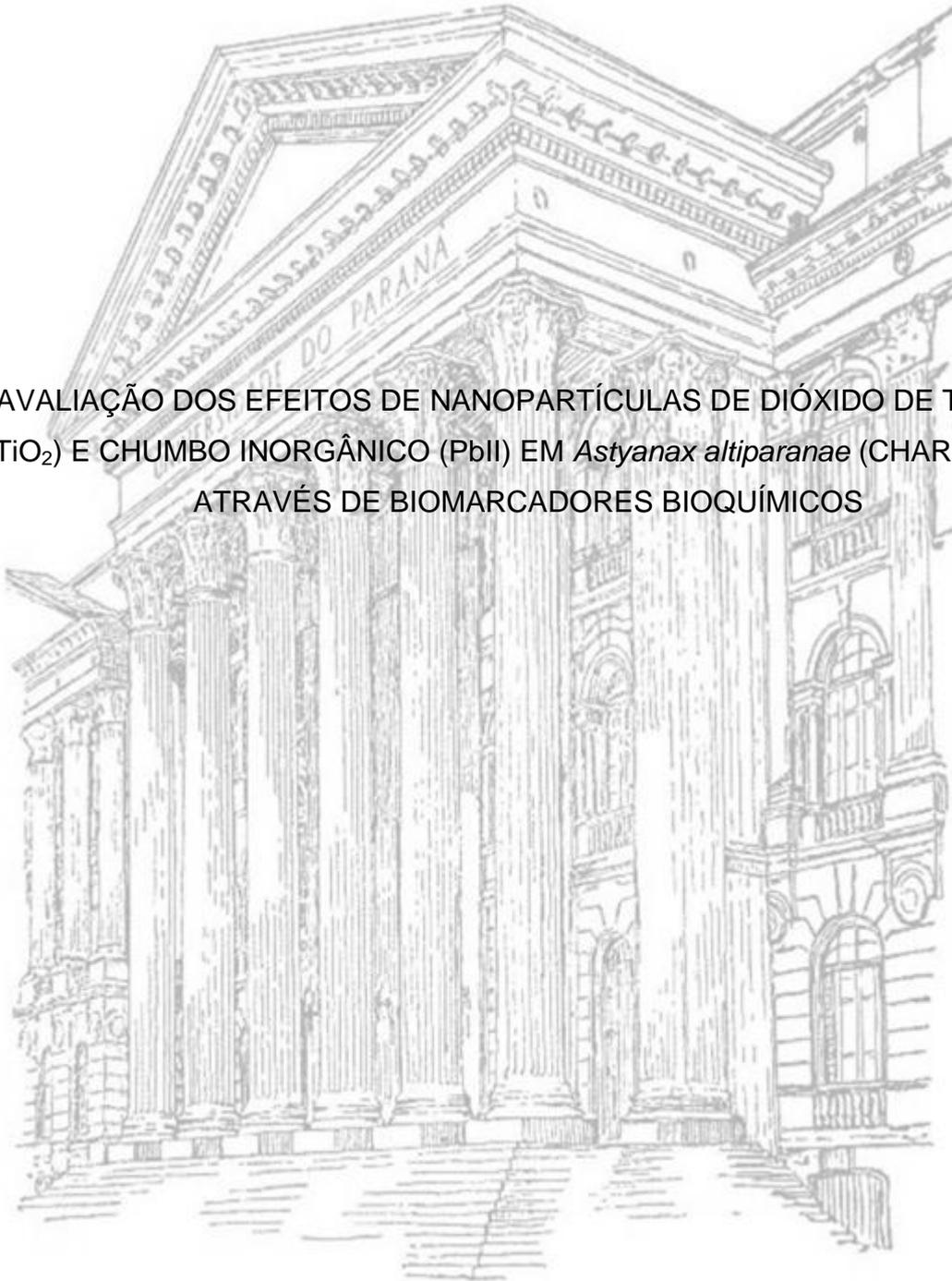


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA SAMPAIO MONTEIRO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO
(TiO₂) E CHUMBO INORGÂNICO (PbII) EM *Astyanax altiparanae* (CHARACIDAE)
ATRAVÉS DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS



CURITIBA

2015

PATRICIA SAMPAIO MONTEIRO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO
(TiO₂) E CHUMBO INORGÂNICO (PbII) EM *Astyanax altiparanae* (CHARACIDAE)
ATRAVÉS DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Cristina da Silva de
Assis

Co-Orientadora: Doutoranda Letícia Da Silva Pereira

CURITIBA

2015

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da minha vida, por me dar forças e cuidar providencialmente de todas as minhas necessidades para que eu chegasse aonde cheguei.

Ao amor da minha vida Fernando, por toda compreensão e paciência, sempre me apoiando, sendo meu alicerce em todos os momentos.

À minha família, por todo cuidado, amor e compreensão por estarem comigo em todos os momentos difíceis. Eu não teria chegado até aqui sem vocês.

À Helena, minha orientadora, pela oportunidade, orientação e paciência que tornaram este trabalho possível.

À Leticia, minha co-orientadora, por me ensinar com toda paciência e dedicação, pelas palavras de apoio e tranquilizadoras.

A todas as meninas do laboratório de Toxicologia Ambiental, por me receberem tão bem no grupo, por todos os ensinamentos, dicas, palavras de incentivo, por toda a ajuda direta na monografia.

À Nicolly e Maristela, pela amizade, companheirismo, paciência, segurando as pontas com as Daphnias no Tecpar, sempre me incentivando e me ajudando quando eu precisava.

Às minhas amigas da graduação, por todos os momentos vividos durante esses últimos anos. Em especial à Marina, por todas as conversas, gargalhadas, por todos os estudos e trabalhos desesperados nos finais de semana e madrugada, por me apoiar nos momentos mais difíceis e sempre se preocupando comigo e me ajudando.

Ao Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental pela a colaboração neste trabalho.

Patricia

RESUMO

Devido à poluição ambiental, os organismos aquáticos se encontram expostos a uma diversidade de compostos químicos. Sabe-se que o chumbo e as nanopartículas de dióxido de titânio são poluentes aquáticos e podem ser simultaneamente encontrados neste ambiente. Aliás, já foi observado que nanopartículas metálicas possuem uma superfície mais reativa, podendo adsorver em suas superfícies outros poluentes, como por exemplo, íons metálicos, que consequentemente são liberados dentro da célula ocasionando efeitos tóxicos. Com base nisso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos do chumbo inorgânico (PbII) e da nanopartícula de dióxido de titânio (NPTiO₂), na espécie de peixe *Astyanax altiparanae* através de biomarcadores bioquímicos. Para isto, exemplares de *A. altiparanae* foram contaminados via injeção intraperitoneal nas concentrações de 2,1 mg/Kg de chumbo inorgânico (PbII), 5 ng/g e 500 ng/g de nanopartículas de dióxido de titânio, ambos isolados e combinados com água destilada e a associação entre contaminantes (PbII+Np). Um grupo controle (CN) foi mantido sob as mesmas condições. Após 96 horas, os peixes foram eutanasiados, e seus tecidos (fígado e cérebro) retirados para a realização das análises. Os biomarcadores bioquímicos avaliados foram a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) cerebral, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GST), além da análise da lipoperoxidação (LPO) no fígado. Os resultados, mostraram um aumento na atividade da AChE cerebral para os grupos tratados com 500 ng/g de NPTiO₂, assim como a associação de 5ng/g de NPTiO₂ mais PbII. No tratamento com 500 ng/g de NPTiO₂ a atividade da SOD foi reduzida em relação ao grupo controle. Porém, não foi observada diferença significativa na atividade da CAT e nem da LPO para ambos contaminantes isolados e combinados. O grupo tratado com o PbII isolado e combinado com as duas concentrações de NPTiO₂ apresentou um aumento da atividade da GST. Pode se concluir que, o Chumbo e as nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂), isolados e combinados não se mostraram neurotóxico, assim como também não ocasionaram danos oxidativos no tecido hepático.

Palavras-chave: Chumbo inorgânico, nanopartículas de dióxido de titânio, biomarcadores bioquímicos.

ABSTRACT

Due to the environmental pollution, the aquatic organisms are exposed to a variety of chemical compounds. It is known that lead and titanium dioxide nanoparticles are water pollutants and can simultaneously be found in this environment. It has already been observed that metallic nanoparticles have a reactive surface. They can adsorb other pollutants in their surfaces, such as metal ions, which eventually are released into the cell causing toxic effects. The aim of this study was to evaluate the possible toxic effects of inorganic lead (PbII) and titanium dioxide nanoparticle (NPTiO₂) in fish species *Astyanax altiparanae* through biochemical biomarkers. *A. altiparanae* specimens were contaminated by intraperitoneal injection with concentrations of 2.1 mg/kg of inorganic lead (PbII), 5 ng/g and 500 ng/g titanium dioxide nanoparticles, both isolated and combined with water distilled and the association between contaminants (PbII + NPTiO₂). A control group was maintained under the same conditions. After 96 hours fish were euthanized and their tissues (liver and brain) removed for the analyzes. Biochemical biomarkers evaluated were enzymes activities of acetylcholinesterase (AChE) in the brain, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST), as well as lipid peroxidation (LPO) in the liver. Results showed, an increase in brain AChE activity for groups treated with 500 ng/g NPTiO₂, as well as with the association of 5 ng/g NPTiO₂ and PbII. In the treatment with 500 ng/g NPTiO₂ the SOD activity was reduced compared to the control group. Therefore it was not observed significant difference in CAT activity no and in the LPO for both contaminants isolated and associated. The group treated with isolated and combined PbII with the both NPTiO₂ concentrations showed an increase in GST activity. It can be concluded that, lead and titanium dioxide nanoparticles (NPTiO₂), isolated or combined showed no neurotoxicity, as well as did not cause oxidative damage to the liver tissue.

Key-words: inorganic lead, titanium dioxide nanoparticles, biochemical biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Exemplar de *Astyanax altiparanae* (Characidae).

FIGURA 2 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) hepática de *Astynax altiparanae*.

FIGURA 3 – Atividade da catalase (CAT) hepática de *Astynax altiparanae*.

FIGURA 4 – Atividade da glutatona S-transferase (GST) hepática de *Astynax altiparanae*.

FIGURA 5 – Peroxidação lipídica (LPO) hepática de *Astynax altiparanae*.

FIGURA 6 - Atividade da acetilcolinesterase (AChE) cerebral de *Astynax altiparanae*.

LISTA DE SIGLAS

- ACh** - acetilcolina
- AChE** - acetilcolinesterase
- ATC** - iodeto de acetiltiocolina
- CAT** - catalase
- ChE** - colinesterase
- BSA** - soro albumina bovina
- CYP 450** - Citocromo P450
- CDNB** - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
- DTNB** - 5,5-ditio-bis-2nitro-benzoato
- ERO** - espécies reativas de oxigênio
- GPx** - glutationa peroxidase
- GSH** - glutationa reduzida
- GST** - glutationa S-transferase
- HCl** - ácido clorídrico
- H₂O₂** - peróxido de hidrogênio
- LPO** - peroxidação lipídica
- NP** - nanopartículas
- NPTiO₂** - nanopartícula de dióxido de titânio
- OMS** - Organização Mundial da Saúde
- PbII** - Chumbo Inorgânico
- SOD** - superóxido dismutase
- ZnO** - Oxido de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	METAIS.....	11
1.1.1	Chumbo (PbII).....	12
1.2	NANOPARTÍCULAS	13
1.2.1	Nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO ₂).....	13
1.3	NANOPARTÍCULAS E METAIS.....	14
1.4	BIOINDICADORES	15
1.4.1	<i>Astyanax altiparanae</i>	15
1.5	BIOMARCADORES	16
1.5.1	Biomarcadores bioquímicos	17
1.5.1.1	Biotransformação e estresse oxidativo	17
1.5.1.2	Danos oxidativos	19
1.5.1.3	Neurotoxicidade.....	20
2	OBJETIVO.....	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	22
3.2	ANÁLISES DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	23
3.2.1	Preparação das amostras	23
3.2.2	Quantificação de proteínas totais	24
3.2.3	Acetilcolinesterase (AChE).....	24
3.2.4	Superóxido-dismutase (SOD).....	25
3.2.5	Catalase (CAT).....	25
3.2.6	Glutathione S-transferase (GST).....	25
3.2.7	Lipoperoxidação (LPO)	26

3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
4	RESULTADOS	27
4.1	Superóxido dismutase (SOD).....	27
4.2	Catalase (CAT)	28
4.3	Glutathione S-transferase (GST).....	29
4.4	Peroxidação lipídica (LPO).....	30
4.5	Acetilcolinesterase (AChE).....	31
5	DISCUSSÃO.....	32
6	CONCLUSÃO.....	36
7	REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

Desde o início da civilização o homem busca satisfazer suas necessidades, apropriando-se e alterando o meio ambiente e seus recursos. Nos últimos séculos devido ao aumento da densidade populacional e às altas produções na indústria e agricultura, a geração de resíduos tóxicos em quantidade prejudicial ao meio ambiente e sua disposição, aumentou consideravelmente nos ecossistemas aquáticos (ARIAS *et al.*, 2007; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

O despejo de efluentes industriais e domésticos sem o devido tratamento, os processos agrícolas e os derramamentos acidentais de compostos químicos, contribuem drasticamente para a contaminação dos cursos d'água. Tendo em vista que, muitos destes compostos são extremamente complexos, formados por diversos componentes prejudiciais ao ambiente aquático, como metais pesados, agrotóxicos e compostos orgânicos (FENT, 2004; FREIRE *et al.*, 2008).

Tal fonte de poluição pode causar grandes danos à qualidade da água e a toda biota que dela depende, incluindo o homem (FREIRE *et al.*, 2008). Esses agentes tóxicos são capazes de interagir com os organismos, afetando mecanismos celulares, ocasionando inúmeras alterações podendo gerar desequilíbrios ecológicos dependendo do grau de impacto e do tempo de exposição (COGO *et al.*, 2009).

Dessa maneira, o interesse do homem pela questão ambiental, e sua preocupação com a preservação e manutenção da qualidade do ecossistema aquático tem aumentado gradativamente nas últimas décadas. Sendo assim, um dos maiores desafios nesta questão é o conhecimento dos efeitos relacionados a exposições simultâneas a diferentes contaminantes. Tendo em vista que os contaminantes não se encontram isolados no ambiente, bem como não são absorvidos isoladamente pelos organismos. Desta forma, sabe-se que os organismos aquáticos se encontram expostos a uma diversidade de compostos químicos com associações do tipo antagônicas e/ou sinérgicas (ROSSI, 2014; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

1.1 METAIS

Os metais são naturalmente encontrados no ambiente, e em pequenas quantidades nos organismos. Sendo zinco, ferro, manganês, cobre, cobalto e molibdênio metais essenciais para os processos fisiológicos de plantas e animais, mas que podem apresentar toxicidade aos organismos quando em altas concentrações. Enquanto outros metais, como cádmio, chumbo e mercúrio não possuem função biológica conhecida e podem ser tóxicos mesmo em quantidades relativamente pequenas (KLINGELFUS, 2014).

Os metais compõem uma classe importante de poluentes, e estão entre os contaminantes mais encontrados na água, podendo derivar do descarte incorreto de resíduos, efluentes industriais, rejeitos de mineração e pela utilização de agrotóxicos (CARVALHO *et al.*, 2000; MACEDO e SIPAÚBA-TAVARES, 2005; PEREIRA, 2014).

Nos ecossistemas aquáticos, os metais podem estar presentes em diferentes formas: livre e dissolvida; complexada pela matéria orgânica dissolvida; complexos solúveis, na fração de lipídeos presentes na água; adsorvidos, nas partículas coloidais e nos particulados orgânicos e inorgânicos suspensos na água; e insolubilizada, usualmente como sulfetos e carbonatos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

A toxicidade dos metais deve-se principalmente à sua capacidade de interferir em reações enzimáticas: bloqueando grupos funcionais essenciais na atuação de uma biomolécula; deslocando íons necessários e modificando a conformação de sítios ativos de proteínas e enzimas. Além de disso, os metais podem sofrer naturalmente metilação, originando os chamados compostos organometálicos. Estes compostos tendem a ser lipossolúveis, o que facilita a entrada na célula através da membrana biológica (ROSSI, 2014). Outro agravante com os metais é que estes não são degradáveis pelo sistema biológico, de maneira que podem acumular-se nos organismos, gerando uma grande preocupação quanto à sua toxicidade (YADAV e TRIVED, 2009).

1.1.1 Chumbo (PbII)

Devido às suas propriedades físicas e químicas o chumbo é um metal com ampla utilização industrial há milhares de anos, onde se tornou um dos contaminantes mais comuns (MOREIRA e MOREIRA, 2004). Embora sua utilização esteja restrita e até banida de algumas indústrias de alguns países, sua contaminação global, resultante das atividades humanas, ainda é significativa (ATSDR, 2007; SCHIFER *et al.*, 2005). Segundo Paoliello (2007) no Brasil as principais indústrias consumidoras de chumbo são as indústrias de baterias automotivas, seguidos das indústrias de pigmentos e o setor eletroeletrônico (solda e ligas).

A distribuição e o comportamento do chumbo no ambiente, bem como o seu potencial de absorção e toxicidade aos organismos depende de suas formas físicas e químicas (inorgânicas e orgânicas) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008). Os organismos aquáticos podem assimilar e acumular altas concentrações de chumbo presente na água e no sedimento. Sendo que a forma orgânica desse elemento (chumbo metilado) é mais lipofílico, sendo absorvido e acumulado mais prontamente (BURATINI e BRANDELLI, 2006). Nos peixes, o chumbo acumula-se principalmente nas brânquias, fígado, rins e ossos (SCHIFER *et al.*, 2005).

Sabe-se que o chumbo é considerado neurotóxico e nefrotóxico e com efeitos deletérios ao sistema cardiovascular e hematológico (ATSDR, 2007). Altas doses de PbII ocasionam danos no sistema nervoso central, rins e sangue, podendo levar a morte. PbII em doses baixas, ocasiona efeitos na síntese do grupamento heme e outros processos bioquímicos, ou então prejudicando funções neurocomportamentais e psicológicas, sendo reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos elementos químicos mais perigosos à saúde humana (ROSSI, 2013; SCHIFER *et al.*, 2005).

1.2 NANOPARTÍCULAS

Com o avanço da nanotecnologia, as nanopartículas também já são encontradas no ambiente aquático (PASCHOALINO *et al.*, 2010). As nanopartículas apresentam sua estrutura na escala de 1 a 100 nanômetros (nm) e estão agrupadas de acordo com sua composição química (KLINGELFUS, 2014). Por sua singularidade em propriedades físico-químicas, como a sua grande capacidade de penetração e sua área de superfície, as nanomoléculas são muito atrativas em tecnologias industriais e medicinais, porém, as características que fazem as nanopartículas interessantes para a tecnologia podem ser um problema quando estas são lançadas no meio ambiente (QUINA, 2004; PASCHOALINO *et al.*, 2010).

Pouco se sabe sobre o potencial de impacto das nanopartículas ao ambiente e aos organismos aquáticos. Sendo que a preocupação com relação a sua toxicidade ocorre principalmente pelo fato de que estas atualmente estão sendo produzidas e utilizadas em produtos comerciais em larga escala, e o risco de alcançarem os diferentes compartimentos ambientais (atmosfera, águas e solo) e se tornarem biodisponíveis é real, tornando a sua presença no meio aquático um risco (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

A internalização celular de nanopartículas ocorre principalmente por endocitose mediada por proteínas presentes na membrana celular, sendo que partículas com 50 nm de tamanho são mais rapidamente internalizadas comparando com partículas menores (abaixo de 14 nm) e maiores (até 500 nm) (CHITHRANI *et al.*, 2006; PASCHOALINO *et al.*, 2010).

1.2.1 Nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂)

Segundo The Project on Emerging Nanotechnologies (2015) dentre os diferentes tipos de nanopartículas, os nanometais como prata (Ag), zinco (Zn), titânio (Ti) e seus óxidos têm sido amplamente utilizados em diversas áreas. As nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂), investigadas neste trabalho, estão

presentes em tintas, materiais de construção, protetores solares, cosméticos, xampus, materiais de limpeza, bactericidas, equipamentos eletrônicos e equipamentos esportivos. Considerando a vasta gama de utilização das NPTiO₂, sua presença no meio ambiente é inevitável, aumentando a preocupação com seu potencial de toxicidade aos organismos e seu impacto ambiental. Por esta razão, vários estudos sob a toxicidade dessa nanomolécula estão sendo realizados, embora os resultados ainda sejam inconclusivos ou contraditórios (ZHANG *et al.*, 2010; CLEMENTE, 2013; KLINGELFUS, 2014; ROSSI 2014).

Em mamíferos, estudos demonstraram que as nanopartículas de TiO₂ podem se acumular em fígado, rim, baço, pulmão, coração e cérebro (LI *et al.*, 2010). E que a absorção NPTiO₂ em organismos terrestres se deve principalmente pela inalação ou ingestão (BRIGGER *et al.*, 2002). Em peixes NPTiO₂ têm sido relatadas como não tóxicas, embora efeitos subletais sejam observados, principalmente relacionado ao estresse oxidativo e inflamação (CLEMENTE, 2013), sendo que a rota de entrada nos animais aquáticos parece ser a absorção direta pelas brânquias e pela superfície epitelial.

1.3 NANOPARTÍCULAS E METAIS

Sabe-se que a absorção de metais é mediada por transportadores de íons da membrana celular (BURY e HANDY, 2010). Enquanto que a maior parte das nanopartículas é internalizada por endocitose, ou através de proteínas de membrana associadas às caveolas (PANYAM *et al.*, 2003; REJMAN *et al.*, 2004). Além disso, já foi observado que nanopartículas metálicas possuem uma superfície mais reativa, podendo adsorver em suas superfícies outros poluentes, como por exemplo, íons metálicos, que conseqüentemente são endocitados junto a elas, e uma vez dentro da célula são liberados ocasionando danos (HURT *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2009), como demonstrado em estudos com *Cyprinus carpio*, onde a bioacumulação de cádmio (ZHANG *et al.*, 2007) e de arsênio (SUN *et al.*, 2009) aumentou na presença de NPTiO₂.

1.4 BIOINDICADORES

Para avaliar os impactos ambientais ocasionados pelos contaminantes é necessário observar os efeitos que estas substâncias causam nos organismos aquáticos. Desta forma, o uso de uma espécie bioindicadora pode ser útil para determinar o impacto ocasionado pelos contaminantes. Bioindicador é o termo empregado para designar uma espécie sentinela que indica mais rapidamente os efeitos causados por contaminantes, em comparação com altos níveis de organização, como populações ou comunidades (ADAMS, 2002). Peixes são ótimos bioindicadores, pois em bioensaios apresentam uma resposta similar a dos mamíferos, podem ser mantidos em laboratório e expostos a xenobióticos, além de representarem um dos maiores vetores de contaminação para os seres humanos, já que são utilizados na alimentação (SILVA *et al.*, 2003).

1.4.1 *Astyanax altiparanae*

Astyanax altiparanae, espécie que foi utilizada como bioindicador no presente estudo, é um peixe nativo que apresenta ampla distribuição geográfica, importância ecológica e valor econômico. *A. altiparanae* pertence à ordem Characiformes, grupo dominante dentre os peixes de água doce da América do Sul e à família Characidae, a maior e a mais complexa desta ordem (BRITSKI *et al.*, 2007). Esta espécie é conhecida popularmente como lambari-tambiú, lambari-de-rabo-amarelo ou lambari-relógio, se distribui principalmente na bacia do Rio Paraná, e também nas bacias do Rio Iguaçu, Rio Paranapanema e Rio Tibagi, sendo uma espécie restrita ao sudeste do Brasil (GALVAN, 2011). São peixes de pequeno porte, atingem em média 10 cm de comprimento apresentam o corpo prateado, com a região ventral esbranquiçada e a região dorsal cinzenta, as nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando os lobos superior e inferior. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (GARUTTI & BRITSKI, 2000) (FIGURA1).



FIGURA 1: Exemplar de *Astyanax altiparanae* (Characidae).
FONTE (GALVAN, 2011)

Astyanax altiparanae apresenta capacidade de ajuste a diversas situações ambientais e grande capacidade adaptativa exploratória (ORSI *et al.*, 2004). Além disso, apresenta papel central na cadeia trófica, constituindo uma parte significativa da dieta de diversos peixes, e sendo também consumida por seres humanos (ORSI *et al.*, 2004; GALVAN, 2011).

1.5 BIOMARCADORES

Biomarcador é definido como uma alteração na resposta biológica (que pode ser desde uma resposta molecular, efeitos celulares e fisiológicos até mudanças comportamentais) de determinado organismo, indicando um desvio no seu “*status normal*” (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Sendo uma forma de identificação precoce de alterações ambientais, que auxilia na tomada de decisões, evitando ou reduzindo danos ambientais (SILVA DE ASSIS, 1998; SILVA, 2007).

A razão mais importante para a utilização de biomarcadores é que eles podem dar informação sobre os efeitos biológicos de poluentes, em vez de apenas a quantificação dos compostos, podendo fornecer informações sobre os potenciais mecanismos de efeitos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008). Existem diversos tipos de biomarcadores que podem ser mensurados como, por exemplo, a expressão de uma proteína ou de alguma atividade catalítica (biomarcadores bioquímicos), uma

alteração morfológica em nível tecidual (biomarcadores morfológicos), celular e até molecular (biomarcadores genéticos) (WALKER *et al.*, 1996).

1.5.1 Biomarcadores bioquímicos

Esses biomarcadores possuem grande importância toxicológica, pois indicam o *status* do organismo em níveis menores de organização celular apresentando uma resposta rápida ao estresse (HUGGETT *et al.*, 1992; VAN DER OOST *et al.*, 2003)

Alguns dos biomarcadores bioquímicos mais utilizados são as enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos e seus metabólitos, e enzimas do sistema antioxidante. Em peixes, como nos demais vertebrados, o fígado é o órgão mais comumente envolvido na desintoxicação desses compostos (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

1.5.1.1 Biotransformação e estresse oxidativo

Quando em contato com contaminantes o organismo pode eliminá-lo por excreção na sua forma original ou então biotransformá-lo. (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Assim, a biotransformação é uma forma do organismo alterar a atividade biológica do composto e conseqüentemente cessar a interação entre este e a célula (ROSSI, 2013). Assim a biotransformação visa reduzir a toxicidade de substâncias, convertendo compostos lipofílicos em estruturas hidrofílicas, que são mais passíveis de eliminação, utilizando assim um complexo sistema enzimático (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008), que podem ter suas atividades induzidas ou inibidas por xenobióticos. (HANG *et al.*, 2004)

A biotransformação apresenta duas fases, chamadas de fase I e fase II. As reações da fase I são catabólicas (oxidação, redução, hidrólise), gerando muitas vezes metabólitos reativos ou tóxicos. As principais enzimas envolvidas nesta

reação são as monooxigenases e heme proteínas, sendo as enzimas do CYP450 (Citocromo P450) heme proteínas que metabolizam compostos lipofílicos em hidrofílicos (GUILOSKI,2014). Na fase II as reações são anabólicas, e envolvem conjugação, que normalmente resultam em produtos inativos embora haja exceções (HANG 2004)

A enzima glutathione S-transferase (GST), pertence a fase II, onde é responsável pela conjugação de componentes eletrofílicos (ou metabólitos da fase I) com a glutathione reduzida (GSH). A GST pertence a uma família de isoenzimas multigênicas diméricas, que se caracterizam pela sua ampla especificidade ao substrato com baixa afinidade. Além de suas funções essenciais no transporte intracelular e a biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas, também desempenha um papel de defesa contra danos oxidativos ao DNA e lipídeos (VAN DER OOST *et al.*, 2003). A atividade desta enzima pode ser indiretamente associada ao estresse oxidativo, uma vez que ela utiliza como cofator o GSH, que também participa da degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ROSSI, 2013).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são compostos capazes de reagir com moléculas orgânicas e macromoléculas celulares críticas, podendo levar a inativação de enzimas (VAN DER OOST *et al.*,2003). Durante os processos metabólicos elas são normalmente produzidas pelas células, entretanto, sob condições normais as enzimas do sistema antioxidante reparam 99% dos danos causados pela oxidação (VALAVANIDIS, 2006). Quando um organismo se encontra em um ambiente com muitos poluentes, seus processos metabólicos de desintoxicação aumentam, podendo formar altos níveis de metabólitos, que conseqüentemente elevam os níveis de EROs ocasionando o que é chamado de estresse oxidativo (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Estresse oxidativo é a condição em que há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a remoção destas por meio dos sistemas de defesa antioxidante. Ocasionalmente aumento ou diminuição na atividade dos sistemas enzimáticos de proteção (VALAVANIDIS, 2006). Algumas das enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), e este sistema ainda conta com fatores não enzimáticos como a glutathione reduzida (GSH).

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima responsável pela degradação do radical livre superóxido (O_2^-), através de sua dismutação, produzindo

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). A atividade desta enzima evita que ocorram reações destes radicais livres com constituintes celulares, ou então que estes ânions venham a gerar novos radicais livres de alta reatividade, como o OH^- (hidroxil), que podem reagir com lipídios e proteínas, causando danos celulares. Porém, o produto dessa reação é uma ERO (H_2O_2) que pode causar diversos danos celulares. Desta forma, o H_2O_2 , por sua vez, será degradado pela catalase (CAT) ou pela glutathiona peroxidase (GPx). (GUILOSKI, 2014; PEREIRA, 2014)

A catalase (CAT) é uma enzima encontrada nos peroxissomos das células. Esta enzima contém o grupo heme, o que facilita a degradação do H_2O_2 , formando como produtos oxigênio e água (VAN DER OOST *et al.*, 2003). A CAT é encontrada em todas as células aeróbicas, com altos níveis no fígado, rim e eritrócitos, e baixos níveis no tecido conjuntivo e cérebro (CHEN, 2003)

1.5.1.2 Danos oxidativos

Quando a célula sofre com o estresse oxidativo um grande número de efeitos bioquímicos e fisiológicos podem ocorrer, como danos em estruturas celulares, inativação de enzimas, carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica, danos de DNA e até morte celular, sendo que estes danos também podem ser utilizados como biomarcadores (VAN DER OOST *et al.*, 2003; VALAVANIDIS, 2006).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é um importante biomarcador bioquímico, pois através dela podemos mensurar danos causados pelo estresse oxidativo (STEGEMAN *et al.*, 1992). O processo de peroxidação lipídica que é a oxidação dos ácidos graxos insaturados de membranas mediada por radicais livres, é uma reação em cadeia, que demonstra a capacidade de uma única espécie de radical em propagar uma série de reações bioquímicas deletérias (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Desta forma, quando um radical livre interage com o ácido graxo insaturado da membrana celular, ele sequestra prótons (H^+) produzindo radicais lipídicos que conseqüentemente, irão reagir com moléculas de O_2 , que são abundantes nas regiões de membrana, gerando um radical peroxila, que novamente irá sequestrar um novo átomo de H^+ de um novo ácido graxo formando hidroperóxido e um novo radical lipídico, que continuará a reação em cadeia

(VALAVANIDIS, 2006). A consequência deste processo é a perturbação nas interações lipídicas, que levam a alterações estruturais das biomembranas e das lipoproteínas e a formação de espécies reativas de oxigênio, que podem induzir a modificação secundária de outros constituintes da membrana (GIROTTI, 2002).

1.5.1.3 Neurotoxicidade

As enzimas utilizadas como biomarcadores de neurotoxicidade são as colinesterases (ChE). Há dois tipos de colinesterases: a butirilcolinesterase (BuChE ou BChE), e a acetilcolinesterase (AChE) (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Estas enzimas se diferenciam pela sua localização e concentração numa mesma espécie, também pela sua afinidade ao substrato, e na velocidade de degradação deste (SILVA DE ASSIS, 1998). Peixes possuem a AChE somente no cérebro, enquanto no músculo ambas são encontradas (STURM *et al.*, 2000).

A AChE é uma enzima encontrada no tecido nervoso, responsável pela propagação do impulso nervoso. Ela está envolvida na desativação da acetilcolina (ACh), hidrolisando esse neurotransmissor em ácido acético e colina, regulando assim a transmissão dos impulsos nervosos, prevenindo que ocorra um estímulo contínuo do neurônio (STURM *et al.*, 2000; VAN DER OOST *et al.*, 2003). A inibição da atividade desta enzima causa um acúmulo de ACh nas fendas sinápticas, causando uma hiper excitação no organismo, podendo levá-lo à morte (NUNES *et al.*, 2014).

A atividade da ChE é muito utilizada para diagnosticar exposição a tóxicos anticolinesterásicos em peixes, e pode ser considerada um dos mais antigos biomarcadores (STURM, *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2013). Apesar da inibição da colinesterase ser um biomarcador específico de exposição aos inseticidas, organofosforados e carbamatos, estudos relatam que efeitos semelhantes de inibição ou até mesmo de aumento da atividade destas enzimas podem ser observados na exposição a metais pesados como o chumbo, porém a concentração necessária para promover esse efeito é relativamente mais alta (STURM *et al.*, 2000; LIONETTO *et al.*, 2003; FRASCO *et al.*, 2005; NUNES *et al.*, 2011; RICHETTI *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2013).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos tóxicos do chumbo inorgânico (PbII) e da nanopartícula de dióxido de titânio (NPTiO₂), na espécie de peixe *Astyanax altiparanae* através de biomarcadores bioquímicos

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar os efeitos do chumbo inorgânico (PbII) e nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂) isolada e associada com chumbo inorgânico na atividade enzimática da AChE cerebral para verificar neurotoxicidade em *Astyanax altiparanae*;
- Avaliar efeitos do chumbo inorgânico (PbII) e nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂) isolada e associada com chumbo inorgânico em enzimas do tecido hepático: superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) e peroxidação lipídica (LPO), para verificar danos oxidativos, em *Astyanax altiparanae*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi uma colaboração do Laboratório de Toxicologia Ambiental, do Departamento de Farmacologia com o Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental do Departamento de Genética, ambos da Universidade Federal do Paraná. Para o desenvolvimento do mesmo a autorização do Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, foi aprovada sob o certificado número 791.

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Exemplares de *Astyanax altiparanae* foram aclimatados durante 60 dias, com fotoperíodo de 12 h e alimentados diariamente com ração comercial no Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, no Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

As nanopartículas de dióxido de titânio (NpTiO₂) anatase (Sigma-Aldrich®) foram diluídas em água destilada nas concentrações de 5 ng/g e 500 ng/g. A homogeneização foi feita por 6 horas. Antes de aplicar a injeção nos animais, as soluções passaram por um ciclo de sonicação com duração de 30 minutos. A solução de Chumbo (PbII) foi preparada com a diluição de PbII (Vetec®) em água destilada, na concentração de 21 mg/Kg.

A contaminação foi feita por injeção intraperitoneal. Os peixes foram anestesiados e pesados, para calcular a dose a ser injetada em cada animal. Durante o experimento os peixes foram mantidos em aquários de 20L, com aeração constante e sem alimentação. Foram utilizados 12 exemplares por grupo, que foram subdivididos em: grupo de controle negativo (com duas injeções de água destilada), grupos contaminados com as duas diluições de NpTiO₂ (5 ng/g e 500 ng/g) mais água destilada, grupo contaminado com PbII (21 mg/Kg) mais água destilada e grupos contaminados com a associação de NpTiO₂ com PbII, totalizando 5 grupos, como segue descrito na tabela 1.

TABELA 1: DISPOSIÇÃO DOS GRUPOS E DOSAGEM DOS CONTAMINANTES TESTADOS

Grupo / experimento	injeção intraperitoneal – 96 horas
CN	Controle negativo (duas injeções de água destilada)
Pb+A	21 mg/kg PbII e água destilada
Np1+A	5ng/g de NPTiO ₂ e água destilada
Np2+A	500ng/g de NPTiO ₂ e água destilada
Np1+Pb	5ng/g de NPTiO ₂ e 21 mg/kg PbII
Np2+Pb	500ng/g de NPTiO ₂ e 21 mg/kg PbII

Após 96 horas da contaminação, os animais foram anestesiados em água contendo benzocaína diluída em etanol a 10%, pesados e medidos. Imediatamente eles foram eutanasiados por secção da medula espinhal e com uma incisão a partir do poro urogenital até a nadadeira peitoral os órgãos de interesse (fígado, cérebro) foram retirados e armazenados a -80°C.

3.2 ANÁLISES DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

A análise dos biomarcadores bioquímicos foi realizada no Laboratório de Toxicologia Ambiental, no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

3.2.1 Preparação das amostras

As amostras de cérebro foram homogeneizadas numa proporção de 1:10 (peso:volume) em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5 com auxílio de micro-homogeneizador. O homogenato foi centrifugado por 20 minutos à 10 .000 x g à 4º C. O sobrenadante foi aliqotado para as análises da concentração de proteínas totais e atividade da acetilcolinesterase (AChE).

As amostras do fígado foram pesadas, e uma porção (\pm 20 mg) de cada amostra foi homogeneizada numa proporção de 1:10 (peso:volume) em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 com auxílio de micro-homogeneizador. O

homogenato foi centrifugado por 30 minutos à 15.000 x g à 4° C. O sobrenadante foi aliqotado para as análises das atividades enzimáticas da glutathiona S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), lipoperoxidação (LPO) e concentração de proteína.

3.2.2 Quantificação de proteínas totais

Para cada amostra de cérebro e fígado foi quantificada a concentração de proteínas totais de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Em microplaca foram adicionados 10 µl de cada amostra diluída em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 na proporção de 1:20 (v/v), seguidos de 250 µl do reativo Bradford diluído na proporção de 1:5, as análises foram realizadas em triplicata. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 595 nm. Como curva padrão foi utilizado BSA (soro de albumina bovina), nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 0 µg/mL.

3.2.3 Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE cerebral foi realizada segundo o método de Ellman et al. (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). O princípio deste método é o desenvolvimento de uma reação colorimétrica (amarela) entre o ATC (iodeto de acetiltiocolina) e o DTNB (5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato) na presença da AChE presente no tecido. Sendo assim, as amostras foram diluídas na proporção 1:4 (v/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5. Em microplaca, 50 µL de cada amostra diluída foram pipetados e em seguida, 200 µL de DTNB (0,75 mM) e 50 µL de ATC (9 mM). A leitura da atividade da AChE foi realizada durante 3 minutos em intervalos de 15 segundos em espectrofotômetro a 405 nm.

3.2.4 Superóxido-dismutase (SOD)

Para a análise da atividade da SOD, no fígado, foi utilizado o método proposto por Gao et al. (1998) que se baseia na capacidade da SOD em inibir a auto oxidação do pirogalol. As amostras de fígado foram diluídas na proporção 1:10 (v/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0. Em microtubos foram adicionados 40 μL de amostra diluída mais 885 μL de tampão Tris/EDTA (1 M/ 5mM pH 8,0) e 50 μL de pirogalol (15 mM). A solução foi incubada protegida da luz por 30 minutos. A reação foi interrompida com 25 μL de HCl 1N. Na microplaca foram adicionadas 300 μL da solução reação, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 440 nm. Simultaneamente foi realizado um controle por amostra com adição dos reagentes, porém sem incubação.

3.2.5 Catalase (CAT)

A cinética da catalase hepática foi avaliada pelo método de Aebi (1984), que se baseia no consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exógeno pela CAT, gerando água e oxigênio com decréscimo gradual na absorbância que pode ser medido por espectrofotometria com comprimento de onda de 240 nm. As amostras foram diluídas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. Na microplaca foram pipetados 5 μL de amostra seguido de 295 μL de solução reação (Tampão Tris-base 1M/EDTA 5 mM, pH 8,0, H_2O_2 20 mM e água MiliQ). A leitura foi realizada durante um minuto em intervalos de 15 segundos.

3.2.6 Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida segundo o método descrito por Keen, Habig e Jakoby (1976), baseado na catalisação da reação de conjugação do substrato 1-

cloro- 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutationa reduzida (GSH) pela GST, formando um tio éter. As amostras de fígado foram diluídas na proporção 1:5 (v/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. Na microplaca foram adicionados 20 µL de amostra diluída, seguido de 180 µL de solução reação – composta por GSH (3 mM), CDNB (3 mM) em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,5. A leitura foi realizada a cada 15 segundos durante 3 minutos em espectrofotômetro a 340 nm.

3.2.7 Lipoperoxidação (LPO)

A análise da LPO foi realizada através da avaliação da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio *FOX (Ferrous Oxidation/ Xylenol Orange Method)*, proposto por Jiang *et al.* (1992). O método consiste na oxidação do ferro, mediada pela presença de peróxidos em meio ácido. Para tanto, as amostras de fígado foram diluídas em metanol na proporção 1:1(v/v), e centrifugadas por 5 minutos a 10.000 x g a 4° C. Em seguida 100 µL do sobrenadante foi pipetado em microtubos e incubados por 30 minutos com 900 µL da solução reação (contendo laranja de xilenol (0,1mM), H₂SO₄ (25 mM), BHT (4 mM), sulfato ferroso amoniacal (2,5 mM) em metanol P.A.). A leitura foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa estatístico *GraphPad Prism 5.0*. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados normais foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média. O limite de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Superóxido dismutase (SOD)

No grupo Np2+A a atividade da SOD foi reduzida em relação ao controle, enquanto nos demais não houve diferença significativa em relação ao controle. Ainda, o grupo Np2+A teve sua atividade reduzida em relação à associação Np2+Pb, porém entre os grupos Np1+A e Np1+Pb não houve diferença. Também, nos grupos associados (Np+Pb) não houve diferença na atividade da SOD em relação ao Pb isolado (Pb+A) (FIGURA 2).

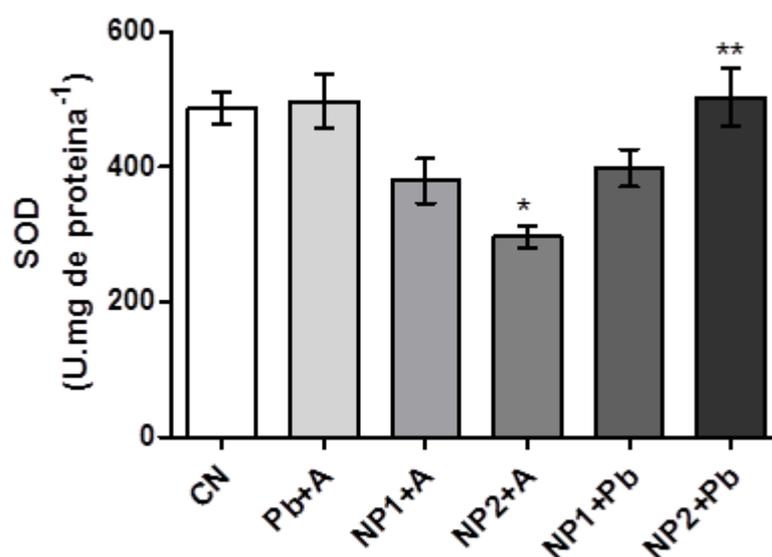


FIGURA 2: Atividade da superóxido dismutase (SOD) hepática de *Astyanax altiparanae*. * indicam diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; ** representa diferença dos grupos associação em relação ao grupo do contaminado com sua respectiva concentração de NPTiO₂ isolada (Np1+A vs. Np1+Pb e Np2+A vs. Np2+Pb) ($p < 0,05$). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística empregada, ANOVA, Bonferroni.

4.2 Catalase (CAT)

Neste estudo não foram observadas alterações na atividade da CAT para nenhum grupo testado quando comparado ao grupo controle ou para os grupos com os contaminantes isolados e associados (FIGURA 3).

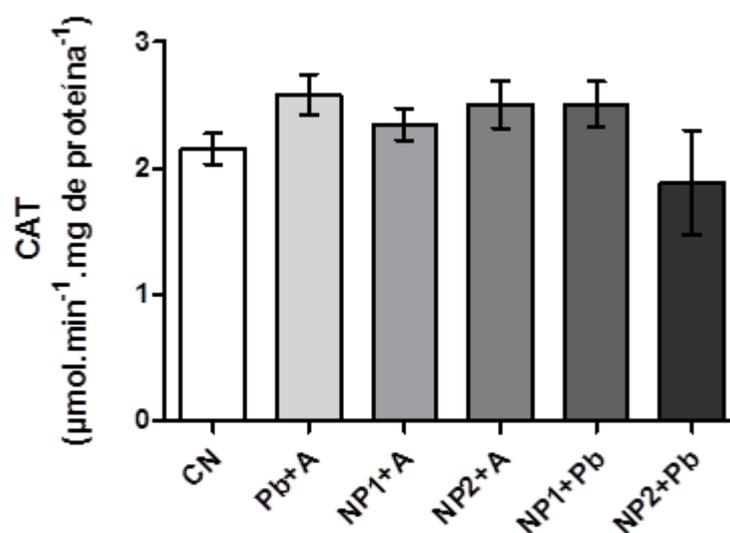


FIGURA 3: Atividade da catalase (CAT) hepática de *Astyanax altiparanae*. Comparação entre os tratamentos. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística empregada, ANOVA, Bonferroni.

4.3 Glutathione S-transferase (GST)

Observou-se um aumento na atividade da GST para o grupo Pb+A, Np1+Pb e Np2+Pb em relação ao grupo controle. Porém, os grupos Np1+A e Np2+A não demonstraram diferença na atividade desta enzima em comparação ao grupo controle. Não houve diferença na atividade da GST quando comparado o grupo Pb+A em relação aos grupos Np1+Pb e Np+Pb. Nos grupos Np1+Pb e Np2+Pb observou-se um aumento na atividade da GST em comparação com os grupos tratados com Np1+A e Np2+A (FIGURA 4).

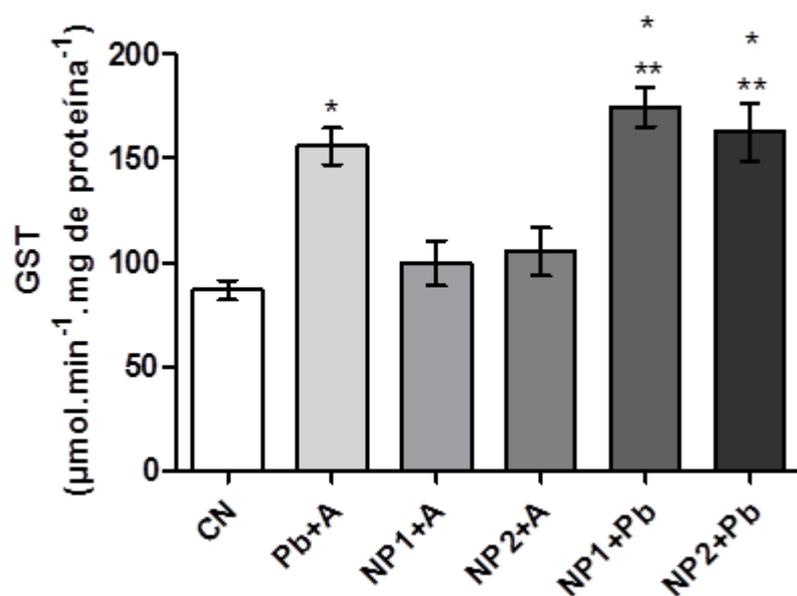


FIGURA 4: Atividade da Glutathione S-Transferase (GST) hepática de *Astyanax altiparanae*. * indicam diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; ** representa diferença dos grupos associação em relação ao grupo do contaminado com sua respectiva concentração de NPTiO₂ isolada (Np1+A vs. Np1+Pb e Np2+A vs. Np2+Pb) ($p < 0,05$). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística empregada, ANOVA, Bonferroni.

4.4 Peroxidação lipídica (LPO)

Neste estudo não foi observada diferença significativa na lipoperoxidação entre os grupos testados e grupo controle e nem entre os grupos com os contaminantes isolados e associados (FIGURA 5).

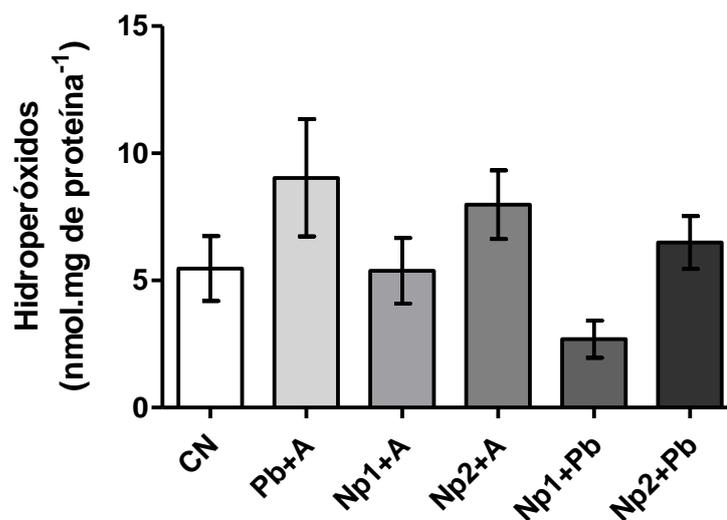


FIGURA 5: Peroxidação lipídica (LPO) hepática em *Astyanax altiparanae* Comparação entre os tratamentos. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística empregada, ANOVA, Bonferroni.

4.5 Acetilcolinesterase (AChE)

Não foi observado alteração na atividade da AChE para o tratamento Pb+A, Np1+A e Np2+Pb quando comparada ao grupo controle. Entretanto, os grupos Np2+A e Np1+Pb apresentaram um aumento na atividade da AChE em relação ao grupo controle. O grupo Np1+Pb também apresentou um aumento na atividade da AChE quando comparado com Pb+A e com Np1+A. Também foi observado um aumento na atividade da AChE no grupo tratado com a Np2+A em relação ao grupo Np1+A. Não houve diferenças na atividade da AChE entre os tratamentos Np1+Pb e Np2+Pb (FIGURA 6).

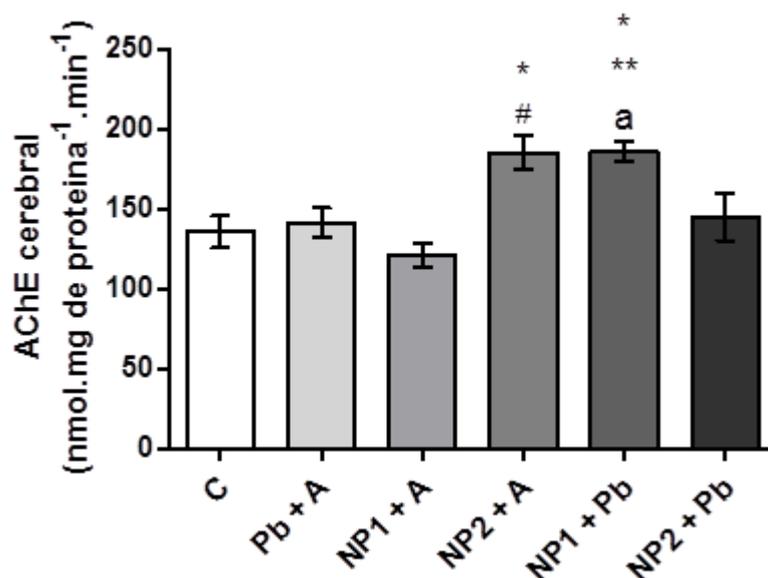


FIGURA 6: Acetilcolinesterase (AChE) cerebral de *Astyanax altiparanae*. * indicam diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; ** representa diferença ($p < 0,05$) dos grupos associação em relação ao grupo do contaminado com sua respectiva concentração de NPTiO₂ isolada (Np1+A vs. Np1+Pb e Np2+A vs. Np2+Pb); (#) indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos com concentrações de NPTiO₂ isoladas; (a) representa diferença ($p < 0,05$) entre os grupos tratados isoladamente com Pb e NPTiO₂. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística empregada, ANOVA, Bonferroni.

5 DISCUSSÃO

Vários estudos demonstram que o caráter eletrofílico do chumbo pode levar a interações com grupos SH de proteínas, afetando sua função e desregulando processos importantes como metabolismo de outras substâncias, funções neurais e parâmetros de estresse oxidativo levando ao dano oxidativo (peroxidação lipídica) (MAITY et al., 2008; DAI et al. 2010; MAITI et al., 2010; KLINGELFUS, 2014; NUNES et al., 2014; ROSSI, 2014;).

Neste estudo, a contaminação com o 21 mg/Kg de PbII não alterou a atividade da SOD e CAT, bem como a LPO, indicando que este composto nesta concentração, no tempo e via de exposição estudados não foi capaz de induzir estresse oxidativo em *Astyanax altiparanae*. Da mesma forma, Rossi, (2013) não encontrou alterações na atividade da SOD no tecido hepático de *Hoplias malabaricus* exposto ao chumbo nas concentrações de 0,1 mg/Kg, 1 mg/Kg e 10 mg/Kg, porém para a CAT as concentrações de 1,0 mg/kg e 10 mg/Kg de PbII causaram um aumento da atividade da enzima. Nunes (2014) observou que atividade da CAT hepática diminuiu após a exposição crônica ao chumbo em *Scophthalmus maximus*, nas concentrações de 300 µg/L e 2700 µg/L de PbII. Em contraste com nosso resultado, Klingelfus (2013) observou aumento da atividade da SOD em *Rhamdia quelen*, após uma dose 21 mg/Kg de PbII. Apesar da ausência de alterações das enzimas do sistema antioxidante frente ao chumbo, sabe-se que a exposição a este metal pode resultar respostas biológicas como o estresse oxidativo, pois diversos estudos relatam que os peixes expostos a metais pesados podem ter um aumento ou redução em enzimas antioxidante (LIONETTO et al, 2003; FRASCO et al., 2005; RICHATTI et al., 2011; SOUID et al., 2014).

Ainda com relação ao grupo 21 mg/Kg de PbII, a atividade da GST aumentou em relação ao grupo controle. Rossi (2013) também observou aumento na atividade da GST para a sua maior concentração de chumbo testada (10 mg/Kg). Assim como Nunes (2014) que notou um aumento na atividade da GST na concentração de 300 µg/L, ao contrário de Klingelfus (2014) que observou uma inibição na atividade da GST para a dose de 21 mg/Kg.

O fígado é um órgão bastante susceptível à NPTiO₂, apresentando acúmulo deste composto e alterações enzimáticas (KLINGELFUS, 2014). Hao et al. (2009)

observou em *Cyprinus carpio* alterações nas enzimas antioxidantes e aumento de peroxidação lipídica, causando necrose e apoptose e promovendo patologias hepáticas. Em ratos, contaminados via injeção intraperitoneal durante 14 dias, o fígado também demonstrou ser mais susceptível à acumulação de NPTiO₂ (LI et al., 2010). Cui et al., (2010) demonstram diminuição da expressão gênica de enzimas e proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, como a SOD, CAT, GST e MT (metalotioneína) em tecido hepático de ratos expostos à NPTiO₂ nas doses de 10 e 50 mg/Kg, porém para a concentração de 5 mg/Kg não apresentou efeitos. Em outro estudo feito com ratos contaminados com 5 mg/kg de NPTiO₂ foi observado elevada quantidade de TiO₂ no fígado, porém foram detectados efeitos tóxicos, e os autores sugerem que em doses baixas, NPTiO₂ podem ser utilizadas de forma segura (FABIAN et al., 2008).

Neste estudo, o grupo tratado somente com 5 ng/g de NPTiO₂ (Np1+A) não sofreu alterações na atividade da SOD, CAT, GST e na LPO, indicando que esta concentração de NPTiO₂ não foi capaz de promover estresse oxidativo no tecido hepático de *Astyanax altiparanae*. Em contraste com nosso estudo, Klingelfus (2014) observou a ocorrência de estresse oxidativo em *Rhamdia quelen*, por meio da diminuição da atividade da CAT e GST para a mesma dosagem e tempo de exposição.

Entretanto, o grupo tratado com 500 ng/g de NPTiO₂ (Np2+A) apresentou redução da atividade da SOD, porém não foram observadas alterações na atividade da CAT, GST e na LPO. Estes resultados indicam uma provável geração de radicais livres, que o sistema antioxidante da *Astyanax altiparanae* foi eficiente em eliminar, pois não houve dano, como observado pela ausência de alteração da LPO. Klingelfus (2014), com a mesma concentração de NPTiO₂ observou o aumento na atividade da SOD em *Rhamdia quelen*, também mostrando que pode ter ocorrido estresse oxidativo, mas que da mesma forma observada em nosso trabalho, não houve dano celular.

Embora a toxicidade dos compostos individuais possa ser bem conhecida, a sua presença simultânea pode induzir efeitos tóxicos ocasionando interações sinérgicas e antagônicas. Sendo que, os efeitos da associação da NPTiO₂ e PbII sobre organismos vivos ainda são desconhecidos (ZHANG et al., 2010).

Neste trabalho, a combinação de 5 ng/g de NPTiO₂ e 500 ng/g de NPTiO₂ com o PbII 21 mg/Kg (Np1+Pb e Np2+Pb) não apresentou efeito nas enzimas SOD

e CAT e nem na LPO. Porém a GST teve um aumento na sua atividade em ambos os grupos. A mesma dose utilizada neste trabalho de NPTiO₂ mais PbII (500 ng/g de NPTiO₂ combinado com o PbII 21 mg/Kg), tratada por injeção intraperitoneal em *Rhamdia quelen*, ocasionou um aumento da atividade da SOD, porém as enzimas CAT e GST, não mostraram efeitos (KLINGELFUS, 2014). Em *Hoplias malabaricus* expostos por via trófica à combinação de PbII 0,1 mg/Kg e 150 µg/Kg de NPTiO₂ houve um aumento da atividade da CAT. Já uma concentração mais elevada de PbII (10 mg/Kg) combinada com (150 µg/Kg) NPTiO₂ levou a um aumento na atividade da GST (ROSSI, 2014).

De modo mais amplo pode-se observar que entre as enzimas do sistema antioxidante hepático, testadas neste estudo, somente a SOD apresentou resposta à dose de 500 ng/g de NPTiO₂, sendo ela reduzida quando comparada ao grupo controle e ao grupo combinado com PbII (Np2+Pb). Este fato indica uma provável ocorrência de estresse oxidativo na célula de *Astyanax altiparanae*. Vários estudos corroboram com este resultado, demonstrando alteração na atividade da SOD pelas NPTiO₂ (ZHANG et al., 2010; KLINGELFUS, 2014; ROSSI 2014).

Neste estudo, observou-se que os grupos tratados com o PbII isolado ou combinando com as NPTiO₂ apresentaram um aumento na atividade da GST. E que os grupos tratados somente com as NPTiO₂ não apresentaram alterações na atividade desta enzima. Indicando que possivelmente, o aumento da atividade da GST foi ocasionada pela presença do chumbo. O aumento da atividade de GST tem sido relatada na literatura tanto para as NPTiO₂ (MAITY et al., 2008; KLAPER et al., 2009) como para o PbII (KIM et al., 2010; NUNES et al., 2014) e a combinação de ambos (ROSSI, 2014; KLINGELFUS 2014).

Como biomarcador de neurotóxicidade a atividade da AChE foi avaliada, onde não se observou efeitos causados pelo chumbo, na dose administrada. Por outro lado, a combinação de 5 ng/g NPTiO₂ e PbII (Np1+Pb) foi capaz de aumentar os níveis da atividade enzimática, sendo que os dois contaminantes isolados não apresentaram alterações na AChE. Evidências do efeito neurotóxico do chumbo por meio da redução da atividade da AChE é relatada por Lima et al., (2013) e Reichetti et al., (2011) em peixe-zebra (*Danio rerio*), assim como por outros trabalhos (LIONETTO et al., 2003; FRASCO et al., 2005; NUNES et al., 2011).

Além disso, em relação às NPTiO₂, a dose de 500 ng/g NPTiO₂ (Np2+A) causou um aumento na atividade da AChE em relação ao grupo controle e ao grupo

de menor concentração de NPTiO₂ (Np1+A). Contrário a este resultado, um estudo *in vitro* testou a absorção e inibição da AChE por diferentes nanopartículas, inclusive a NPTiO₂ na concentração de 800 mg/L⁻¹ e observou que aproximadamente 30% da nano foi absorvida ocasionando inibição da AChE (WANG *et al.*, 2009). Porém, os efeitos da associação do chumbo e nanopartículas na atividade da AChE não estão descritos na literatura, sendo necessário a realização de mais estudos.

6 CONCLUSÃO

- Chumbo e as nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂), isolados e combinados não se mostraram neurotóxicos, assim como também não ocasionaram danos oxidativos no tecido hepático;
- Nestas condições a associação de NPTiO₂ com o Pb não foi capaz de potencializar os efeitos dos compostos isolados.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, S. M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, p 644, 2002.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v 105, p 121-126, 1984.

AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v 6(1), p 1-13, 2003.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI R.; BAPTISTA D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v 12, n1, p 61-72, 2007.

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

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v 72, p 248-254, 1976.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. 2 ed, EMBRAPA, Brasília, p. 227, 2007.

BURY, N.R.; HANDY, R.D. Copper and iron uptake in teleost fish. In: BURY, N.R.; HANDY, R.D.; editors. Surface chemistry, bioavailability and metal homeostasis in aquatic organisms: An integrated approach. Essential Reviews in Experimental Biology, v. 2, **Society for Experimental Biology Press**, London, UK, p. 107-127, 2010.

CARVALHO, C. E. V.; FARIA, V. V.; CAVALCANTE, M. P. O.; GOMES, M. P.; REZENDE, C.E. Distribuição de Metais Pesados em Peixes Costeiros Bentônicos da Região de Macaé, R.J., Brasil. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, v. 3, n 2, p 64-68, 2000.

CHEN, X.; LIANG, H.; REMMEN, H.V.; VIJG, J.; RICHARDSON, A. Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v 422, n 2, p 197-210, 2004.

CHITHRANI, B.D.; GHAZANI, A.A.; CHAN, W.C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. **Nano Letters**, v. 6, p 662-668, 2006.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V.L.; FEITOSA, O.L.; LIMA, R.; JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N.; FRANCETO, L.F. Fish exposure to nano-TiO₂ under diferente experimental conditions: Methodological aspects for nanoecotoxicology investigations. **Science of the Total Environment**, v 463, p. 647-656, 2013.

CUI, Y.; GONG, X.; DUAN, Y.; LI, N.; HU, R.; LIU, H.; HONG, M.; ZHOU, M.; WANG, L.; WANH, H.; HONG, F. Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v 183, p 874-880, 2010.

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

DA SILVA, M.D. **Biomonitoramento de uma reserva particular do patrimônio natural (RPPN) através da aplicação de biomarcadores bioquímicos, morfológicos e genéticos em *Astynax sp.*** Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DAI, W.; FU, L.; DU, H.; LIU, H.; XU, Z. Effects os montmorillonite on Pb accumulation, oxidative stress, and DNA damage in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to dietary Pb. **Biological Trace Element Research**, v 136, p 71-78, 2010.

ELLMANN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDREAS, V. J.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FABIAN, E.; LANDSIEDEL, R.; MA-HOCH, L.; WIENCH, K.; WOHLLEBEN, W.; RAVENZWAAY, B. V. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. **Archives of Toxicology**, v 82, p 151 – 157, 2008.

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

FERREIRA, M.; CAETANO, M.; COSTA, J.; POUSÃO-FERREIRA, P.; VALE, C.; REIS-HENRIQUES, M. A. Metal accumulation and oxidative stress responses in, culture and wild, White seabream from Northwest Atlantic. **Science of The Total Environment**, v 407, p 638-646, 2008.

FRASCO, M. F.; FOURNIER, D.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. **Biomarkers**, v 10, n 5, p 360 – 375, 2005.

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

GALVAN, G. L. **Avaliação genotóxica de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino e pesquisa utilizando como bioindicador o peixe *Astyanax altiparanae* (CHARACIDAE)**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Paraná, 2011.

GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; Gao, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v 45, n 1, p 41-45, 1998.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia**, PUC RS, Série Zoologia, Porto Alegre, v 13, p 65-88, 2000.

GIROTTI, A. W. Introduction to serial reviews on regulatory and cytoprotective aspects of lipid hydroperoxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v 33, n. 2, p 153, 2002.

GUILOSKI, I.C. **Efeitos bioquímicos, genéticos, hematológicos, morfológicos e reprodutivos dos micropoluentes diclofenaco e paracetamol em *Rhamdia quelen* (PISCES, TELEOSTEI)**. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

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

HANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p 159-161, 2004.

HAO, L.; WANG, Z.; XING, B. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Environmental Sciences**, v 21, p 1459-1466, 2009.

HELLOU, J.; ROSS, N.W.; MOON, T.W. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. **Environmental Science and Pollution Research**, v 19, p. 2007-2023, 2012.

JIANG, Z-Y., HUNT, J.V., WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v 202, p 384-389, 1991.

LI, N.; DUAN, Y.; HONG, M.; ZHENG, L.; FEI, M.; ZHAO, X.; WANG, J.; CUI, Y.; LIU, H.; CAI, J.; GONG, S.; WANG, H.; HONG, F. Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 195, p. 161–8, 2010.

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H.C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v 269, p 105-119, 2010.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v 251, n 20, p 6183-6188, 1976.

KIM, K. T.; KLAINE, S. J.; CHO, J.; KIM, S. H.; KIM, S. D. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. **Science of the Total Environment**, v 408, p 2268-2272, 2010.

KLAPER, R.; CRAGO, J.; BARR, J.; ARNDT, D.; SETYOWATI, K.; CHEN, J. Toxicity biomarker expression. In daphnids exposed to manufactured nanoparticles: Changes in toxicity with functionalization. **Environmental Pollution**, v 157, p 1152-1156, 2009.

KLINGELFUS, T. **Efeitos tóxicos de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e chumbo inorgânico (PbII) em *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)**. 89 f, Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

LIMA, D.; ROQUE, G.M.; ALMEIDA, E. A. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Environmental Research**, v 91, p 45-51, 2013.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; PASCARIELLO, L.; MARINOSCI, T. SCETTINO, T. Integrad use of biomarkes (acetylcholinesterase and antioxidante enzymes activities) in *Mutilus galloprovinciali* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine área. **Marine Pollution Bulletin**, v 46, p 324-330, 2003.

LIVINGSTONE, D.R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Biotechnology**, v 57, p.195-221, 1993.

MACEDO, C. F.; SIPAÚBA-TAVARES L. H. Variações de nutrientes e estado trófico em viveiros sequenciais de criação de peixes. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. Maringá, v. 27, n. 3, p. 405-411, 2005.

MAITI, A. K.; SAHA, N. C.; PAUL, G. Effect of lead on oxidative stress, Na⁺K⁺ATPase activity and mitochondrial eléctron traspost chain activity of the brain of *Clarias batrachus* L. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v 84, p 672-676, 2010.

MAITY, S.; ROY, S.; CHAUDHURY, S.; BHATTACHARYA, S. Antioxidant resposes of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. **Environmental Pollution**, v 151, p 1-7, 2008.

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

MOREIRA, F. R; MOREIRA, J. C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v 9 (1), p 167-181, 2004.

MUTO, N.; REN, H.W.; HWANG, G.S.; TOMINAGA, S.; ITOH, N.; TANAKA, K. Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by airpumping stress, dexamethasone, and metals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v 122, p 75–82, 1999.

NUNES, B.; BRANDÃO, R.; SÉRGIO, T.; RODRIGUES, S.; GONÇALVES, F.; CORREIA, A. T. Effects of environmentally relevant concentrations of metallic

compounds on the flatfish *Scophthalmus maximus*: biomarkes of neurotoxicity stress and metabolism. **Environmental Science and Pollution Research**, v 21, n 12, p 7501-7511, 2014.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparane* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio rio Paranapanema, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 207-218, 2004.

PANYAM J, SAHOO S K, PRABHA S, BARGAR T, LABHASETWAR V. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticle. **International Journal of Pharmaceutics**, v 262, p 1–11, 2003.

PAOLIELLO, M.M, DE CAPITANI, E.M. Occupational and environmental human lead exposure in Brazil. **Environmental Research**, v 103, p 288-97, 2007.

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

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

PEREIRA, L. S. **Efeitos do cádmio em parâmetros bioquímicos, genotóxicos, hematológicos e histológicos de *Rhamdia quelen***. 59 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

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

RECILLAS, S., GARCÍA, A., GONZÁLEZ, E., CASALS, E., PUNTES, V., SÁNCHEZ, A., FONT, X. Use of CeO₂, TiO₂ and Fe₃O₄ nanoparticles for the removal of lead

from water: Toxicity of nanoparticles and derived compounds. **Desalination**, v 277, p 213-220, 2011.

REJMAN, J.; OBERLE, V.; ZUHORN, I.S.; HOEKSTRA, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. **Biochemical Journal**, v 377, p159-69, 2004.

RICHETTI, S. K.; ROSEMBERG, D. B.; VENTURA-LIMA, J.; MONSERRAT, J.M.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **NeuroToxicology**, v 32, p 116-122, 2011.

RONG ZHANG, YUJIE NIU, YAWEI LI, CHUNFANG ZHAO, BO SONG, YAO LI, YIKAI ZHOU. 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.

ROSSI, S. C. **Estudo ecotoxicológico da exposição ao chumbo e à nanopartícula de dióxido de titânio em *Hoplias malabaricus***. 101 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

ROSSI, S.C.; MELA, M.; BOSCHEN, S.L.; CUNHA, C.; NETO, F.F.; RIBEIRO, C.A.O.; NEVES, A.P.P.; SILVA DE ASSIS, H.C. Modulatory effect of nano TiO₂ on Pb in *Hoplias malabaricus* thopically exposed. **Environmental Toxicology and Phamacology**, v 38, p 71-78, 2014.

SCHULZ, U.H.; MARTINS-JÚNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v 61, n 4, p 615-622, 2001.

SHIFER, T.S; JUNIOR, S.B.; MONTANO, M.A.E. Aspectos Toxicológicos do Chumbo. **Infarma**, v 17. n 5/6, p. 67-72, 2005.

SILVA DE ASSIS, H. C. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen**. Ph.D. Thesis, University of Berlin, Berlin, Germany, 1998.

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

SOUID, G.; SOUAYED, N.; YAKTITI, F.; MAAROUFI, K. Lead accumulation pattern and molecular biomarkers of oxidative stress in seabream (*Sparus aurata*) under short-term metal treatment. **Drug and Chemical Toxicology**, v 38, n 1, p 98-105, 2015.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Molecular responses to enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. **Environmental Research**. p. 235-335, 1992.

SUN, H.; ZHANG, X.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.; CRITTENDEN, J. C. Influence of titanium dioxide nanoparticles on speciation and bioavailability of arsenite. **Environmental Pollution**, v 157, p 1165-70, 2009.

The Project on Emerging Nanotechnologies. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/cpi/browse/nanomaterials/titanium-dioxide/>>. Acesso em 08/05/2015.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, D.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v 64, p 178-189, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v 13, n 2, p 57-149, 2003.

ZAGATTO, P.A. e BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações**. 2 ed. São Carlos: Rima, p. 486, 2008.

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

ZHANG, R.; NIU, Y.; LI, Y.; ZHAO, C.; SONG, B.; LI, Y.; ZHOU, Y. Acute toxicity study of the interaction between titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v 30, p 52-60, 2010.

ZHU, X.; ZHU, L.; LANG, Y.; CHEN, Y. Oxidative stress and growth inhibition in the freshwater fish *Carassius auratus* induced by chronic exposure to sublethal fullerene aggregates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v 27, n 9, p 1979-1985, 2008.

WALKER, C. M.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**, Bristol, PA. Taylor & Francis, p 344, 1996.

WANG, Z.; ZHAO, J.; LI, F.; GAO, D.; XING, B. Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. **Chemosphere**, v 77, p 67-73, 2009.

YADAV, K. K.; TRIVEDI, S.P. Chromosomal aberrations in a fish, *Channa punctata* after *in vivo* exposure to three heavy metals. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v 678, p 7-12, 2009.