| 3.7.3.Escores.....  | 30        |
| 3.8. Análise estatística .....  | 31        |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>  | <b>32</b> |
| 4.1. Caracterização da suspensão das nanopartículas de dióxido de titânio ..... | 32        |
| 4.2.Parâmetros físico-químicos .....  | 33        |
| 4.3. Tecido Sanguíneo .....   | 35        |
| 4.4. Tecido Branquial.....  | 37        |
| 4.5. Tecido Renal.....  | 38        |
| 4.6. Tecido Hepático.....   | 38        |
| 4.7. Tecido Cerebral .....  | 39        |
| <b>5. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>   | <b>46</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>48</b> |

## RESUMO

Um dos principais tipos de alteração antrópica da qualidade da água é o lançamento de poluentes nos corpos hídricos. Nos últimos dois séculos, a produção foi baseada no processo de industrialização, e em decorrência do crescimento populacional e dos avanços tecnológicos e agrários surgiu a necessidade de síntese de novos compostos. Os nanomateriais, produzidos em grande escala, possuem propriedades físico-químicas únicas que colaboram para a sua vasta utilização nos mais variados setores da produção. As nanopartículas de dióxido de titânio têm sido amplamente utilizadas em cosméticos, filtros-solares, aditivos para combustível, catalisadores, tintas, corantes alimentícios e em várias outras aplicações industriais. O chumbo é um metal encontrado no ambiente e muito utilizado pela sociedade, porém, é um metal não essencial. Apesar do uso controlado, o chumbo ainda é muito empregado em indústrias, na fabricação de baterias, tintas, refino, na reparação de automóveis, soldas, tubulações de água potável e na composição do fumo do tabaco. O progressivo lançamento de produtos químicos e substâncias desconhecidas nos ambientes aquáticos têm sido seguidos pela preocupação em entender a dinâmica destes xenobióticos nos diferentes ecossistemas, e o efeito tóxico resultante da disposição de seus resíduos, portanto, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a genotoxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio, do chumbo inorgânico e da associação dos dois contaminantes, em peixes da espécie *Hoplias intermedius* através da contaminação hídrica. 73 exemplares juvenis de trairão foram submetidos à contaminação aguda (96 horas), subdivididos em cinco grupos com aproximadamente 15 exemplares cada nas concentrações de 0,033 mg de PbII/L; 100 mg de NpTiO<sub>2</sub>/L; a conjugação dos dois contaminantes; o controle negativo e o controle positivo com MMS na dose de com 5 µg de MMS/g do peso do animal. A sinergia do chumbo inorgânico com as nanopartículas de dióxido de titânio não foi constatada, contudo as NpTiO<sub>2</sub> apresentaram genotoxicidade nas células branquiais, renais e cerebrais.

Palavras-chave: trairão, ensaio cometa, teste do micronúcleo písceo.

## ABSTRACT

One of the main types of anthropogenic changes in water quality is the release of pollutants loads. Over the past two centuries, the production was based in the industrialization process, and as a result of population growth and technological and agricultural advancements, the need of synthesis new compounds has emerged. Nanomaterials produced on a large scale have unique physicochemical properties that contribute for their widespread use in various sectors of industry. Nanoparticles of titanium dioxide have been widely used in cosmetics, sun-filters, fuel additives, catalysts, dyes, food colors and in various other industrial applications. Lead is a metal found in the environment and widely used by society, but it is a non-essential metal. Despite the controlled use, lead is still used in industries, in the manufacture of batteries, paint, refining, in auto repair, welding, piping clean water and in the composition of tobacco smoke. The progressive release of chemicals and unknown substances in aquatic environments have been followed by the concern to understand the dynamics of these xenobiotics in different ecosystems, and the toxic effect resulting from the disposal of their waste, so the present study aimed to evaluate the genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles, inorganic lead and the association of the two contaminants in fish species *Hoplias intermedius*, through water contamination. 73 *H. intermedius* juvenile specimens were subjected to acute semi-static contamination (96 hours), divided into five groups with approximately 15 specimens each in concentrations of 0.033 mg PbII/L ; 100 mg NpTiO<sub>2</sub>/ L; the combination of both contaminants; the negative control and the positive control with 5 µg/g of MMS animal weight. Synergy inorganic lead to nanoparticles of titanium dioxide was not observed, but the NpTiO<sub>2</sub> present genotoxicity in gill, kidney and brain cells.

Keywords: traírao, comet assay, piscine micronucleus test.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Contaminação hídrica

A existência e manutenção da vida no planeta estão direta ou indiretamente relacionadas aos recursos hídricos, sendo parte indispensável dos ecossistemas terrestres (RIBEIRO, 2010; LINS *et. al.*,2010). No decorrer do desenvolvimento das civilizações da humanidade a água é vista como provedora do desenvolvimento, sendo utilizada para geração de energia, nas áreas industriais, áreas agrícolas e domínio doméstico (CHAMBO, 2011; TUNDISI, 2003).

A qualidade da água pode ser alterada por processos naturais e antrópicos. Segundo RIBEIRO (2010), os fenômenos naturais provocam alterações físicas na forma de escoamentos superficiais em áreas tropicais. Ao passo que para as ações humanas, os principais meios de alteração hídrica são o lançamento de cargas poluentes nos sistemas aquáticos, a alteração do uso do solo e modificações e intervenções diretas no sistema fluvial.

A biota aquática está exposta constantemente as substâncias nocivas destinadas ao ambiente. Estas podem se tornar poluentes quando capazes de interatuar com os organismos e causar uma gama de alterações prejudiciais à população, comunidades ou ecossistemas, dependendo do tempo de exposição e do grau de contaminação (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006; JESUS & CARVALHO, 2008). Portanto, os sistemas biológicos aquáticos refletem os efeitos dos diferentes agentes lançados no meio, fornecendo uma medida agregada dos impactos (BARBOUR *et. al.* 1999).

Nos dois últimos séculos, a forma de produção foi baseada na industrialização, e em decorrência do crescimento populacional combinado com os avanços tecnológicos e da agricultura surgiu a necessidade de síntese de novos compostos químicos, cujas composições envolvem átomos ou grupos funcionais que não são frequentes ou nunca encontrados na natureza. Uma vez lançados no ambiente, estes compostos, são intitulados xenobióticos (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006; JESUS & CARVALHO, 2008).

PIMENTEL *et. al.*(2006) retratam o uso de aproximadamente 80 mil substâncias químicas nas indústrias farmacêuticas, alimentícias ou uso doméstico. Segundo a CAS, uma das divisões da American Chemical Society, existem mais de 90 milhões de substâncias químicas, orgânicas e inorgânicas (tais como minerais, misturas, polímeros, ligas, compostos de coordenação e sais), registradas no mundo. Com a vasta quantidade de substâncias, registradas e não registradas, as informações e conhecimento sobre o mecanismo e as formas de interações destas com o meio ambiente e seus organismos são poucos ou desconhecidos.

O progressivo lançamento de produtos químicos e substâncias desconhecidas em corpos d'água, devido à criação cada vez mais acelerada de novas tecnologias, têm sido seguidos pela preocupação em entender a dinâmica destes xenobióticos nos diferentes ecossistemas, e o efeito tóxico resultante da disposição de seus resíduos (ROSSI, 2013).

## 1.2. A toxicidade das nanopartículas

A definição de nanomateriais manufacturados é a fabricação de materiais em uma escala de 1 a 100 nm (MASCANGIOLI & ZHANG, 2003). Os nanomateriais são produzidos com intuito de portarem propriedades físico-químicas únicas a partir do diminuto tamanho, forma, grande área de superfície, condutividade ou alta reatividade química e alta capacidade de penetração (MASCANGIOLI & ZHANG,2003; OBERDÖRSTER *et. al.*, 2005; MAYNARD, 2007; CLEMENTE *et. al.*, 2013). Tais características resultam nos consequentes avanços da nanotecnologia, principalmente nas áreas têxteis, eletrônica, indústria farmacêutica e ciência da computação (CLEMENTE *et. al.*, 2013).

O avanço da nanotecnologia e seu crescente investimento potencializa o consumo destes materiais. Mais de 60 países investem em nanotecnologia nacional. Em 2012, os quatro países que mais investiram foram os Estados Unidos com 2,1 bilhões, Japão com 1,3 bilhões, Rússia com 974 milhões e Alemanha com 617 milhões de dólares (HOLDREN *et. al.*, 2014). PASCHOALINO, MARCONE e JARDIM (2010) atentamente observam que os valores empregados em estudos de toxicidade dos nanomateriais são ínfimos em relação ao investimento para o progresso dos mesmos.

Em relação à toxicidade e ecotoxicidade das nanopartículas manufaturadas, alguns estudos constataram genotoxicidade, citotoxicidade e estresse oxidativo *in vivo* em mamíferos e *in vitro* a partir de células humanas (BERMUDEZ *et. al.*, 2004, BRUNNER *et. al.*, 2006; ASHARANI *et. al.*, 2009; LINDBERG *et. al.*, 2009); estudos *in vitro* em peixes, (OBERDÖRSTER, 2004; SHAW & HANDY, 2011), em insetos (POSGAI, R. *et. al.*, 2011), em células vegetais (GHOSH, BANDYOPADHYAY e MUKHERJEE, 2010) e em bactérias relevantes aos sistemas naturais (BRAYNER *et. al.*, 2006).

As nanopartículas quando em contato com o ambiente aquático podem formar agregados com a matéria orgânica presente sendo estabilizadas na fase líquida. No estado aglomerado as nanopartículas podem não apresentar suas estruturas em nanoescala, ocasionando a redução de absorção destes compostos através das células (DELMOND, 2013), sugerindo então que organismos aquáticos são expostos às nanopartículas em suspensão no meio líquido (HANDY *et. al.*, 2008).

Por apresentar diminuta dimensão, as nanopartículas atravessam sem dificuldades as lamelas branquiais de peixes, apresentando um risco de exposição tanto trófica devido à matéria orgânica em suspensão, quanto respiratória por sua entrada através das brânquias (HANDY, OWEN e VALSAMI-JONES, 2008).

O muco encontrado nos epitélios branquiais e intestinais dos peixes é uma solução viscosa de poliânions bem conhecida por sua capacidade de quelar cátions e transportá-los para o interior da célula através de proteínas transmembrana. As nanopartículas possuem uma carga policatiônica em sua superfície conferindo uma ligação mais rápida e mais forte às mucoproteínas (SMITH, SHAW, e HANDY, 2007). Nesta mesma conjuntura SINGH *et. al.*(2009) destacam a maior possibilidade de interação das nanopartículas catiônicas com o material genético, já que este é carregado negativamente.

### 1.2.1. Nanopartículas de dióxido de titânio

A nanopartícula de dióxido de titânio ( $\text{NpTiO}_2$ ) é um dos materiais mais utilizados na nanotecnologia principalmente devido à atividade catalítica e absorção de radiação ultravioleta em comprimentos de onda específicos (CLEMENTE *et. al.*, 2013). Elas têm sido amplamente utilizadas em cosméticos, filtros-solares, aditivos para combustível, catalisadores, tintas, corantes alimentícios e em várias outras aplicações industriais (AITKEN *et. al.*, 2006). Na parte ambiental, as nanopartículas de dióxido de titânio têm sido utilizadas para decompor a matéria orgânica presente na água em virtude da sua ação catalítica (ZHANG *et. al.*, 2007).

O dióxido de titânio está presente nas formas cristalinas anatase, rutilo e *brookite* (CLEMENTE *et. al.*, 2013). Ponderando as múltiplas possibilidades de utilização das nanopartículas de dióxido de titânio a presença desta substância no meio ambiente é inevitável. Além de poucos estudos sobre as nanopartículas, os resultados sobre a sua toxicidade são inconclusivos e contraditórios (CLEMENTE *et. al.*, 2012).

O dióxido de titânio é considerado um composto de baixa toxicidade, porém quando em escala nanométrica, estudos têm comprovado que ele pode se tornar tóxico (ZHANG *et. al.*, 2007). CLEMENTE *et. al.*(2013) sabendo das propriedades fotocatalíticas das  $\text{NpTiO}_2$  utilizaram luz ultravioleta (UV) a fim de verificar o aumento da toxicidade das nanopartículas em organismos aquáticos sob condições ambientais. A contaminação hídrica aguda em *Piaractus. Mesopotamicus* (Pacuaranha) resultou em efeitos subletais para os peixes, relacionados ao estresse oxidativo e inflamação quando as  $\text{NpTiO}_2$  estavam sob luz UV.

Quando expostas a  $\text{NpTiO}_2$ , as células humanas do epitélio bronquial apresentaram formação de micronúcleo, peroxidação lipídica e indução de dano no DNA devido às propriedades oxidativas das nanopartículas, capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (OBERDÖRSTER *et. al.*,1992; GURR *et. al.*, 2005).

OYA, (2013) observou danos no DNA de eritrócitos e tecido cerebral de *Rhamdia quelen* após injeção intraperitoneal, com  $\text{NpTiO}_2$  em baixas dosagens ( $5\mu\text{g/g}$ ). Segundo a autora, a concentração da solução pode ter aumentado o efeito genotóxico quando comparado com os grupos de doses maiores pelo favorecimento

de agregação das nanopartículas devido à força iônica da solução nas maiores doses.

ZHU *et. al.*(2009) expôs microcrustáceos da espécie *Daphnia magna* a suspensões de  $\text{NpTiO}_2$  e relatou o acúmulo das nanopartículas no intestino dos organismos após um período de 48 horas. ZHU, CHANG e CHEN (2010) observaram inibição do crescimento e reprodução de *Daphnia magna* em exposição crônica a  $\text{NpTiO}_2$ .

A  $\text{NpTiO}_2$ , assim como outras nanopartículas metálicas, possui a capacidade de adsorver outros metais tóxicos em sua superfície reduzindo a disponibilidade destes elementos na água (BARAKAT, 2005). ZHANG *et. al.*(2007) mostraram um aumento tanto da adsorção de cádmio pelas  $\text{NpTiO}_2$ , quanto um maior acúmulo do metal nos tecidos de carpas (*Cyprinus carpio*). SUN *et al.* (2007) observaram o mesmo acontecimento com o metal arsênio; na presença de  $\text{NpTiO}_2$ . Os resultados observados pelos autores indicam uma sinergia das nanopartículas com o cádmio e arsênio, o que possivelmente contribuiu no transporte do metal para os tecidos do animal.

Deste modo, com a vasta e crescente aplicação de nanopartículas de dióxido de titânio nos diversos setores de produção, sua presença nos ambientes aquáticos é inevitável, seja por lançamento direto ou durante o uso. Portanto, são necessários estudos mais detalhados do comportamento de dióxido de titânio no ambiente aquático assim como sua distribuição e toxicidade em peixes (HANDY *et. al.*, 2008).

### 1.3. A toxicidade dos metais

Os metais são elementos naturais que podem ser encontrados usualmente no ambiente, nas plantas, nos animais. O zinco (Zn), ferro (Fe) e cobre (Cu), por exemplo, são responsáveis pelo funcionamento do organismo sendo cofatores em reações enzimáticas, e que por tal motivo são denominados metais essenciais. Contudo, existem metais que não possuem função biológica conhecida, os metais não essenciais, e estudos mostram que seus efeitos nos organismos podem ser deletérios, como por exemplo, o mercúrio (Hg), arsênio (As), chumbo (Pb) e cádmio (Cd) (ZAGATTO& BERTOLETTI, 2006; ROSSI, 2013).

A toxicidade dos metais está associada a um dos seguintes eventos: o bloqueio de grupos funcionais essenciais na atuação de uma biomolécula, o deslocamento de outros metais presentes no sistema, modificações na conformação de sítios ativos e na estrutura quaternária de proteínas (*GUTHRIE e PERRY, 1980; HAMOND e BELILES, 1980 apud KLINGELFUS, 2013*).

Diversos organismos e estruturas de animais aquáticos são recobertos por muco, como por exemplo, as células branquiais de peixes que secretam continuamente um muco extracelular rico em glicoproteínas que cobre o epitélio branquial. Deste modo, o muco pode servir como um sistema de troca iônica e com a presença de um forte ligante orgânico, como os metais, presentes no ambiente, estes podem estar se concentrando muito próximos a superfície branquial (*TAO et. al., 2000*). Para tanto, a absorção de metais em peixes pode ocorrer principalmente através do trato gastrointestinal devido à exposição através de dieta, e pela superfície branquial por meio da exposição hídrica (*ROSSI, 2013*).

### 1.3.1. Chumbo

O uso antrópico do chumbo, ao longo do século passado, têm alterado a disponibilidade e distribuição deste elemento tóxico local e globalmente. Em consequência das altas emissões de chumbo nos centros urbanos, devido à criação de tecnologias, as concentrações deste metal em centros urbanos são milhares de vezes maiores do que as concentrações nos tempos pré-tecnológicos. Em corpos d'água, o chumbo é proveniente de descargas industriais diretas, deposição de partículas aéreas ou por precipitação nas estradas (*PAIN, 1995*).

O chumbo é um metal encontrado no ambiente e muito utilizado pela sociedade, porém é um metal não essencial. Apesar de controle sobre o seu uso o chumbo ainda é muito empregado em indústrias, na fabricação de baterias, tintas, refino, na reparação de automóveis, soldas, tubulações de água potável e na composição do fumo do tabaco (*PATRICK, 2006; RIBEIRO, 2010*). No Brasil as indústrias de baterias automotivas são responsáveis por 80% do consumo de chumbo, seguidos pelas indústrias de pigmentos (12%) e o setor eletroeletrônico (8%) através da produção de soldas e ligas (*SILVA, 2001*).

Segundo a resolução do Conama 357/2005 a concentração de chumbo inorgânico (PbII) permitida em águas de classe 3 é de 0,033mg/l. Águas de classe 3 são classificadas como: águas que podem ser destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado;
- b) a irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;
- c) a pesca amadora;
- d) a recreação de contato secundário;
- e) a dessedentação de animais.

O chumbo é considerado neurotóxico e nefrotóxico além de causar efeitos deletérios no sistema cardiovascular e hematológico (ATSDR, 2007).

O chumbo possui a capacidade de mimetizar elementos essenciais, principalmente cálcio, ferro e zinco, se ligando às mesmas proteínas e moléculas que esses metais, causando alterações nas atividades fisiológicas normais da célula (COMPANY *et. al.*, 2006).

Danos ao DNA de *Hoplias malabaricus* foram observados em contaminações através de injeção intraperitoneal (RAMSDORF *et. al.*, 2009) e trófica (FERRARO *et. al.* 2004; CESTARI *et. al.*, 2004). A ação genotóxica do chumbo parece ser indireta, através da inibição do sistema de reparo do DNA e a produção de radicais livres, porém os dados ainda são contraditórios, apesar das evidências do risco genético associado à exposição do chumbo (GARCÍA-LESTÓN *et. al.*, 2010).

Contudo, segundo MONTEIRO (2009) apesar das evidências sobre genotoxicidade do chumbo, as informações sobre o potencial genotóxico do chumbo e seu mecanismo de toxicidade ainda é escasso para as espécies de peixes neotropicais.

#### 1.4. Organismo-teste

Organismos-teste são espécies mantidas em condições laboratoriais que em conjunto com os conhecimentos de sua biologia são suficientes para serem utilizadas como indicadores da toxicidade de substâncias. O modo de cultivo e as metodologias de ensaio empregadas para estes organismos são definidas em

normas técnicas, permitindo a reprodutibilidade dos resultados (ARENZON, NETO e GERBER, 2011).

O organismo-teste para ser utilizado em estudos de toxicologia necessita de algumas características descritas por BOHRER (1995) como a disponibilidade e abundância no ambiente, facilidade de cultivo em laboratório e conhecimento da biologia da espécie e ser preferencialmente um organismo sensível e local. A facilidade de manutenção em condições laboratoriais, a relação com grupos de importância ecológica, a estabilidade genética de populações uniformes e a presença na cadeia alimentar do homem também são aspectos de um organismo-teste, segundo RAND (1995).

Dentre as espécies que atendem a esses critérios podemos citar os peixes, que segundo SHAW & HANDY (2011) são considerados bons bioindicadores de poluição aquática devido a sua considerável distribuição nos diversos ecossistemas, por se mostrarem sensíveis para a detecção de poluentes mesmos em baixas concentrações e serem organismos adequados para trabalhos laboratoriais (organismos-teste).

Outro fator importante ao se optar pelo uso de peixes como organismos-teste é a semelhança fisiológica e histológica do seu organismo com o de outros vertebrados, inclusive o do homem. Esse fator aliado à universalidade do código genético permite aos especialistas inferir propriedades a um agente químico como genotóxico, citotóxico, carcinogênico e teratogênico (VILLELA *et. al.*, 2003).

A espécie *Hoplias intermedius* (FIGURA 1), popularmente conhecida como trairão, pertencente à ordem Characiformes e à família Erythrinidae, é uma espécie de água doce, encontrada no rio São Francisco (Minas Gerais, Bahia e Pernambuco), alto rio Paraná, incluindo rios Grande, Paranaíba e Piquiri (Paraná) e afluentes do rio Doce em Minas gerais, Brasil (OYAKAWA & MATTOX, 2009).



Figura 1 – Exemplar da espécie *Hoplias intermedius*. Fonte: Tatiane Klingelfus.

O trairão reside em ambientes lânticos, com hábitos preferencialmente noturnos e comportamento territorialista (PLANQUETTE, KEITH e LE BAIL, 1996). Os indivíduos adultos alimentam-se de peixes, geralmente dos gêneros *Astyanax*, *Curimatá* e *Aequidens*. Os indivíduos jovens são onívoros, alimentando-se de algas, crustáceos, larvas de insetos e peixes (SOARES, ALMEIDA e TUNK, 1986).

As espécies do gênero *Hoplias* são comumente utilizadas em condições laboratoriais por apresentarem fácil adaptação e manutenção. Por serem predadores de hábito alimentar piscívoro e representarem um nível elevado da cadeia alimentar aquática, as espécies deste gênero podem ser utilizadas como bioindicador de contaminação ambiental pelo fato de acumularem contaminantes. Por estas razões são também comumente empregadas em bioensaios de contaminação trófica, como modelos para análises toxicológicas e ecotoxicológicas (CESTARI *et. al.*, 2004; RAMSDORF *et. al.*, 2009; SILVA *et. al.*, 2011; MELA *et. al.*, 2011).

### 1.5. Biomarcadores

A definição para biomacador é qualquer alteração biológica que esteja relacionada à presença de um composto químico no ambiente indicando uma anormalidade que não pode ser detectada no organismo intacto (VAN GESTEL &

VAN BRUMMELEN, 1996). Portanto são utilizados a fim de averiguar de maneira prévia as alterações induzidas pela ação de substâncias e poluentes (VAN DER OOST, BEYER e VERMEULEN, 2003; MIRANDA, 2006).

#### 1.6. Genotoxicidade

A genética toxicológica é a área da genética que estuda os processos responsáveis pela alteração da base genética da vida, tanto na estrutura físico-química (o DNA - ácido desoxirribonucleico), sendo o processo denominado mutagênese; quanto na alteração do determinismo genético ao nível celular ou orgânico, classificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese. (ERDTMANN, 2003).

Efeitos genotóxicos podem ser definidos como efeitos potencialmente prejudiciais ao material genético que ocorrem em consequência de um dano induzido ao DNA (FERNÁNDEZ *et. al.*, 2011).

Um dos agentes responsáveis por causar danos no DNA são os compostos químicos e estes podem classificados de acordo com o tipo de dano produzido: (1) químicos que agem diretamente no DNA; (2) químicos nos quais o seu metabólito causa dano ao DNA; (3) químicos que aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio e (4) químicos que inibem a síntese e o reparo do DNA (LEE & STEINERT, 2003).

Biomarcadores de genotoxicidade foram anteriormente desenvolvidos com organismos aquáticos, para avaliar o potencial genotóxico de diferentes agentes químicos no ambiente aquático, dentre eles se destacam o Teste de Micronúcleo Píscico (TMP), Avaliação de Alterações Morfológicas Nucleares (AMN) e o Ensaio Cometa (BÜCKER, CARVALHO e ALVES-GOMES, 2006). Estes testes são capazes de detectar efeitos dos agentes que potencialmente causam danos ao DNA e consequentemente afetam a saúde do organismo (BARBOSA *et. al.*, 2010; NUNES *et. al.*, 2011).

### 1.6.1. Teste de Micronúcleo Písceo

O teste do micronúcleo em eritrócitos de sangue periférico é uma técnica rápida, sensível e confiável para detectar danos no DNA, devido a frequentes divisões celulares (FENECH, 2000). Através da ação de agentes clastogênicos (que induzem quebras e produzem fragmentos na estrutura do cromossomo) e aneugênicos (que atuam provocando alterações no número de cromossomos no genoma, devido a um erro de distribuição destes durante a divisão celular) ocorrem as quebras no DNA. Estes fragmentos ou cromossomos inteiros formados serão envoltos por uma membrana nuclear tornando-se visíveis como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula, sendo denominado micronúcleo. Os micronúcleos aparecem nas células filhas, em decorrência de danos sofridos nas células parentais (RIBEIRO, 2003).

O teste de micronúcleo tem sido usado em todo o mundo para a avaliação de contaminantes no ambiente aquático, especialmente em peixes (FREIRE *et. al.*, 2008). Estudos recentes têm descrito a presença de outras anomalias nucleares além do micronúcleo, em células de peixes expostos a substâncias genotóxicas (ÇAVAS & ERGENE- GOZÜKÄRA, 2005; RAMSDORF *et. al.*, 2009, FERNÁNDEZ *et. al.*, 2011). Em geral, a presença dessas anomalias é considerada como um indicador de efeito genotóxico (AYLON E GARCIA VASQUEZ, 2001), ainda que os mecanismos responsáveis pela formação destas alterações não tenha sido descrito. Contudo, a análise das alterações morfológicas nucleares pode complementar a investigação do potencial de genotoxicidade de uma substância (ÇAVAS& ERGENE-GOZÜKÄRA, 2005).

Estas alterações morfológicas nucleares foram classificadas por CARRASCO, TILBURY e MYERS (1990) como (1) *Blebbbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, (2) *Lobed*: núcleos com múltiplas evaginações o longo do núcleo e mais largas daquelas descritas para *Blebbbed*, (3) *Vacuolated*: núcleos que apresentam ausência do material genético formando vacúolos em seu interior, (4) *Notched*: núcleos que apresentam uma invaginação bem definida interiorizando no núcleo.

Outra alteração morfológica observada é a frequência de células binucleadas, que indica uma divisão celular anormal devido a um bloqueio da citocinese, resultando em desequilíbrio genético nas células podendo estar envolvido no mecanismo de carcinogênese (FENECH *et. al.*, 2003; FERNÁNDEZ *et. al.*, 2011).

#### 1.6.2. Ensaio Cometa

O DNA das células de organismos eucarióticos possui alguns centímetros de comprimento e há a necessidade de uma condensação para seu armazenamento no núcleo. Quando expostos a danos, a molécula de DNA relaxa seu enovelamento e conseqüentemente ocasiona quebras na estrutura molecular (FERRARO, 2009; COLLINS *et. al.*, 2008).

O ensaio cometa, ou SCGE (*Single-Cell Gel Eletrophoresis*) é um método considerado sensível para a detecção de rupturas nos filamentos de DNA de células eucarióticas individualizadas (COLLINS *et. al.*, 2008). O princípio da técnica é baseado no fato de que o DNA da célula que não sofreu dano irá migrar em conjunto formando uma esfera. As células que sofreram dano terão formado fragmentos e estes irão migrar em velocidades diferentes na eletroforese por terem tamanho e peso distintos, formando uma cauda. Quanto maior for a cauda formada em relação ao nucleóide, maior o número de quebras e, portanto, maior o dano causado (COLLINS, 2004; COLLINS *et. al.*, 2008). Em virtude de seus resultados e sensibilidade, o ensaio cometa é aplicado em testes de novos produtos, avaliação da genotoxicidade, monitoramento de contaminação ambiental com genotoxinas, biomonitoramento humana e epidemiologia molecular e investigação essencial em danos e reparo do DNA (COLLINS, 2004).

#### 1.7. JUSTIFICATIVA

Devido ao grande consumo diário de inúmeras substâncias químicas, poluentes são liberados em rios e mares através de efluentes industriais, processos agrícolas, derrames acidentais e não acidentais de lixos químicos e orgânicos contaminando o meio aquático e sua biota. Levando em conta o grande consumo de chumbo e das nanopartículas de dióxido de titânio além dos fatores de

contaminação ambiental anteriormente citados, são relevantes os estudos que buscam aprimorar conhecimentos acerca da interação, dos efeitos e das respostas dos organismos a estes xenobióticos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio, do chumbo inorgânico e da associação dos dois contaminantes, em peixes da espécie *Hoplias intermedius* através de contaminação hídrica.

#### 2.1.1. Objetivos específicos

Avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio na concentração de 100 mg/L, do chumbo inorgânico na concentração de 0,033 mg/L e da associação dos contaminantes em células eritrocitárias *Hoplias intermedius* através do Teste de Micronúcleo Písceo e Alterações Morfológicas Nucleares;

Avaliar a genotoxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio na concentração de 100 mg/L, do chumbo inorgânico na concentração de 0,033 mg/L e da associação dos contaminantes nos tecidos branquial, sanguíneo, hepático, renal e cerebral de *Hoplias intermedius* através do Ensaio Cometa;

Verificar se a associação entre as Nanopartículas de Dióxido de Titânio e Chumbo II aumenta significativamente os danos no DNA quando comparados aos compostos isoladamente.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Organismo teste

Os exemplares de *Hoplias intermedius* foram obtidos da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de FURNAS, São José do Rio da Barra, sul de Minas Gerais. A piscicultura não apresentam contaminação ou fontes capaz de fazê-lo.

Foram utilizados 73 exemplares juvenis que foram subdivididos em 5 grupos dos quais 18 peixes para o grupo controle negativo, 10 peixes para o grupo controle positivo e 15 peixes para cada grupo de exposição (PbII, PbII+NpTiO<sub>2</sub> e NpTiO<sub>2</sub>). Os peixes apresentaram massa corpórea de 11,14±1,361g com comprimento padrão médio de 18,62±5,767cm.

Os peixes foram submetidos à contaminação hídrica nas concentrações de 0,033 mg/L de chumbo inorgânico (PbII), e 100 mg/L de NpTiO<sub>2</sub> e a associação dos dois contaminantes (PbII+NpTiO<sub>2</sub>). Paralelamente, foi acondicionado um grupo controle negativo (CN) e um grupo controle positivo (CP) tratado com 5 µg/g de Metilmetanosulfonato (MMS), totalizando assim 5 grupos, sob as mesmas condições de aeração e fotoperíodo.

#### 3.2. Aclimação

Os animais foram aclimatados durante aproximadamente 60 dias em tanques de 2000 litros em ambiente externo com temperatura e aeração controladas. Após este período os peixes foram realocados por 20 dias em tanques 250 litros (FIGURA 2) com aeração, fotoperíodo controlado (12h claro/ 12h escuro) e alimentação com uma mistura de ração comercial e peixe a cada 48 horas. Decorrido este período, 73 exemplares de traíções foram dispostos em 5 aquários com capacidade de 108 litros de acordo com a quantidade para cada grupo acima citada (FIGURA 3). Os peixes foram mantidos nestes aquários nas mesmas condições de aeração e fotoperíodo por mais 7 dias, recebendo alimento apenas nos 3 primeiros dias. Decorrido todo o período de aclimação o experimento foi iniciado e os animais não receberam alimento.



Figura 2 - Bioensaio do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental do departamento de genética da Universidade federal do Paraná. Fonte: Taynah Vicari.

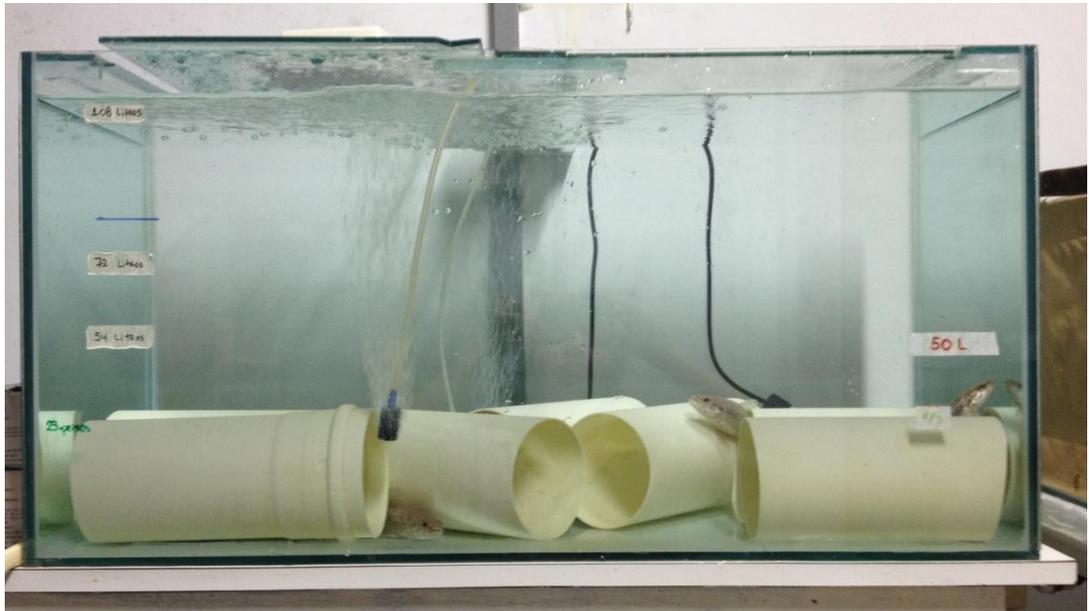


Figura 3 – Aclimação de 7 dias dos exemplares de *Hoplias intermedius* em aquários de 108 litros com aeração, fotoperíodo controlado (12h/12h) e alimento disponível apenas nos 3 primeiros dias. Fonte: A autora.

### 3.3. Preparo das soluções

#### 3.3.1. Chumbo inorgânico (PbII)

A concentração de PbII utilizada neste trabalho foi de acordo com a resolução 357/2005 do CONAMA para águas de classe 3. Para realização da solução de chumbo inorgânico foi utilizado o nitrato de chumbo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ). Sabendo que 1 mol de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  contém 207,200 mg de PbII, foi utilizado 527,490 mg de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  para obtermos 330mg de PbII. A concentração da solução-mãe foi de 330 mg de PbII/L. Para a contaminação inicial foram diluídos 7,2 ml da solução mãe em 72 litros do aquário, já para as renovações de dois terços do volume total foram utilizados 4,8 ml da solução mãe, tendo ao final a concentração de 0,033 mg de PbII/L nos tratamentos.

#### 3.3.2. Nanopartículas de dióxido de titânio ( $\text{NpTiO}_2$ )

As  $\text{NpTiO}_2$  utilizadas para o preparo das soluções foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, em forma de pó na coloração branca.

A caracterização das nanopartículas foi desenvolvida através da análise da área de superfície específica, realizada pelo LACTEC - UFPR utilizando a análise de Brunauer Emmett Teller (BET) (BRUNAUER, EMMETT e TELLER, 1938). Além disso, a estrutura cristalina, através das análises do XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy) e a química da superfície, através do método conhecido como DLS (Dynamic Light Scattering) também foram confeccionados, juntamente com as imagens das nanopartículas através da microscopia eletrônica de transmissão. A química da superfície das nanopartículas foi realizada através do método XPS pelo Prof. Dr. Wido Herwig Schreiner, do departamento de Física da UFPR e o método DLS foi realizado pelo Prof. Dr. Aldo José Gorgatti Zarbin, do Departamento de Química da UFPR. A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada pelo Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

A suspensão de 100 mg de  $\text{NpTiO}_2$ /L foi escolhida por ser a concentração máxima recomendada pela OECD (1992), Organização de Cooperação e de

Desenvolvimento Econômico, que considera que as concentrações maiores que esta não apresentam relevâncias ambientais.

Para obter a concentração de 100 mg de  $\text{NpTiO}_2/\text{L}$  nos tratamentos a concentração da solução-mãe foi de 10000 mg de  $\text{NpTiO}_2/\text{L}$ . Para a primeira contaminação foram feitos 720 ml de solução-mãe, contendo 7200 mg de  $\text{NpTiO}_2$  em 720 ml de água destilada para serem misturados a 72 litros de água. Para as renovações em 48 litros de água, foram realizadas suspensões com 4800 mg em 480 ml de água destilada. Após o preparo das suspensões de  $\text{NpTiO}_2$  elas foram sonicadas por 30 minutos em banho-maria ultrassônico (Schuster, L-100) em uma frequência de 42 KHz.

### 3.4. Tratamento

Os parâmetros para realização dos testes foram através do protocolo nº 203 da diretiva OECD (1992). Para iniciar o experimento de contaminação hídrica os aquários com capacidade de 108 litros utilizados para aclimatação foram esvaziados até atingir 72 litros de água. Os peixes foram contaminados via hídrica (FIGURA 4) por um período de 96 horas em um regime semi-estático, onde dois terços dos contaminantes ou da água foram renovados a cada 24 horas. No grupo controle negativo não foi adicionado nenhum contaminante e no grupo controle positivo foi injetado 5  $\mu\text{g}$  de MMS/g do peso do animal 24 horas antes do término do experimento.

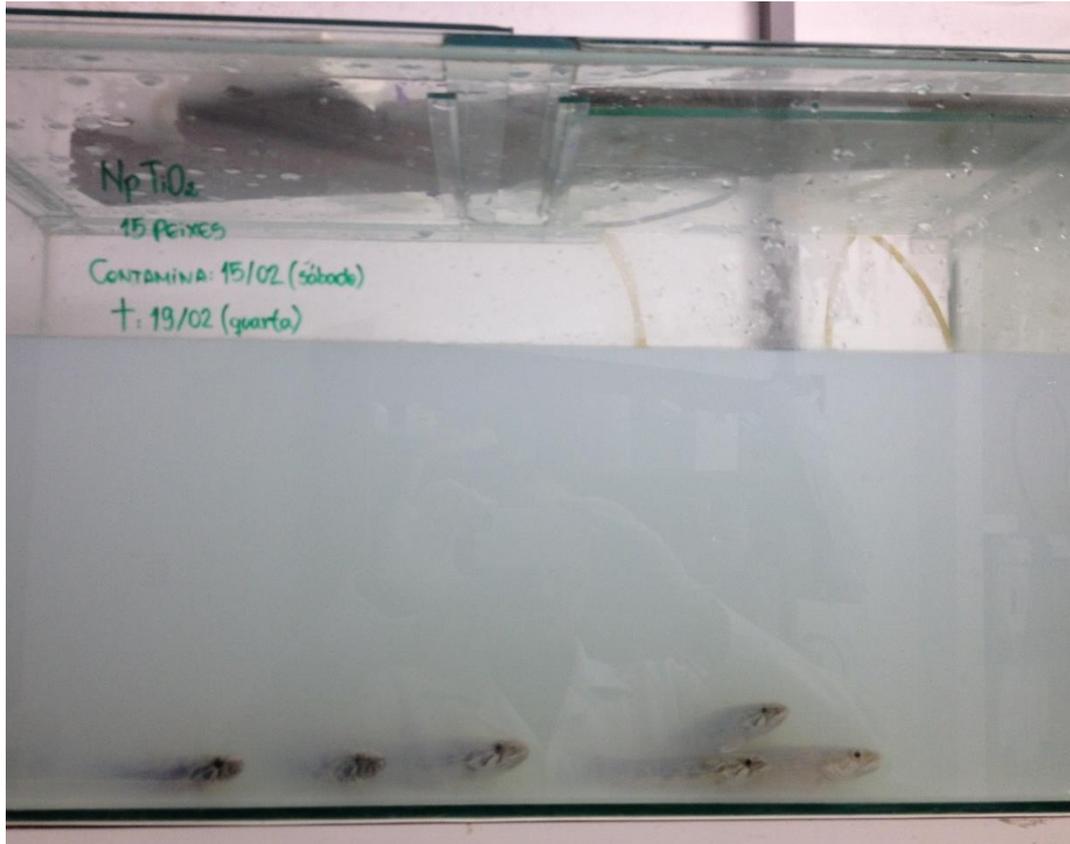


Figura 4 - Exemplares de *Hoplias intermedius* sob contaminação hídrica das nanopartículas de dióxido de titânio (NpTiO<sub>2</sub>). Fonte: A autora.

### 3.5. Amostragem

#### 3.5.1. Amostras hídricas

Para a análise química da água, amostras foram retiradas dos aquários antes e logo após a renovação dos contaminantes ou somente da água, ou seja, eram retiradas duas amostras por dia de cada aquário. As amostras eram contidas em garrafas de plástico de um litro e armazenadas em freezer para posterior análise.

#### 3.5.2. Amostras teciduais

Para a obtenção das amostras biológicas, os exemplares de *H. intermedius* foram anestesiados com Benzocaína diluída em etanol a 20% em uma concentração de 10mg/L, e em seguida pesados, medidos e sexados (FIGURA 5).



Figura 5 - Exemplar de *Hoplias intermedius*, após anestesia com Benzocaína 20%. Fonte: Laís Fernanda Oya Silva.

O sangue periférico foi extraído através da veia caudal, em seguida foi pingado uma gota em uma lâmina limpa para a realização do esfregaço sanguíneo para o TMP, e 10 $\mu$ l colocado em microtubos do tipo eppendorf de 1,5 ml, contendo 1,0 ml de soro bovino fetal e guardado sob refrigeração e na ausência de luz. Com o auxílio de tesoura e pinças finas foram retirados amostras dos tecidos renal, hepático, branquial e cerebral (FIGURA 6) e colocados em eppendorfs de 2,0 mL contendo 0,5 ml de soro bovino fetal e guardados sob refrigeração para posterior realização do EC (RAMSDORF *et al.* 2009).

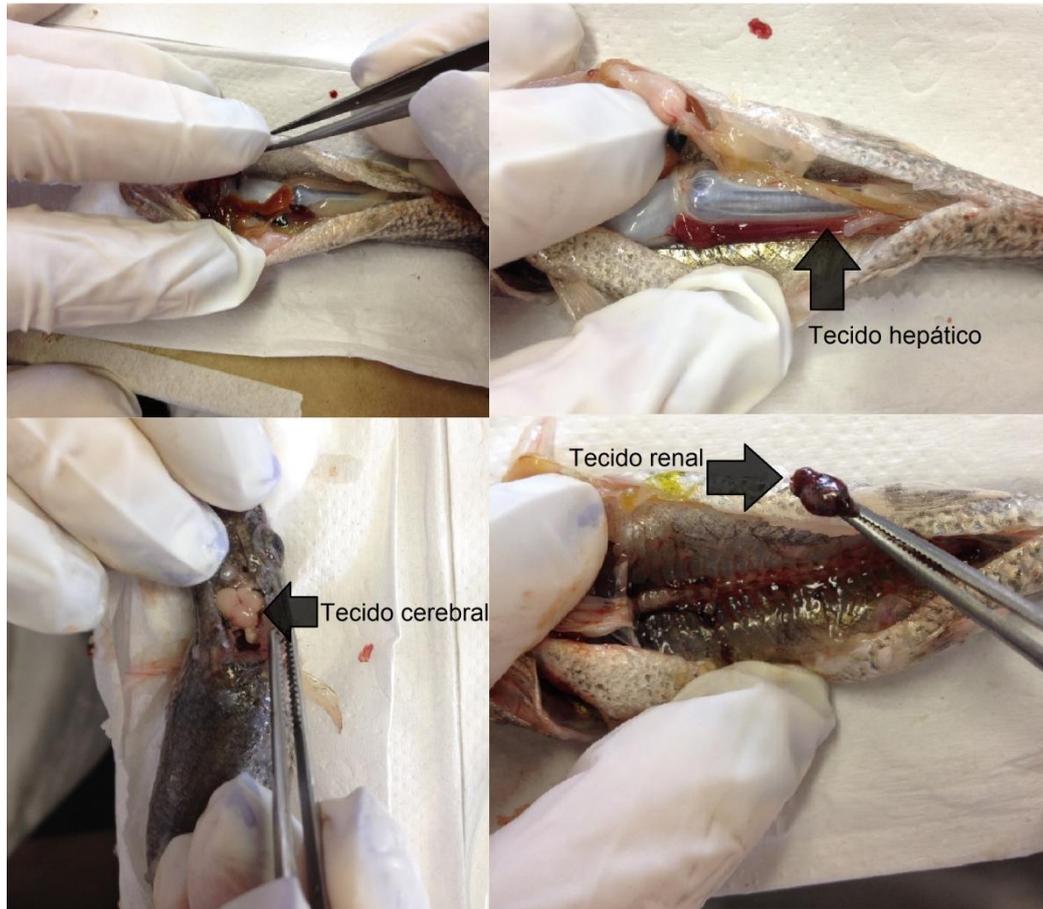


Figura 6 - Coleta com auxílio de pinças dos tecidos hepático, renal e cerebral dos exemplares de *Hoplias intermedius*. Fonte: A autora.

### 3.6. Teste do Micronúcleo Písceo

Para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade foi empregado o TMP segundo HEDDLE (1973) e SCHIMID (1975) com modificações por FERRARO *et. al.*, 2004. Após a coleta do sangue do animal, pingou-se uma gota de sangue em uma lâmina limpa e com o auxílio de uma lamínula foi realizada a técnica do esfregaço sanguíneo (FIGURA 7). Após um período de 24 horas, as lâminas foram fixadas em cubetas de vidro com etanol absoluto por 15 minutos. Posteriormente as lâminas foram coradas com giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 12 minutos; foram enxaguadas com água destilada, secaram por 24 horas e posteriormente foram analisadas em microscópio óptico da marca Olympus aumento de 1000X (FIGURA 8). Através do teste cego foram analisadas 2000 células por lâmina observando a presença de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares segundo CARRASCO, TILBURY e MYERS (1990) (FIGURA 9).

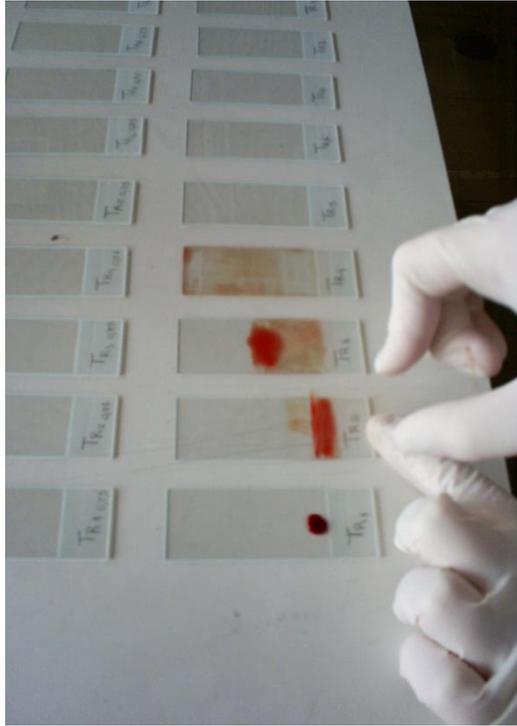


Figura 7 - Técnica do esfregaço sanguíneo. Fonte: Taynah Vicari.

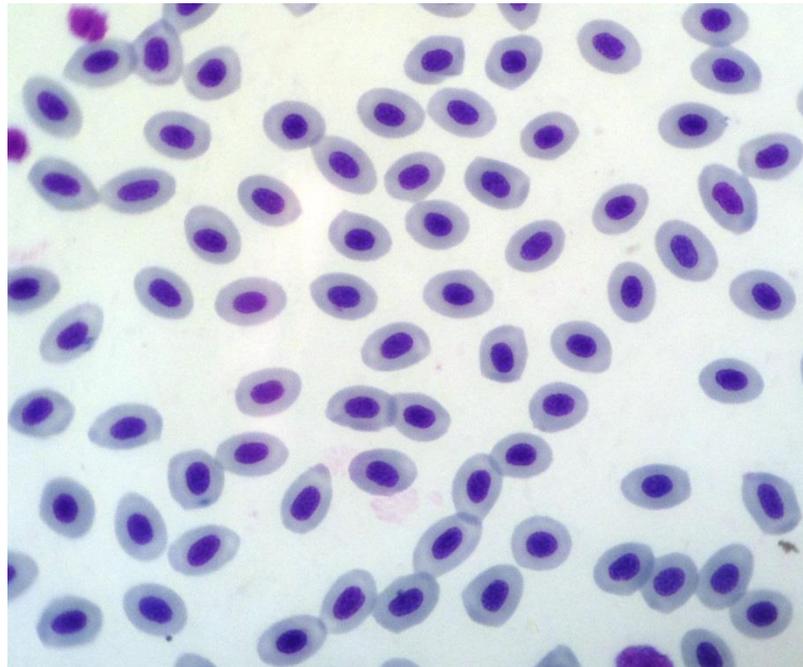


Figura 8 - Células eritrocitárias de *Hoplias intermedius* no aumento de 1000x após a técnica de esfregaço e coloração com Giemsa. Fonte: A autora.

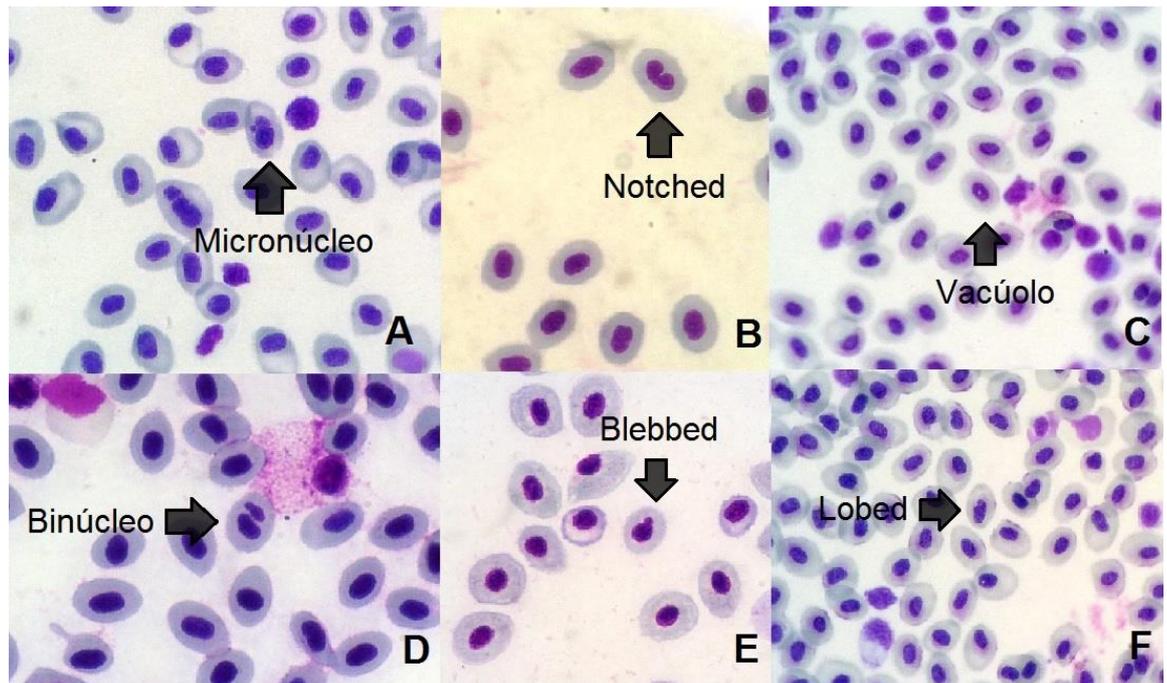


Figura 9 - Exemplo de células eritrocitárias com presença de micronúcleo e com alterações morfológicas nucleares de *Hoplias intermedius* no aumento de 1000x do microscópio óptico. A - célula com micronúcleo, B - notched, C - vacúolo, D - binúcleo, E - blebbed e F - lobed. Fonte: A autora.

### 3.7. Ensaio cometa

A técnica utilizada para o ensaio cometa foi a descrita por SINGH *et al.*(1988) com modificações segundo FERRARO *et al.*(2004) e CESTARI *et al.* (2004) para eritrócitos e por RAMSDORF *et al.* (2009) para tecidos sólidos.

#### 3.7.1. Ensaio cometa para eritrócitos

Foram coletados 10  $\mu$ l de suspensão celular e misturado com 120  $\mu$ l de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C), a mistura foi então colocada sobre uma lâmina com a cobertura de agarose normal previamente confeccionada, coberta com uma lamínula e levada a geladeira por 15 minutos. Decorrido o tempo de refrigeração as lamínulas foram retiradas com cuidado e as lâminas foram colocadas em solução de lise dentro de cubetas que foram mantidas em refrigeração por 24 horas.

As lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese horizontal (resfriada a 4°C e mantida no escuro) de modo que não houvesse espaço entre elas

e, quando necessário, lâminas limpas foram utilizadas para preencher os espaços vazios. Em seguida, foi adicionado o tampão de eletroforese com pH maior que 13, delicadamente, de maneira a cobrir as lâminas que foram mantidas na solução por 30 minutos para a desespiralização do DNA. A corrida da eletroforese foi realizada a 25V e 300 mA por 25 minutos.

Após o término da eletroforese, as lâminas foram retiradas cuidadosamente e neutralizadas três vezes com 5ml de tampão de neutralização composto por 51,04 g de Tris e 1 litro de água deionizada (pH 7,5) por 5 minutos. As lâminas foram secas na posição inclinada, fixadas com etanol por 5 minutos e posteriormente guardadas até o momento de análise.

Para a análise, cada lâmina foi corada com 30  $\mu$ L de brometo de etídeo (20 mg/L) e posteriormente coberta com uma lamínula e analisada imediatamente no microscópio de epifluorescência (Leica<sup>®</sup>, DFC300).

### 3.7.2. Ensaio cometa para os tecidos renal, hepático, branquial e cerebral.

Os tecidos foram desagregados em micro homogeneizador (TECNAL<sup>®</sup>, TE-103) a 1500 rpm por cerca de 30 segundos. Posteriormente foram coletados 20  $\mu$ L do homogenato obtido e misturado com 120  $\mu$ L de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C), para a montagem das lâminas. O restante do procedimento prossegue-se de forma semelhante ao ensaio com eritrócitos.

### 3.7.3. Escores

Utilizando o microscópio de epifluorescência, com aumento de 400x, foram analisados 100 nucleóides por lâmina.

Os danos analisados são a relação do comprimento da cauda em relação à 'cabeça' do cometa, sendo: 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano moderado), 3 (dano elevado) e 4 (dano máximo) (FIGURA 10). Os cometas com DNAs totalmente fragmentados, ou seja, aqueles em que não se visualiza a região da cabeça, foram desconsiderados da contagem por apresentarem características de células inviáveis (COLLINS, *et. al.*, 2008).

Os escores dos danos foram atribuídos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe, como no exemplo que se segue:

Escores = [(0 x número de nucleóides com dano 0)+(1 x número de nucleóides com dano 1)+(2 x número de nucleóides com dano 2)+(3 x número de nucleóides com dano 3)+(4 x número de nucleóides com dano 4)].

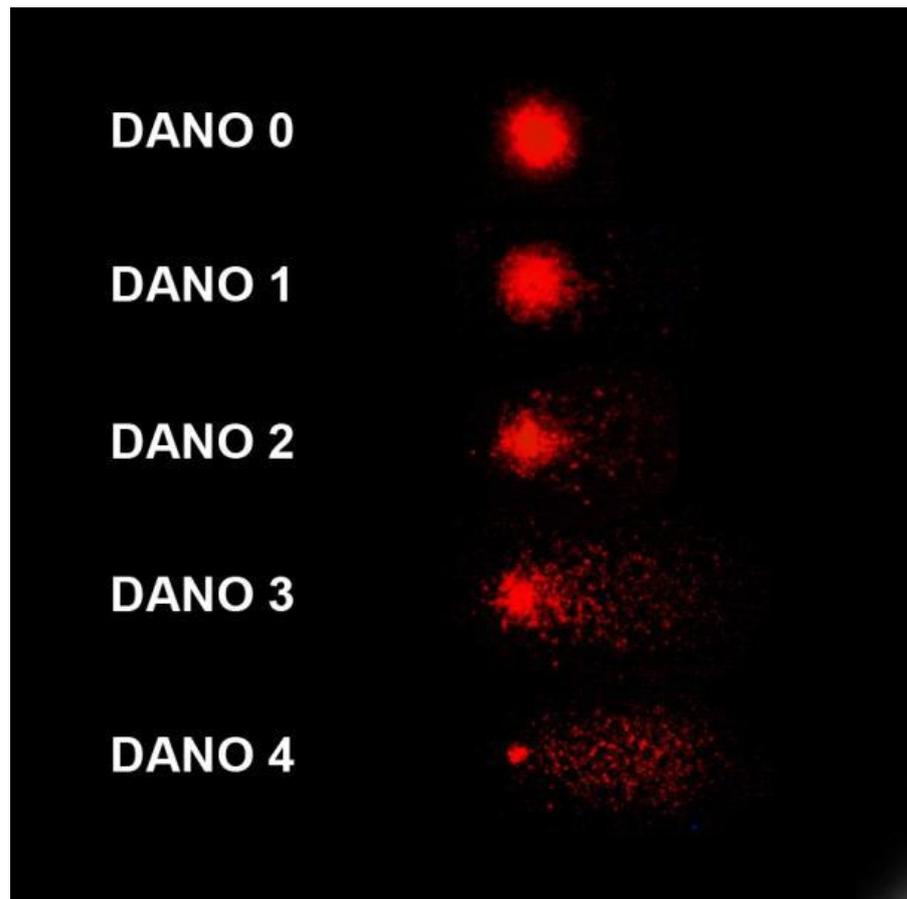


Figura 10- Modelo de Nucleóides com danos de 0 a 4, utilizado na classificação na análise do ensaio cometa. Fonte: KLINGELFUS, 2013.

### 3.8. Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi empregado a fim de verificar a normalidade das amostras. Quando estas não apresentavam normalidade foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls, caso contrário era utilizado o teste da Anova (1 critério) com pós-teste T (LSD). Os testes foram usados a fim de verificar as possíveis diferenças entre os grupo expostos e grupos controle positivo e negativo, com um nível de significância menor que 0,05.

## 4. RESULTADOS

Não houve mortalidade dos peixes devido à contaminação do chumbo inorgânico e das nanopartículas de dióxido de titânio. Contudo, no aquário em que os peixes foram expostos à conjugação dos contaminantes uma traíra se alimentou de outra.

Dos 72 espécimes de *Hoplias intermedius* utilizados no trabalho, 43 foram fêmeas e 29 foram machos.

### 4.1. Caracterização da suspensão das nanopartículas de dióxido de titânio

As estruturas cristalinas que compunham as  $\text{NpTiO}_2$  eram 100% do tipo anatase, constituídas de 28,42% de titânio e 71,58% de oxigênio e apresentando uma dimensão média de 45 nm e 107 nm para as partículas agregadas (FIGURA 12). A análise B.E.T. mostrou uma área de superfície específica de 83.47  $\text{m}^2/\text{g}$  das nanopartículas. Através microscopia eletrônica de transmissão, foi obtida a estrutura morfológica e o tamanho das nanopartículas de dióxido de titânio em pó (FIGURA 11).

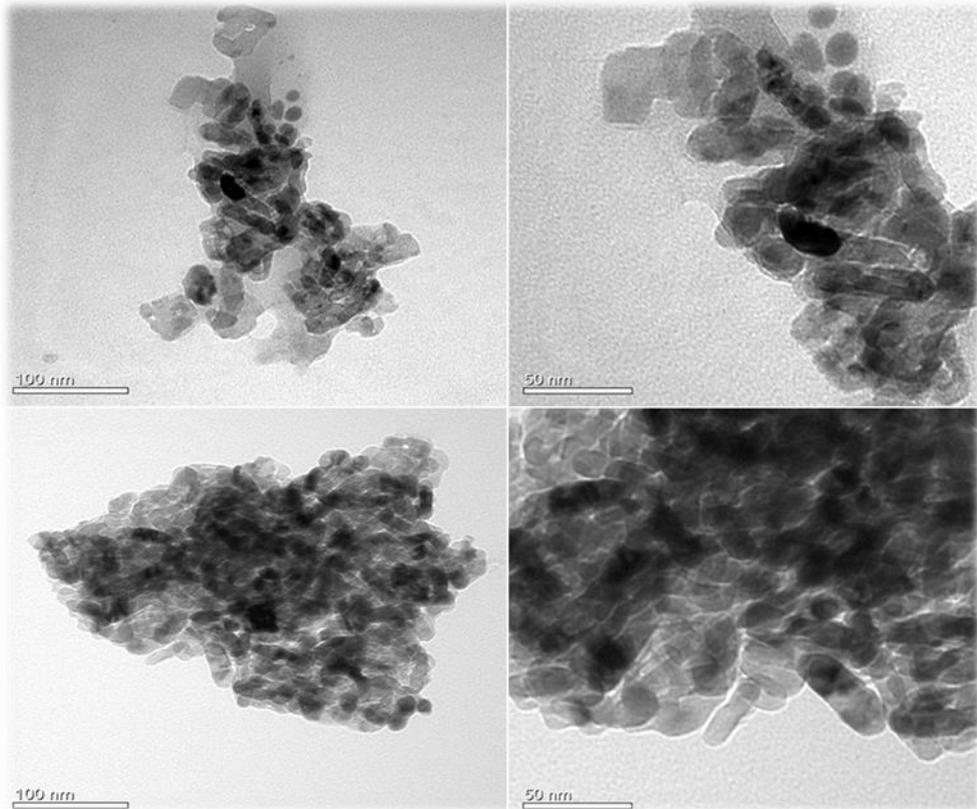


FIGURA 11 - Aglomerados de  $\text{NpTiO}_2$  por microscopia eletrônica de transmissão. (Fonte: Taynah Vicari)

#### 4.2. Parâmetros físico-químicos

A temperatura média dos aquários foi de  $23.09 \pm 1.432$  °C e a concentração média de oxigênio dissolvido foi de  $8.332 \pm 0.5626$  mg/L (TABELA 1).

Tabela 1 - Temperatura média e taxa média de oxigênio dissolvido nos aquários de cada grupo (CN, PbII, PbII+NpTiO<sub>2</sub>, NpTiO<sub>2</sub> e MMS) utilizado durante o experimento de exposição hídrica aguda (96 horas).

| Temperatura °C    |                   |                         |                    |                  |                   |
|-------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| CN                | PbII              | PbII+NpTiO <sub>2</sub> | NpTiO <sub>2</sub> | MMS              | Média             |
| $23.48 \pm 1.952$ | $23.46 \pm 1.809$ | $22.73 \pm 1.024$       | $22.6 \pm 0.6733$  | $22.98 \pm 1.55$ | $23.09 \pm 1.432$ |

| Oxigênio dissolvido (mg/L) |                  |                         |                    |                    |                    |
|----------------------------|------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| CN                         | PbII             | PbII+NpTiO <sub>2</sub> | NpTiO <sub>2</sub> | MMS                | Média              |
| $8.06 \pm 0.7369$          | $8.4 \pm 0.4637$ | $8.675 \pm 0.15$        | $8.4 \pm 0.4967$   | $8.175 \pm 0.7805$ | $8.332 \pm 0.5626$ |

O Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) da Universidade Federal do Paraná, analisou a concentração de PbII nas amostras de

água retiradas antes e depois da renovação dos contaminantes dos aquários de PbII e de PbII com NpTiO<sub>2</sub>. A análise hídrica mostrou que a concentração efetiva 0,04±0,014 mg de PbII/L não estava biodisponível nas amostras retiradas antes da renovação dos contaminantes (<0,01 mg/L), contudo nas amostras após a renovação havia disponibilidade de PbII (TABELA 2).

Tabela 2- Análise hídrica realizada pelo CEPPA em relação à concentração (mg/L) de PbII nas amostras retiradas dos aquários ante e depois da contaminação.

| Antes da renovação<br>Tempo de contaminação (h)  |           | PbII<br>(mg/L) | PbII+NpTiO <sub>2</sub> (mg/L) |
|--|-----------|----------------|--------------------------------|
| 0  |           | <0.01          | <0.01                          |
| 24   |           | <0.01          | <0.01                          |
| 48   |           | <0.01          | <0.01                          |
| 72   |           | <0.01          | <0.01                          |
| 96   |           |                |                                |
| Depois da renovação<br>Tempo de contaminação (h) | CN (mg/L) | PbII<br>(mg/L) | PbII+NpTiO <sub>2</sub> (mg/L) |
| 0  | <0.01     | 0.03           | 0.07                           |
| 24   | <0.01     | 0.05           | 0.06                           |
| 48   | <0.01     | 0.04           | 0.05                           |
| 72   | <0.01     | 0.03           | 0.04                           |
| 96   | <0.01     | 0.03           | 0.03                           |

## 4.3. Tecido Sanguíneo

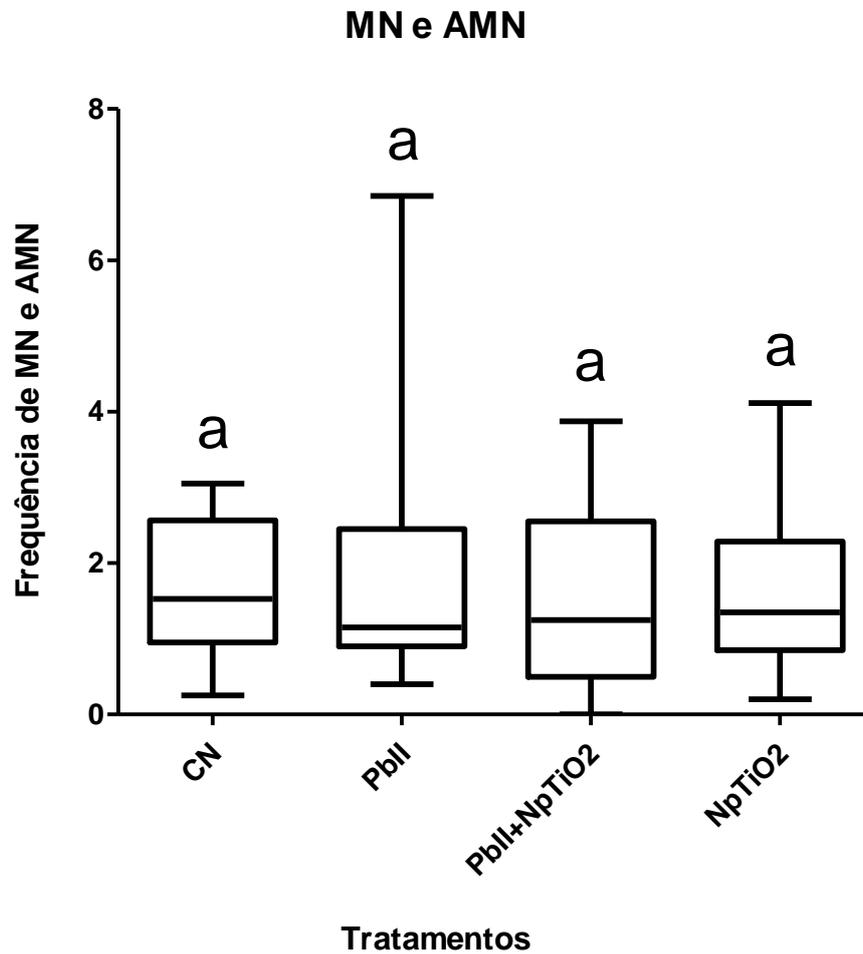


Gráfico 1 – Teste do Micronúcleo Písceo e Alterações Morfológicas Nucleares. Frequência de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares dos eritrócitos de *H. intermedius* nos grupos tratados (PbII, PbII+NpTiO<sub>2</sub> e NpTiO<sub>2</sub>) e controle (CN).

Não houve diferenças quanto à presença de micronúcleo e dos tipos de alterações morfológicas do núcleo entre os grupos ( $p=0,908$ ) (GRÁFICO 1) (TABELA 3).

Tabela 3- Frequências de MN e AMN encontradas nos grupos tratados (PbII, PbII+NpTiO<sub>2</sub> e NpTiO<sub>2</sub>) e controle (CN e MMS).

| Frequências de AMN      |               |               |               |               |               |               |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                         | Micronúcleo   | Blebbbed      | Lobed         | Notched       | Binúcleo      | Vacúolo       |
| CN                      | 2±0           | 2.8889±0.0352 | 2.8611±0.0386 | 4.9444±0.3487 | 2.3611±0.0375 | 5.9444±0.6416 |
| PbII                    | 2.2667±0.0297 | 2.5333±0.053  | 3.0333±0.0741 | 5.0667±0.7436 | 2.2333±0.0297 | 5.8667±0.916  |
| PbII+NpTiO <sub>2</sub> | 2.3333±0.0129 | 2.3333±0.0129 | 3.2±0.0478    | 4.6667±0.3407 | 2.8±0.0244    | 5.6667±0.816  |
| NpTiO <sub>2</sub>      | 2.1±0         | 2.6±0.0228    | 3±0.0486      | 4.9333±0.3873 | 2.4333±0.0206 | 5.9333±0.7771 |
| MMS                     | 2.25±0        | 2.45±0.0158   | 2.85±0.024    | 5.25±0.3991   | 2.45±0.0158   | 5.75±1.1723   |

Com relação ao EC, o grupo controle positivo, exposto ao MMS, não diferiu do CN em relação aos danos do DNA das células eritrocitárias (GRÁFICO 2).

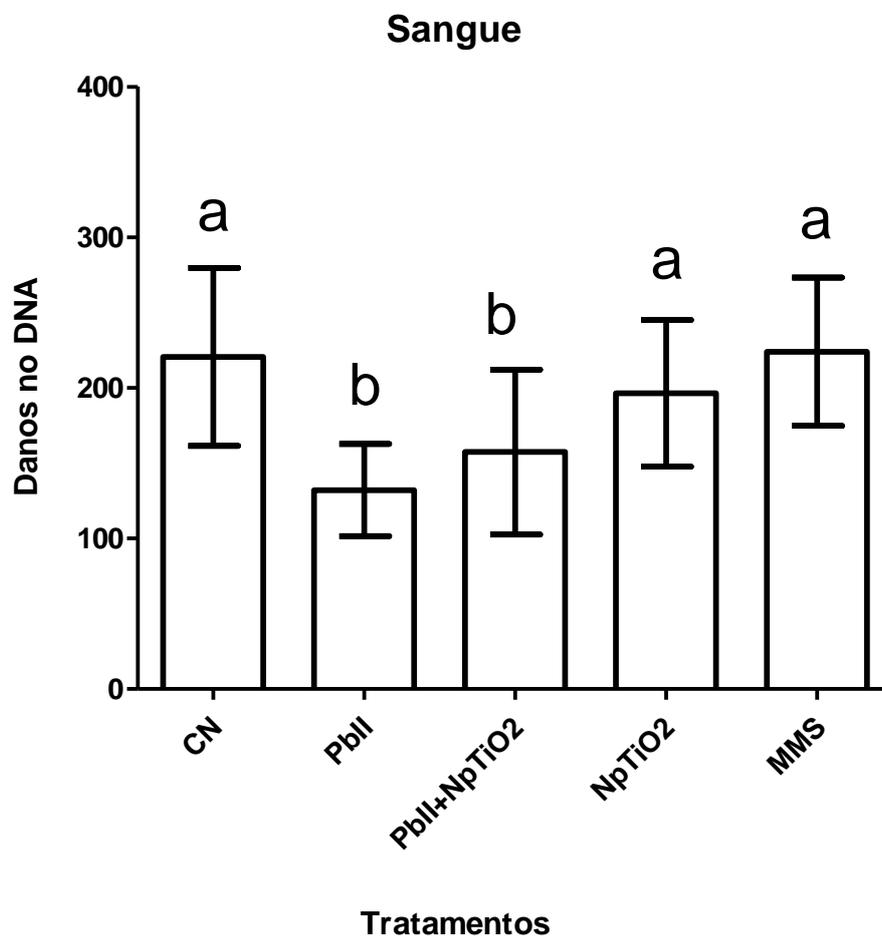


Gráfico 2 - Ensaio cometa de eritrócitos. Danos ao DNA do tecido sanguíneo de *Hoplias intermedius* após exposição hídrica aguda (96 horas) ao chumbo e nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Nestes dados foi utilizado Anova (1 critério) seguido do pós-teste T (LSD). Letras diferentes significam diferença significativa de  $p < 0,05$ .

#### 4.4. Tecido Branquial

Através do ensaio cometa pode-se observar que os grupos expostos à  $\text{NpTiO}_2$  e aos contaminantes conjugados apresentaram maiores danos no DNA quando comparado aos grupos controle negativo (CN) e PbII, contudo apresentaram menores danos quando comparados ao MMS. Diferentemente dos demais grupos, o PbII não apresentou diferença em relação ao CN. (GRÁFICO 3).

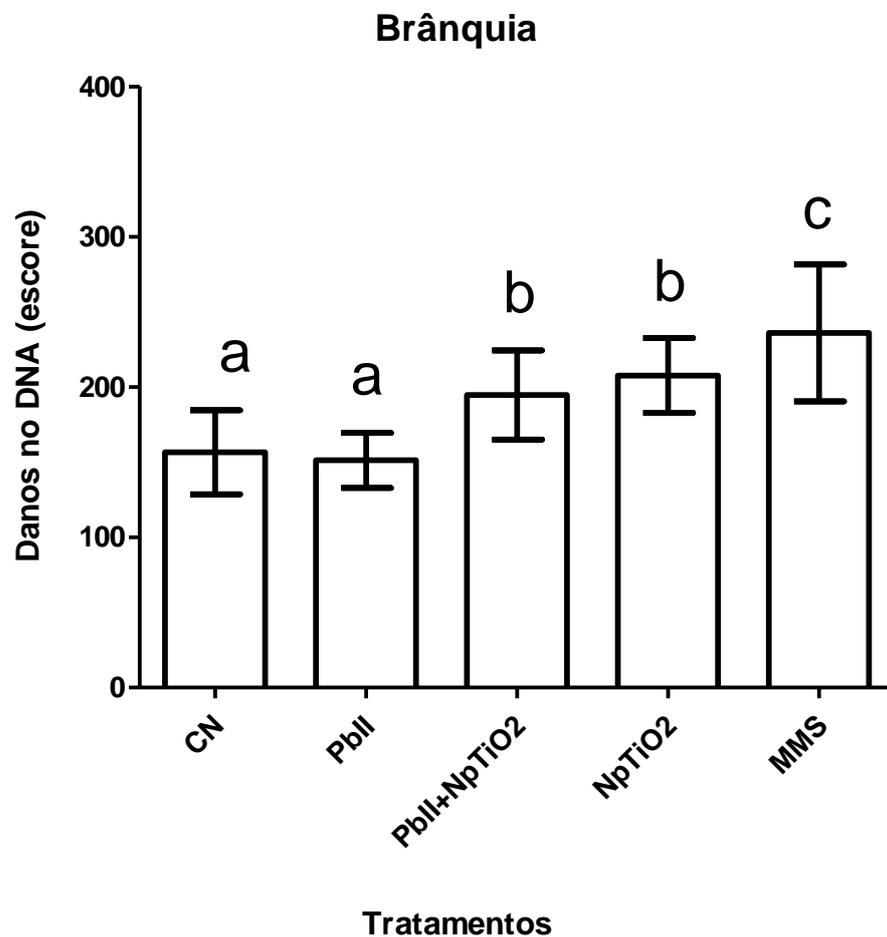


Gráfico 3 – Ensaio cometa de brânquia. Danos ao DNA do tecido branquial de *Hoplias intermedius* após exposição hídrica aguda (96 horas) ao PbII e  $\text{NpTiO}_2$ . Letras diferentes significam diferença significativa de  $p < 0,05$  (Anova 1 critério).

#### 4.5. Tecido Renal

As células renais sob exposição do PbII, PbII+NpTiO<sub>2</sub> e NpTiO<sub>2</sub> apresentaram maiores danos ao DNA em relação ao CN, mas ainda assim, tiveram danos menores quando comparados a ação do MMS.(GRÁFICO 4).

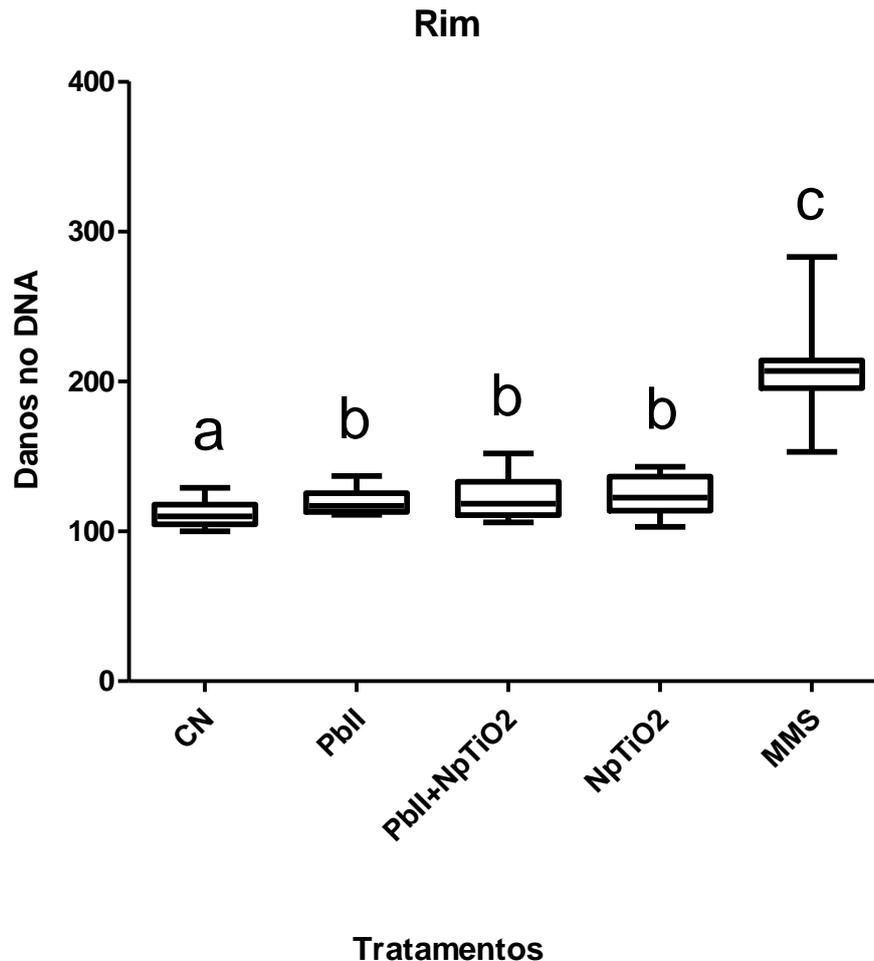


Gráfico 4 – Ensaio cometa de rim. Danos ao DNA das células renais de *Hoplias intermedius* após exposição hídrica aguda (96 horas) ao chumbo e nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Letras diferentes significam diferença significativa de  $p < 0,05$ .

#### 4.6. Tecido Hepático

No ensaio cometa em hepatócitos, não observamos diferenças significativas entre os grupos expostos em relação ao controle negativo (GRÁFICO 5).

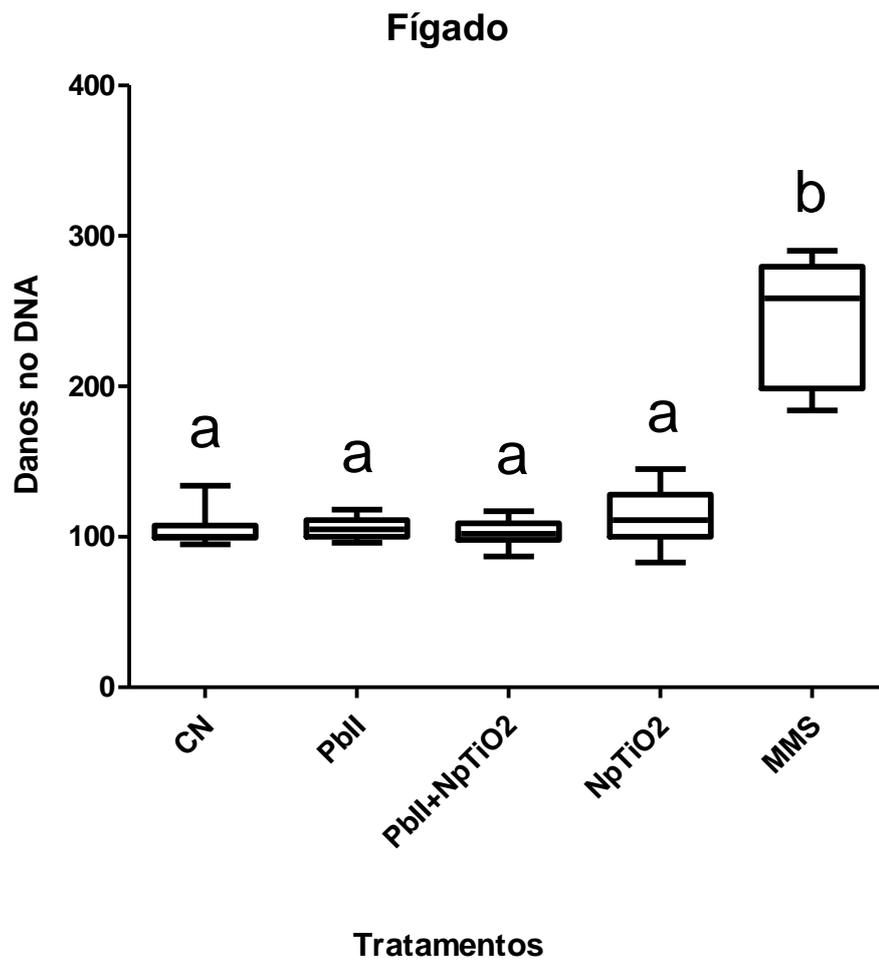


Gráfico 5 - Ensaio cometa de fígado. Danos ao DNA das células hepáticas de *Hoplias intermedius* após exposição hídrica aguda (96 horas) ao chumbo e nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Letras diferentes significam diferença significativa de  $p < 0,05$ .

#### 4.7. Tecido Cerebral

Os animais expostos ao PbII+NpTiO<sub>2</sub> e a NpTiO<sub>2</sub> apresentaram maiores danos no DNA das células cerebrais em relação ao CN e PbII isolado (GRÁFICO 6).

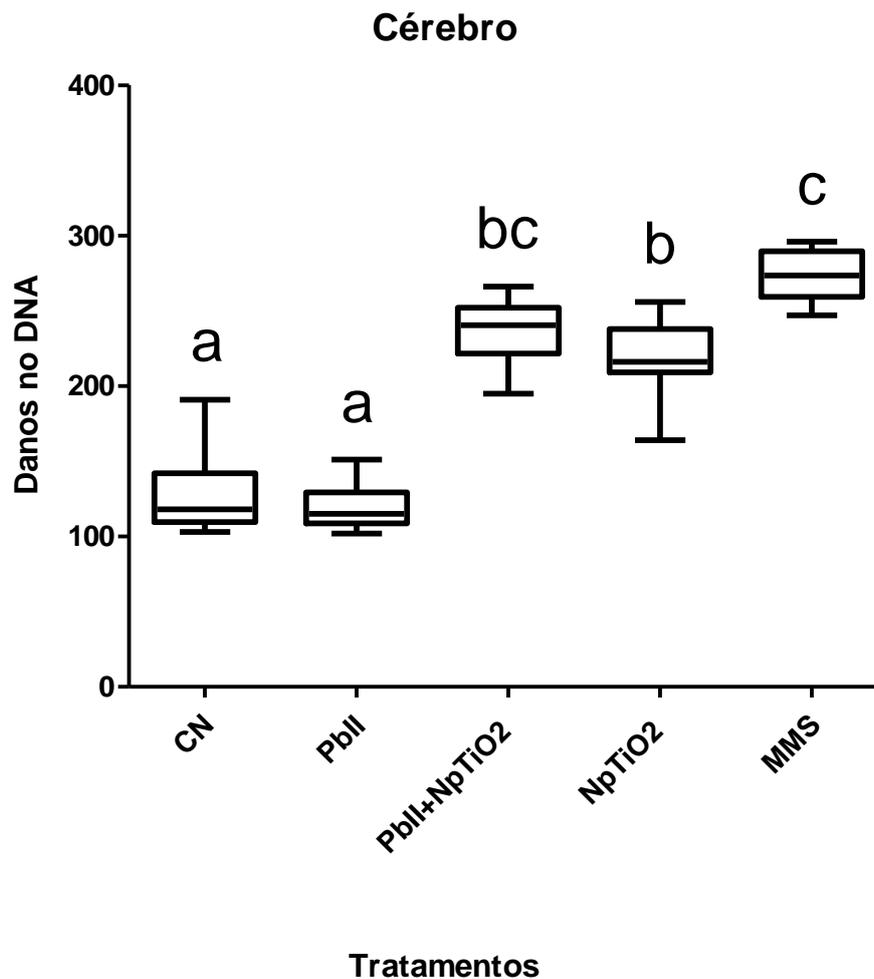


Gráfico 6 –Ensaio cometa de cérebro. Danos ao DNA das células do cérebro de *Hoplias intermedius* após exposição hídrica aguda (96 horas) ao chumbo e nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ . Letras diferentes significam diferença significativa de  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

A predação intraespecífica ocorrida durante o experimento de contaminação hídrica é respaldada pela explanação de LUZ *et. al.* (2000), que explica que a heterogeneidade do tamanho dos indivíduos de *Hoplias lacerdae* e a insatisfação em relação às exigências nutricionais são um dos fatores que induzem o canibalismo. Portanto, a diferença de tamanho entre os peixes e a suspensão do alimento durante o experimento podem ter induzido a relação ecológica do canibalismo.

A bioindisponibilidade do chumbo nas etapas de renovação de acordo com as análises hídricas podem ser explicadas aderência do metal ao muco produzido

pelo peixe, como TAO (2000) que verificou em seu trabalho com *Carassius auratus* que quanto mais elevadas as concentrações de PbII as quais o peixe era exposto mais muco ele produzia. Por sua composição TAO (2000) considerou o muco como um ligante orgânico para o chumbo possuindo a capacidade de adsorver as partículas do metal presentes na coluna d'água. Contudo, outro trabalho com chumbo e filtros com fibras de vidro mostrou que os metais catiônicos foram bem adsorvidos pelo vidro e que em soluções com condições de águas naturais essa adsorção aumenta, diminuindo sua biodisponibilidade (FUHRMANN & FITTS, 2004), assim, o chumbo também pode ter sido adsorvido pelo vidro.

Os trabalhos sobre os efeitos das nanopartículas em organismos aquáticos são relativamente recentes, a primeira publicação foi no ano de 2004, mostrando a indução de estresse oxidativo ao cérebro de *Micropterus salmoides* pelo nanomaterial Fulereo C<sub>60</sub> (OBERDÖRSTER, 2004). Após este marco, muitos têm sido os experimentos com diversas nanopartículas manufaturadas, devido ao alto consumo e presença destas no ambiente aquático.

Dentre as publicações sobre as nanopartículas de dióxido de titânio há uma gama de resultados variados sobre a sua toxicidade, devido aos diferentes tratamentos e modelos experimentais aplicados, assim como, as diferentes características físico-químicas das NpTiO<sub>2</sub> (CLEMENTE *et. al*, 2012).

LEE, KIM e CHOI (2009) utilizaram a concentração de 1 mg/L de NpTiO<sub>2</sub> em um ensaio hídrico de 24 horas em 150 neonatos do microcrustáceo *Daphnia magna* e em 10 larvas do mosquito *Chironomus riparus* e não constataram genotoxicidade nem ecotoxicidade das nanopartículas para ambos os organismos.

Em um estudo *in vitro* com leucócitos de *Tursiops truncatus*, golfinhos nariz-de-garrafa, foram avaliadas a genotoxicidade e viabilidade de células expostas as concentrações de 20, 50 e 100 µg/ml de TiO<sub>2</sub> na forma rutilo e nas mesmas concentrações de TiO<sub>2</sub> na forma anatase com poucas partículas menores que 100 nm e sua maioria com alguns µm. Nas concentrações de 50 e 100 µg/ml foram observadas que ambas as formas, rutilo e anatase, induziram fragmentação do DNA havendo um aumento dos danos nos períodos de 24 e 48 horas, ocorrendo uma maior fragmentação após 24 horas e um leve declínio no período de 48 horas. Os autores explicam que essa diminuição pode ser relativa ao mecanismo de reparo do DNA. No teste de viabilidade celular percebeu-se que a porcentagem de células viáveis em 48 horas, 89,9%, diminuiu para 85,8% para o contaminante na forma

rutilo e para 71% no contaminante de forma anatase, o que evidencia o efeito genotóxico das  $\text{NpTiO}_2$  (BERNARDESCHI *et. al.*, 2010).

GOSH, BANDYOPADHYAY e MUKHERJEE (2010) analisaram a genotoxicidade das  $\text{NpTiO}_2$  em *Allium cepa* e *Nicotiana tabacum* nas doses de 0, 2, 4, 6, 8 e 10nM e em linfócitos humanos nas doses de 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,50; 1,75 e 2nM de  $\text{NpTiO}_2$  e *bulk*  $\text{TiO}_2$ . No EC de *A. cepa* ocorreu aumento nos danos do DNA atingindo um pico na dose de 4mM e em seguida houve decaimento dos danos até a dose mais alta. Em *N. tabacum* ocorreu o mesmo padrão tendo o pico de danos na dose de 2mM seguido pelo decaimento dos danos até a maior dose. Nos linfócitos o EC mostrou dano no DNA na dose mais baixa de  $\text{NpTiO}_2$  (0,25mM) e um efeito dose-dependente nas doses de *bulk*  $\text{TiO}_2$ . A  $\text{LC}_{50}$  observada no teste de viabilidade celular dos linfócitos foi de 1 e 1,25mM sendo que dos 93% das células do controle, apenas 82% e 85% eram viáveis nas maiores doses de  $\text{NpTiO}_2$  e *bulk*  $\text{TiO}_2$ , atestando a genotoxicidade das  $\text{NpTiO}_2$  tanto para plantas como para linfócitos humanos. Em um ensaio hídrico agudo de 5 dias com a espécie de peixe *C. auratus* expostos a 10 e 100mg/L de  $\text{NpTiO}_2$  foram observadas acúmulo de Ti no intestino e brânquias tendo maior acúmulo na maior concentração. Não houve acúmulo de Ti no tecido cerebral dos peixes e uma pequena parcela foi quantificada nos músculos. Os autores também observaram que na maior concentração houve anormalidades fisiológicas e mudanças de comportamento dos animais.

Em outro ensaio hídrico com peixes BOYLE (2013) utilizaram 1 mg/L de  $\text{NpTiO}_2$  e *bulk*  $\text{TiO}_2$  por 14 dias, os autores não observaram diferenças entres os diferentes tipos de  $\text{TiO}_2$ , nem aumento de Ti nos órgãos internos de *Oncorhynchus mykiss* exceto nas brânquias, onde havia 22 vezes mais Ti no tratamento com  $\text{NpTiO}_2$  e 31 vezes mais Ti no tratamento com *bulk*  $\text{TiO}_2$ .

Apesar das publicações sobre os efeitos das  $\text{NpTiO}_2$ , poucas relatam suas interações com outros compostos, como os metais, encontrados no ambiente aquático (ZHANG *et. al.*, 2010; ENGATES & SHIPLEY, 2011). É ainda menor o número de publicações sobre a interação das nanopartículas com metais em organismos aquáticos (SUN *et. al.*, 2007; ZHANG *et. al.*, 2007; SUN *et. al.*, 2009; HU *et. al.*, 2012; PAVAGADHI, SATHISHKUMAR e BALASUBRAMANIAN, 2014).

SUN *et al.* (2007) realizaram um ensaio hídrico crônico (25 dias) com *Cyprinus carpio* a fim de avaliar a bioacumulação do arsênio (0,2 mg As/L) na presença e ausência das  $\text{NpTiO}_2$  (10mg/L). Após o período de exposição além de

observar uma forte acumulação de  $\text{NpTiO}_2$ , as carpas também acumularam mais As na presença das nanopartículas no intestino, estômago e brânquias em todos os períodos (2,5,10 e 20 dias), no fígado e no músculo após 5, 10 e 20 dias e nas escamas e pele após o 10º dia. Isto levou os autores a concluir que as  $\text{NpTiO}_2$  podem ser responsáveis pela forte capacidade de adsorção do As e transporte facilitado deste metalóide. O mesmo procedimento foi realizado com o metal cádmio (0,1mg/L), e além do forte acúmulo de  $\text{NpTiO}_2$ , após 25 dias de exposição, também foram observados o aumento da concentração de cádmio na presença das nanopartículas em 146%, além de acúmulos significativos nos órgãos vitais e brânquias das carpas (ZHANG *et. al.*, 2007).

Em um ensaio agudo de 24 horas com *Ceriodaphnia dubia* foram realizados tratamentos com Pb em concentrações menores que 1,5 mg/L em pH 7,8 e pH 6,8, com  $\text{NpTiO}_2$  nas concentrações de 50, 100, 200, 500 e 1000mg/L e tratamentos com concentrações de Pb variando entre 0 e 4,5mg/L juntamente com 200mg/L de  $\text{NpTiO}_2$  ou 120mg/L de nanopartículas de cério ( $\text{NpCeO}_2$ ). Quando isoladas as nanopartículas não apresentaram toxicidade nem mortalidade, contudo na presença de Pb em concentrações menores que 200 mg/L elas apresentaram toxicidade significativa. A  $\text{LC}_{50}$  para o Pb sob pH 7,8 foi de 606  $\mu\text{g/L}$  e para pH 6,8 foi de 411  $\mu\text{g/L}$ , para a conjugação de Pb+ $\text{NpTiO}_2$  a  $\text{LC}_{50}$  foi de 98  $\mu\text{g/L}$  e para Pb+ $\text{NpCeO}_2$  foi 210  $\mu\text{g/L}$ , constatando o maior efeito tóxico das  $\text{NpTiO}_2$  em relação a  $\text{NpCeO}_2$  (HU *et. al.*, 2012)

No presente trabalho foi avaliado a genotoxicidade das  $\text{NpTiO}_2$  (100 mg/L) e do PbII (0,033 mg/L) isolados e em conjunto. O EC com tecido sanguíneo não mostrou diferença entre os controles negativo e positivo. O MMS é um agente alquilante e conhecido pelo seu potencial genotóxico (SUZUKI *et. al.*, 2005) sendo muito utilizado como modelo para análises dos efeitos de poluentes ambientais (OYA, 2013; KLINGELFUS, 2013; FABBENDER & BRAUNBECK, 2013). Uma explicação para a semelhança do perfil genotóxico entre os controles é a de que o MMS, neste ensaio, pode ter causado uma elevada taxa de citotoxicidade causando a morte das células sanguíneas durante o período de 24 horas, impossibilitando a avaliação da genotoxicidade nos eritrócitos, ou o MMS necessitaria de um tempo de exposição mais prolongado para causar danos ao DNA das células eritrocitárias e para isso há a necessidade de um ensaio piloto com diferentes concentrações do agente alquilante para uma visualização abrangente do que ocorreu.

No TMP e AMN não foram observadas diferenças nas frequências de micronúcleo e alterações morfológicas do núcleo entre os tratamentos. CLEMENTE *et. al.* (2013) expôs *P. mesopotamicus* (Pacu-caranha) às NpTiO<sub>2</sub> nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 mg/L sob ensaio agudo hídrico (96 horas). Após o período de exposição não foram encontrados micronúcleos nos eritrócitos e a frequência de AMN na concentração de 100mg/L não foi significativa em relação ao controle negativo, o que corrobora com o resultado constatado no presente trabalho. Resultados não significativos de TMP e AMN também ocorreram em *Hoplias malabaricus* (atual *H. intermedius*) contaminados com PbII nas doses de 7, 21, 63 e 100 µg/g através de injeções intraperitoneais (RAMSDORF *et. al.*, 2009) e na espécie *Rhamdia quelen* através da contaminação hídrica subcrônica semi-estática nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,10 mg/L de nitrato de chumbo (RAMSDORF *et. al.*, 2011) mostrando que o TMP e AMN pode não ser tão sensível em exposições agudas como o ensaio cometa demonstrando assim a importância da utilização de mais de um biomarcador.

Nas brânquias ocorreram maiores danos no DNA quando os peixes foram expostos as NpTiO<sub>2</sub> e a conjugação das NpTiO<sub>2</sub>+PbII. As brânquias estão em contato direto com o ambiente aquático, o que faz com que sejam órgãos-alvo para tóxicos presentes na água (SUN *et al.*, 2007). Durante a exposição de metais a quantidade de muco da superfície branquial aumenta (HANDY & EDDY, 1991) o que pode ter contribuído para a adsorção das nanopartículas (SUN *et al.*, 2007) resultando no maior dano do DNA nas células branquiais quando contaminadas com as NpTiO<sub>2</sub> e também com as NpTiO<sub>2</sub>+PbII.

Alguns trabalhos com *Hoplias malabaricus*, mostraram a indução de danos ao DNA em células sanguíneas e renais após contaminação por chumbo através de injeções intraperitoneais nas doses de 7, 21, 63 e 100µg de PbII/g. (RAMSDORF *et. al.*, 2009). Em estudos de contaminação trófica, utilizando 21µg de PbII/g, a partir da mesma espécie de peixe FERRARO *et. al.*(2004) e CESTARI *et. al.*(2004) observaram aumento de danos no DNA, por meio do Ensaio Cometa de eritrócitos, além de um aumento na frequência de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos ao utilizar o Teste do Micronúcleo Písceo após contaminação com 21µg de PbII/g e 0,3µg de TBT/g (FERRARO *et. al.*, 2004).

Em um ensaio hídrico com *Tilapia zillii* utilizando concentrações de 0,5; 1; 2 e 4 mg/L de Pb e cobre (Cu) foram observados os acúmulos dos metais nas

brânquias, fígado e músculo dos peixes após 14 dias de exposição, embora, o acúmulo de Pb no fígado tenha sido relativamente baixo quando comparado ao tecido branquial. Os autores alegam que tal fato pode estar ligado a indução de proteínas de ligação do chumbo no fígado, relacionadas com as metalotioneínas, e ainda afirmam que o acúmulo destes metais é dependente da concentração e do tempo de exposição (AY, KALAY e TAMER, 1999). SUIÇMEZ *et. al.* (2006) também observaram acúmulo de Pb em diferentes tecidos de *Oncorhynchus mykiss* após ensaio hídrico de 72 horas com concentrações de 0,1;1 e 10 mg/L. A maior concentração de Pb foi encontrada nas brânquias nos tratamentos de 0,1 e 10mg/L. Além do acúmulo os autores também observaram danos histopatológicos no fígado e nas brânquias e atestam que mesmo em baixas concentrações os metais pesados podem acumular nos tecidos, principalmente nas brânquias, rins e fígado quando permanecem no organismo ao longo do tempo.

Outro trabalho com Pb, Cd e Zn em exposição hídrica, por um período de 35 dias, utilizando *Misgurnus anguillicaudatus* mostrou danos ao DNA através do EC no hepatopâncreas do peixe. Foram utilizadas 0,05; 0,5 e 5mg/L de Cd, 0,5 e 5mg/L de Pb e Zn em tratamentos com os metais isolados e em conjugação. O hepatopâncreas apresentou danos significativos no DNA em todos os tratamentos tendo a porcentagem de DNA fragmentado aumentado durante o tempo de exposição, e quando em conjunto os três metais causaram danos mais severos ao material genético (ZHANG *et. al.*, 2008).

A células renais apresentaram maiores danos do DNA nos grupos expostos ao PbII, PbII+NpTiO<sub>2</sub> e NpTiO<sub>2</sub>. PATEL *et. al.* (2006) demonstrou acumulação significativa e tempo-dependente de PbII na concentração de 0,5 mg/L nos rins de *Oncorhynchus mykiss* após exposição hídrica por 3, 8, 24 e 96 horas. Através de análises fisiológicas os autores sugerem que o rim desempenha um importante papel no metabolismo e pode ser rota de excreção do chumbo, o que poderia explicar os maiores danos causados pelo PbII e PbII+NpTiO<sub>2</sub> no tecido renal de *H. intermedius* no presente trabalho.

Os grupos PbII+NpTiO<sub>2</sub> e NpTiO<sub>2</sub> causaram maiores danos no DNA das células cerebrais quando comparados ao controle negativo. Em um trabalho trófico com ratos utilizando NpTiO<sub>2</sub> e PbAc (acetato de chumbo) foi observado o acúmulo do titânio (Ti) e Pb além de danos histopatológicos nos tecidos renais, hepáticos e cerebrais dos animais. A co-exposição dos contaminantes aumentou o acúmulo de

Ti e Pb nos tecidos em relação aos contaminantes isolados e no tecido cerebral ocorreu a redução da atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase (ZHANG *et. al.*, 2010). Em um ensaio hídrico subcrônico (30 dias) utilizando 0,01; 0,03 e 0,1 mg/L de nitrato de chumbo RAMSDORF (2011) observou redução da atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro dos peixes *Astyanax sp.* na concentração de 0,03mg/L, o que apoia o aumento de danos causados nas células do tecido cerebral de *Hoplias intermedius*.

OYA (2013) utilizou a espécie *Rhamdia quelen* em um ensaio agudo (96 horas) via injeção intraperitoneal com 21 µg/g de PbII; 5, 50 e 500 ng/g de NpTiO<sub>2</sub> e associação dos contaminantes. Em células cerebrais e eritrocitárias, a menor dose de NpTiO<sub>2</sub> (5ng/g) se mostrou capaz de causar danos no DNA. A dose administrada de PbII não causou danos no tecido cerebral, a autora explica que provavelmente o contaminante estava em processo de metabolização dificultando a sua ação tóxica no período de 96 horas.

A falta de diferença significativa do grupo exposto ao PbII para os tecidos cerebrais e hepáticos em relação ao CN mostra que a concentração de PbII permitida pelo CONAMA 357 para águas de classe III não oferece danos sérios à *Hoplias intermedius* sob condições laboratoriais. Segundo SUN *et. al.* (2003) em altas concentrações metais não-essenciais, como o Pb, podem induzir a produção de radicais livres em quantidades muito pequenas porém podem afetar a atividade das endonucleases e polimerases o que também resulta em mutações no DNA. Apesar disto, mesmo em uma concentração baixa, o tecido renal apresentou notável sensibilidade ao PbII para a contaminação hídrica, o que demonstra que este tecido, de grande importância para a produção de células jovens por ser o tecido hematopoiéticos dos peixes, pode ser um tecido alvo para este metal.

## 6. CONCLUSÃO

Não foi constatada a sinergia do chumbo inorgânico com as nanopartículas de dióxido de titânio, contudo as NpTiO<sub>2</sub> apresentaram genotoxicidade nas células branquiais, renais e cerebrais e o chumbo inorgânico causou genotoxicidade no tecido renal.

Há necessidade de aumentar as análises com outros biomarcadores, como as análises nos eritrócitos corados com laranja de acridina e análises bioquímicas, a

fim de investigar melhor o potencial tóxico das nanopartículas de dióxido de titânio na concentração e no tipo de contaminação (hídrica) utilizada no presente trabalho.

## REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J. *et. al.* **Manufacture and use of nanomaterials:** current status in the UK and global trends. *Occupational Medicine*. v. 56, p. 300–306, 2006.

ARENZON, A., NETO, T.J.P. e GERBER, V. **Manual sobre toxicidade em efluentes industriais.** Porto Alegre – RS: CEP SENAI de Artes Gráficas Henrique d'Ávila Bertaso, 2011.

ASHARANI, P. V. *et. al.* **Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells.** *ACS NANO*, 2009.

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

AY, Ö; KALAY, L; TAMER, M.C. **Copper and Lead accumulation in tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na,K-ATPase Activity.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.62, n.2, p. 160-168, 1999.

BARBOUR, M. T. *et. al.* **Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers:** Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, 2 ed. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C., 1999. Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/monitoring/rsl/bioassessment/index.cfm>>. Acesso em: 20/1/2014.

BARAKAT, M. A. **Adsorption behavior of copper and cyanide ions at TiO<sub>2</sub>-solution interface.** *Journal of Colloid and Interface Science*. v. 291, p.345–352, 2005.

BARBOSA, J.S. *et. al.* **Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 73. p. 320–325, 2010.

BERMUDEZ, E. *et. al.* **Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles.** *Toxicology Science*. v. 77, p. 347–357, 2004.

BERNARDESCHI, M. *et. al.* **Genotoxic potential of TiO<sub>2</sub> on bottlenose dolphin leukocytes.** *Analytical and bioanalytical chemistry*, v.396, n.2, p. 619-623, 2010.

BOHRER, M. B. **Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do sistema de tratamento dos efluentes líquidos industriais (SITEL) do pólo petroquímico do sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplanctônica.** 470p. Tese (Doutorado em Ciências) - UFSCar, São Paulo, 1995.

BOYLE, D. *et. al.* **Subtle alterations in swimming speed distributions of rainbow trout exposed to titanium dioxide nanoparticles are associated with gill rather than brain injury.** *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), v.126, p. 116-127, 2013.

BRAYNER, R. *et. al.* **Toxicological Impact Studies Based on *Escherichia coli* Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium.** *Nano Letters*. v. 6, n. 4, p. 866-870, 2006.

BRUNAUER, S., EMMETT, P. H. e TELLER, E. **Adsorption of gases in multimolecular layers.** *Journal of the American Chemical Society* v.60, p.309–319, 1938.

BRUNNER, T. J. *et. al.* **In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility.** *Environmental Science Technology*.v.40, p. 4374-4381, 2006.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W. e ALVES-GOMES, J.A. **Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno.** *Acta Amazônica*, v. 36, p. 357-364, 2006.

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

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

CESTARI, M.M. *et. al.* **Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations.** *Genetics and Molecular Biology*. v. 27, n. 2, p. 270-274, 2004.

CHAMBO, A.P.S. **Bioindicadores para determinação de metais pesados no reservatório da Itaipu Binacional, Paraná, Brasil.** Dissertação para o programa de pós—graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2011. Disponível em: <[http://tede.unioeste.br/tede/tde\\_arquivos/8/TDE-2013-01-25T111419Z-873/Publico/Ana\\_Paula\\_Sartorio\\_Chambo.PDF](http://tede.unioeste.br/tede/tde_arquivos/8/TDE-2013-01-25T111419Z-873/Publico/Ana_Paula_Sartorio_Chambo.PDF)>. Acesso em: 23/1/2014.

CLEMENTE Z. *et. al.* **Ecotoxicology of nano-TiO<sub>2</sub>** — an evaluation of its toxicity to organism of aquatic ecosystems. *Environmental Research*, v.6, p.33–50, 2012.

CLEMENTE, Z. *et. al.* **Fish exposure to nano-TiO<sub>2</sub> under different experimental conditions:** Methodological aspects for nanoecotoxicology investigations. *Science of the Total Environment*, v.463-464, p.647 – 656, 2013.

CLEMENTE, Z. *et. al.* **Toxicity assessment of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions.** *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), v.147, p.129-139, 2014.

COLLINS, A.R., **The comet assay for DNA damage and repair.** *Molecular Biotechnology*, v.26:3, p. 249-261,2004.

COLLINS, A.R., *et.al.* **The comet Assay:** topical issues. *Mutagenesis*. v.23,3. p. 143-151, 2008.

COMPANY,R. *et. al.* **Source and impact of lead contamination on δ-aminolevulinic acid dehydratase activity in several marine bivalve species along the Gulf of Cadiz.** *Aquatic Toxicology*. v. 101. p. 146–154, 2006.

DELMOND, K.A. **Genotoxicidade e estresse oxidativo em *Astyanax serratus* (Characidae) expostos ao chumbo inorgânico (PbII) e nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) isolado e em associação.** 131 p. Dissertação de mestrado – Programa de pós-Graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/30136/R%20-%20D%20-%20KEZIA%20AGUIAR%20DELMOND.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 17/1/2014

ENGATES, K.E. & SHIPLEY, H.J. **Adsorption of Pb, Cd, Cu, Zn, and Ni to titanium dioxide nanoparticles: effect of particle size, solid concentration, and exhaustion.** *Environmental science and pollution research international*, v.18, n.3, p. 386-395, 2011.

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

FABBENDER, C. & BRAUNBECK, T. **Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of zebrafish (*Danio rerio*) by use of the comet assay and micronucleus test after in vivo exposure to methyl methanesulfonate.***Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v.91, n.1, p.89-95, 2013.

FENECH, M. **The in vitro micronucleus technique.***Mutation Research* v 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. *et. al.* **E. HUMN project:** detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* v 534, p 65-75, 2003.

FERNÁNDEZ, B. *et. al.* **Micronuclei and other nuclear Abnormalities in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) as Biomarkers of Cyto-genotoxic Pollution in Mediterranean Waters.***Environmental and Molecular Mutagenesis*. v. 52. p. 479-491, 2011.

FERRARO, M. V. M. *et. al.* **Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests.***Genetics and Molecular Biology*, v.27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FERRARO, M.V.M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos.** 176 p. Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em genética. Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2009. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/17868/TESE%20DOUTORADO%20MVf.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 15/1/2014.

FREIRE, M.M. *et. al.* **Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos.***Oecologia Brasiliensis*. v. 12, n.3, p.347-354, 2008.

FUHRMANN, M. & FITTS, J. P. **Adsorption of Trace Metals on Glass Fiber Filters.***Journal of Environment Quality*, v.33, n.5, p. 1943-1944, 2004.

GARCÍA-LESTÓN, J. *et. al.* **Genotoxic effects of lead: An updated review.** Environment International. v. 36, p.623–63, 2010.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M. e MUKHERJEE, A. **Genotoxicity of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes.** Chemosphere, v. 81, p.1253–1262, 2010.

GURR, J. *et. al.* **Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells.**Toxicology, v. 213, p. 66–73, 2005.

HANDY, R. D., & EDDY, F. B. **Effects of inorganic cations on Na<sup>+</sup> adsorption to the gill and body surface of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in dilute solutions.**Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v.48, p.1829–1837, 1991.

HANDY, R. D. *et. al.* **Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis.** Ecotoxicology. v. 17, p. 396–409, 2008a.

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

HEDDLE, J.A. **A rapid in vivo test for chromosome damage.**Mutation Research. v. 18, p.187-190, 1973.

HOLDREN, J.P. *et. al.***Report to the presidente and congresso on the fifth assessment of the national nanotechnology initiative.** Outubro de 2014.Disponível em :<[http://www.whitehouse.gov/sites/default/files/microsites/ostp/PCAST/pcast\\_fifth\\_nni\\_review\\_oct2014\\_final.pdf](http://www.whitehouse.gov/sites/default/files/microsites/ostp/PCAST/pcast_fifth_nni_review_oct2014_final.pdf)> . Acesso em: 10/11/2014.

HU, J. *et. al.* **Toxicity of lead on *Ceriodaphnia dubia* in the presence of nano-CeO(2) and nano-TiO(2).** Chemosphere, v.89, n.5, p.536-541, 2012.

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

KLINGELFUS, T. **Efeitos tóxicos de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e chumbo inorgânico (PbII) em *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2013. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/30519>>. Acesso em: 10/1/2014.

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

LEE, S.; KIM, S e CHOI, J. **Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure**. Environmental toxicology and pharmacology, v.28, n.1, p.86-91, 2009.

LINDBERG, H. K. *et. al.* **Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro**. Toxicology Letters, v.186, p.166–173, 2009.

LINS, J.A.P.N. *et. al.* **Uso de peixes como biomarcadores para o monitoramento ambiental aquático**. Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais. Curitiba. v. 8. n.4 p. 469-484,2010.

LUZ, R. K. *et. al.* **Avaliação de canibalismo e comportamento territorial de alevinos de trairão (*Hoplias lacerdae*)**. Acta Scientiarum, v.22, n.2, p.465-469, 2000.

MASCIANGIOLI, T. & ZHANG, W.-X. **Environmental technologies at the nanoscale**. Environmental Science e Technology, v.37, n.5, p.102–108, 2003.

MAYNARD, A. D. **Nanotechnology: The next big thing, or much ado about nothing?** The Annals of Occupational Higiene. v. 51, n. 1, p. 1–12, 2007.

MELA, M. *et. al.* **Mercury distribution in target organs and biochemical responses after subchronic and trophic exposure to neotropical fish *Hoplias malabaricus***. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, v.40, n.1, p.245-256, 2014.

MIRANDA, A.L.C. **Bioacumulação de poluentes organopersistentes (POPs) em traíra (*hoplias malabaricus*) e seus efeitos *in vitro* em células do sistema imune**

**de carpa (*Cyprinus carpio*)**. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2006. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/7833>>. Acesso em: 14/5/2014

MONTEIRO, V. A exposição aguda ao chumbo induz danos no DNA de vários tecidos do peixe *Prochilodus lineatus*. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em genética e biologia molecular, da Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, 2009. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000159979>. Acesso em: 14/12/2014.

NUNES, E.A.*et. al.* **Genotoxic assessment on river water using different biological systems**. *Chemosphere*.v.84. p.47-53, 2011.

OBERDÖRSTER, G. *et. al.* **Role of the alveolar macrophage in lung injury—Studies with ultrafine particles**. *Environmental Health Perspectives*. v. 97, p.193–199, 1992.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **Guideline for the Testing of Chemicals: Fish Acute Toxicity Test**. Test No. 203, 1992.

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

OBERDÖRSTER, G. *et al.* **Principles for Characterizing the Potential Human Health Effects from Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy**. *Particle and Fibre Toxicology*, v. 2, p. 1–8, 2005.

OYA, L.F. **Avaliação genotóxica em eritrócitos e tecido cerebral de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) após exposição aguda à Nanopartícula de Dióxido de Titânio (TiO<sub>2</sub>) e Chumbo Inorgânico Pb(II)**. Monografia para Bacharel em Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2013. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/32176>>. Acesso em: 24/2/2014.

OYAKAWA, O. T. & MATTOX, G. M. T. **Revision of the neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species**. *Neotropical Ichthyology*, v..7, n.2, p. 117-140, 2009.

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

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

PATEL, M. *et.al.* **Renal responses to acute lead waterborne exposure in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Aquatic Toxicology, v. 80, p. 362–371, 2006.

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

PAVAGADHI, S.; SATHISHKUMAR, M. e BALASUBRAMANIAN, R. **Uptake of Ag and TiO<sub>2</sub> nanoparticles by zebrafish embryos in the presence of other contaminants in the aquatic environment.** Water research, v.55, p.280-291, 2014.

PIMENTEL, L. C. F. *et. al.* **O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado.** Química Nova. v. 29. n.5. p. 1138-1149, 2006.

PLANQUETTE, P.; KEITH, P. e LE BAIL, P.Y. **Atlas des poissons d'eaud oucede Guyane (tome 1).** Collection du Patrimoine Naturel, IEGB-M.N.H.N., INRA,CSP, Min. Env., Paris.v.22, p. 166, 1996.

POSGAI, R. *et. al.* **Differential toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles on *Drosophila melanogaster* development, reproductive effort, and viability: Size, coatings and antioxidants matter.** Chemosphere, v. 85, p 34–42, 2011.

RAMSDORF, W. *et. al.* **Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*.** Enviromental and Monitoring Assessment. v.158. p. 77-85. 2009.

RAMSDORF, W. **Avaliação da Toxicidade dos Compostos Fipronil, Nitrato de Chumbo e Naftaleno em Peixes.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2011. Disponível em:<<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/27116>>. Acesso em: 14/12/2014.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.** 2nd edition. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis, 1125p.1995.

RESOLUÇÃO CONAMA 345/2005 – Disponível em:  
 <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em:  
 10/02/2014

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

RIBEIRO, V.E. **Avaliação da qualidade da água do Rio São Francisco no segmento entre Três Marias e Pirapora – MG:** metais pesados e atividades antropogênicas. Dissertação de Mestrado- Curso de pós-graduação em Geografia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2010. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/MPBB-89JFKJ>>. Acesso em: 15/5/2014.

ROSSI, S.C. **Estudo ecotoxicológico da exposição ao chumbo e à nanopartícula de dióxido de titânio em *Hoplias malabaricus*.** Tese de Doutorado – Programa de pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2013. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/31767>>. Acesso em: 8/1/2014.

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

SHAW, B. J.& HANDY, R.D. **Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions.** *EnvironmentInternational*, v.37, n.6, p.1083-1097, 2011.

SILVA, B. C. E. **Chumbo in:** Balanço mineral brasileiro. 2001. Disponível em: <<http://www.dnrm.gov.br/assets/galeriadocumento/balancomineral2001/chumbo.pdf>>. Acesso em: 17/1/2014.

SILVA, C. DA, *et. al.* **First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure.** *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology, v.57, n.1, p.141-147, 2011.

SINGH, N.P.*et. al.* **A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells.** *Experimental Cell Research*, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N. P. *et. al.* **NanoGenotoxicology:** the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, v. 30, p. 3891–3914, 2009.

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

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

SUIÇMEZ, M. *et. al.* **Copper and Lead Accumulation in Tissues of a Freshwater Fish *Tilapia zillii* and Its Effects on the Branchial Na,K-ATPase Activity.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.77, n.4, p.551-558, 2006.

SUN, D W. *et. al.* **Study on the hazards of heavy metals to fishes.** *Reservoir Fisheries*, v.23, p.4–6, 2003.

SUN, H.*et al.* **Enhanced Accumulation of Arsenate in Carp in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles.** *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 178, p. 245–254, 2006.

SUN, H. *et. al.* **Influence of titanium dioxide nanoparticles on speciation and bioavailability of arsenite.** *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, v.157, n.4, p.1165-1170, 2009.

SUZUKI, H. *et. al.* **Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats. A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS).** *Mutation Research*, v.583, n.2, p.133-145, 2005.

TAO, S. *et. al.* **Fish uptake of inorganic and mucus complexes of lead.** *Ecotoxicology and environmental safety*, v.46, n.2, p.174-180, 2000.

TUNDISI, J.G. **Recursos Hídricos. O futuro dos recursos.** *Multi Ciência*, 2003. Disponível em: <[http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_01/A3\\_Tundisi\\_port.PDF](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_01/A3_Tundisi_port.PDF)>. Acesso em: 20/1/2014.

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

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

VILLELA, I. *et. al.* **Bioensaios para o monitoramento de Genotoxicidade ambiental.** In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.). Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance, c.7, p.147-160, 2003.

ZAGATTO, P.A.&BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações.** 2 ed. São Paulo – SP, Brasil. Editora Rima, 2006.

ZHANG, X. *et. al.* **Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles.**Chemosphere. v. 67. p. 160–166. 2007.

ZHANG, Y. *et. al.* **Effects of heavy metals Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on DNA damage of loach *Misgurnus anguillicaudatus*.** Frontiers of Biology in China, v.3, n.1, p. 50-54, 2008.

ZHANG, R. *et. al.* **Acute toxicity study of the interaction between titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in mice.**Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 30, p. 52–60, 2010.

ZHU, X. *et. al.* **Acute Toxicities of Six Manufactured Nanomaterial Suspensions to *Daphnia magna*.**Journal of Nanoparticle Research, v. 11, p. 67–75, 2009.

ZHU, X.; CHANG, Y. e CHEN, Y. **Toxicity and Bioaccumulation of TiO<sub>2</sub> Nanoparticle Aggregates in *Daphnia magna*.**Chemosphere, v. 78, n. 3, p. 209–215, 2010.