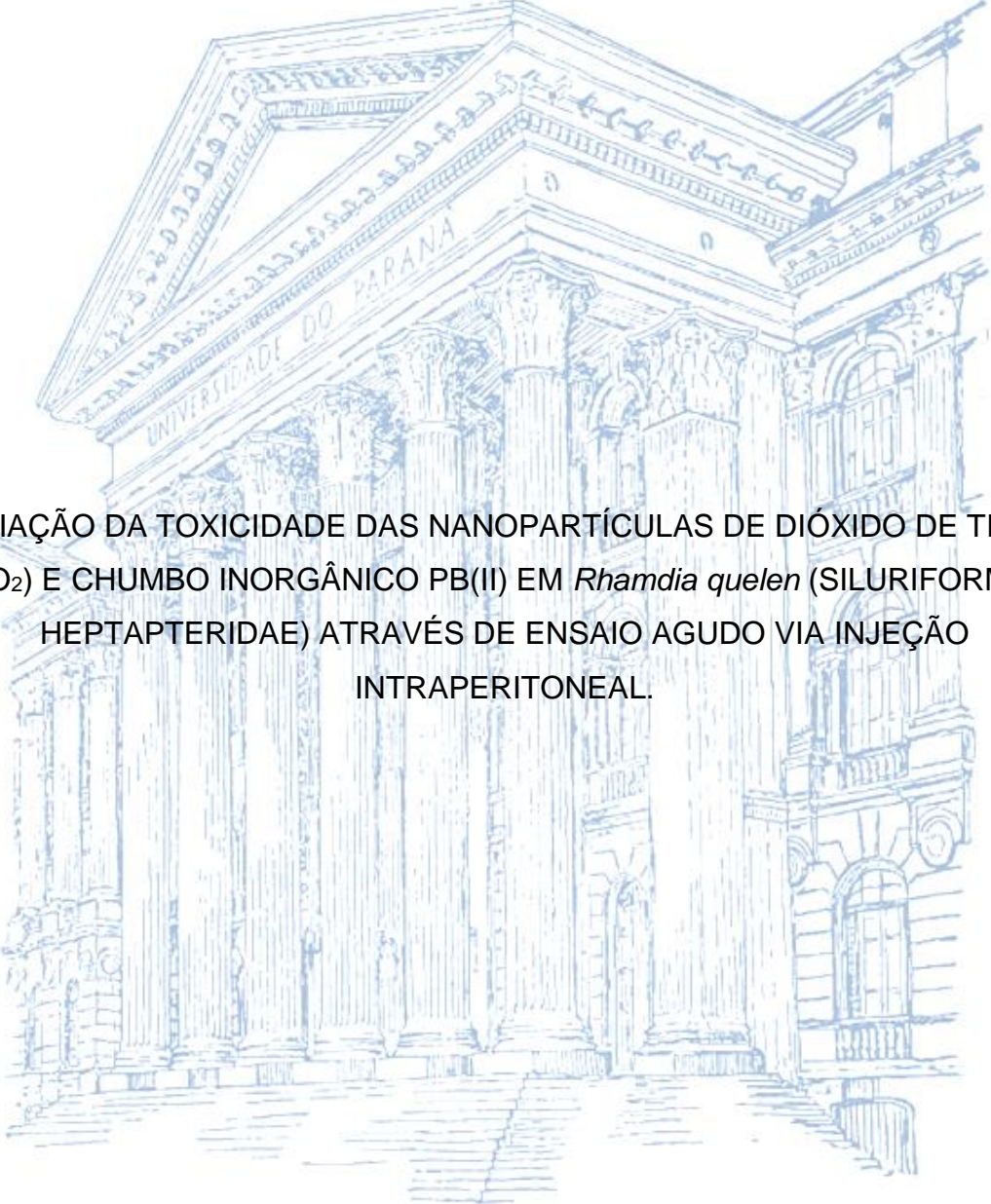


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAÍS FERNANDA OYA SILVA



AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO₂) E CHUMBO INORGÂNICO Pb(II) EM *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) ATRAVÉS DE ENSAIO AGUDO VIA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL.

CURITIBA

2016

LAÍS FERNANDA OYA SILVA

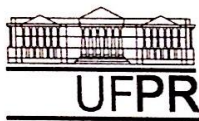
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO₂) E CHUMBO INORGÂNICO Pb(II) EM *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) ATRAVÉS DE ENSAIO AGUDO VIA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL.

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

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

CURITIBA

2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo assinados, membros da banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado, a qual se submeteu **LAÍS FERNANDA OYA SILVA**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética são de parecer que se aprove a candidata.

Secretaria da Coordenação do Programa do Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 23 de março de 2016

Doutora Wanessa Algarte Ramsdorf

Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Membro Titular

Doutora Izonele Cristina Guilosk

Pós-doutoranda/Programa de Pós-Graduação em Farmacologia/UFPR - Membro Titular

Doutora Marta Margarete Cestari

Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Presidente

Visto

Doutora Lupe Furtado Alle
Coordenadora

Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR

Lupe Furtado Alle
Coordenadora do PPG-GEN / UFPR
Matrícula 200300

AGRADECIMENTOS

Ao meu falecido pai, Edmar, por me ensinar o valor dos estudos e ter contribuído para a base da minha educação, que foi essencial para eu chegar até aqui.

À minha mãe Elizabeth e meu pai Gilberto, pelo apoio, incentivo e investimento na minha nova carreira.

À minha família pelo apoio e por entenderem quando eu dizia: “Não posso porque preciso estudar!”.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Marta Margarete Cestari, que acreditou no meu potencial e me deu a oportunidade de trabalhar em seu laboratório desde a iniciação científica.

Às Professoras Dra. Wanessa Ramsdorf, Dra. Izonete Cristina Guiloski e Dra. Daniela Morais Leme, por aceitarem o convite para banca de avaliação desta dissertação.

Àos Professores do Programa de Pós-graduação em Genética da UFPR, por contribuírem muito na minha formação.

Aos colegas do Laboratório de Mutagênese Ambiental, Antônio Marques, Tatiane, Geonildo, Emanuele, Juliana, Gustavo, Laercio, Gabriele e Taynah por terem contribuído muito na minha formação, pela parceria no trabalho e na vida, e por todas as conversas, filosóficas ou não, durante o café pós almoço.

À técnica Cintya, e aos estagiários Bruno, Helyandra e Ananda por toda ajuda durante e pós o experimento.

Ao Dr. Laercio Dante Stein Piancini e à Dra. Cristiane Benicá pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho, como banca de acompanhamento.

Às colegas Sabrina e Thalita do departamento de farmacologia da UFPR, as quais contribuíram diretamente na produção deste trabalho.

Aos colegas de graduação, Andressa Xuxu, Renattho, Charles, Dandie, Thais, Diego, Micheli, que dividem, em diferentes áreas, os desafios da pós-graduação, pela amizade e pelos encontros aleatórios na cantina que sempre terminavam com a promessa de marcar um café futuramente.

Ao meu namorado André Luiz, por compreender a importância da pesquisa na minha vida, e por me apoiar, principalmente nos momentos mais críticos do desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

RESUMO

As Nanopartículas de dióxido de titânio (NpTiO_2) fazem parte de uma inovação tecnológica que é amplamente explorada por diferentes setores industriais, entretanto, os efeitos desta nanopartícula no ambiente ainda são desconhecidos. Estresse oxidativo, citotoxicidade, neurotoxicidade e alterações na expressão de alguns genes são algumas das implicações relatadas em estudos *in vivo* e *in vitro*. O chumbo apesar de reconhecidamente tóxico, ainda é empregado na produção de acessórios para pesca, tintas, baterias, e serviços metalúrgicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade das NpTiO_2 e Chumbo inorgânico (PbII), quando injetados no peixe de forma isolada ou em associação, isto devido à capacidade da nanopartícula adsorver íons e moléculas em sua superfície. Exemplares da espécie *Rhamdia quelen* (jundiá) foram submetidos ao ensaio agudo (96 horas), através de duas injeções intraperitoneais. Os espécimes foram divididos em 11 tratamentos: Controle negativo (CNN), Controle Negativo 1 (CN1), Controle negativo 2 (CN2), 0,5ng/g $\text{NpTiO}_2+\text{H}_2\text{O}$ (NP1), 5ng/g $\text{NpTiO}_2+\text{H}_2\text{O}$ (NP2), 50ng/g $\text{NpTiO}_2+\text{H}_2\text{O}$ (NP3), $\text{H}_2\text{O}+40\mu\text{g/g Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Pb), 0,5ng/g $\text{NpTiO}_2+40\mu\text{g/g Pb}(\text{NO}_3)_2$ (NP1+Pb), 5ng/g $\text{NpTiO}_2+40\mu\text{g/g Pb}(\text{NO}_3)_2$ (NP2+Pb), 50ng/g $\text{NpTiO}_2+40\mu\text{g/g Pb}(\text{NO}_3)_2$ (NP3+Pb), Controle positivo (0,5 $\mu\text{g/g}$ MMS). Os três controles negativos foram tratados com nenhuma (CNN), uma (CN1) e duas (CN2) injeções de água destilada, com o objetivo de avaliar se a variável volumétrica administrada poderia alterar as respostas dos biomarcadores aqui utilizados. Após 96 horas, os animais foram sacrificados e os tecidos coletados. Foram realizados o teste de micronúcleo pisco com eritrócitos, o ensaio cometa com os tecidos sanguíneo, cerebral, hepático e renal. Para a análise dos biomarcadores bioquímicos foram utilizadas porções do fígado, cérebro e músculo, e para a quantificação de metal foram coletadas as vísceras. O teste de micronúcleo pisco e alterações morfológicas nucleares não apresentou diferença entre os tratamentos. O ensaio cometa apresentou aumento de danos ao DNA nos tratamentos NP1 e NP2 para eritrócitos, NP1, NP3 e NP2+Pb para tecido renal, e houve uma redução de danos em NP1+Pb em tecido cerebral. Foi observado aumento da atividade da GST no grupo NP1 e NP2+Pb. A concentração de GSH aumentou em todos os tratamentos, associados e isolados. O tratamento de NP1+Pb induziu a SOD e inibiu a CAT. A enzima AChE muscular teve uma inibição em todas as doses de nanopartículas isoladas, enquanto que na AChE cerebral só houve a indução no tratamento de NP1+Pb. Foi observado um aumento da peroxidação lipídica dos tratamentos NP1, NP2 e NP1+Pb. Não foi observada nenhuma resposta padrão, dos tratamentos de associação entre as nanopartículas e o metal, que evidencie a interação entre contaminantes.

Palavras chave: nanomateriais, toxicidade, ensaio cometa, peixe, biomarcadores enzimáticos.

ABSTRACT

Titanium dioxide nanoparticles (NpTiO₂) are part of a technological innovation that is widely used by different industrial sectors; however, the effects caused by them in the environment remain unknown. Oxidative stress, cytotoxicity, neurotoxicity and alteration in gene expression are some implications reported by *in vivo* and *in vitro* studies. Although recognized as toxic, lead is still used in the production of accessories for fishing, paints, batteries and metallurgical services. Thus, the aim of this work was to evaluate toxicity of NpTiO₂ and inorganic lead (PbII), when they were injected into fish, alone or in association, mainly due to the ability of nanoparticles to adsorb ions and molecules on its surface. Specimens of *Rhamdia quelen* (common name: *catfish*) were submitted to acute test (96 hours), by two intraperitoneal injections (*i.p.*). Then, they were divided into 11 treatments: **Negative Control (NC)**, **Negative Control 1 (NC1)**, **Negative Control 2 (NC2)**, 0.5 ng / g NpTiO₂ + H₂O (NP 1), 5 ng / g NpTiO₂ + H₂O (NP 2), 50ng / g NpTiO₂ + H₂O (NP3), H₂O + 40µg / g Pb(NO₃)₂ (Pb), 0.5 ng / g NpTiO₂ + 40µg / g Pb(NO₃)₂ (NP1 + Pb), 5ng / g NpTiO₂ + 40µg / g Pb(NO₃)₂ (NP2 + Pb), 50ng / g + NpTiO₂ 40µg / g Pb(NO₃)₂ (NP3 + Pb), **Positive Control (PC: 5µg / g MMS)**. The negative controls were treated with no (CNN), one (CN1) or two (CN2) injections of distilled water, in order to evaluate whether given variable volume could alter the biomarkers used in this study. After 96 hours, fish were sacrificed and samples collected. The piscine micronucleus test was performed as well as the comet assay with erythrocytes, brain, liver and kidney tissue. For biochemical analysis, liver parts were used, as brain and muscle tissues, to verify enzyme activity. About the lead quantification, this was performed in the fish viscera, using a pool of samples. The piscine micronucleus test and nuclear morphological alterations did not differ between treatments. Otherwise, comet assay showed an increased in DNA damage in NP1 and NP2 treatments for erythrocytes, NP1, NP3 and NP2 + Pb for kidney tissue, and there was a reduction observed in DNA damage on group NP1 + Pb, in brain tissue. About biochemical biomarkers, there was an increase of GST activity in NP1 and NP2 + Pb group. In the same way, GSH concentration increased in all treatments in association with Pb and in isolated groups. Treatment of NP1 + Pb induced SOD and inhibited CAT activity. Muscle acetylcholinesterase inhibition was observed on groups exposed to isolated nanoparticles for all concentrations, whereas brain acetylcholinesterase activity was only induced in NP1 + Pb treatment. An increase in lipid peroxidation of treatments NP1, NP2 and NP1 + Pb was observed. In conclusion, there has been no standard response in association treatments between nanoparticles and the metal (Pb) that reveals the interaction between contaminants.

Keywords: nanomaterials, toxicity, comet assay, fish, enzymatic biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ETAPAS DA REAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO	15
FIGURA 2 - CLASSIFICAÇÃO DE NUCLEÓIDES SEGUNDO COLLINS ET AL. (1997).....	18
FIGURA 3 - FORMAS ESTRUTURAIS DO TIO ₂ . A) ANATASE B) RUTILO.....	22
FIGURA 4 - EXEMPLAR DE <i>Rhamdia quelen</i>	24
FIGURA 5 - COLETA DE MATERIAL. (A) COLETA DE SANGUE PELA ARTÉRIA CAUDAL. (B) COLETA DO RIM POSTERIOR (RP).....	31
FIGURA 6 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) CEREBRAL (A) E MUSCULAR (B) NOS CONTROLES NEGATIVOS SEM INJEÇÃO DE ÁGUA DESTILADA (CNN), COM UMA INJEÇÃO (CN1) E DUAS INJEÇÕES (CN2). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (p<0,05) ENTRE OS GRUPOS.	44
FIGURA 7 - ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) (A), CATALASE (CAT) (B), GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX) (C) E GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) (D) EM TECIDO HEPÁTIDO DE <i>Rhamdia quelen</i> , NOS GRUPOS CONTROLES NEGATIVO SEM INJEÇÃO (CNN), COM UMA INJEÇÃO (CN1) E COM DUAS INJEÇÕES (CN2). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS.....	45
FIGURA 8 - AVALIAÇÃO DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GSH) (A), PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) (B) E METALOTIONEÍNA (C) EM TECIDO HEPÁTIDO DE <i>Rhamdia quelen</i> , NOS GRUPOS CONTROLES NEGATIVO SEM INJEÇÃO (CNN), COM UMA INJEÇÃO (CN1) E COM DUAS INJEÇÕES (CN2). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS.	46
FIGURA 9 - DANOS AO DNA DE ERITRÓCITOS (A), RIM (B), FÍGADO (C) E CÉREBRO (D) DE <i>Rhamdia quelen</i> , DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. CONTROLE NEGATIVO SEM INJEÇÃO (CNN), CONTROLE NEGATIVO COM UMA INJEÇÃO DE ÁGUA DESTILADA (CN1), CONTROLE NEGATIVO COM DUAS INJEÇÕES DE ÁGUA DESTILADA (CN2) E CONTROLE POSITIVO (CP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (P<0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS.	48

- FIGURA 10 - ELETROMICROGRAFIA DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ COM FORMA CRISTALINA DE ANATASE.....41
- FIGURA 11 - TAMANHO DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ NAS SUSPENSÕES COLOIDAIS DE 0,05mg/L, 0,5 mg/L E 5 mg/L.....42
- FIGURA 12 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) CEREBRAL EM *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) , 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (p<0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS.....50
- FIGURA 13 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) MUSCULAR EM *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) , 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (p<0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS.....51
- FIGURA 14 - ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) EM FÍGADO DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) , 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO (CN2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (p<0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS.....53
- FIGURA 15 - ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM FÍGADO DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) , 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g

NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (p<0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS.....54

FIGURA 16 - ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) EM FÍGADO DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (p<0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS.....56

FIGURA 17 - ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) EM FÍGADO DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (p<0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS.....57

FIGURA 18 – CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM FÍGADO DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (p<0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS.....59

FIGURA 19 – AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) EM FÍGADO DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g

NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.....60

FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNA (MET) EM CÉLULAS HEPÁTICAS DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. NÃO HOUVE DIFERENÇA ENTRE OS TRATAMENTOS.61

FIGURA 21 - TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES. (V) VACUOLATED, (N) NORMAL, (NT) NOTCHED, (BL)BLEBBED. FONTE: A AUTORA.62

FIGURA 22 - DANOS AO DNA DE ERITRÓCITOS DE *Rhamdia quelen*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINUSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.65

FIGURA 23 - DANOS AO DNA DE TECIDO RENAL DE *Rhamdia quelen*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM

MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINUSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.66

FIGURA 24 - DANOS AO DNA DE TECIDO HEPÁTICO DE *Rhamdia quelen*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2 , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40 μ g/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINUSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.67

FIGURA 25 - DANOS AO DNA DE TECIDO CEREBRAL DE *Rhamdia quelen*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2 , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40 μ g/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINUSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DOSES E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO E CHUMBO ADMINISTRADAS EM <i>Rhamdia quelen</i>	27
TABELA 2 - TRATAMENTOS E TEMPOS DE CONTAMINAÇÃO	30
TABELA 3 – CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS DE NANOPARTÍCULAS DE TiO ₂ OBTIDAS PELO APARELHO ZETA SIZER®.....	43
TABELA 4 - QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO NAS VÍSCERAS DE <i>Rhamdia quelen</i>	43
TABELA 5 - FREQUÊNCIA MÉDIA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS DE <i>Rhamdia quelen</i> , SEPARADOS POR BLEBBED, LOBED, NOTCHED, VACUOLATED, TOTAL DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES E PERCENTUAL DE ERITRÓCITOS IMATUROS. VALORES EXPRESSOS EM MEDIANA (1ºQ/3ºQ). NÃO HOUE DIFERENÇA ESTATÍSTICA (P < 0,05) ENTRE OS GRUPOS.	47
TABELA 6 – FREQUÊNCIA MÉDIA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS DE <i>Rhamdia quelen</i> , SEPARADAS ENTRE BLEBBED, LOBED, NOTCHED, VACUOLATED , TOTAL DE AMN E % DE ERTITRÓCITOS IMATUROS. COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES CONJUNTOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA. VALORES EXPRESSOS EM MEDIANA (1ºQ/3ºQ). NÃO HOUE DIFERENÇA ESTATÍSTICA (P < 0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS. 63	

LISTA DE SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase
AMN – Alterações morfológicas nucleares
ATC – Iodeto de acetiltiocolina
BSA – Albumina de soro bovino
CAS – *Chemical Abstract Service*
CAT – Catalase
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEPPA – Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos
DTNB – 5,5-ditio-bis-2nitro-benzoato
ERO – Espécie reativa de oxigênio
GPx – Glutaciona peroxidase
GR – Glutaciona redutase
GSH – Glutaciona reduzida
GSSG – Glutaciona dissulfeto
GST – Glutaciona S-transferase
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IARC – *International Agency for Research on Câncer*
ICP-AES – Espectrometria de transmissão atômica por plasma acoplado indutivamente
LPO – Peroxidação lipídica
LSD – *Least significant difference*
MDA – Malondialdeído
MT – Metalotioneína
NBT – Nitrobutilazul de tetrozólíio
NpTiO₂ – Nanopartícula de dióxido de titânio
OMS – Organização Mundial de Saúde
PbII – Chumbo inorgânico
Pb(NO₃)₂ – Nitrato de chumbo
SOD – Superóxido dismutase
USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Biomarcadores Bioquímicos	11
1.1.1	Acetilcolinesterase (AChE)	12
1.1.2	Glutaciona S-transferase (GST)	12
1.1.3	Superóxido dismutase (SOD)	12
1.1.4	Catalase (CAT)	13
1.1.5	Glutaciona peroxidase (GPx)	13
1.1.6	Glutaciona reduzida (GSH)	13
1.1.7	Peroxidação lipídica (LPO)	14
1.1.8	Metalotioneína (MT)	15
1.2	Biomarcadores Genéticos	15
1.2.1	Teste do Micronúcleo Písceo (MNP)	16
1.2.2	Ensaio Cometa	17
1.3	Chumbo	19
1.4	Nanopartículas	20
1.4.1	Nanopartículas de Dióxido de Titânio (NpTiO ₂)	21
1.4.2	Associação entre nanopartículas e metais	23
1.5	<i>Rhamdia quelen</i>	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Preparação das Soluções de NpTiO ₂ e PbII	27
3.2	Aclimação dos animais	28
3.3	Desenho experimental	29
3.4	Sacrifício e coleta de amostras	30
3.5	Biomarcadores bioquímicos	31
3.5.1	Concentração proteica	32
3.5.2	Atividade da acetilcolinesterase (AChE)	32
3.5.3	Atividade da Glutaciona S-transferase (GST)	33

3.5.4	Atividade da superóxido dismutase (SOD)	33
3.5.5	Atividade da catalase (CAT)	33
3.5.6	Atividade da glutaciona peroxidase (GPx).....	34
3.5.7	Concentração de glutaciona reduzida (GSH)	34
3.5.8	Lipoperoxidação (LPO).....	34
3.5.9	Metalotioneínas (MT).....	35
3.6	Biomarcadores Genéticos.....	35
3.6.2	Teste do Micronúcleo Písceo (MNP)	35
3.6.3	Ensaio Cometa	36
3.6.4	Quantificação de metal em tecido.....	39
3.7	Análise estatística	39
4	RESULTADOS	41
4.1	Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio.....	41
4.2	Determinação de chumbo nas vísceras de <i>Rhamdia quelen</i>	43
4.3	Avaliação dos Controles Negativos	44
4.4	Biomarcadores bioquímicos.....	48
4.5	Biomarcadores genéticos	62
4.5.1	Teste do micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares.....	62
4.5.2	Ensaio cometa	64
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÃO	86
7	REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

A industrialização usufrui de uma vasta diversidade de produtos químicos potencialmente tóxicos, e podem gerar resíduos em quantidades prejudiciais ao meio ambiente. À medida em que a humanidade avança no desenvolvimento ecológico, a necessidade de expansão e exploração de recursos aumenta, e conseqüentemente, a presença de resíduos químicos no ambiente também é potencializada (ZAGATTO, 2006). Em 2016, a CAS (*Chemical Abstract Service*) irá ultrapassar o registro de 100 milhões de substâncias químicas (CAS, 2016).

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

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

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

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

O uso de animais nos ensaios possibilita várias vias de administração da substância em estudo, pode ser através de alimentos, da água ou de injeções. Ainda é possível avaliar seus efeitos através de órgãos ou tecidos específicos, em células

germinativas ou somáticas, além de poder comparar contaminações crônicas ou agudas (RABELLO-GAY, RODRIGUES e MONTELEONE-NETO, 1991).

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

Um bioindicador ideal, além de sobreviver em ambientes saudáveis, deve apresentar uma resistência relativa aos contaminantes a que está exposto, ser abundante no ambiente e adaptar-se bem aos ensaios de laboratório. Para bioensaios de mutagenicidade e genotoxicidade, é preferível sempre o uso de organismos endêmicos.(PANDRANGI et al., 1995; AKAISHI, 2003).

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

1.1 Biomarcadores Bioquímicos

Biomarcadores bioquímicos são chamados de biomarcadores precoces de contaminação ambiental (PAYNE et al., 1987) porque conseguem detectar alterações relacionadas ao estresse em funções bioquímicas e fisiológicas antes do início de efeitos nos níveis populacionais ou da comunidade (BUCHELI; FENT, 1995). As enzimas envolvidas no processo de detoxificação de xenobiontes são os principais biomarcadores bioquímicos estudados (VAN DER OOST et al., 2003).

1.1.1 Acetilcolinesterase (AChE)

Em peixes, a acetilcolinesterase pode ser encontrada no cérebro, em eritrócitos e no músculo (KLEMZ e SILVA DE ASSIS, 2005). A função desta enzima é realizar hidrólise da acetilcolina (ACh), presente nas sinapses, em colina e ácido acético (KAVITHA e RAO, 2007; VIRGENS, 2009). Essa hidrólise previne um estímulo nervoso contínuo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

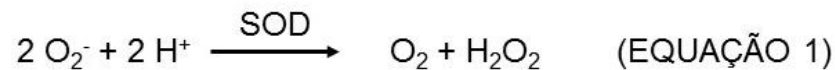
É conhecido o efeito de inibição que organofosforados e carbamatos causam na atividade desta enzima (SHAONAN et al., 2004; CHANDRASEKARA; PATHIRATNE, 2005; GUILOSKI et al., 2013). Alguns estudos apresentam sensibilidade da acetilcolinesterase com outros tipos de contaminantes como metais (FRASCO et al., 2005; JEBALI et al., 2006).

1.1.2 Glutationa S-transferase (GST)

A glutatona S-transferase é uma enzima importante no mecanismo de biotransformação de fase II. Presente no citosol, a GST realiza a conjugação de compostos lipofílicos, ou oriundos da fase I, com a glutatona reduzida (GSH) tornando-os hidrofílicos e mais fáceis de serem eliminados pela célula (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; MARIONNET; DESCHAUX; REYNAUD, 2006; KIM et al., 2010).

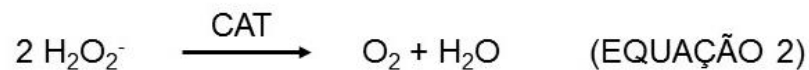
1.1.3 Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase atua como uma primeira defesa contra espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHO et al., 2006). É uma metaloenzima responsável por converter superóxidos reativos ($\cdot\text{O}_2^-$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) através da reação de dismutação (Equação 1). O produto gerado pela ação da SOD, o peróxido de hidrogênio, também pode causar danos celulares ao penetrar nas células e alterar enzimas importantes (ATLI et al., 2006). Assim, enzimas como a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx) são importantes na degradação deste H_2O_2 .



1.1.4 Catalase (CAT)

As catalases são enzimas que atuam na quebra de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Equação 2). Estão localizadas nos peroxissomos da maioria das células, são envolvidas no metabolismo de ácidos graxos, por este motivo alterações na sua atividade, principalmente em células hepáticas, podem ser de difícil interpretação (STEGEMAN et al., 1992).



1.1.5 Glutathiona peroxidase (GPx)

A glutathiona peroxidase, ao contrário da catalase, é uma enzima capaz de converter uma variedade de peróxidos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). É a principal peroxidase em peixes, tem grande importância na degradação de peróxidos lipídicos, evitando a propagação das reações em cascata da peroxidação lipídica (LPO). Para degradar peróxidos, a GPx necessita de glutathiona reduzida (GSH) como cofator, que será oxidada no final do processo (GSSG – glutathiona dissulfeto) (Equação 3) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).



1.1.6 Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona reduzida é uma molécula não enzimática importante para o sistema antioxidante. Além de ser um cofator para a GPx, atua também no metabolismo de fase II, principalmente através da atividade da GST, onde é conjugada com compostos eletrofílicos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A GSH pode alterar

taxas de absorção e eliminação de metais, uma vez que metais, essenciais ou não, dependem de moléculas com agrupamento tiol ($R - SH$), para entrar nas células (LANGE; AUSSEIL; SEGNER, 2002).

1.1.7 Peroxidação lipídica (LPO)

Um dos principais danos causados pelo estresse oxidativo é a lipoperoxidação (LPO). Devido à suscetibilidade dos lipídios de membrana reagirem com as EROs, as sucessivas reações de oxidação afetam a função das membranas celulares, aumentando sua permeabilidade, e em casos extremos podem causar sua ruptura total, seguida de morte celular (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000; MEAGHER e FITZGERALD, 2000; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Assim, a LPO é um bom biomarcador de contaminação ambiental, pois permite inferir danos celulares causados por estresse oxidativo (STEGEMAN *et al.*, 1992; HAI *et al.*, 1995; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O processo de peroxidação lipídica ocorre através de uma cadeia de reações deletérias. Quando um radical livre sequestra de um ácido graxo insaturado um próton (H^+), formando um radical lipídico e uma molécula de H_2O . Esse radical lipídico pode reagir com o O_2 e formar um radical peroxil (LOO^*), que poderá retirar um H^+ de outra molécula de ácido graxo e estabelecer uma cadeia de reações autocatalíticas oxidando as membranas em hidroperóxidos lipídicos (Figura 1) (ESTERBAUER, 1984).



Iniciação: Sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular.



Propagação: o L^\bullet reage com o O_2 , resultando em LOO^\bullet . Esse novamente sequestra hidrogênio do ácido poliinsaturado, gerando o segundo L^\bullet .



Terminação: autodestruição de radicais formados na etapa de Propagação.

FIGURA 1 - ETAPAS DA REAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO
 FONTE: BATISTA, COSTA e PINHEIRO-SANT'ANA (2007).

1.1.8 Metalotioneína (MT)

Um importante biomarcador bioquímico não enzimático, quando a contaminação é por metais, é a metalotioneína (MT). As metalotioneínas são um conjunto de proteínas ricas em cisteína e metais, como zinco e o cobre. Suas funções estão relacionadas com o transporte e armazenamento de metais pesados essenciais, e a desintoxicação de metais não essenciais, como cádmio, mercúrio. As Metalotioneínas agem como sequestradoras de metais, são induzidas pela exposição a uma ampla gama de metais, e estão relacionadas com a função protetora (STEGEMAN et al., 1992; VIARENGO et al., 2000; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

1.2 Biomarcadores Genéticos

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

A utilização de biomarcadores precoces, como bioquímicos ou genéticos, pode detectar danos iniciais causados por xenobióticos, e ser aplicado como medida preventiva ao desenvolvimento de danos mais severos em níveis populacionais ou de comunidades (KENDAL et al., 2001; VAN DER OOST et al., 2003).

1.2.1 Teste do Micronúcleo Písceo (MNP)

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

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

Os critérios para classificação de micronúcleo písceo são: apresentar-se visivelmente separado do núcleo principal, com as membranas distinguíveis e mesma refringência, e ter aproximadamente de 1/10 a 1/30 do tamanho núcleo principal (AL SABTI e METCALFE, 1995; AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000; GUSTAVINO et al., 2001).

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

Em peixes, os diferentes tipos de alterações morfológicas nucleares ainda não apresentam sua origem completamente compreendida. Carrasco, Tylbury e Myers

(1990) descreveram e fotografaram as alterações morfológicas nucleares (AMN) de eritrócitos de peixes e as classificaram como:

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

A técnica do teste de micronúcleo píceo foi modificada por Ueda et al. (1992), os autores utilizaram laranja de acridina no lugar da tradicional Giemsa. Çavas e Ergene-Gözükara (2005) também utilizaram este tipo de coloração para analisar a presença de micronúcleos em eritrócitos jovens, aumentando assim a sensibilidade do teste. Os eritrócitos imaturos podem ser identificados pela coloração avermelhada e fluorescente no citoplasma destas células, devido à presença de RNA.

1.2.2 Ensaio Cometa

O Ensaio cometa, SCGE (*Single-Cell Gel Eletrophoresis*), avalia danos no DNA em células individualizadas, através da medida da migração do DNA em gel de agarose após corrida eletroforética (SINGH *et al.*, 1988; FERRARO, 2004). O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL, GORDON e BATTY, 2001).

A técnica descrita por Singh et al. (1988) consiste em utilizar uma suspensão de células depositadas em lâmina com agarose, posteriormente as células passam por um processo de lise, desespiralização do DNA e uma corrida eletroforética em

tampão alcalino. Assim, é possível detectar eventos de quebras de fita simples ou duplas, sítios álcalo-lábeis e sítios de reparo tardio.

O DNA da célula que não possuir dano migrará em conjunto durante a corrida eletroforética, caracterizando-se como um círculo. As células que possuírem danos em seu DNA apresentarão fragmentos diversos. Fragmentos menores tendem a migrar com mais velocidade que fragmentos maiores. Ocorrendo danos intensos, muitos fragmentos de tamanhos variados serão formados, e migrarão em velocidades diferentes, formando então a figura típica de um cometa (OLIVE, BANÁTH e DURAND, 1990).

Uma das metodologias para quantificar os danos é realizada através da relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pelos fragmentos de DNA. Esta classificação varia entre classe 0, onde não ocorreu dano visível, até a classe 4, indicando a ocorrência de muitos danos ao DNA (Figura 2) (COLLINS et al., 1997).

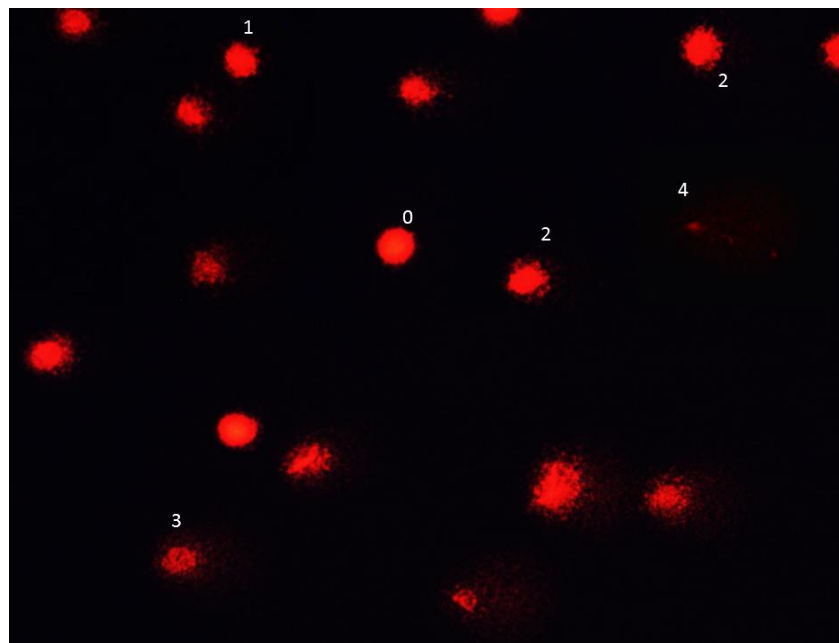


FIGURA 2 - CLASSIFICAÇÃO DE NUCLEÓIDES SEGUNDO COLLINS ET AL. (1997).
FONTE: A AUTORA.

Diversas publicações demonstram que o ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos no DNA, causados por diferentes classes de agentes mutagênicos em peixes (BELPAEME, COOREMAN e KIRSCH-VOLDERS, 1998). Uma das vantagens do ensaio cometa é que este não depende de proliferação celular para ser realizado, portanto pode ser utilizado com qualquer tipo celular nucleado. Uma vez que substâncias genotóxicas, com frequência, são tecido-específicas, é possível analisar

diretamente os tecidos-alvo (PANDRANGI et al., 1995; ROJAS, LOPEZ e VALVERDE, 1999).

1.3 Chumbo

O chumbo é um metal não essencial, altamente tóxico, sendo que todos os seus efeitos conhecidos em organismos vivos são deletérios. É um metal de coloração branca acinzentada, brilhante, dúctil, macio e resistente à corrosão. Sua concentração no solo é de 1,6g por 100kg de solo, o que o torna um metal raro no ambiente (PAIN, 1995).

Existem duas formas de chumbo inorgânico: PbII e PbIV. A forma orgânica geralmente é encontrada em complexos com mais de quatro carbonos. A forma inorgânica é menos tóxica que a orgânica, pois esta atravessa a membrana plasmática com muito mais facilidade (PAIN, 1995). Ambas as formas de chumbo são amplamente utilizadas na indústria, para a fabricação de vernizes, explosivos, vidros coloridos, baterias, fósforos, tintas antioxidantes, manufatura de pesticidas, reagentes analíticos, entre outros (JOHNSON, 1998).

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

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) pela resolução nº357, de 17 de março de 2005, define, para águas doces de classe III, 0,033mg/L como limite de máximo de chumbo total neste ambiente (CONAMA, 2005).

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC), classifica o chumbo e seus compostos inorgânicos dentro do Grupo 2B. Esta classificação define o chumbo inorgânico como agente com limitada evidência de ser carcinogênico em humanos e com poucas, mas suficientes, evidências para animais de laboratório (IARC, 2006).

Em testes biológicos e bioquímicos, o chumbo induziu respostas como inibição de enzimas, mutações, aberrações cromossômicas, câncer e defeitos congênitos (JOHNSON, 1998). Trabalhos com peixes de água doce, indicam que estes animais acumulam muito mais rapidamente e em maior concentração, compostos orgânicos do chumbo do que os inorgânicos. Sob altas concentrações, destacam-se relatos de

quadros anêmicos, redução na eclosão de ovos e curvatura da lateral da espinha. Em doses letais, o chumbo induz um incremento na produção de muco, conseqüentemente ocorre obstrução das brânquias, levando o animal à morte (PAIN, 1995).

Os animais aquáticos podem absorver o chumbo disponível na água através da pele, brânquias ou ingestão de alimentos. Fatores que influenciam na capacidade de absorção do chumbo são: presença de outros elementos químicos, pH, temperatura e a forma química do chumbo (TAO et al., 1999). Estudos realizados com dois peixes de água doce, *Lepomis gibbosus* e *Salmo gairdneri*, mostraram maior capacidade de absorção do metal quando o pH da água diminuiu (PAIN, 1995).

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

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

O chumbo pode danificar a via oxidativa normal das células fazendo com que estas acumulem os radicais livres, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2^-), estes radicais podem promover oxidações de vários compostos celulares. Se um desses compostos for o DNA existe o risco de ocorrerem lesões no mesmo (MERIAN, 1991). Estudos apontam o chumbo como um agente co-carcinogênico, devido a interferência do mesmo com os processos de reparo do DNA, desta forma, potencializando o efeito genotóxico de outros agentes, como por exemplo, a radiação UV (FRACASSO et al., 2002).

1.4 Nanopartículas

As nanopartículas apresentam dimensão entre 1 e 100 nm, e estão agrupadas de acordo com sua composição química, como nanomaterias de carbono (fulerenos e nanotubos), óxidos metálicos (por exemplo, TiO_2 e ZnO), nanomateriais metálicos (por exemplo, Au e Ag), semicondutores (*quantum dots*) e nanomateriais orgânicos

poliméricos (White book on Nanotechnologies, 2008). Por sua singularidade em propriedades físico-químicas, como grande capacidade de penetração, grande área de superfície e atividade química, nanopartículas tornam-se potencialmente atrativas em tecnologias industriais e medicinais, porém, não é bem conhecido seu impacto no ambiente e para os seres vivos (OBERDÖRSTER, MAYNARD e DONALDSON, 2005; BORM et al, 2006; KREYLING et al, 2006; LAM et al, 2006; MAYNARD, 2007). As características que tornam nanopartículas interessantes para a indústria, são as mesmas que trazem preocupações da sua presença em sistemas naturais (QUINA, 2004).

1.4.1 Nanopartículas de Dióxido de Titânio (NpTiO₂)

As nanopartículas de dióxido de titânio estão presentes em tintas, protetores solares, laminados, embalagens de alimentos, plásticos transparentes, creme dental, medicamentos, produtos alimentícios, papéis, produtos farmacêuticos, cosméticos, produtos de limpeza, tratamentos de purificação da água e até mesmo como material microbiano em descontaminações (SHI et al., 2013; CZAJKA et al.; 2015).

Em 2005 a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) estimou que a produção anual de NpTiO₂ foi de aproximadamente 2000 toneladas, sendo que 65% desta produção teria sido destinada à produção de protetores solares e cosméticos. A produção prevista para os anos entre 2006-2010 foi de 5000 toneladas/ano, e entre 2011-2014 a produção atingiria mais de 10000 ton/ano (USEPA, 2010).

O dióxido de Titânio (TiO₂) pode ser encontrado naturalmente em três formas estruturais diferentes: anatase e rutilo, que são de natureza tetragonal (Figura 3) e broquite (natureza ortorrômbica) (SKOCAJ et al., 2011).

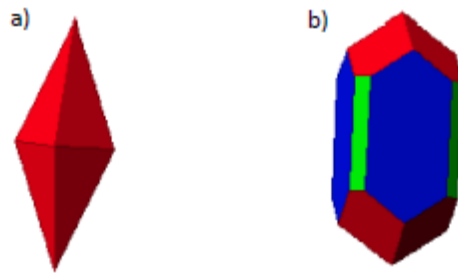


FIGURA 3 - FORMAS ESTRUTURAIS DO TiO_2 . A) ANATASE B) RUTILO. FONTE: PEREIRA, 2010.

As nanopartículas penetram nas células principalmente por endocitose, mediadas por clatrina e caveolina. Partículas com 50nm de tamanho são mais facilmente internalizadas quando comparadas com partículas menores (abaixo de 14nm) ou maiores (até 500nm) (CHITHRANI et al., 2006; REJMAN et al., 2004).

Em estudos realizados com *Daphnia sp.*, mantidas em suspensões de nanopartículas por 48h, detectou-se acumulação no intestino (ZHU et al., 2009), além de rápida acumulação de nanopartículas de dióxido de titânio, com permanência de parte considerável após 72h. Em exposição crônica, as nanopartículas de dióxido de titânio inibiram o crescimento e a reprodução das *Daphnia sp.*, em baixas concentrações (ZHU, CHANG e CHEN, 2010). Porém, em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) não foi detectada acumulação em órgãos internos (FEDERICI, SHAW e HANDY, 2007; JOHNSTON et al, 2010). Em carpa (*Cyprinos carpio*), houve acúmulo de titânio no músculo e no fígado quando mantidos em água contendo nanopartículas de dióxido de titânio (SUN et al., 2007).

Tratamento agudo realizado com truta arco-íris, em concentração de até 1mg/L, não causou toxicidade, mas foram detectados efeitos subletais, como patologias de órgãos internos e alterações bioquímicas e respiratórias (FEDERICI et al., 2007). Em ensaio trófico, adicionando nanopartículas de dióxido de titânio nas concentrações de 10 e 100 mg/kg no alimento de truta arco-íris juvenis por dois meses, não houve influência da nanopartícula de dióxido de titânio no crescimento da espécie de peixe, tampouco em suas características hematológicas (RAMSDEN et al., 2009). Scown et al. (2009) quando contaminaram truta-arco-íris, via injeção intravenosa, com a dose média de 1,3 mg/Kg de NpTiO_2 , detectaram baixas quantidades de titânio no fígado. O fígado também demonstrou ser o órgão mais susceptível à acumulação de NpTiO_2 quando contaminados por 14 dias via intraperitoneal (LI et al., 2010).

Os estudos apresentam resultados e conclusões contraditórias devido variações nas características das nanopartículas, assim como na metodologia aplicada para a avaliação de danos que essas podem causar (TAVARES, 2014).

1.4.2 Associação entre nanopartículas e metais

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

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

1.5 *Rhamdia quelen*

Rhamdia quelen (Figura 4), ou jundiá, pertence à família Heptapteridae (NELSON, 2006), é uma espécie de peixe com distribuição neotropical, encontrada do sul do México até o centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). É uma espécie nativa promissora para o cultivo, com rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, fácil adaptação ao manejo, boa produtividade em açudes e alto potencial de comercialização (GOMES et al., 2000). É uma espécie resistente ao inverno e apresenta rápido crescimento no verão (BARCELLOS et al., 2003).



FIGURA 4 - EXEMPLAR DE *Rhamdia quelen*. FONTE: KLINGELFUS (2013)

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

A coloração do jundiá varia de marrom avermelhado claro a cinza ardósia. A pigmentação da parte inferior da cabeça é variável. Os barbilhões têm crescimento alométrico negativo e esta relação é provavelmente aumentada devido à grande possibilidade de dano dos barbilhões em exemplares grandes (SILFVERGRIP, 1996). *Rhamdia quelen* vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, a procura de alimento (GUEDES, 1980). Em experimentos com larvas e alevinos dessa espécie em cativeiro, observou-se uma acentuada aversão à luz e busca de locais escuros (PIAIA et al., 1999).

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

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho propõe avaliar a toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio (NpTiO_2) e chumbo inorgânico (PbII), isolados e em mistura, em diferentes tecidos de exemplares de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae), após contaminação aguda (96 horas) via injeção intraperitoneal, utilizando diferentes biomarcadores bioquímicos e genéticos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os danos no DNA, através do ensaio cometa, de células renais, cerebrais, hepáticas e eritrocitárias em exemplares da espécie *Rhamdia quelen*, contaminados através de injeções intraperitoneais nas doses de 0,5ng/g, 5ng/g e 50ng/g do peixe, de NpTiO_2 ;
- Avaliar os danos no DNA, através do ensaio cometa, de células renais, cerebrais, hepáticas e eritrocitárias em exemplares da espécie *Rhamdia quelen*, contaminados através de injeções intraperitoneais nas três doses de NpTiO_2 associadas à dose de 40 $\mu\text{g/g}$ do peixe, de chumbo inorgânico;
- Avaliar a mutagenicidade dos xenobióticos NpTiO_2 (0,5ng/g, 5ng/g e 50ng/g) e do PbII (40 $\mu\text{g/g}$), separadamente e associados, utilizando o teste de micronúcleo píficeo e das alterações morfológicas nucleares em eritrócitos;
- Avaliar a toxicidade das NpTiO_2 (0,5ng/g, 5ng/g e 50ng/g), do PbII (40 $\mu\text{g/g}$) e da associação destes contaminantes em exemplares da espécie *Rhamdia quelen*, contaminados via injeção intraperitoneal, utilizando os seguintes biomarcadores bioquímicos: AChE cerebral e muscular, GST, SOD, CAT, GPx, GSH, LPO e MT no fígado.
- Quantificar o chumbo inorgânico nas vísceras de *Rhamdia quelen*;
- Avaliar possíveis efeitos causados pela variável volumétrica entre os controles negativos (sem injeção, 1 injeção e 2 injeções) como teste de micronúcleo

písceo (eritrócitos) e ensaio cometa (células hepáticas, renais, cerebrais e eritrocitárias);

- Verificar se os xenobióticos provocam modificações prejudiciais no organismo estudado e se estas modificações são potencializadas pela associação entre eles.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação das Soluções de NpTiO₂ e PbII

Para a solução de chumbo inorgânico (PbII) foi utilizado Nitrato de chumbo (Pb(NO₃)₂) adquiridos da Vetec® diluído em água destilada. A quantidade de Pb(NO₃)₂ necessária para produzir a solução de PbII na concentração de 4g/L foi calculada através das massas molares do nitrato de chumbo (331,2g/mol) e do chumbo (207,2g/mol).

As suspensões de nanopartículas foram feitas com NpTiO₂ adquiridas da Sigma-Aldrich® (Titanium (IV) oxide nanopowder, 21 nm particle size (TEM), ≥99.5% trace metals basis) na forma anatase em água destilada. As três suspensões (0,05mg/L, 0,5mg/L e 5mg/L) foram sonicadas em banho maria ultrasonicador (42KHz) por 5 minutos para promover a desagregação das partículas. Antes da aplicação das injeções, as suspensões foram novamente sonicadas por 30 minutos, na mesma frequência, para promover a ressuspensão das nanopartículas.

As concentrações de todas as soluções foram calculadas a fim de que o volume da dose a ser administrada seja fixo e constante, 0,01mL/g de peixe. A tabela a seguir apresenta as concentrações utilizadas e as respectivas doses administradas.

TABELA 1 - DOSES E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO E CHUMBO ADMINISTRADAS EM *Rhamdia quelen*.

		DOSES	CONCENTRAÇÕES	VOLUME INJETADO
NpTiO ₂	NP1	0,5ng/g	0,05mg/L	0,01 mL/g de peixe
	NP2	5ng/g	0,5mg/L	0,01 mL/g de peixe
	NP3	50ng/g	5mg/L	0,01 mL/g de peixe
PbII	PB	40µg/g	4g/L	0,01 mL/g de peixe

A caracterização das nanopartículas, pó e suspensão, foram feitos em parceria com a Embrapa de São Carlos/SP. Para a caracterização do pó de NPTiO₂ foram utilizados os métodos apresentados na tabela 2.

MÉTODOS/EQUIPAMENTOS	ANÁLISE
Microscopia eletrônica de Trasmissão (TEM) e Difração de raio-X	Estrutura Cristalina
Brunauer Emmett Teller (Teoria da Adsorção Multimolecular - método B.E.T.)	Área de superfície específica
<i>Dynamic Scattering</i> (DLS)	Tamanho médio e índice de polidispersão
<i>Electrophoresis e Laser Doppler Velocimetry</i>	Potencial zeta
<i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy</i> (XPS)	Química de superfície

As suspensões de nanopartículas foram caracterizadas através do aparelho Zetasizer® Nano Series ZS90 (*Malvern Instruments*, Worcestershire, UK) no qual se verificou o tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta. As medidas foram realizadas a 28 °C. Para análise de tamanho das partículas e índice de polidispersão foram utilizadas cubetas de poliestireno, cada análise durou em média 105s e foi obtida com um ângulo de detecção de 90° e laser vermelho 633nm. Para determinar o potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido, realizando em média 12 corridas para cada amostra. Com o índice de polidispersão foi possível calcular a % de polidispersão [% Polidispersão (%Pd) = (Pdl)^{1/2} x 100], e assim verificar a homogeneidade de tamanhos de partículas presentes na suspensão coloidal, sendo considerada como suspensão homogênea quando %Pd < 20 (MALVERN, 2005).

3.2 Aclimação dos animais

Os espécimes de *Rhamdia quelen* foram adquiridos da piscicultura Sergio Kasuo Akiyoshi, do município de Toledo, sem histórico ou fontes de contaminação. Os peixes passaram por um período de aclimação de 60 dias em tanque de 2000

litros, com temperatura controlada em 28°C, pH 7,0, fotoperíodo natural, alimentação com ração comercial duas vezes ao dia, aeração e circulação d'água constantes.

3.3 Desenho experimental

Após o período de aclimação, os peixes foram transferidos para aquários individuais de 20 litros com aeração e temperatura (28°C) constantes, e fotoperíodo de 12 horas claro:12 horas escuro.

No procedimento de contaminação, os peixes foram anestesiados e pesados, para o cálculo do volume de cada dose administrada intraperitonealmente. Com exceção dos quatro grupos controles, em todos os demais tratamentos cada animal recebeu duas injeções de mesmo volume, com o intervalo de 24 horas entre elas. Assim, a contaminação foi realizada em dois momentos: Contaminação T0 (0 hora), e Contaminação T1 (24 horas após T0).

Os 176 peixes (n=16 animais por grupo) foram divididos em sete tratamentos (0,5; 5,0 e 50,0 ng/g de NpTiO₂, 40µg/g de PbII, 0,5 de NpTiO₂ + 40µg/g de PbII, 5,0 de NpTiO₂ + 40µg/g de PbII, 50,0 de NpTiO₂ + 40µg/g de PbII,) e 3 controles negativos [Controle Negativo "Natural" (CNN – Sem injeção), Controle Negativo 1 (CN1 – 1 injeção) e Controle Negativo 2 (CN2 – 2 injeções) para avaliar se há influência nos resultados advinda da variável volumétrica e estresse de manipulação. Para os tratamentos isolados dos contaminantes, que receberiam apenas uma injeção com a dose do contaminante, foi acrescentada uma injeção extra de água destilada, dose de 0,01mL/g de peixe, para eliminar a variável volumétrica com apenas um xenobiótico (isolados) e com aqueles com dois xenobióticos (associados) (Tabela 3).

Como controle positivo da técnica do Ensaio Cometa, foi utilizado Metil Metano Sulfonato (MMS) em dose única, via injeção intraperitoneal, de 5µg/g, 24 horas antes do sacrifício dos animais (72 horas depois do início da contaminação).

Devido os animais terem sido mantidos em aquários individualizados durante o experimento, não foi possível realizar a exposição dos 176 exemplares de *Rhamdia quelem* simultaneamente. Portanto, o ensaio foi realizado em 5 réplicas (5 semanas). Para garantir a homogeneidade dos grupos, os 16 espécimes de cada tratamento foram divididos de maneira que cada réplica tivesse exemplares de todos os grupos.

TABELA 2 - TRATAMENTOS E TEMPOS DE CONTAMINAÇÃO

	CONTAMINAÇÕES		
	T0 (0 Hora)	T1 (24 horas)	72 horas
CNN	-	-	-
CN1	H ₂ O Destilada	-	-
CN2	H ₂ O Destilada	H ₂ O Destilada	-
NP1	0,5ng/g NpTiO ₂	H ₂ O Destilada	-
NP2	5ng/g NpTiO ₂	H ₂ O Destilada	-
NP3	50ng/g NpTiO ₂	H ₂ O Destilada	-
Pb	H ₂ O Destilada	40µg/g PbII	-
NP1+Pb	0,5ng/g NpTiO ₂	40µg/g PbII	-
NP2+Pb	5ng/g NpTiO ₂	40µg/g PbII	-
NP3+Pb	50ng/g NpTiO ₂	40µg/g PbII	-
CP	-	-	0,5µg/g MMS

3.4 Sacrifício e coleta de amostras

Após 96 horas do início da contaminação os animais foram anestesiados, em benzocaína 10% dissolvida em água, e eutanasiados para a coleta de tecidos. Apenas o grupo controle positivo foi eutanasiado 24 horas após a injeção de MMS.

Os 176 animais eutanasiados tinham peso médio de 18,79±5,99 gramas, comprimento total médio de 13,86±1,56 cm e comprimento padrão médio de 11,27±1,21 cm, sendo 78 machos e 98 fêmeas.

Com o auxílio de seringa e agulha heparinizadas, foi coletado cerca de 1mL de sangue periférico, através da artéria caudal (Figura 5a), e 10µL deste sangue foi imediatamente adicionado em microtubo do tipo Eppendorf® contendo 1mL de soro bovino fetal (SBF) para diluição, e armazenado ao abrigo da luz. Posteriormente esta suspensão celular foi utilizada na confecção das lâminas destinadas ao ensaio cometa de eritrócitos. Outros 10µL do sangue foram coletados e diluídos em 10 µL de SBF para a realização do esfregaço sanguíneo necessário à análise do teste do micronúcleo pisco.

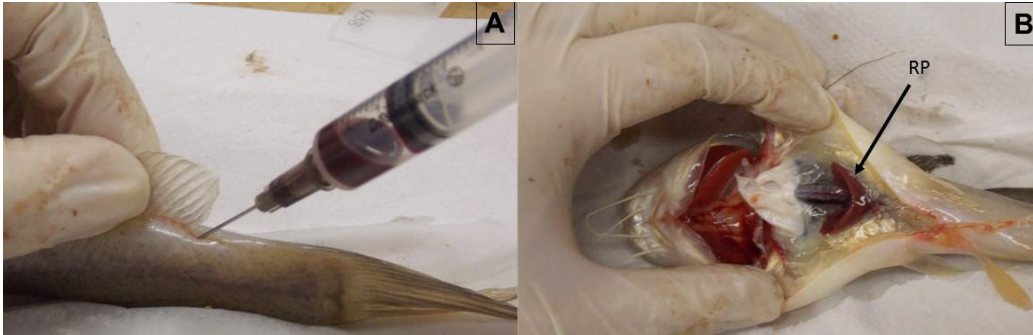


FIGURA 5 - COLETA DE MATERIAL. (A) COLETA DE SANGUE PELA ARTÉRIA CAUDAL. (B) COLETA DO RIM POSTERIOR (RP).

FONTE: A AUTORA.

Após a coleta de sangue realizou-se uma incisão ventral longitudinal, desde a abertura anal até a região da cabeça, para acessar a cavidade ventral e coletar as amostras de tecidos. Para a realização do ensaio cometa, foram retiradas pequenas porções dos seguintes órgãos: fígado, rim posterior (Figura 5b) e cérebro. Esses tecidos foram mantidos em 0,5mL de soro bovino fetal, sob condições de refrigeração e ausência de luz. O restante do fígado e cérebro, assim como uma porção do músculo, também foram coletados e mantidos em microtubos sob refrigeração, e posteriormente armazenados em freezer -70°C , para a realização das análises bioquímicas.

As vísceras restantes (estômago, intestino, coração, e rim anterior), dos grupos que continham metal e controle negativo, foram coletadas para a realização da análise de quantificação de metal. As vísceras foram armazenadas em sacos plásticos e estocadas em freezer -4°C , e posteriormente enviadas ao Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA).

3.5 Biomarcadores bioquímicos

Um fragmento de cérebro (± 50 mg) e do músculo axial (± 100 mg) foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5), numa proporção 1:10 (peso: volume). Em seguida o homogenato foi centrifugado a 12.000 xg por 20 minutos à 4°C . O sobrenadante foi aliquoteado para a análise da atividade da AChE.

Uma porção (± 100 mg) de cada amostra de fígado foi homogeneizada em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7), numa proporção de 1:10 (peso:volume) e centrifugadas à 15.000 xg por 30 minutos à 4°C . O sobrenadante foi aliquoteado para

a análise das atividades das enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), e glutathione peroxidase (GPx), e dos níveis de glutathione reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (LPO).

Outra porção (± 80 mg) de cada amostra de fígado foi homogeneizada em tampão Tris-HCl (20mM)/sacarose buffer (500mM) (pH 8,6), numa proporção de 1:5 (peso:volume), centrifugada a 15.000 xg por 30 minutos à 4°C, e o sobrenadante foi aliquoteado para a quantificação de metalotioneínas.

3.5.1 Concentração proteica

Para a normalidade dos dados das análises bioquímicas foi realizada a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Os homogenatos de todos os tecidos foram diluídos em uma proporção de 1:20. Então, 10 μ L da amostra diluída foi pipetada em microplaca e adicionado 250 μ L da solução de Bradford. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorbância com aqueles provenientes de uma curva padrão realizada com albumina de soro bovino (BSA). A análise foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm.

3.5.2 Atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AchE, tanto cerebral quanto muscular, foi medida segundo método de Ellman et al. (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998), e consiste no desenvolvimento de uma reação colorimétrica entre o ATC (iodeto de acetiltiocolina) e o DTNB (5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato) na presença de acetilcolinesterase, que pode ser mensurada por espectrofotometria a 405nm. Para tanto as amostras foram diluídas para 800 μ g de proteína.mL⁻¹ em tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,5). Em microplaca, foram adicionados 50 μ L de amostra, 200 μ L de DTNB (0,75mM) e 50 μ L de ATC (9mM), respectivamente. A leitura da atividade foi feita por 3 minutos em intervalos de 15 segundos, e a mesma foi expressa em nmol.min⁻¹ .mg de proteína⁻¹ .

3.5.3 Atividade da 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 CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a glutathione reduzida (GSH), pela GST, formando um tioéter que pode ser medido pelo aumento da absorbância a 340 nm. Os sobrenadantes de fígado foram diluídos para 2 mg de proteína.mL⁻¹. Em microplaca foram adicionados 20 µL de amostra, seguido de 180 µL de solução reação [GSH (3mM), CDNB (3 mM), tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 6,5)]. A medida da absorbância foi feita a cada 15 segundos durante 3 minutos, e a atividade foi expressa em nmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

3.5.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

O homogenato puro das amostras de fígado foi diluído (1:10) em tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,0). Em 40 µL da amostra diluída foi adicionado 885 µL de tampão Tris-EDTA pH 8,0, 50 µL de pirogalol e incubadas por 30 minutos. Após a incubação foi adicionado 25 µL de HCl 1N e 300 µL da reação foi adicionada em microplaca. Para cada amostra foi feita uma amostra controle a qual não passou pelo processo de incubação. A análise foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 440 nm (GAO et al., 1998). A atividade foi expressa em U de SOD.mg de proteína⁻¹.

3.5.5 Atividade da catalase (CAT)

Para medir a atividade da CAT hepática foi utilizado o método de Aebi (1984), que se baseia no consumo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) exógeno pela CAT, gerando água e oxigênio, podendo ser mensurado por espectrofotometria a 240 nm. As amostras foram diluídas (1:5) e como substrato foi utilizada uma solução de H₂O₂ a 20 mM. Em microplaca foram adicionados 5 µL da amostra e 295 µL da solução de H₂O₂. A leitura da absorbância foi realizada a cada 15 segundos durante 1 minuto e a atividade foi expressa em µmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

3.5.6 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

O método para determinar a atividade da GPx baseou-se na medida do decréscimo de absorbância a 340 nm, gerado durante a redução de GSSG, catalisada pela GR (Glutathiona reductase), em presença de NADPH (HAFEMAN; SUNDE; HOEKSTRA, 1974). Para tanto, em microplaca, foi adicionado a amostra, uma solução de azida sódica (2mM), com o objetivo de inibir a atividade da CAT, para que ela não degrade o H₂O₂ presente, e por último uma solução reação, contendo: H₂O₂ (5 mM), NADPH (0,3077mM), GSH (3,0769 mM) e GR (1,54 U.mL⁻¹) diluídos em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7). A leitura da atividade foi feita por 2 minutos, a cada 15 segundos e os resultados foram expressos em nmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

3.5.7 Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

O método para indicar a concentração da glutathiona reduzida foi baseado em Sedlak e Lindsay (1968). Uma alíquota de 200 µL de amostra de fígado pura com 50 µL de TCA (ácido tricloroacético) 50% foi utilizada e centrifugada à 10000x g por 10 minutos. Na microplaca foi pipetado 50 µL do sobrenadante, 230 µL de tampão TRIS 0,4 M e 20 µL de DTNB 2,5 mM. A análise foi realizada no comprimento de onda de 415 nm. A concentração de GSH foi expressa em µg de GSH.nm de proteína⁻¹.

3.5.8 Lipoperoxidação (LPO)

A peroxidação de lipídios foi analisada através do método FOX, que baseia-se na rápida oxidação do Fe+2 mediada por peróxido sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe+3 – laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve a luz a 550-570 nm. O homogenato puro das amostras de fígado foi ressuspendido em metanol (1:1) e centrifugado à 5000 g por 5 minutos. Após, foi adicionado o reativo Fox à 100 µL do sobrenadante e incubadas por 30 minutos. Em microplaca foi pipetado 300 µL da reação, em triplicata. A análise em espectrofotometria foi realizada em comprimento de onda de 560 nm (JIANG; HUNT; WOLFF,1992). A unidade de concentração de peróxidos lipídicos usada foi nmol.mg de proteína⁻¹.

3.5.9 Metalotioneínas (MT)

Para a avaliação do conteúdo de metalotioneínas foi utilizado o método proposto por Viarengo *et al.* (1997), com algumas modificações. Este método determina o conteúdo de sulfidrilas (presentes nas MTs) a partir da comparação com uma curva de GSH, considerando 30% como a porcentagem de cisteínas que correspondem à MTs. Para tanto foi realizada uma série de precipitações, centrifugações e ressuspensões, culminado na ressuspensão do *pellet* contendo MT, ao qual foi adicionado a solução de Ellman, contendo: DTNB (0,4 mM) em tampão fosfato de sódio/NaCl (0,2 M/ 2 M, pH 8), e a leitura foi realizada a 412 nm . A unidade de concentração de MT usada foi $\mu\text{g. mg de proteína}^{-1}$.

3.6 Biomarcadores Genéticos

3.6.2 Teste do Micronúcleo Písceo (MNP)

Foi empregada a técnica descrita por Ueda *et al.* (1992) para analisar a frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos, e também fazer a análise quantitativa de eritrócitos normocromáticos (maduros) e policromáticos (imaturos).

A técnica consiste nas seguintes etapas:

- a) Diluir o sangue periférico coletado na proporção (1:1) em soro bovino fetal.
- b) Sobre a lâmina limpa depositar uma porção desta diluição de sangue.
- c) Fazer o esfregaço sanguíneo com auxílio de uma lamínula, sempre em um único sentido, espalhando o material por toda a sua extensão;
- d) Secar as lâminas *over night*;
- e) Fazer a fixação mergulhando as lâminas em metanol durante 10 minutos;
- f) Corar as lâminas imediatamente antes da análise microscópica com laranja de acridina a 0,003%.
- g) As lâminas foram analisadas, em teste cego, em microscópio de epifluorescência Leica DMLS2, com aumento de 1000x.

h) Foram analisados 2000 eritrócitos por animal. Somente foram consideradas as hemácias nucleadas com as membranas celular e nuclear intactas. Foram considerados micronúcleos somente as partículas que, em relação ao núcleo principal, não excederam 1/3 do seu tamanho, nitidamente separadas, com as bordas distinguíveis e com a mesma refringência do núcleo. As alterações na forma normal dos núcleos, que não se enquadraram na definição de micronúcleo, foram consideradas alterações morfológicas nucleares e analisadas segundo Carrasco, Tilbury e Myers (1990).

i) Foram contabilizados os eritrócitos policromáticos, e realizado o cálculo da frequência (% de eritrócitos policromáticos = total de eritrócitos policromáticos/2000). Estes eritrócitos imaturos, por apresentarem maior quantidade de RNA em seu citoplasma em relação às células maduras, ao serem corados com laranja de acridina apresentam o citoplasma vermelho.

3.6.3 Ensaio Cometa

Foi utilizada a técnica descrita por Singh et al. (1988) com modificações realizadas por Ferraro *et al.* (2004) e Cestari et al. (2004), e adaptada para tecido sólido (rim) em *Hoplias malabaricus* por Ramsdorf et al. (2009).

As primeiras etapas do ensaio cometa foram realizadas antes da coleta dos tecidos a serem analisados. Primeiro, as lâminas foram cobertas com uma fina camada de agarose normal. A etapa seguinte foi a preparação da agarose LMP (*Low melting point*), que forma a segunda camada na lâmina. Estas duas etapas iniciais estão descritas abaixo:

Preparo das lâminas com cobertura de agarose para ensaio cometa

a) Foram dissolvidos 1,5g de agarose normal em 100mL de PBS e agitado por duas horas. A mistura foi levada ao forno de micro-ondas até sua fervura e completa dissolução.

b) Após a primeira fervura, a agarose foi mantida em temperatura ambiente. Quando solidificada completamente, foi picada e levada ao forno de micro-ondas novamente. Essa etapa foi repetida por três vezes.

- c) Ao final das etapas de fervura, a agarose foi mantida em banho-maria a 70°C.
- d) As lâminas, previamente limpas, foram mergulhadas na agarose até a metade da porção esmerilhada, e retirado o excesso de agarose na face não esmerilhada da lâmina.
- e) As lâminas secaram em superfície plana e em temperatura ambiente *over night*, para a completa solidificação da cobertura de agarose.

Preparo da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)

- a) Foram dissolvidos 100mg de agarose LMP em 20mL de PBS.
 - b) Essa solução foi fervida em forno de micro-ondas apenas uma vez.
 - c) Até o momento de uso, a agarose LMP permaneceu em geladeira.
- Quando em uso, foi aquecida e mantida em 37°C.

3.6.3.1 Ensaio cometa com eritrócitos

Para o tecido sanguíneo, foram realizados os seguintes procedimentos:

- a) Da suspensão celular composta pelo sangue coletado (10 μ L) e diluído em soro bovino fetal (1mL), foi pipetado 10 μ L e homogeneizado com 120 μ L de agarose LMP;
- b) Esta mistura foi depositada sobre a lâmina, previamente coberta com agarose normal;
- c) Foram colocadas lamínulas cobrindo toda a superfície da lâmina, espalhando homogeneamente a suspensão celular por toda extensão laminar;
- d) Essas lâminas foram refrigeradas por pelo menos 15 minutos, para solidificar a nova camada de agarose;
- e) Após a refrigeração, as lamínulas foram gentilmente retiradas;
- f) As lâminas foram mergulhadas em cubetas contendo solução de lise e mantidas sob refrigeração por, pelo menos, 24 horas;
- g) Depois do processo de lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese. A cuba foi mantida sob refrigeração, na ausência de luz, e com uma solução de eletroforese alcalina (pH>13);

- h) As lâminas permaneceram nesta solução alcalina de eletroforese por 25 minutos, antes da corrida eletroforética, para desespiralização do DNA;
- i) Após este período, iniciou a corrida de eletroforese por 25 minutos, com as fontes configuradas para fornecer 300mA e 1V/cm.
- j) Ao final dos 25 minutos da corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com o tampão de neutralização (pH7,5). O processo de neutralização ocorreu com 3 banhos de tampão a cada 5 minutos.
- k) As lâminas secaram ao ar *overnight*;
- l) Quando secas, foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos;
- m) As lâminas foram coradas somente no momento da análise. Para isso, foram adicionados 30µL de brometo de etídio (20mg/L – Sigma-Aldrich®) em cada lâmina, e cobertas com uma lamínula;
- n) A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência Leica DMLS2, com filtro de rodamina e sob aumento de 400x.
- o) Foram analisados 100 nucleóides por animal. Os nucleóides foram classificados de acordo com o dano, de acordo com o comprimento da cauda em relação à cabeça, formadas após a corrida eletroforética. Foram atribuídos valores de classes para estes danos: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano extenso), e 4 (dano máximo). Através da classificação e quantificação dos danos foram gerados escores, através do somatório da quantidade de dano multiplicada pelo valor da classe (COLLINS et al., 1997).

3.6.3.2 Ensaio cometa para tecidos sólidos

Para a realização do ensaio cometa utilizando tecidos sólidos, como fígado, rim e cérebro, foi aplicada a metodologia de Ramsdorf *et al.* (2009) com ajustes, conforme segue:

- a) Os tecidos coletados e armazenados em soro bovino fetal, refrigerados e na ausência de luz, foram homogeneizados em homogeneizador *Potter®* a 1500rpm.
- b) Desta suspensão celular, foi adicionado 20µL e homogeneizado em 120µL de agarose LMP;

c) Para as próximas etapas, foram repetidos os procedimentos descritos no item 4.6.2.1 a partir da etapa b.

3.6.4 Quantificação de metal em tecido

Para a quantificação foram utilizadas as vísceras dos animais submetidos à exposição ao Pb. As amostras foram destinadas ao Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) para a realização da análise.

A metodologia consiste em triturar e homogeneizar as amostras, em seguida foram pesados cerca de 0,5 a 1 g que passam por processo de digestão ácida com cerca de 5 ml de ácido nítrico, e 1 ml de peróxido de hidrogênio. Após filtração e aferição de volume, os elementos químicos foram quantificados por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES). Paralelamente foi realizada a análise de uma prova do branco dos reagentes e uma prova enriquecida com a quantidade mínima do elemento contaminante e avaliada a % de recuperação como parâmetro de garantir o desempenho do procedimento.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada separando os tratamentos grupos:

- CNN, CN1, CN2;
- CN2, H₂O+Pb;
- CN2, NP1+H₂O, NP2+H₂O, NP3+H₂O;
- CN2, NP1+Pb, NP2+Pb, NP3+Pb;
- NP1+H₂O, NP1+Pb, H₂O+Pb;
- NP2+H₂O, NP2+Pb, H₂O+Pb;
- NP3+H₂O, NP3+Pb, H₂O+Pb.

O controle positivo foi incluído apenas na análise estatística do ensaio cometa, pois esse é um controle da técnica. Em todos os grupos foi testada a normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste ANOVA (1 critério) seguido do pós-teste t (LSD – *Least significant difference*). Quando os dados não apresentaram distribuição normal ou apresentaram variâncias desiguais, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-

Wallis, com pós teste de Student-Newman-Keuls. Foi considerado nível de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$).

Todas as análises foram executadas através dos programas BioEstat 5.0 e GraphPad® Prism 6.0.

4 RESULTADOS

Durante o período de aclimação, e durante a realização dos bioensaios, não houve mortalidade de nenhum indivíduo.

4.1 Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio

A microscopia eletrônica de transmissão (Figura 10) e a difração de raio-X confirmaram que o pó de nanopartícula utilizado foi 100% composto da forma cristalina anatase. O material também apresentou área de superfície específica de $83,47\text{m}^2/\text{g}$ (B.E.T.), tamanho médio de 107nm , tamanho de dispersão de 45nm (DLS), e a química de superfície composta por $28,42\%$ de titânio e $71,58\%$ de oxigênio (XPS).

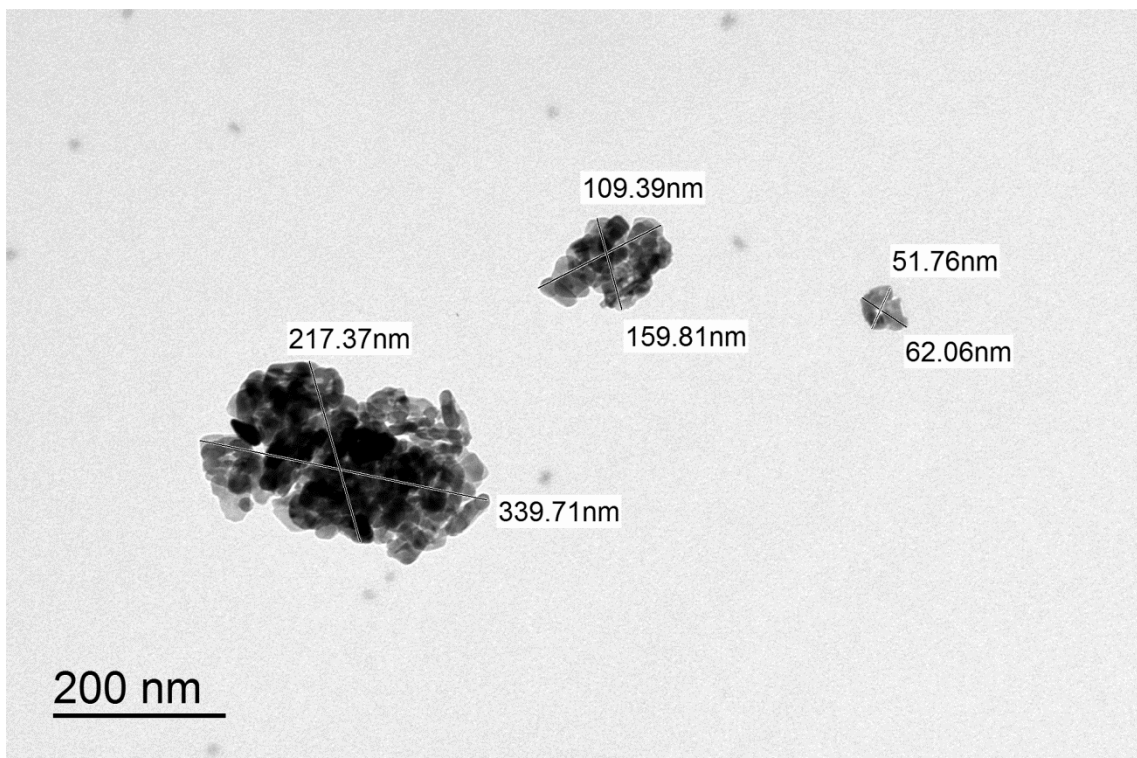


FIGURA 6 - ELETROMICROGRAFIA DE NANOPARTÍCULAS DE TiO_2 COM FORMA CRISTALINA DE ANATASE.

As suspensões de $0,05\text{mg/L}$ e $0,5\text{mg/L}$ apresentaram partículas com tamanho médio de $570,3\text{ nm}$ e $334,1\text{ nm}$, respectivamente. A suspensão mais concentrada, 5mg/L , apresentou dois tamanhos médios de partículas, $352,7\text{ nm}$ e 5560 nm (Figura 11).

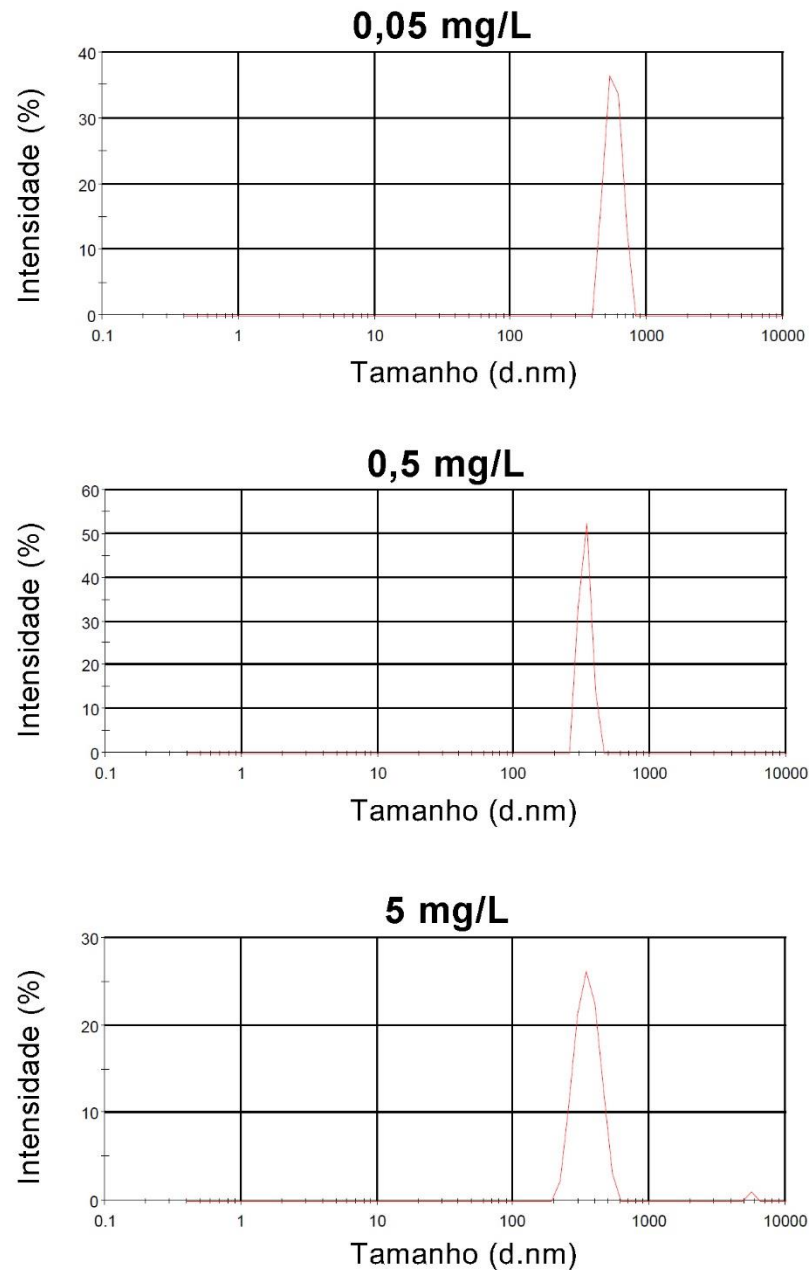


FIGURA 7 - TAMANHO DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ NAS SUSPENSÕES COLOIDAIIS DE 0,05mg/L, 0,5 mg/L E 5 mg/L.

A magnitude do potencial zeta fornece uma indicação das condições de estabilidade do sistema. Quando as partículas apresentam um potencial zeta elevado, $+30\text{mV} < \zeta < -30\text{mV}$, elas se repelem, garantindo a estabilidade da dispersão. Mas quando este potencial zeta é pequeno, $+30\text{mV} > \zeta > -30\text{mV}$, não há força suficiente para evitar que as partículas se aproximem, conseqüentemente, pode ocorrer floculação, tornando a dispersão instável (MALVERN, 2005). As três suspensões analisadas apresentaram valores de potencial zeta negativo ($\zeta > -30\text{mV}$) (Tabela 5).

O percentual de polidispersão fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos de partículas. Nas três suspensões analisadas este índice foi maior que 20%, indicando a formação de sistemas heterogêneos (Tabela 5).

TABELA 3 – CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ OBTIDAS PELO APARELHO ZETA SIZER®.

Concentração (mg/ml)	Tamanho (d.nm/intensidade)	Potencial Zeta (mV)	% de Polidispersão
0,05	570,3	-2,83	80,68
0,5	334,1	-5,38	93,97
5	352,7 e 5560	-4,68	81,79

4.2 Determinação de chumbo nas vísceras de *Rhamdia quelen*

A análise de quantificação de chumbo nas vísceras de *Rhamdia quelen*, realizada pelo CEPPA, no controle negativo ficou abaixo do limite de detecção (<0,10mg/Kg). O tratamento de H₂O+Pb, apresentou a maior quantidade de chumbo por Kg de tecido úmido (305,21mg/Kg). Nas associações do chumbo com as três concentrações de nanopartículas de dióxido de titânio, os indivíduos dos grupos NP1 e NP3 foram os quem apresentaram as maiores quantidades de chumbo, 293,16 e 278,37mg/Kg, respectivamente. O grupo exposto a associação NP2+Pb apresentou média de 186.12mg de chumbo/Kg (Tabela 6).

TABELA 4 - QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO NAS VÍSCERAS DE *Rhamdia quelen*.

Tratamento	[] tecidual (mg/Kg)
Controles Negativos (CNN, CN1, CN2)	<0.10
H₂O+PB	305.21
NP₁+PB	293.16
NP₂+PB	186.12
NP₃+PB	278.37

4.3 Avaliação dos Controles Negativos

Ao comparar os três controles negativos, observamos uma redução significativa na atividade da AChE cerebral nos controles com uma ($p=0,0005$) e duas injeções ($p<0,0001$) em relação ao controle sem injeção (Figura 6a).

Não houve diferença ($p>0,05$) na atividade da AChE muscular entre os controles negativos (Figura 6b).

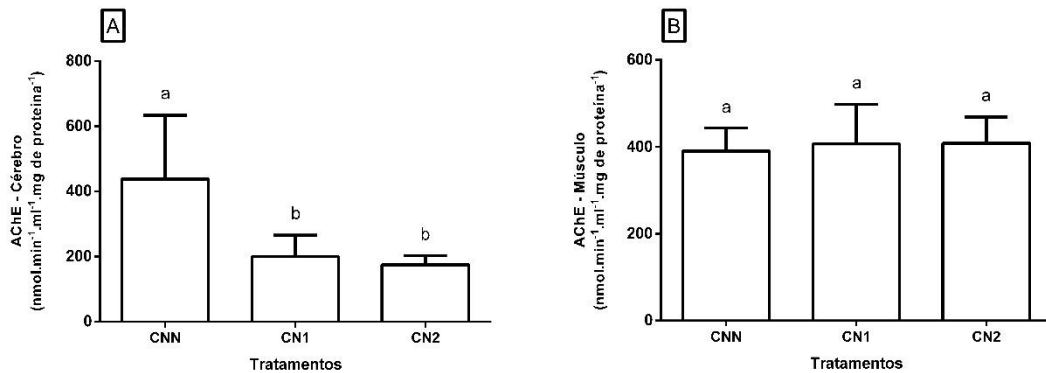


FIGURA 8 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) CEREBRAL (A) E MUSCULAR (B) NOS CONTROLES NEGATIVOS SEM INJEÇÃO DE ÁGUA DESTILADA (CNN), COM UMA INJEÇÃO (CN1) E DUAS INJEÇÕES (CN2). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p<0,05$) ENTRE OS GRUPOS.

A Atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase não diferiu entre os controles (Figura 7 a, b, c). Porém, foi observada uma redução significativa na atividade da glutathione S-transferase ao comparar o CNN com o grupo CN2 ($p<0,0001$) (Figura 7d).

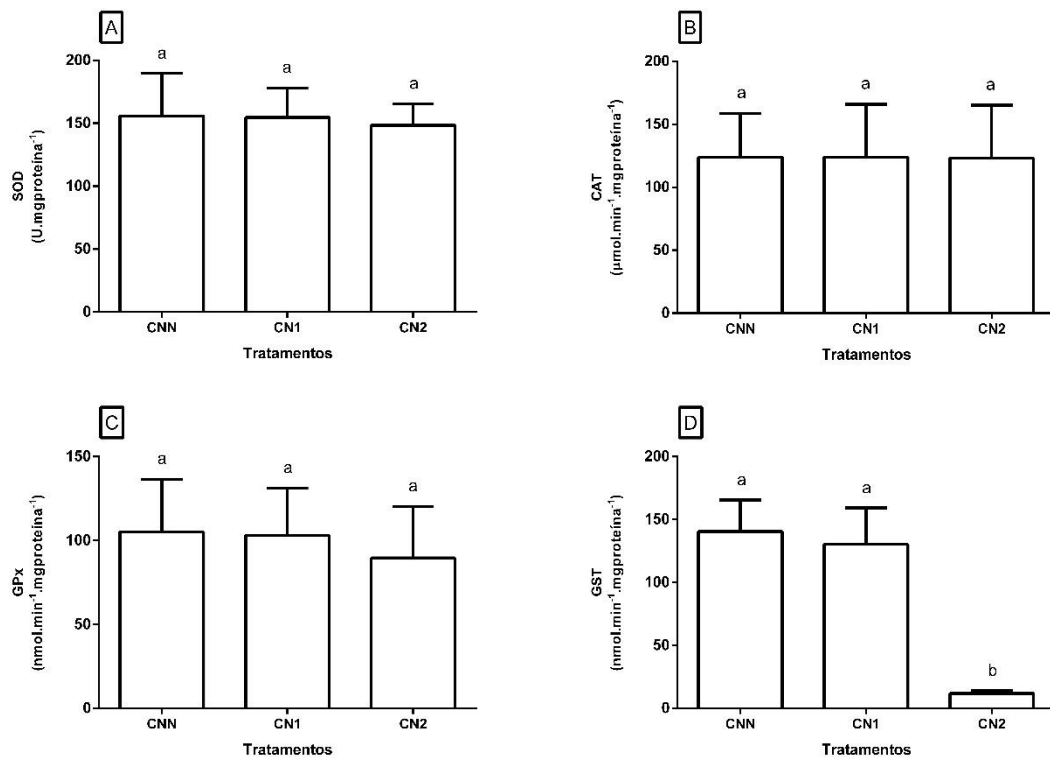


FIGURA 9 - ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) (A), CATALASE (CAT) (B), GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX) (C) E GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) (D) EM TECIDO HEPÁTICO DE *Rhamdia quelen*, NOS GRUPOS CONTROLES NEGATIVO SEM INJEÇÃO (CNN), COM UMA INJEÇÃO (CN1) E COM DUAS INJEÇÕES (CN2). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS GRUPOS.

A concentração de GSH reduziu no grupo CN2 em relação aos grupos CNN ($p < 0,0001$) e CN1 ($p = 0,0001$) (Figura 8a). Resultado semelhante foi obtido com os níveis de LPO (Figura 8b), onde o grupo CN2 também diferiu de CN1 ($p = 0,0115$) e CNN ($p < 0,001$).

A análise de metalotioneína não apresentou diferenças entre os três controles negativos (Figura 8c).

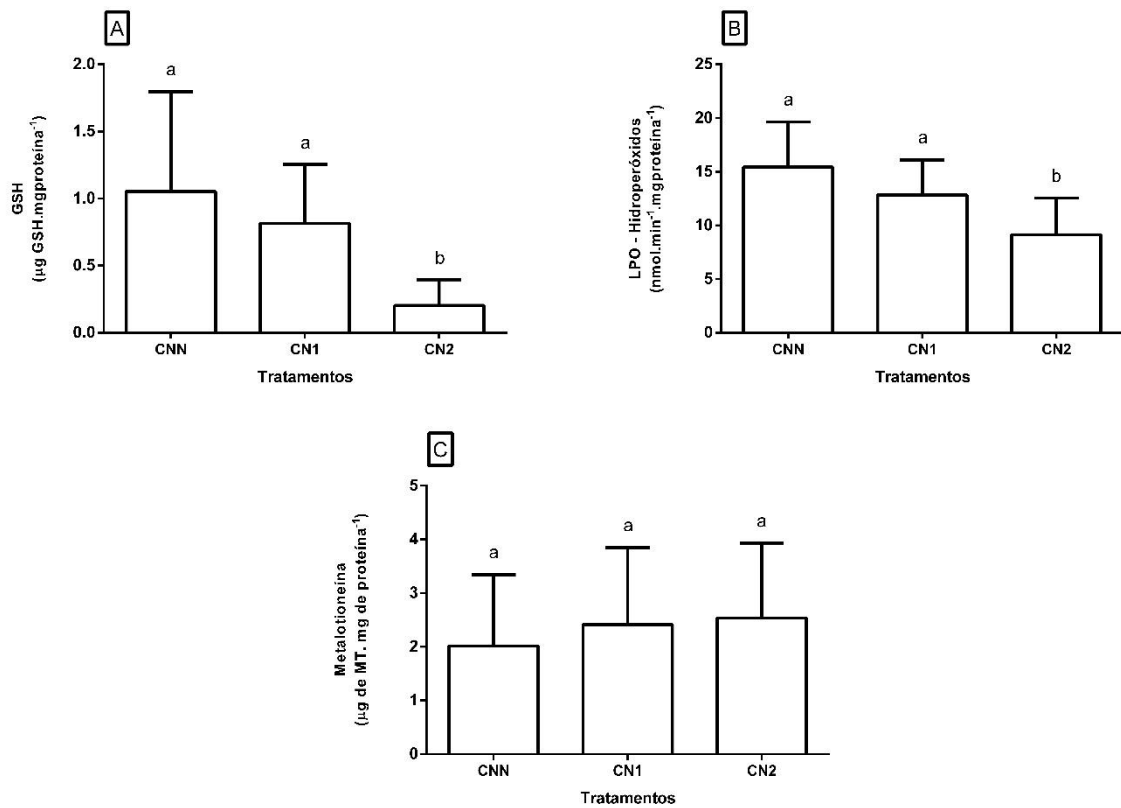


FIGURA 10 – AVALIAÇÃO DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GSH) (A), PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) (B) E METALOTIONEÍNA (C) EM TECIDO HEPÁTIDO DE *Rhamdia quelen*, NOS GRUPOS CONTROLES NEGATIVO SEM INJEÇÃO (CNN), COM UMA INJEÇÃO (CN1) E COM DUAS INJEÇÕES (CN2). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS GRUPOS.

Na análise mutagênica, não foi observado nenhum micronúcleo nos eritrócitos dos grupos controle. Quando analisados por alterações morfológicas nucleares os controles negativos e positivo não diferiram. Também não houve diferença no percentual de eritrócitos policromáticos (imaturos) (Tabela 4). Apesar disso, podemos destacar a quantidade alta de eritrócitos do tipo vacuolated nos três controles, ao comparar com as demais alterações morfológicas nucleares.

TABELA 5 - FREQUÊNCIA MÉDIA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS DE *Rhamdia quelen*, SEPARADOS POR BLEBBED, LOBED, NOTCHED, VACUOLATED, TOTAL DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES E PERCENTUAL DE ERITRÓCITOS IMATUROS. VALORES EXPRESSOS EM MEDIANA (1ºQ/3ºQ). NÃO HOUE DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS GRUPOS.

TRATAMENTOS	BLEBBED	LOBED	NOTCHED	VACUOLATED	TOTAL AMN	% ERITRÓCITOS IMATUROS
CNN	0 (0 / 3.5)	0 (0 / 1)	0.5 (0 / 2)	8.5 (4 / 24.25)	13 (4.25 / 30.5)	0.4 (0.16 / 0.94)
CN1	0 (0 / 1)	0 (0 / 1)	0 (0 / 1)	9 (5 / 15)	10 (6 / 17)	0.3 (0.2 / 1)
CN2	1 (0 / 2.25)	0 (0 / 3)	0 (0 / 2)	4 (1.75 / 12.25)	7 (3 / 17.25)	0.42 (0.1 / 0.87)
CP	1 (1 / 2.75)	1 (0 / 2.75)	0.5 (0 / 1)	11 (3.25 / 22)	12.5 (6 / 33)	0.2 (0.05 / 1.363)

Nas análises de genotoxicidade, o ensaio cometa apresentou resultados semelhantes para os quatro tecidos analisados (sangue, rim, fígado e cérebro), mostrando que não houve diferença nos escores entre os três controles negativos, tendo sido observado aumento de danos apenas no controle positivo (Figura 9a-d).

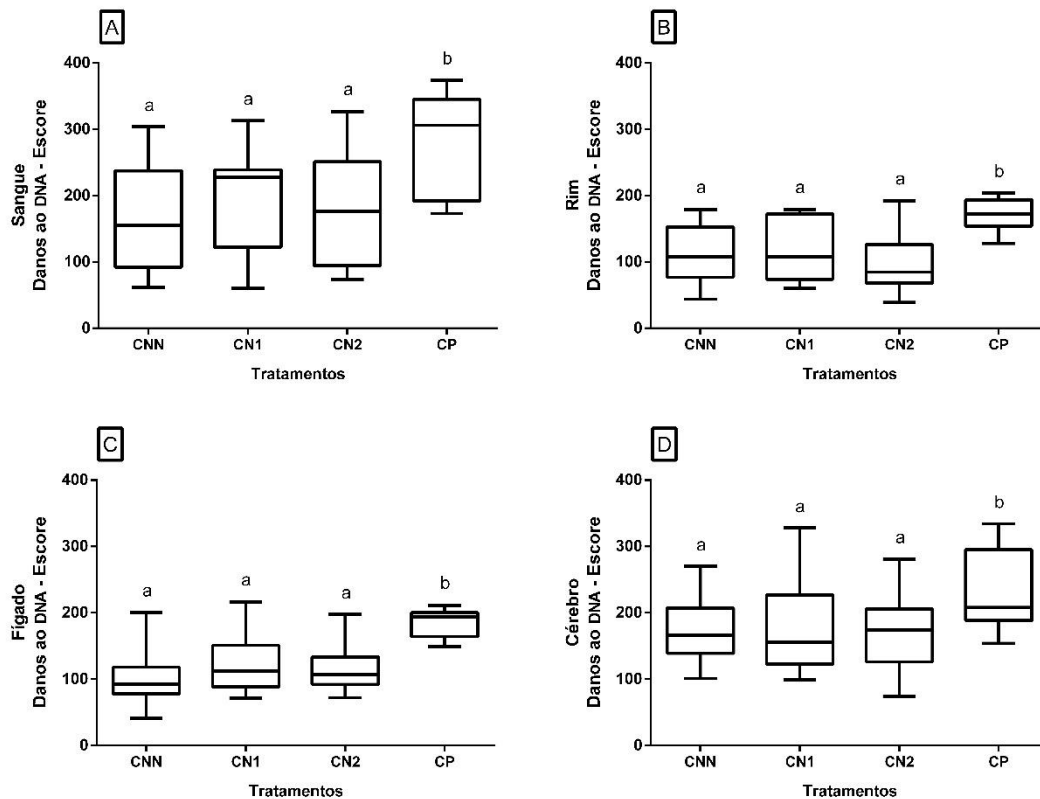


FIGURA 11 - DANOS AO DNA DE ERITRÓCITOS (A), RIM (B), FÍGADO (C) E CÉREBRO (D) DE *Rhamdia quelen*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. CONTROLE NEGATIVO SEM INJEÇÃO (CNN), CONTROLE NEGATIVO COM UMA INJEÇÃO DE ÁGUA DESTILADA (CN1), CONTROLE NEGATIVO COM DUAS INJEÇÕES DE ÁGUA DESTILADA (CN2) E CONTROLE POSITIVO (CP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

4.4 Biomarcadores bioquímicos

A análise dos controles negativos nos apresentaram alterações significativas nas respostas dos biomarcadores bioquímicos, principalmente para o tratamento CN2. Desta forma, o controle negativo 2 (CN2) foi utilizado como referência nas análises

estatísticas, para biomarcadores bioquímicos e genéticos, uma vez que em todos os tratamentos foram administrados mesmo volume.

Os indivíduos expostos ao chumbo não apresentaram diferença na atividade da AChE cerebral em relação ao controle negativo ($p > 0,05$), assim como os grupos expostos somente a nanopartícula também não diferiram do controle (Figura 12 a,b). Quando avaliamos a AChE cerebral dos exemplares expostos às NpTiO_2 e ao metal, o grupo NP1+Pb apresentou um aumento na atividade desta enzima quando comparada ao CN2 ($p = 0,016$), entretanto, NP2+Pb e NP3+Pb não diferiram do CN2 e de NP1+Pb (Figura 12c). Ao comparar os tratamentos associados, de cada dose, com os tratamentos dos contaminantes isolados, observamos que o grupo exposto ao chumbo apresentou uma menor atividade da AChE cerebral, quando comparada com a nanopartícula isolada ou em associação ao Pb. Esta resposta pode ser observada nas análises para as doses NP1 e NP2 (Figura 12 d-e). Na dose maior, NP3, foi observada diferença entre NP3+H₂O e o tratamento com Pb ($p = 0,0119$), entretanto para NP3+Pb não diferiu de NP3 ou do Pb (Figura 12 f).

A atividade da AChE muscular não apresentou diferença na análise entre os grupos CN2 e Pb (Figura 13 a). As três doses de nanopartículas de TiO_2 proporcionaram uma redução na atividade da enzima, diferindo do CN2 (Figura 13b). Quando combinadas as nanopartículas com o metal, não houve diferença significativa entre os grupos expostos e o CN2 (Figura 13c). Nas análises dos tratamentos de associação (NP1+Pb, NP2+Pb, NP3+Pb), quando comparados com grupos isolados de nanopartículas e chumbo, não foram observadas diferenças as doses NP1 e NP3 (Figura 13 d,f). Porém, para a dose intermediária (NP2) houve um aumento significativo na atividade da AChE muscular no tratamento associado (NP2+Pb), quando comparado com o grupo exposto à nanopartícula isolada ($p = 0,0165$), mas sem diferir do tratamento de chumbo isolado (Figura 13 e).

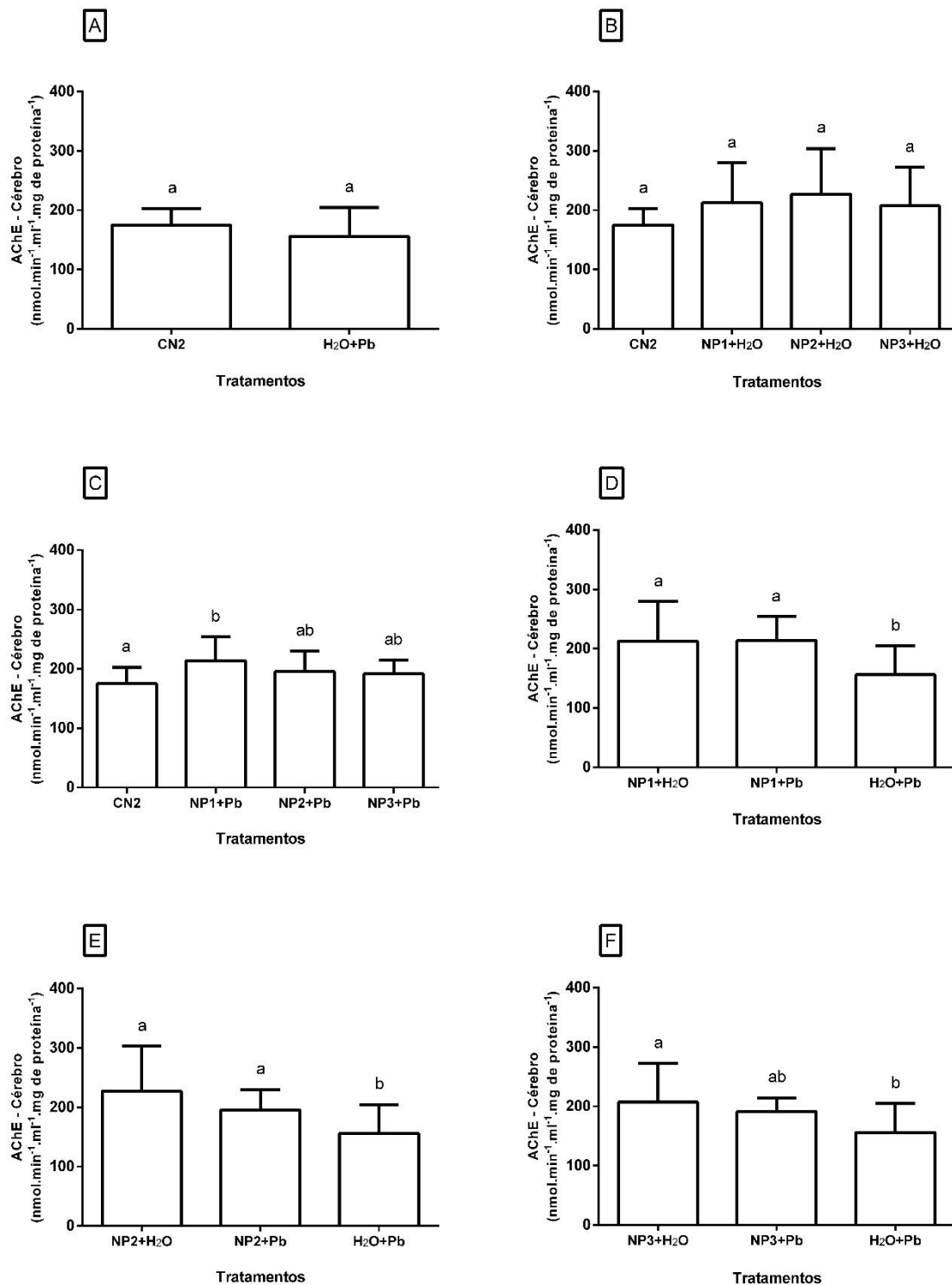


FIGURA 12 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) CEREBRAL EM *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) , 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40 μ g/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

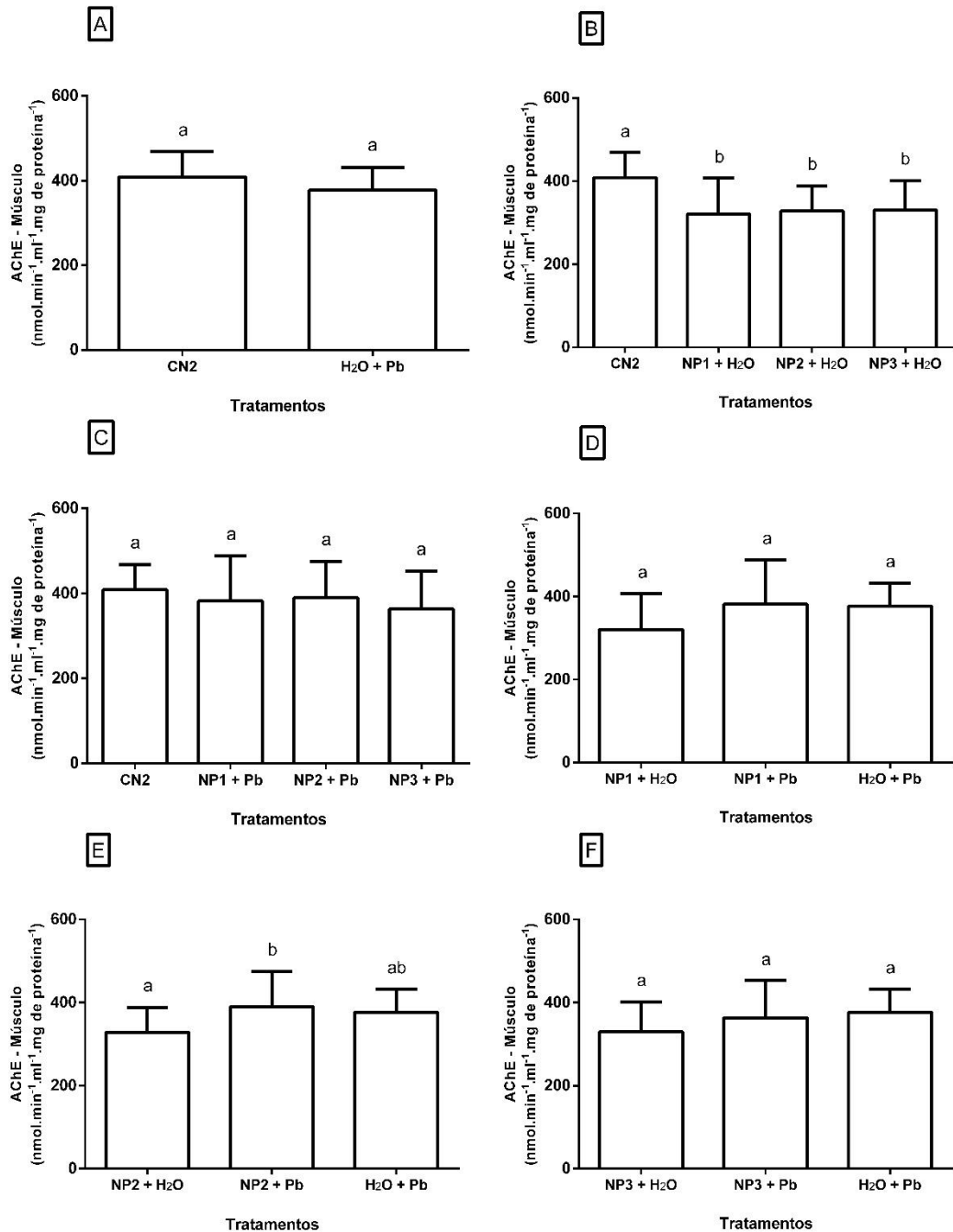


FIGURA 13 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) MUSCULAR EM *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) , 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40 μ g/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

A atividade da GST em tecido hepático mostrou um aumento no grupo contaminado com Pb em relação ao CN2 ($p=0,006$) (Figura 14a). Nos tratamentos de nanopartículas, indivíduos expostos à dose NP1 apresentaram um aumento na atividade desta enzima, diferindo tanto do CN2 quanto de NP2 e NP3 ($p<0,0001$) (Figura 14b). O grupo NP2+Pb teve aumento na atividade da GST diferindo do CN2 ($p=0,0058$), enquanto que as demais associações não apresentaram diferenças em relação ao controle negativo nem entre si (Figura 14c). Quando comparados os grupos expostos as doses associadas ao metal, com os grupos com nanopartícula de TiO₂ e com chumbo isolados, não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 14d-f).

O tratamento com chumbo resultou em um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) quando comparado ao controle negativo ($p=0,00383$) (Figura 15a). Não foi encontrada diferença na atividade da SOD entre os três tratamentos com nanopartícula de TiO₂ em relação ao CN2 (Figura 15b). Na análise dos exemplares expostos a associação NP1+Pb foi verificada a redução na atividade da enzima SOD, diferindo de CN2 ($p=0,0193$), de NP2+Pb ($p=0,0143$) e NP3+Pb ($p=0,0459$) (Figura 15c). Ao comparar tratamentos associados com os isolados, o grupo NP1+Pb apresentou redução da atividade de SOD em relação aos grupos expostos aos contaminantes isolados (Figura 15d). Os grupos da dose NP2, não apresentaram diferença entre os três tratamentos (NP2+H₂O, NP2+Pb, Pb+H₂O) (Figura 15e). Na maior dose de nanopartícula, NP3, somente o chumbo isolado resultou em aumento na atividade, apresentando diferença estatística em relação à nanopartícula isolada ($p=0,0243$) e a associação dos contaminantes ($p=0,0132$) (Figura 15f).

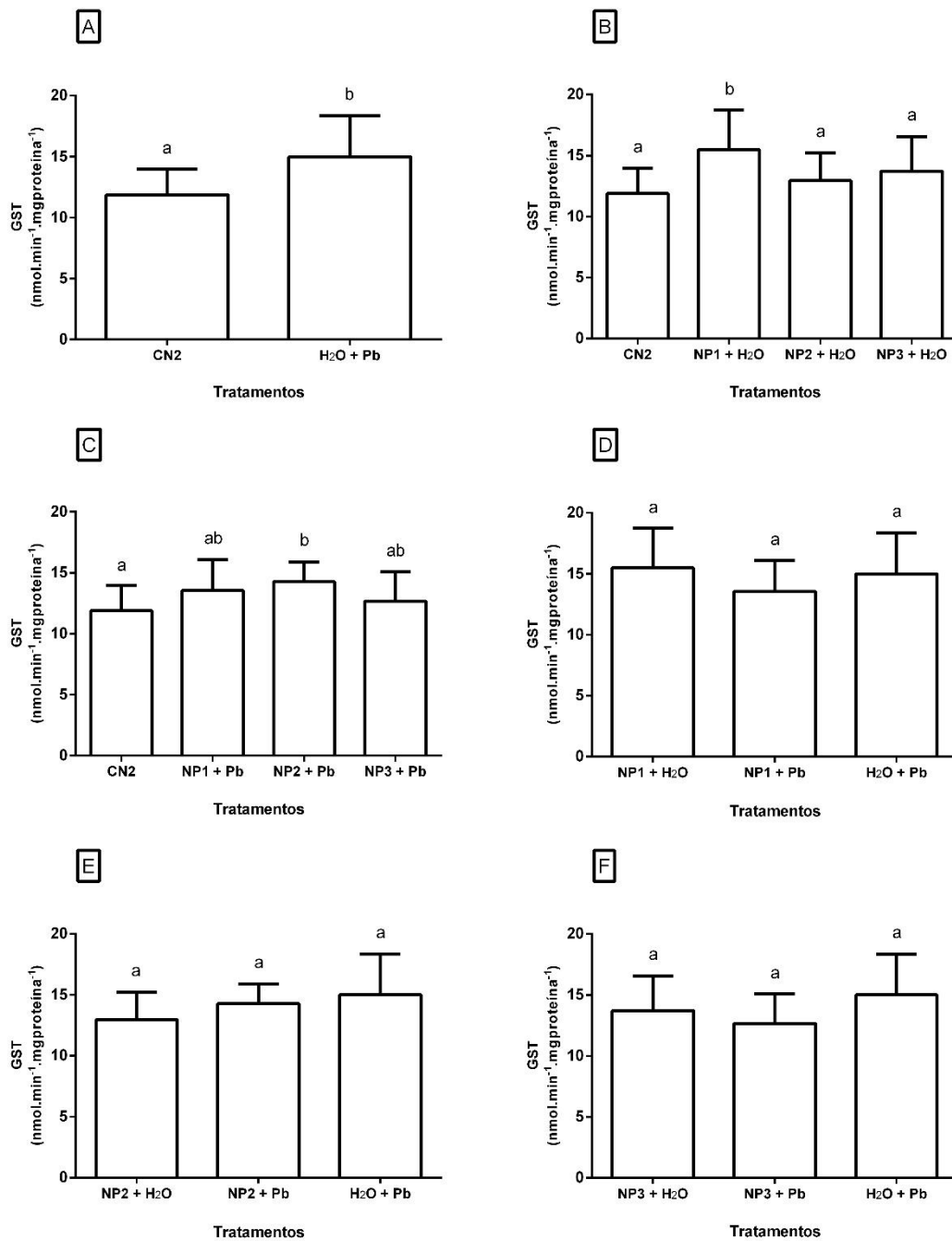


FIGURA 14 - ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) EM FÍGADO DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) , 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO (CN2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40 μ g/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

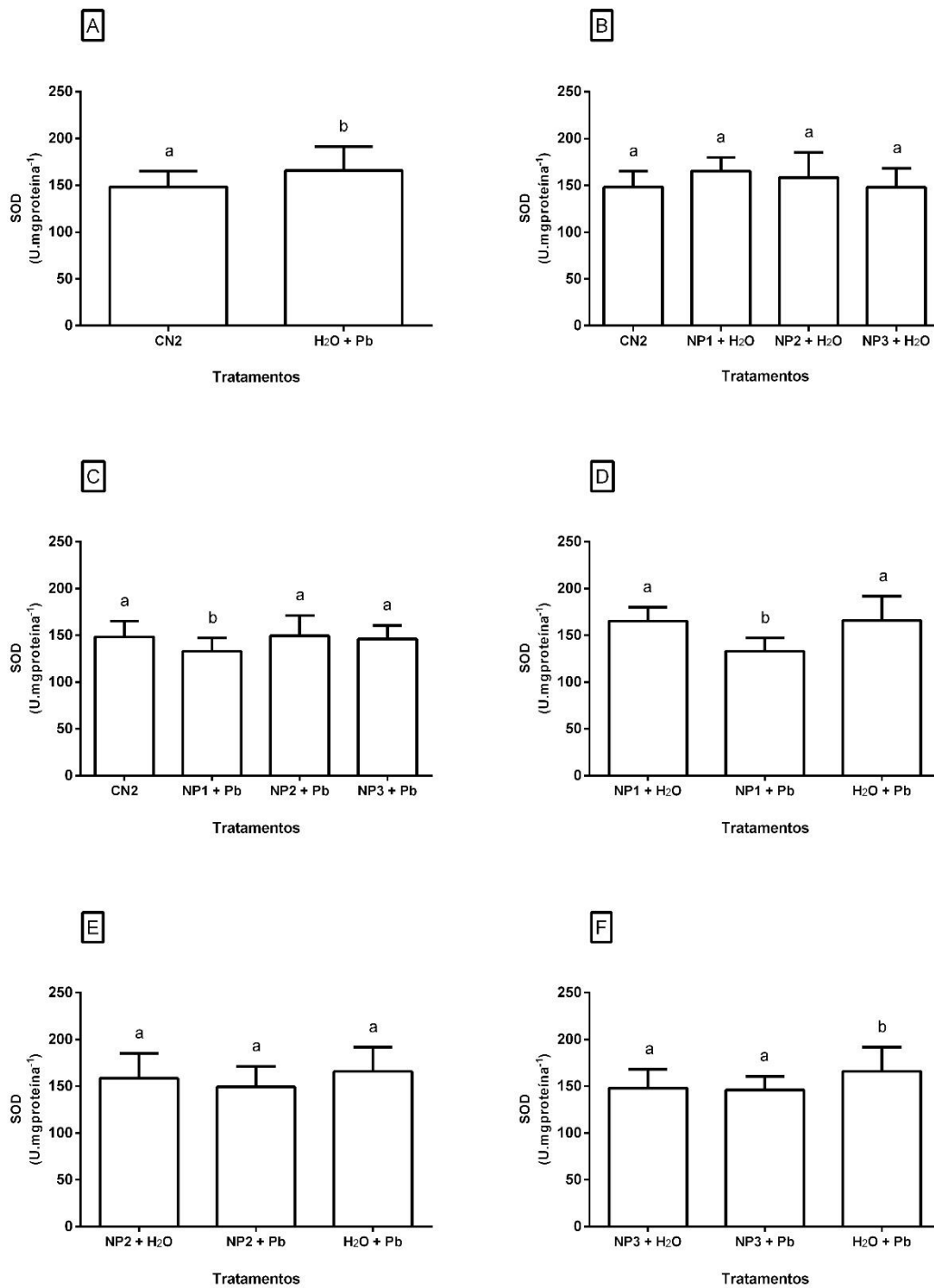


FIGURA 15 - ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM FÍGADO DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) , 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2) , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40 μ g/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

A atividade da enzima catalase (CAT) não apresentou diferença entre os grupos CN2 e Pb (Figura 16a), o mesmo ocorreu entre os grupos CN2, NP1, NP2 e NP3 (Figura 16b). Houve um aumento na atividade da CAT nos indivíduos expostos ao tratamento NP1+Pb quando comparado ao CN2 ($p=0,0343$), ao NP2+Pb ($p=0,0018$) e ao NP3+Pb ($p=0,0003$) (Figura 16c). Na análise dos grupos de NP1, NP1+Pb e Pb e dos grupos NP2, NP2+Pb e Pb, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Figura 16 d-e), apenas o grupo exposto à associação NP3+Pb apresentou redução na atividade da CAT quando comparado ao grupo NP3 ($p=0,0292$) e Pb ($p=0,0330$) (Figura 16f).

Os tratamentos com chumbo (Figura 17a), nanopartículas isoladas (Figura 17b) e associação entre nanopartículas e metal (Figura 17c) não apresentaram diferença na atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) quando comparadas ao CN2. Para os grupos NP1, NP1+Pb e Pb (Figura 17d), não houve diferença significativa, mas no grupo NP2+Pb houve maior atividade da GPx em relação ao grupo NP2 ($p=0,0092$) (Figura 17e). A análise da maior dose (NP3), mostrou diferença ao ser comparada a NP3+Pb ($p=0,0037$) e Pb ($p=0,0396$) (Figura 17f).

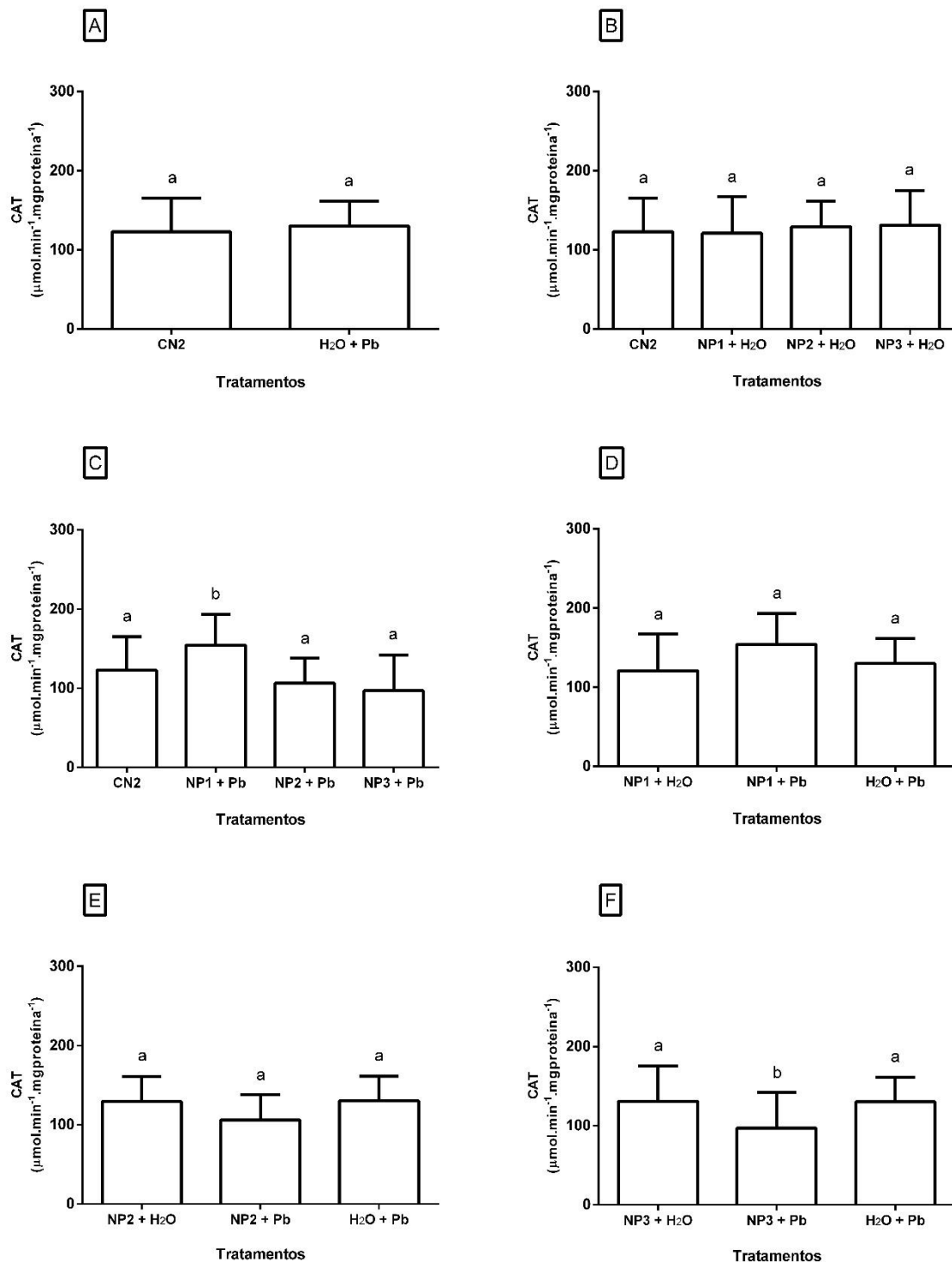


FIGURA 16 - ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) EM FÍGADO DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2), 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb, 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (p<0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS.

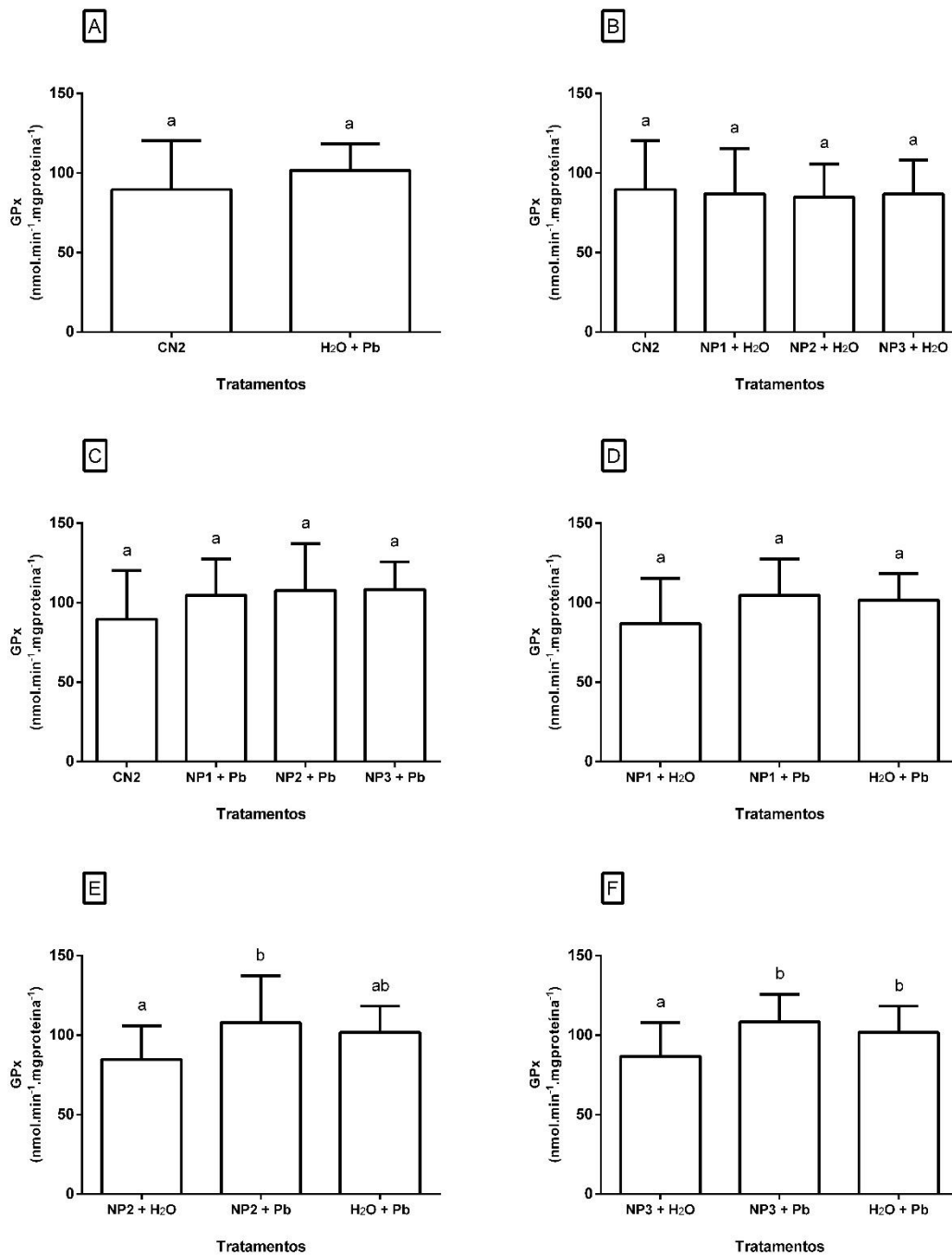


FIGURA 17 - ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) EM FÍGADO DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2), 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb, 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40 μ g/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) apresentou um aumento significativo nos indivíduos do tratamento com chumbo em relação ao grupo CN2 ($p=0,0001$) (Figura 18a). Em indivíduos expostos às três doses de nanopartícula de TiO_2 também foi observado um aumento de GSH, NP1 diferiu tanto do CN2 ($p<0,0001$) quanto de NP3 ($p=0,0252$), que também diferiu do controle negativo ($p=0,0073$). A dose de 5ng/g (NP2) diferiu somente do CN2 ($p<0,0001$) (Figura 18b). As associações também apresentaram aumento de GSH, diferenciando-os do controle negativo. Os tratamentos NP1+Pb e NP2+Pb também foram estatisticamente diferentes entre si ($p=0,0109$) (Figura 18c). O grupo NP1 não diferiu do tratamento NP1+Pb e do H_2O +Pb (Figura 18d). O tratamento NP2 apresentou menor concentração de GSH quando comparada aos grupos NP2+Pb ($p<0,0001$) e H_2O +Pb ($p=0,0221$), assim como esses dois tratamentos também mostraram diferença estatística ($p=0,0071$) (Figura 18e). O grupo NP3 (50ng/g) teve menor concentração de GSH quando comparado aos grupos NP3+Pb ($p<0,001$), e o metal isolado ($p=0,0054$) (Figura 18f). Além disso, destacamos que tanto o grupo NP2+Pb, quanto o grupo NP3+Pb foram os de maior concentração da GSH.

O nível de peroxidação lipídica (LPO) no tratamento com chumbo não resultou diferença em relação ao CN2 (Figura 19a). Quando foram comparados os grupos NP1 e NP3 com CN2 as diferenças foram significativas ($p=0,0167$) e ($p=0,0195$), respectivamente. O grupo NP2 não diferiu do CN2, porém foi observada diferença em relação a NP1 ($p=0,0003$) e NP3 ($p=0,0004$) (Figura 19b). Para as associações, apenas NP1+Pb apresentou um aumento de hidroperóxidos, diferenciando do controle negativo ($p=0,035$), do NP2+Pb ($p=0,0009$) e de NP3+Pb ($p=0,0281$) (Figura 19c). Porém, dos conjuntos estatísticos que avaliam a associação de contaminantes em relação aos expostos de forma isolada, somente a dose intermediária (NP2) apresentou diferenças entre os tratamentos. Os exemplares expostos ao Pb apresentaram uma concentração maior de hidroperóxidos quando comparado com NP3+Pb ($p=0,0281$) e NP3 ($p=0,0133$) (Figura 19e).

Não foi possível evidenciar qualquer alteração significativa na concentração de metalotioneínas em nenhum dos grupos analisados (Figura 20 a-f).

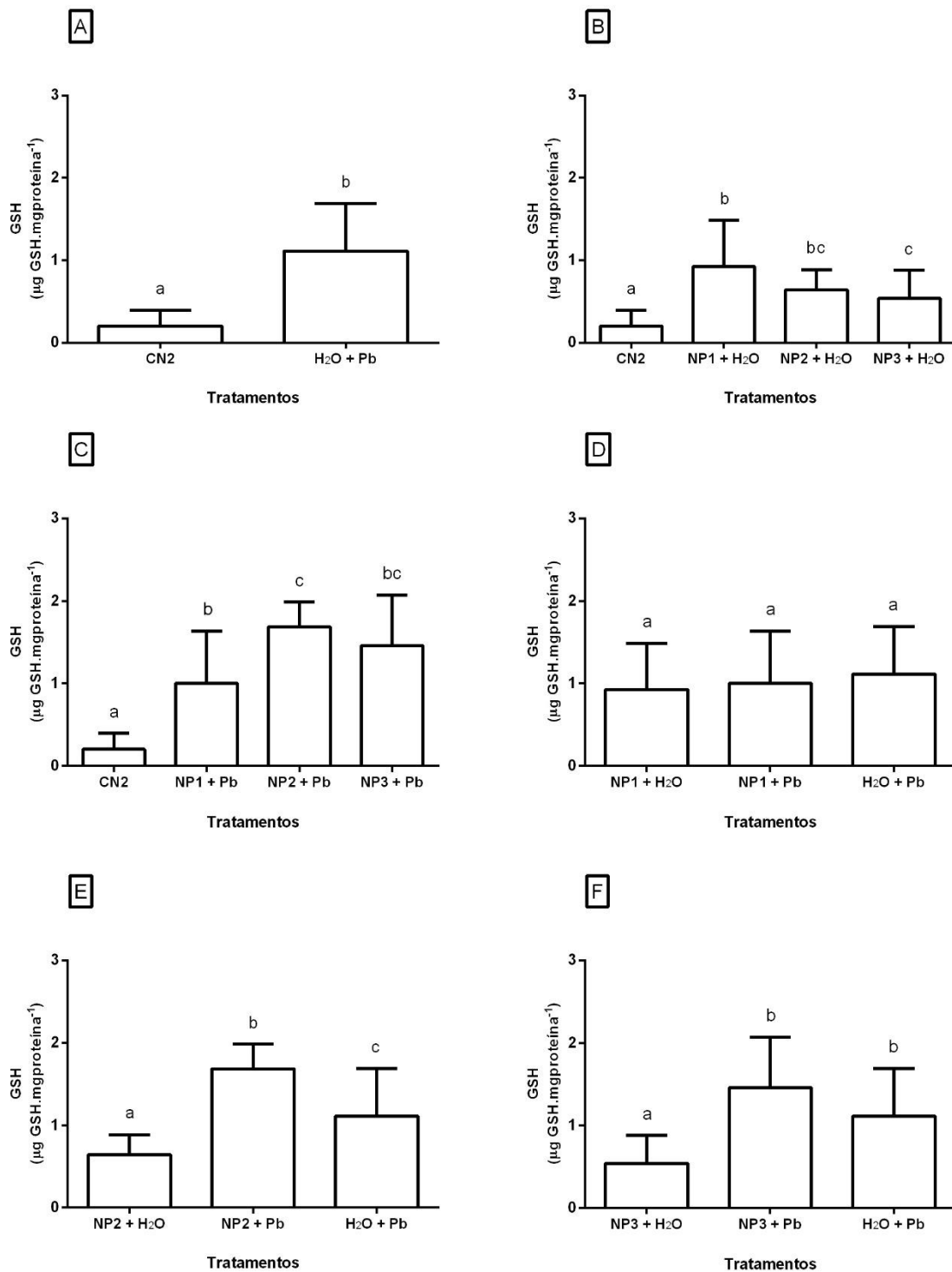


FIGURA 18 – CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM FÍGADO DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2), 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb, 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (p<0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS.

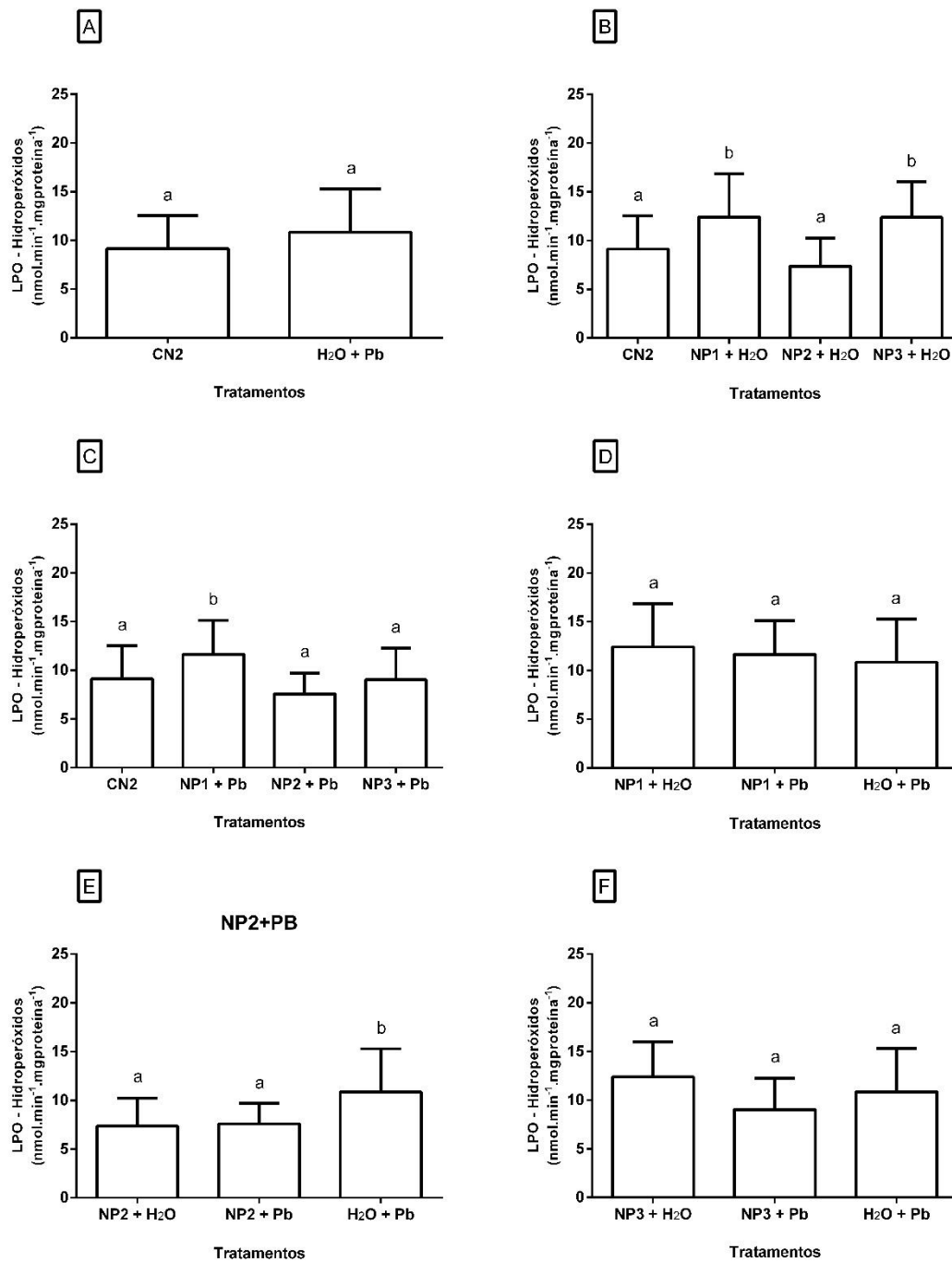


FIGURA 19 – AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) EM FÍGADO DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2), 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb, 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA (p<0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS.

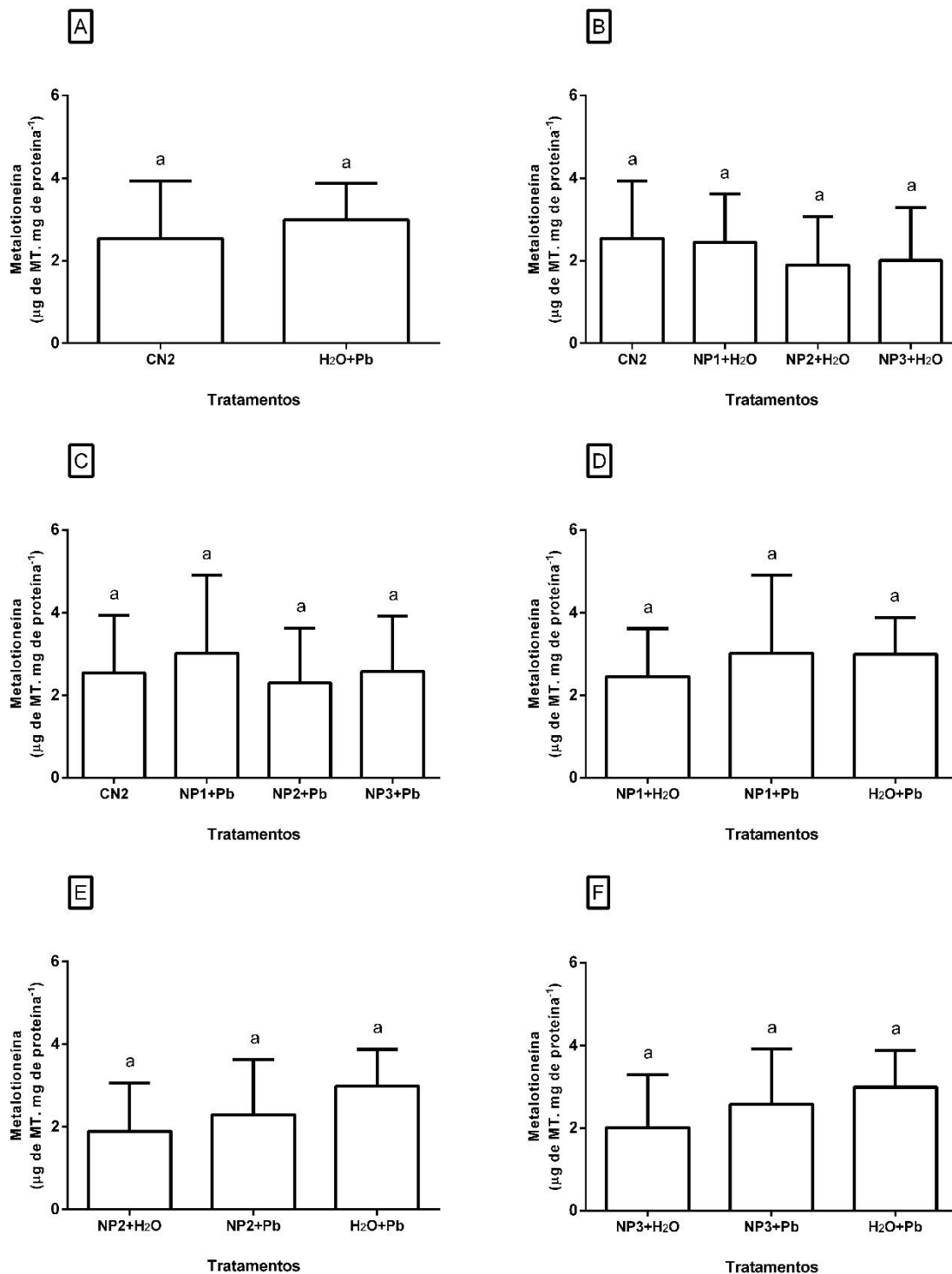


FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNA (MET) EM CÉLULAS HEPÁTICAS DE *Rhamdia quelen*. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40µg/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2 , 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb , 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40µg/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40µg/g Pb E CHUMBO (40µg/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ±ERRO PADRÃO. NÃO HOUE DIFERENÇA ENTRE OS TRATAMENTOS.

4.5 Biomarcadores genéticos

4.5.1 Teste do micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares

Durante análise das lâminas de micronúcleos, não foram observados micronúcleos. As alterações morfológicas nucleares mais frequentes durante a análise foram: *blebbed*, *lobed*, *notched* e *vacuolated* (Figura 21).

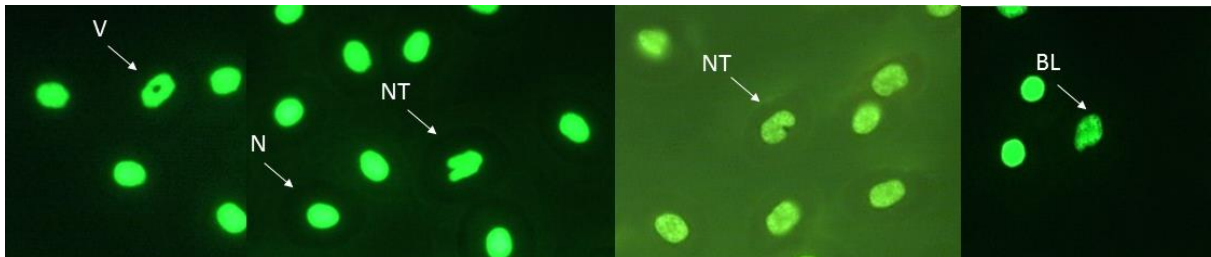


FIGURA 21 - TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES. (V) VACUOLATED, (N) NORMAL, (NT) NOTCHED, (BL)BLEBBED. FONTE: A AUTORA.

A análise estatística das alterações morfológicas nucleares totais não apresentaram diferenças significativas em relação a nenhum grupo, assim como quando foram analisadas as alterações morfológicas nucleares separadamente (Tabela 7). Porém, o tipo de alteração mais frequente em todos os grupos foi *vacuolated*.

Ao analisar o percentual de eritrócitos imaturos, também não foi possível observar diferença significativa em nenhum conjunto de análise (Tabela 7).

TABELA 6 – FREQUÊNCIA MÉDIA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS DE *Rhamdia quelen*, SEPARADAS ENTRE BLEBBED, LOBED, NOTCHED, VACUOLATED, TOTAL DE AMN E % DE ERITRÓCITOS IMATUROS. COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES CONJUNTOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA. VALORES EXPRESSOS EM MEDIANA (1ºQ/3ºQ). NÃO HOUVE DIFERENÇA ESTATÍSTICA (P < 0,05) ENTRE OS TRATAMENTOS.

TRATAMENTOS		BLEBBED	LOBED	NOTCHED	VACUOLATED	TOTAL AMN	% ERITRÓCITOS IMATUROS
A	CN2	1 (0 / 2.25)	0 (0 / 3)	0 (0 / 2)	4 (1.75 / 12.25)	7 (3 / 17.25)	0.42 (0.1 / 0.87)
	H ₂ O + Pb	1 (0 / 1)	1 (0 / 1.75)	0 (0 / 1)	5.5 (3.25 / 12.75)	7.5 (6 / 18.25)	0.55 (0.26 / 1.16)
B	CN2	1 (0 / 2.25)	0 (0 / 3)	0 (0 / 2)	4 (1.75 / 12.25)	7 (3 / 17.25)	0.42 (0.1 / 0.87)
	NP1 + H ₂ O	1 (0 / 3)	0 (0 / 2)	0 (0 / 1)	9 (3 / 17)	11 (4 / 20)	0.55 (0.15 / 0.95)
	NP2 + H ₂ O	1 (0 / 2.75)	0 (0 / 1.75)	0 (0 / 2)	8.5 (2 / 25.75)	9 (4.25 / 33.25)	0.4 (0.17 / 1.05)
	NP3 + H ₂ O	1 (0 / 2)	0 (0 / 2)	0 (0 / 1)	7 (5 / 12)	9 (6 / 17)	0.35 (0.1 / 1.2)
C	CN2	1 (0 / 2.25)	0 (0 / 3)	0 (0 / 2)	4 (1.75 / 12.25)	7 (3 / 17.25)	0.42 (0.1 / 0.87)
	NP1 + Pb	0 (0 / 1.75)	0 (0 / 0)	0.5 (0 / 2)	6.5 (3.25 / 10.5)	8 (3.5 / 12.75)	0.45 (0.21 / 1.02)
	NP2 + Pb	0.5 (0 / 1)	1 (0 / 1)	0.5 (0 / 2.75)	8.5 (4.25 / 19)	12.5 (5.5 / 27.5)	0.4 (0.2 / 0.86)
	NP3 + Pb	1 (0 / 1.75)	0.5 (0 / 1)	0 (0 / 2)	6 (1.25 / 15)	10 (3 / 18.75)	0.47 (0.15 / 0.85)
D	H ₂ O + Pb	1 (0 / 1)	1 (0 / 1.75)	0 (0 / 1)	5.5 (3.25 / 12.75)	7.5 (6 / 18.25)	0.55 (0.26 / 1.16)
	NP1 + Pb	0 (0 / 1.75)	0 (0 / 0)	0.5 (0 / 2)	6.5 (3.25 / 10.5)	8 (3.5 / 12.75)	0.45 (0.21 / 1.02)
	NP1 + H ₂ O	1 (0 / 3)	0 (0 / 2)	0 (0 / 1)	9 (3 / 17)	11 (4 / 20)	0.55 (0.15 / 0.95)
E	H ₂ O + Pb	1 (0 / 1)	1 (0 / 1.75)	0 (0 / 1)	5.5 (3.25 / 12.75)	7.5 (6 / 18.25)	0.55 (0.26 / 1.16)
	NP2 + Pb	0.5 (0 / 1)	1 (0 / 1)	0.5 (0 / 2.75)	8.5 (4.25 / 19)	12.5 (5.5 / 27.5)	0.4 (0.2 / 0.86)
	NP2 + H ₂ O	1 (0 / 2.75)	0 (0 / 1.75)	0 (0 / 2)	8.5 (2 / 25.75)	9 (4.25 / 33.25)	0.4 (0.17 / 1.05)
F	H ₂ O + Pb	1 (0 / 1)	1 (0 / 1.75)	0 (0 / 1)	5.5 (3.25 / 12.75)	7.5 (6 / 18.25)	0.55 (0.26 / 1.16)
	NP3 + Pb	1 (0 / 1.75)	0.5 (0 / 1)	0 (0 / 2)	6 (1.25 / 15)	10 (3 / 18.75)	0.47 (0.15 / 0.85)
	NP3 + H ₂ O	1 (0 / 2)	0 (0 / 2)	0 (0 / 1)	7 (5 / 12)	9 (6 / 17)	0.35 (0.1 / 1.2)

4.5.2 Ensaio cometa

Neste teste, o controle positivo (CP) foi utilizado para verificar se a corrida eletroforética foi realizada adequadamente, pois as lâminas do CP correm junto com as lâminas dos grupos contaminados e do CN2.

O ensaio cometa com células do sangue apresentou maior índice de danos no tratamento Pb quando comparado ao CN2 ($p=0,0102$) (Figura 22a). Na análise dos grupos das nanopartículas, as doses de NP1 e NP2 apresentaram níveis de danos maiores que CN2 ($p= 0,0363$ e $p=0,0189$, respectivamente), enquanto que NP3 não apresentou diferença significativa em relação ao CN2 (Figura 22b). Quando comparados os grupos de $NpTiO_2+Pb$, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (Figura 22c). As análises dos conjuntos dos contaminantes isolados e em associação não diferiram em nenhuma das três doses (Figura 22 d-f).

Em tecido renal não foi observada diferença entre o CN2 e o tratamento com chumbo (Figura 23a). Na comparação entre as doses de $NpTiO_2$, NP1 e NP3 apresentaram resultados similares entre si e significativamente diferentes em relação ao grupo CN2 ($p=0,0014$ e $p=0,0195$, respectivamente) (Figura 23b). A dose intermediária (NP2) diferiu somente de NP1 ($p=0,0273$), mas foi similar ao CN2 (Figura 23b). Ao comparar as associações, somente NP2+Pb apresentou danos ao DNA significativamente maiores que o CN2 ($p=0,0384$). Quando comparadas as três associações não houve diferença estatística (Figura 23c). Ao comparar o grupo NP1 com NP1+Pb, observou-se mais danos no DNA do primeiro grupo ($p = 0,0113$), mas este (NP1) não foi significativamente diferente do grupo Pb (Figura 23d). Para os grupos NP2, NP2+Pb e Pb (Figura 23e), não houve diferença entre eles, o mesmo acontecendo com os grupos NP3, NP3+Pb e Pb (Figura 23d-f).

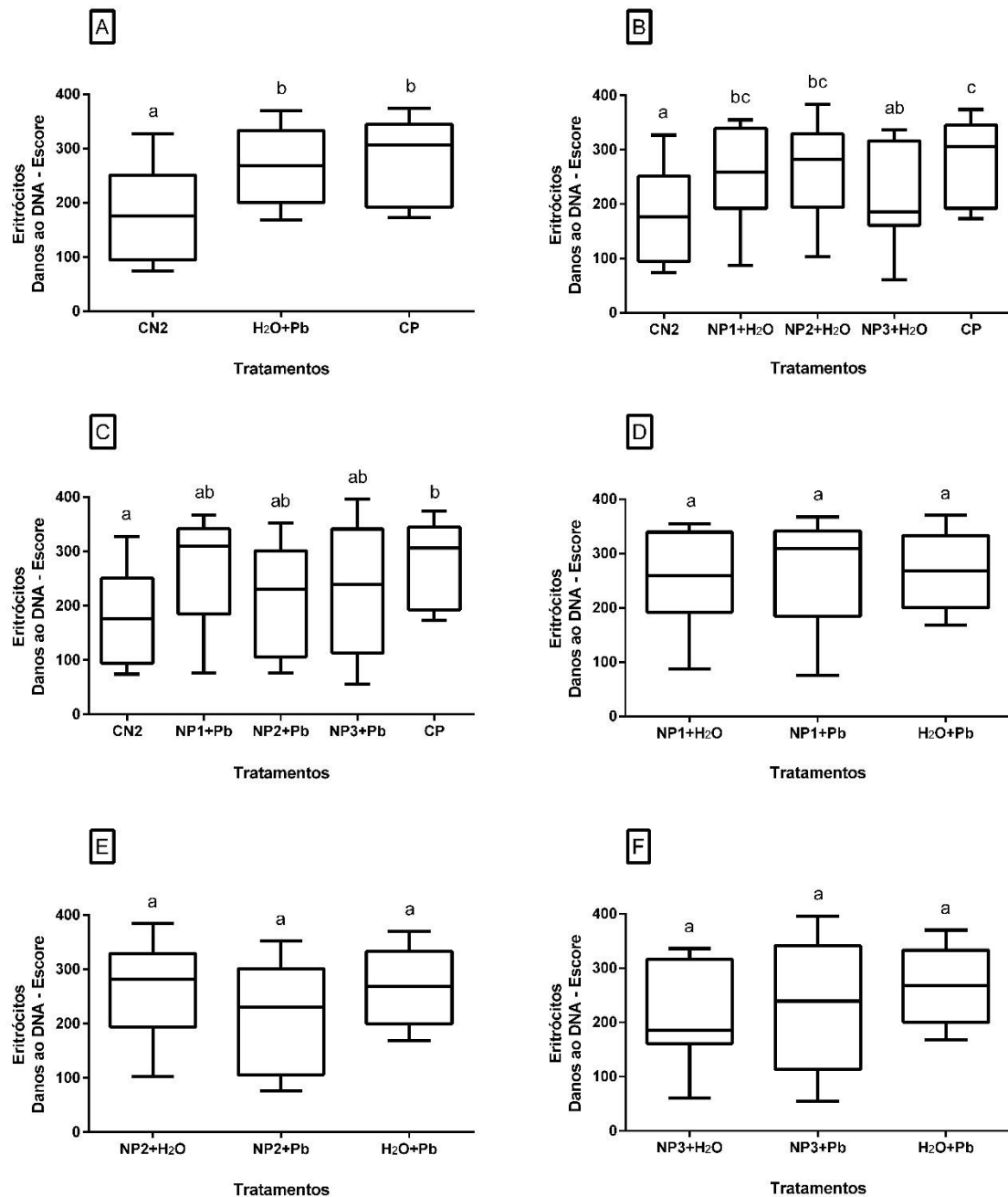


FIGURA 22 - DANOS AO DNA DE ERITRÓCITOS DE *Rhamdia quelen*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2), 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb, 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40 μ g/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINUSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

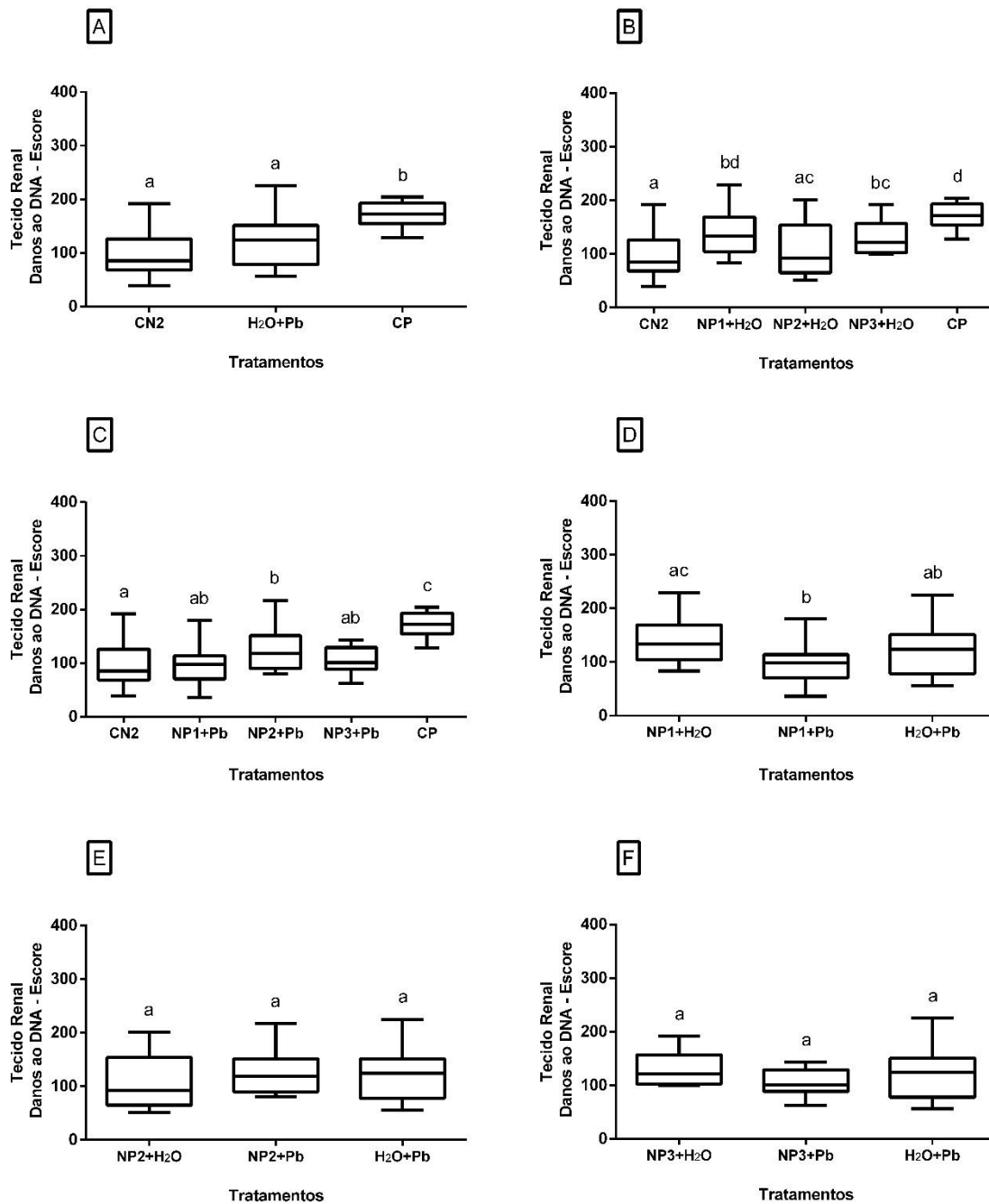


FIGURA 23 - DANOS AO DNA DE TECIDO RENAL DE *Rhamdia quelen*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2), 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb, 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40 μ g/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINUSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

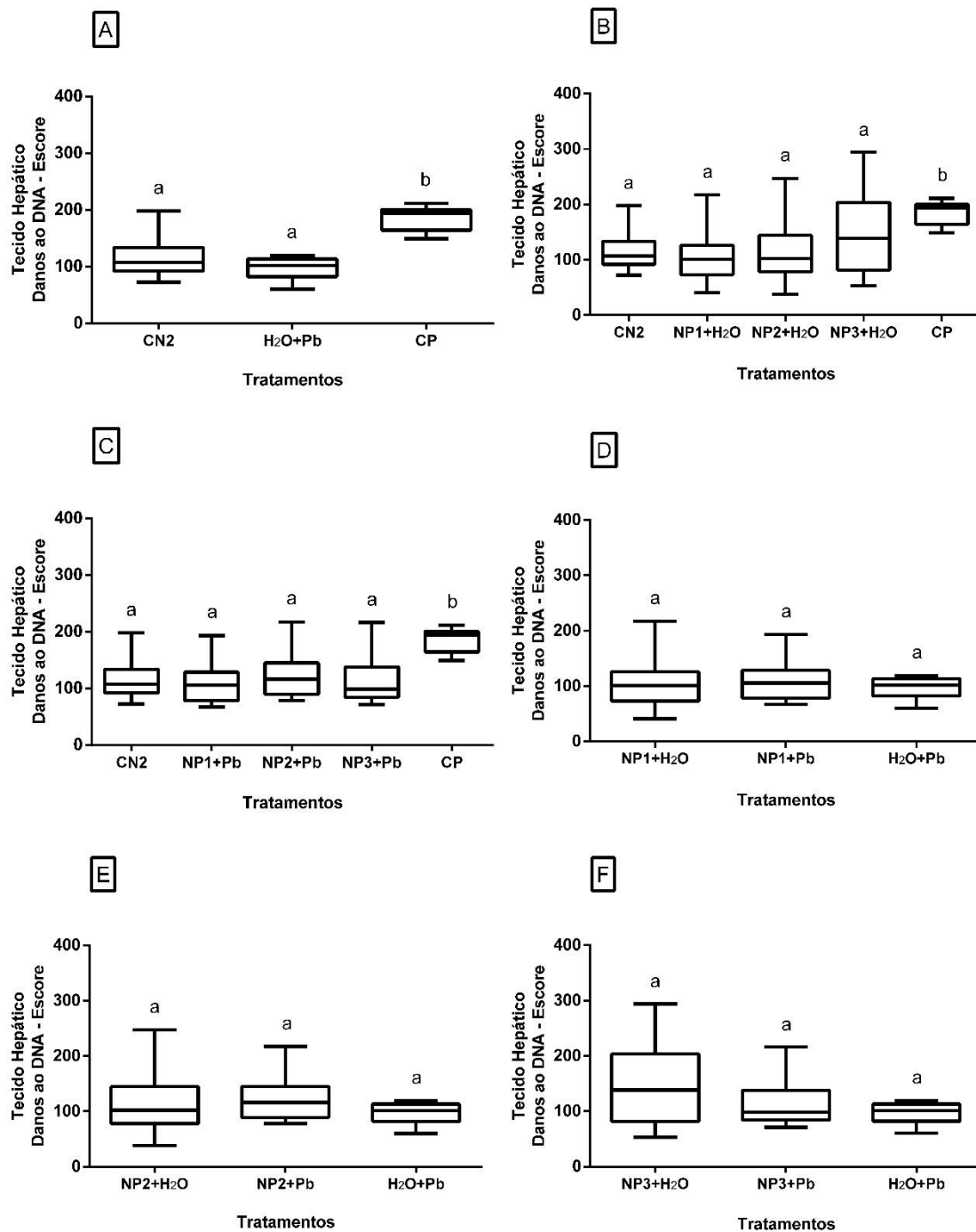


FIGURA 24 - DANOS AO DNA DE TECIDO HEPÁTICO DE *Rhamdia quelen*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2), 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb, 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40 μ g/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINUSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

Ao contrário dos demais tecidos, o ensaio cometa de tecido hepático não apresentou diferenças no nível de dano ao DNA nos diferentes tratamentos. Em todos os conjuntos de análise só foi possível observar diferença com o controle positivo que foi utilizado apenas como parâmetro para a corrida eletroforética (Figura 24 a-f).

O ensaio cometa de tecido cerebral evidenciou um aumento de danos ao DNA dos indivíduos expostos ao tratamento com chumbo em relação ao grupo CN2 ($p=0,0222$) (Figura 25a). Os níveis de danos ao DNA observados nos tratamentos NP1 e NP3 não foram diferentes do CN2. Porém, no grupo NP2 houve menor quantidade de danos ao DNA quando comparado ao controle positivo ($p=0,013$) (Figura 25b). Para a análise das associações não foi observada diferença entre NP2+Pb e NP3+Pb em relação ao grupo CN2. No grupo de associação NP1+Pb foi possível observar uma quantidade menor de danos quando comparado com NP2+Pb ($p=0,0238$), NP3+Pb ($p=0,0132$) e ao CN2 ($p=0,0002$) (Figura 25c). Também foi observada a mesma redução em relação aos tratamentos NP1+H₂O ($p=0,04$) e H₂O+Pb ($p=0,0038$) (Figura 25d). As comparações entre os grupos NP2, NP2+Pb e Pb (Figura 25e), bem como entre NP3, NP3+Pb e Pb (Figura 25f), não apresentaram diferenças entre os níveis de danos ao DNA no tecido cerebral.

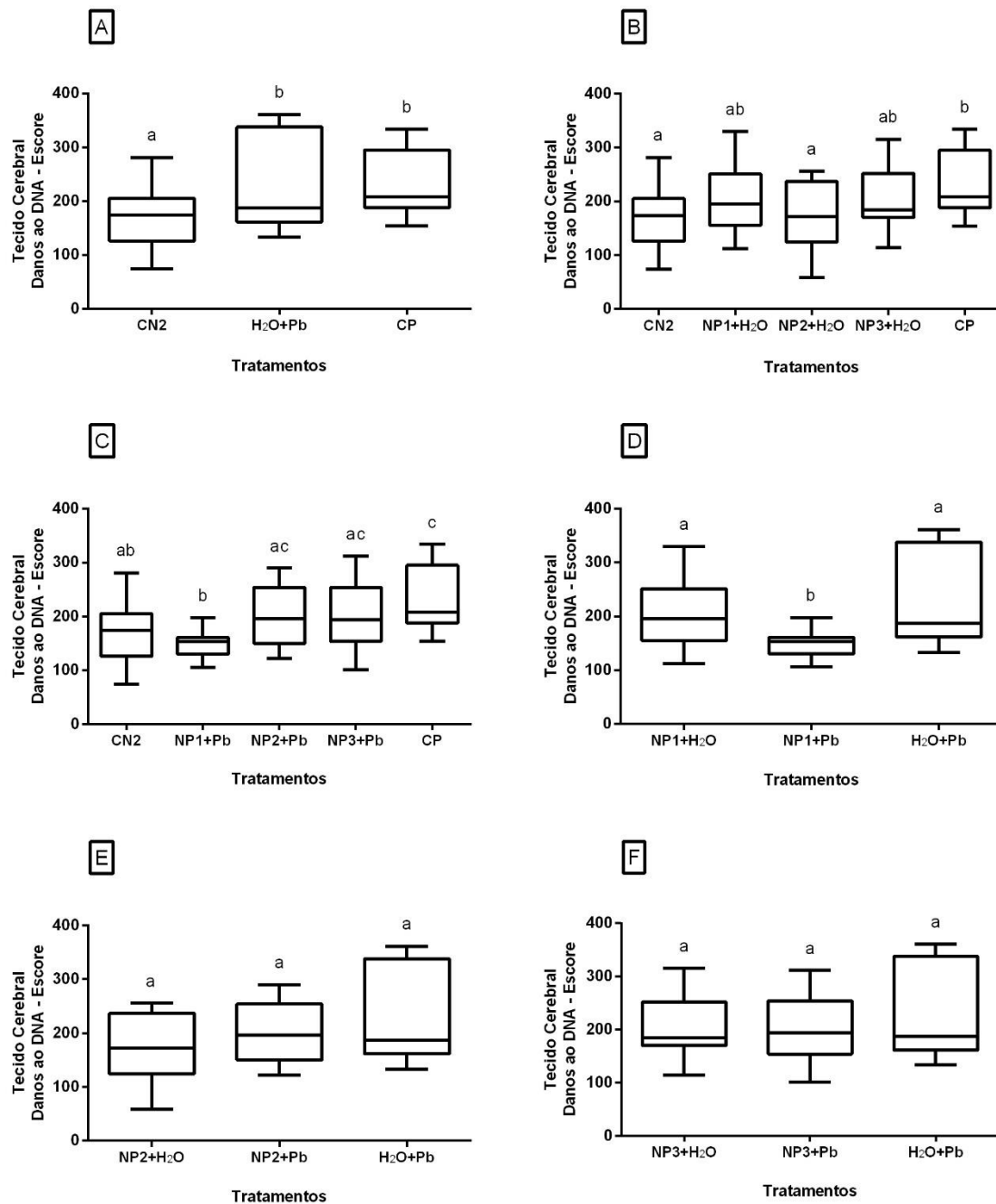


FIGURA 25 - DANOS AO DNA DE TECIDO CEREBRAL DE *Rhamdia quelen*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. (A) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2) E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (B) CONTROLE NEGATIVO 2 (CN2), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1), 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 50ng/g NPTiO₂ (NP3), (C) CONTROLE NEGATIVO 2), 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb, 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb, 50ng/g NPTiO₂ (NP3) + 40 μ g/g Pb, (D) 0, 5ng/g NPTiO₂ (NP1), 0,5ng/g NPTiO₂ (NP1)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (E) 5ng/g NPTiO₂ (NP2), 5ng/g NPTiO₂ (NP2)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb), (F) 50ng/g NPTiO₂ (NP3), 50ng/g NPTiO₂ (NP3)+ 40 μ g/g Pb E CHUMBO (40 μ g/g Pb). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINUSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

5 DISCUSSÃO

A crescente utilização de nanopartículas gera resíduos que tem como destino os efluentes, assim, a preocupação sobre os riscos e impactos ambientais também as tornam alvos dos estudos de ecotoxicologia. Além dos estudos de toxicidade, existem trabalhos que avaliam a capacidade da fotocatalise das NpTiO_2 aplicada em tecnologias promissoras de remoção e degradação de metais pesados como o chumbo, como biorremediação (MURRINI, LEYVA e LITTER, 2007; ZHANG, 2007, LIU e LIANG, 2008). Desta forma, testes toxicológicos são ferramentas úteis, que podem determinar a toxicidade de certos compostos, e gerar informações que possibilitem a identificação de efeitos sob o material genético, potencial carcinogênico, e o desenvolvimento de normas de utilização e descarte apropriados evitando riscos às populações e ao ambiente.

O presente estudo avaliou o potencial tóxico, genotóxico e citotóxico das NpTiO_2 , e sua associação com o Pb utilizando injeções intraperitoneais em exemplares de *Rhamdia quelen*, popularmente conhecidos como jundiá. A espécie foi escolhida por ser endêmica, ter importância comercial, e ser facilmente mantida em laboratório, e muito utilizada como organismos teste em bioensaios. Apesar da via intraperitoneal não ser uma forma de exposição semelhante às naturais, como trófica e hídrica, ela foi escolhida por ser um meio de administrar o contaminante com precisão da dose, e por ainda existirem poucas informações sobre as ações das NpTiO_2 *in vivo*.

Menard, Drobne e Jemec (2011) concluíram, em sua revisão sobre a ecotoxicologia da NpTiO_2 , que o efeito da nanopartícula não está correlacionado com tamanho da partícula primária, mas pode estar relacionado com a dimensão da partícula secundária e/ou com a sua área de superfície específica. Por este motivo, muitos autores destacam a importância da caracterização de suas propriedades físico-químicas (WARHEIT et al., 2007; ELSAESSER et al., 2012; KUMAR e DHAWAN; 2013). A toxicidade das nanopartículas não deve ser limitada ao tamanho da partícula, e/ou a concentração ou dose da suspensão, isso devido às múltiplas variáveis envolvidas, como: tamanho das partículas, estrutura cristalina, área de superfície, carga, revestimento superficial, distribuição de tamanhos, entre outras características (MENARD, DROBNE e JEMEC, 2011; ELAESSER et al., 2012; KUMAR e DHAWAN,

2013). Estudos com nanomateriais que não possuem a caracterização adequada podem simplesmente relatar efeitos de uma substância de características desconhecidas (MENARD, DROBNE e JEMEC, 2011). Desta forma, no presente trabalho foram caracterizados o pó (tamanho das partículas, composição, forma, área de superfície) e as suspensões (estado de agregação, índice de polidispersão e potencial zeta). As três suspensões utilizadas neste trabalho (NP1, NP2 e NP3) apresentaram o potencial zeta negativo, porém maior que +30mV, isto significa que as partículas não possuíam força suficiente para se repelirem, tornando sua dispersão instável, e podendo resultar em floculação. O percentual de polidispersão em todas as suspensões foi superior a 80%, indicando que todas formaram sistemas heterogêneos em relação a distribuição do tamanho das partículas.

A concentração de chumbo encontradas nas vísceras do tratamento com chumbo foi de 305,21mg/kg, os tratamentos de associação das NpTiO_2 nas doses de 0,5ng/g e 50ng/g apresentaram uma redução da quantidade de metal de 3,95% e 8,8%, respectivamente. No tratamento de 5ng/g associado ao chumbo houve uma expressiva diferença de 39,02% quando comparado ao tratamento somente com o Pb. Essa suspensão de nanopartículas (NP2) foi a que apresentou na sua caracterização o menor tamanho médio de partículas, 334,1 nm, podendo existir uma relação entre o tamanho dos aglomerados de nanopartículas e a concentração de metal nas vísceras, como demonstrado com estes dados.

Zhang *et al.* (2007) e Sun *et al.* (2007) realizaram exposição hídrica com *Cyprinus carpio*, associando as NpTiO_2 com cádmio e arsênico, respectivamente. Após 25 dias de exposição, Zhang *et al.* (2007) encontraram um aumento de 146% de cádmio nas vísceras dos tratamentos associados, Sun *et al.* (2007), também encontrou resultado semelhante, um acúmulo de 80% maior de arsênico no fígado do grupo de associação com a nanopartícula, quando comparada somente com o metal. Muitos trabalhos apontam rim e fígado como os órgãos que mais acumulam metais pesados, em relação à brânquias e músculo, por exemplo (DURAL *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2007; TÜRKMEN *et al.*, 2008, TÜRKMEN *et al.*, 2009). No presente trabalho não foi obtido resultado semelhante, possivelmente devido ao tempo de exposição ao metal que foi de apenas 72 horas. Infelizmente não foi possível quantificar o Pb no fígado, pois esse foi destinado ao ensaio cometa e às análises bioquímicas, não havendo quantidade suficiente para a quantificação.

A administração de substâncias via intraperitoneal é uma técnica comumente utilizada em laboratório com roedores, peixes e em outras espécies cujo acesso intravenoso é difícil, além disso a técnica permite administrar grandes volumes, em relação às demais vias, de maneira segura (MORTON et al., 2000; TURNER et al., 2011).

O volume máximo recomendado para administração por esta via é de 10mL/Kg, não indicada a aplicação desta técnica mais de uma vez por dia no mesmo animal (MORTON et al., 2000). Injeções com grandes volumes, dependendo do tamanho do animal, promovem distensão excessiva do abdômen, o que pode causar desconforto e dor e influenciar no resultado do estudo (MORTON *et al.*, 2000; TURNER *et al.*, 2011). As doses da solução de chumbo (Pb) e as suspensões de nanopartículas de dióxido de titânio (NpTiO₂) foram calculadas respeitando a recomendação informada no trabalho de Morton et al. (2000), 0,01mL/g (uma injeção por dia). Por fazer a administração das soluções no volume máximo recomendado, julgamos conveniente verificar se o volume poderia causar algum distúrbio bioquímico, como estresse oxidativo, ou danos ao material genético.

Apesar de não ter sido observado diferenças significativas na quantidade de danos ao DNA ou de alterações morfológicas nucleares nos três grupos de controle negativo (controle negativo sem injeção (CNN), controle negativo com uma injeção (CN1), controle negativo com duas injeções (CN2)), as análises bioquímicas mostraram-se alteradas. Houve redução de acetilcolinesterase no cérebro para os animais tratados com uma e duas injeções de água destilada, no fígado observamos significativas reduções da atividade da GST e dos níveis de GSH e LPO no grupo CN2. Porém, não foi observado alteração em enzimas que também indicam a presença de espécies reativas de oxigênio, como a SOD, CAT e GPx. Turner et al. (2011) recomenda que as soluções injetadas na cavidade peritoneal devem ser estéreis, não irritantes e isotônicas. Devido a alta reatividade das nanopartículas com outras moléculas ou íons, fator que promove a formação de aglomerados, foi utilizado como solvente água destilada. A água destilada, que possui característica hipotônica, pode ter contribuído para os efeitos nas atividades das enzimas e na concentração de LPO. Além disso, para GSH e LPO podemos verificar uma redução gradual relacionada com a quantidade de volume administrado, o que pode ser uma evidência da influência dessa variável nas respostas dos biomarcadores. Por este motivo, ao

analisar os demais grupos tratados com NpTiO_2 e Pb, utilizamos o CN2 como referência.

Embora os danos ao DNA não tenham apresentado diferenças entre os tratamentos e o controle negativo, o fígado apresentou alterações na atividade de algumas enzimas. A glutathione S-transferase, por exemplo, é uma enzima de fase II de biotransformação, ela catalisa a conjugação de uma glutathione (GSH) com uma ampla variedade de compostos eletrofílicos, sejam eles de origem endógena ou exógena (LEAVER, WRIGHT e GEORGE, 1997).

Neste trabalho, quando analisada a atividade da glutathione S-transferase observamos que o tratamento com chumbo resultou em aumento na sua atividade em relação ao grupo controle negativo. Efeito semelhante, para este tratamento, foi encontrado no biomarcador de glutathione reduzida (GSH). O efeito observado, para o aumento da GST no tratamento com chumbo, corrobora com o estudo de Eroglu *et al.* (2015), que ao expor espécimes de tilápia, *O. niloticus*, em soluções de $0,1\mu\text{g/mL}$ de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, observou aumento na atividade da GST após 7 dias de exposição hídrica. Resultado semelhante, para GST, foi obtido por Baysoy *et al.* (2012) com a mesma espécie, porém ambos os autores registraram a redução da GSH, justificando esta redução como um esgotamento da fase II de biotransformação causada pelo aumento da atividade da GST.

Atli e Canli (2008), ao expor tilápias a diferentes metais, após 14 dias de contaminação hídrica observaram aumento na concentração de GSH, e relacionaram este efeito com o sistema de defesa primária que envolve a glutathione reduzida para proteger o animal de estresse oxidativo. Entretanto, existem trabalhos que afirmam que a GSH pode alterar taxas de absorção e eliminação de metais, essenciais ou não, e dependem de moléculas com agrupamento tiol ($\text{R} - \text{SH}$), como o presente na glutathione reduzida, para entrar nas células (LANGE; AUSSEIL; SEGNER, 2002). Assim, o aumento observado de GSH no grupo exposto ao de chumbo pode estar associado à esta propriedade.

Ao expor indivíduos da espécie *Oreochromis niloticus* à nanopartículas de dióxido de titânio, nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mg/L, através de injeção intraperitoneal, Varela-Valencia *et al.* (2014) avaliaram a expressão de genes relacionados com o estresse oxidativo, como a SOD, CAT e GST, em diferentes tempos. A expressão de GST mostrou um aumento expressivo nas seis primeiras

horas após a injeção, porém sua expressão foi reduzida após 12 horas. Os autores também relacionaram a indução da expressão dos genes com o tamanho da partícula e a sua fase estrutural, concluindo que a fase rutilo gera com maior rapidez respostas na expressão dos genes CAT e GST, sugerindo assim, que ela seja responsável pela produção de altos níveis de espécies reativas de oxigênio.

Trabalhos com outras espécies, como *Mytilus galloprovincialis* (Molusco), mostrou que 24 horas de exposição provocou aumento significativo de glutathione S-transferase em concentrações de 0,2 mg/L, 1 mg/L e 5mg/L (CANESI et al., 2010). Em *Daphnia magna* (Crustáceo), concentrações de 1mg/L, 5 mg/L e 10mg/L também foi relatado aumento, dose-dependente, na atividade da GST em 48 horas de exposição (KIM et al., 2010). Além da resposta dependente da dose, Kim et al. (2010) também observaram uma relação da indução da atividade da enzima com o tamanho das partículas aglomeradas. Porém, camundongos que foram submetidos a gavagens diárias de NpTiO₂, por 60 dias, a expressão de GST no fígado foi reduzida na dose de 50mg/Kg, caracterizando uma regulação negativa de RNAm de GST e levando à redução de defesas antioxidantes, com a consequente redução de GSH (CUI et al., 2010). No presente estudo, ao comparar os tratamentos com nanopartículas de dióxido de titânio, houve um pequeno aumento, porém significativo, na atividade da GST nos espécimes tratados com a 0,5ng/g de NpTiO₂ (NP1) em relação ao grupo controle negativo e às doses maiores.

A questão da caracterização das suspensões de nanopartículas pode influenciar na atividade e expressão de GST, como mencionado por Varela-Valencia et al. (2014), e relatado na literatura pela divergência nas respostas obtidas para espécies e/ou tratamentos diferentes. No trabalho de Della Torre et al. (2015), utilizando a mesma espécie que o trabalho de Canesi et al. (2010), o molusco *Mytilus galloprovincialis*, em 96 horas de exposição à 0,1mg/L de NpTiO₂, não apresentou aumento significativo na atividade da glutathione S-transferase. Porém, neste mesmo trabalho, quando a nanopartícula foi exposta concomitante à um metal, o Cádmiu, houve uma redução da expressão de GST quando comparada com os tratamentos isolados, suportando a hipótese de um efeito antagonista entre os dois contaminantes na via de desintoxicação deste molusco. Neste trabalho, a comparação entre as associações dos contaminantes mostrou um aumento na atividade de GST no tratamento com NP2+Pb, diferindo apenas do CN2. Nas demais doses de

nanopartículas em associação com o chumbo não houve diferença entre os tratamentos ou em relação ao controle. E, ao contrário do trabalho de Della Torre et al. (2010), não foi evidenciado neste estudo nenhum tipo de interação, agonista ou antagonista, entre a NpTiO_2 e o Pb, em relação à atividade da GST.

Na análise do nível de GSH no fígado, para nanopartículas isoladas, foi observado um aumento nos níveis de glutathiona reduzida quando expostas a NpTiO_2 , corroborando com os resultados encontrados por Wang et al. (2008a) em camundongos e Su et al. (2014) em larvas do inseto *B. mori*. Nas três doses houve aumento de glutathiona reduzida, porém, no grupo NP1 o aumento foi mais expressivo que em NP2 e NP3. Em outros estudos de estresse oxidativo em peixes causado por NpTiO_2 , os níveis de GSH reduziram conforme as concentrações foram aumentadas, relacionando esta redução com a indução de EROs (PURUSHOTHAMAN et al., 2014; SONG et al., 2015). Para as associações ($\text{NpTiO}_2 + \text{Pb}$), também foi evidenciado o aumento de GSH, mas ao contrário do grupo exposto à NpTiO_2 isolada, as maiores doses apresentaram quantidade maior de glutathiona reduzida. Essa resposta pode estar relacionada mais com o efeito do metal, pois, como já foi mencionado anteriormente, devido ao agrupamento tiol presente na glutathiona reduzida, a taxa de absorção e eliminação pode ter sido modulada pela associação da nanopartícula com o metal. Nas análises de tratamentos associados e isolados, para NP2+Pb e NP3+Pb houve um aumento significativo de GSH em relação ao grupo exposto somente à NpTiO_2 .

Metais pesados como chumbo, cádmio e mercúrio possuem elétrons que podem ser compartilhados formando ligações covalentes com outras moléculas, por exemplo, proteínas que possuam o radical sulfidril, ou tiol, como a glutathiona redutase. A interação entre o metal e a GSH é um evento essencial da resposta tóxica de muitos metais. Quando ocorre a depleção GSH, saturação por metais, geralmente em exposições crônicas, as enzimas do sistema de defesa antioxidante tentam contornar esse desequilíbrio. Porém, algumas enzimas, que contem nos sítios ativos um grupo sulfidril, podem se tornar inativas na presença do metal.

O zinco, por exemplo, é um cofator de muitas enzimas, e os metais pesados podem substituí-lo no sítio de ligação da enzima, tornando-a inativa (ERCAL, GURER-ORHAN e NUKHET, 2001). Saliu e Kalifat (2012), ao expor em ensaio hídrico semi estático, indivíduos da espécie *Clarias gariepinus* ao sal $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, verificaram

irregulares mudanças na atividade da SOD, CAT, GST nas duas primeiras semanas de exposição. No final de 28 dias, houve aumento da atividade de GST e redução da SOD e CAT. Os autores concluem que esta redução pode ocorrer devido a menor atividade da SOD na produção de H_2O_2 , resultando na redução da atividade da catalase também. No presente estudo, na análise do tratamento com o metal, somente a SOD apresentou um aumento na atividade, a enzima CAT não evidenciou diferença na sua atividade em relação ao grupo controle negativo.

Uma das características físico-químicas das nanopartícula de TiO_2 é a propriedade de fotoativação, que leva à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). A grande área de superfície das nanopartículas está relacionada com a produção de EROs, pois quanto menor o tamanho das partículas, maior é a indução de estresse oxidativo (SRIKANTH et al., 2015). Os organismos utilizam diversas enzimas como a SOD, CAT e a GPx para remover espécies reativas de oxigênio (CUI et al., 2010). A SOD pode converter um radical superóxido em peróxido de hidrogênio. Esse H_2O_2 pode ser reduzido pela CAT, gerando água e oxigênio, ou pela ação da GPx que formará água e a glutathiona oxidada (GSSG). Este sistema SOD, CAT e GPx promove a primeira defesa do organismo contra toxicidade oxidativa, em nível celular (FANG e ZHENG, 2002).

As primeiras evidências de produção de espécies reativas de oxigênio *in vivo*, após a exposição à $NpTiO_2$, foi no cérebro de vertebrados não mamíferos (CZAJKA et al., 2015). O aumento de EROs no cérebro de camundongos causou a redução na atividade de SOD, CAT, GPx e na concentração de GSH (HU et al., 2011). O estudo de Ma et al. (2010), também com camundongos, também observou que para doses entre 10mg/kg e 150mg/kg de $NpTiO_2$, a atividade da SOD, CAT e da GPx apresentaram uma redução dose-dependente no tecido cerebral, após 14 dias de injeções diárias do contaminante. A produção excessiva de EROs afeta o sistema antioxidante do cérebro resultando no aumento de LPO, que está intimamente relacionada com a redução de enzimas como a SOD, CAT e GPx, além da não enzimática GSH (MA et al., 2010).

Em bioensaio hídrico com carpas (*Cyprinus carpio*) expostas à $NpTiO_2$ nas concentrações 10mg/L, 50mg/L, 100mg/L e 200mg/L, Hao, Zhenyu e Baoshan (2009) observaram que na menor concentração houve aumento constante da atividade da SOD no fígado, durante 8 dias. Na dose 50mg/L foi observado um pico no segundo

dia, e depois uma gradual redução próxima ao controle, e os autores explicam este efeito como uma indicação de que o sistema antioxidante do fígado estava sob estresse. Nas concentrações mais elevadas foi observada redução significativa na atividade da SOD, indicando que, devido ao excesso de EROs e a ineficácia do sistema de defesa, a atividade da SOD foi inibida. A resposta da enzima GPx foi similar à SOD. Ainda no trabalho de Hao, Zhenyu e Baoshan (2009), a atividade da CAT no fígado teve um pequeno aumento no decorrer dos 8 dias na menor concentração. Com 50mg/L, nos primeiros dias, a catalase foi levemente inibida, mas a partir do sexto dia foi possível ver a indução de sua atividade. E, nas duas maiores concentrações houve a inibição da CAT, sendo a atividade observada menor que o grupo controle negativo durante todo o período de exposição.

Ensaio *in vitro* com linhagem celular Chinnok (CHSE-214) de salmão *Oncorhynchus tshawytscha*, submetidos a 24 horas de exposição à NpTiO₂, nas concentrações de 10, 20, 40 e 60 µg/mL, mostram redução dose-dependente nas atividades das enzimas SOD e CAT, além do aumento dose-dependente de peroxidação lipídica (LPO). Assim, os resultados apontam que as NpTiO₂ induzem o estresse oxidativo, e apresentam citotoxicidade, uma vez que a viabilidade celular também foi reduzida conforme a concentração exposta (SRIKANTH et al., 2015).

No presente estudo, os tratamentos somente com NpTiO₂ não apresentaram diferenças em relação ao controle, na atividade das enzimas SOD e CAT. Quando comparadas as associações, houve redução da SOD no tratamento de NP1+Pb, e nesse mesmo tratamento também foi observado aumento na atividade da CAT. Quando comparados os grupos associados e isolados, o tratamento NP1+Pb apresentou redução na atividade da SOD, quando comparado aos tratamentos isolados, mas não foi observada diferença para a CAT. Para ambas enzimas, SOD e CAT, não houve evidência de sinergismo entre NpTiO₂ e Pb no grupo NP2+Pb, quando comparado aos contaminantes isolados. Ao comparar NP3+Pb com a NpTiO₂ e o Pb isolados, a análise da SOD mostrou que o grupo de associação (NP3+Pb) não diferiu da NpTiO₂ isolada, mas apresentou menor atividade que o tratamento somente com Pb. Porém, a atividade da CAT foi reduzida na associação NP3+Pb em relação a NpTiO₂ e ao Pb separadamente. Estes resultados não caracterizam um estresse oxidativo no tecido hepático. Porém, as pequenas alterações de SOD e CAT podem ser reflexo da sua ação contra espécies reativas de oxigênio, geradas nos primeiros

dias de exposição, corroborando como observado no trabalho de Hao, Zhenyu e Baoshan (2009).

Camundongos submetidos a gavagens diárias, por 60 dias, com suspensões de 5, 10 e 50 mg/Kg de NpTiO₂ apresentaram significativas reduções na expressão dos genes SOD, CAT, GPx, MT e GST (CUI et al., 2010). Depois de internalizadas as nanopartículas não permanecem livremente no citoplasma, mas preferencialmente nas mitocôndrias. Quando as mitocôndrias são invadidas por nanopartículas, a capacidade de defesa antioxidante pode ser comprometida. Para Cui et al. (2010), parte da geração de EROs são originadas pela propriedade catalítica das nanopartículas. A superprodução de EROs interfere no equilíbrio do sistema antioxidante do fígado, resultando em peroxidação lipídica e apoptose nos hepatócitos, fato que está intimamente relacionado com a redução de enzimas como SOD, CAT e GPx (CUI et al., 2010).

Em *Daphnia magna* em ensaio agudo de 48 horas de exposição à concentração de 5mg/L e aglomerados de até 200nm, até 400nm e 800nm, para GPx e GST houve aumento na atividade das enzimas GPx e GST de acordo com o tamanho das partículas, ou seja, nanopartículas com aglomerados entre 400 e 800 nm apresentaram maior atividade. Resultado semelhante foi obtido com a avaliação de diferentes concentrações (1, 5 e 10mg/L NpTiO₂), sendo observado o aumento de GPx com o aumento da concentração (KIM et al., 2010).

Neste trabalho, não foi observado mudanças na atividade da enzima GPx, quando os indivíduos foram expostos ao chumbo ou às nanopartículas isoladas, ou nos tratamentos de associação em relação ao controle negativo. Somente quando comparadas as doses de 5 e 50 ng/g associadas ao metal (NP2+Pb e NP3+Pb), houve um significativo aumento na expressão de GPx, diferindo da atividade observada nos grupos tratados somente com a NpTiO₂. Este resultado corrobora com os dados obtidos com a atividade da SOD e CAT, pois as três enzimas trabalham como a primeira defesa do sistema antioxidante, porém não ficou evidente, através da atividade destas enzimas, a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio.

A LPO pode ser definida como a deterioração oxidativa dos lipídios de membrana da célula, e por isso é amplamente utilizada como um marcador de estresse oxidativo (SAYEED et al., 2003). Os lipídios de membrana são suscetíveis às espécies reativas de oxigênio, promovendo sucessivos eventos de oxidação e

causando danos às membranas celulares. Hao, Zhenyu e Baoshan (2009) utilizaram avaliaram a peroxidação lipídica em carpas juvenis expostas à quatro concentrações diferentes de NpTiO_2 (entre 10mg/L e 200mg/L), por um período de 8 dias. No decorrer da exposição, todas as concentrações proporcionaram aumento da peroxidação lipídica dose-dependentes.

Neste estudo, nós observamos aumento nos níveis de LPO nos tratamentos NP1 e NP3 em relação ao controle negativo e à NP2. O grupo NP1+Pb também apresentou um aumento quando comparado às demais associações e ao CN2. Outro dado importante da associação, foi a redução de LPO no tratamento NP2+ Pb, pois o grupo tratado somente com chumbo apresentou maior peroxidação lipídica. Ao contrário do que encontramos na literatura, não observamos nos dados uma relação dose-dependente para a LPO, uma hipótese é a não geração de EROs suficiente para causar danos excessivos às membranas celulares.

As metalotioneínas (MT) possuem um papel importante na desintoxicação de metais pesados. Os dados obtidos sobre a MT no fígado não evidenciaram qualquer alteração significativa em nenhuma das análises, seja nanopartículas isoladas ou em associação com o metal. Campana, Saraquete e Blasco (2003) só obtiveram resposta de aumento de metalotioneínas no fígado sete dias após a exposição via intraperitoneal. Os autores utilizaram a espécie *Halobatrachus didactylus* para avaliar os níveis de MT em diferentes tecidos. Foi administrada uma injeção com solução de chumbo na concentração de 100 $\mu\text{g/L}$ na proporção de 10 $\mu\text{L/g}$ de peixe, tendo sido coletadas amostras de fígado e rim após 2, 5 e 7 dias da exposição. Além do aumento de MT hepáticas evidenciado apenas no sétimo dia, o rim apresentou redução de MT a partir do quinto dia após a injeção. Os autores observaram que a MT hepática é afetada pelo acúmulo do metal no fígado, ou seja, a resposta da MT hepática dependeria do tempo que o chumbo demora para acumular-se neste órgão. Osbourne et al. (2013), em estudo com embriões de *Danio rerio*, não observaram alterações para metalotioneínas, quando expostos à nanopartículas de dióxido de titânio.

Muitos estudos avaliam a neurotoxicidade das NpTiO_2 (FEDERICI et al., 2007; WANG et al., 2008a; WANG et al., 2008b; RAMSDEN et al., 2009; MA et al., 2010; SHENG et al., 2014). Ma et al. (2010) encontraram acúmulo de nanopartículas de TiO_2 no cérebro de camundongos tratados com injeções intraperitoneais diárias, por 14 dias. Nesse trabalho, o estresse oxidativo e as lesões cerebrais foram geradas através

de uma cascata de reações como a redução da capacidade antioxidante total e das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx), e de antioxidantes não enzimáticos como a GSH, aumento da peroxidação lipídica, e espécies reativas de oxigênio, além da redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE). Os autores concluíram que as nanopartículas administradas via intraperitoneal podem ser translocadas para o cérebro, causando lesões.

De Lima, Roque e De Almeida (2013) observaram significativa redução da atividade da AChE nas vísceras de espécimes de *Danio rerio* (zebrafish) expostos a 0,5mg/l de acetato de chumbo nos períodos de 2 e 7 dias. Metais pesados podem induzir alterações estruturais e funcionais em proteínas cerebrais, levando a degeneração celular, interferindo na expressão de genes e sinais de tradução, assim como no processo de reparo do DNA (RICHETTI et al., 2010; DE LIMA, ROQUE e DE ALMEIDA, 2013). Richetti et al. (2010) verificaram que a presença dos metais no tecido cerebral de zebrafish não alteram a expressão do gene da AChE, mas o efeito do metal na atividade desta enzima ocorre provavelmente por alterações na estrutura e função das proteínas cerebrais, ocasionando um efeito indireto na AChE nas fendas sinápticas.

Em nosso estudo, a AChE cerebral não apresentou alterações nos tratamentos de chumbo, e nos tratamentos NP1, NP2 e NP3, em relação ao CN2. Para as associações foi possível observar um aumento significativo da atividade da AChE no grupo NP1+Pb. Nos três conjuntos de análise entre os tratamentos associados, NpTiO₂+Pb, com os tratamentos de NpTiO₂ e Pb separados, foi possível observar que as associações não diferiram dos respectivos tratamentos com NpTiO₂. Porém, houve a redução da atividade da AChE no tratamento do metal isolado, quando comparado às três associações.

A AChE muscular também não diferiu nas atividades entre os tratamentos de chumbo e o CN2, o mesmo foi observado nos tratamentos de associação. As três doses de NpTiO₂ mostraram uma redução na atividade da AChE. E, somente o tratamento NP2 apresentou menor atividade em relação à NP2+Pb e ao Pb.

Ma et al. (2010) também observaram uma redução da AChE no tratamento somente com NpTiO₂. Porém, no referido trabalho, a atividade da enzima foi mensurada em tecido cerebral, e para esse tecido não foi observada redução de atividade no presente estudo.

O metilmetanosulfonato (MMS) é um agente alquilante, conhecidamente genotóxico (SUZUKI et al., 2005), utilizado como controle positivo no ensaio cometa, principalmente para a verificação da corrida eletroforética. Porém, não se mostrou eficiente como controle positivo para o teste de micronúcleo píceo e alterações morfológicas nucleares. Suzuki *et al.* (2005) obteve resposta positiva para micronúcleo em sangue periférico de ratos 48 horas após a contaminação, porém as doses de MMS utilizadas foram de 8 a 16 vezes maiores que a dose administrada no presente estudo. As análises de frequência de alterações morfológicas nucleares e micronúcleos não evidenciaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, quando estes foram analisados por tipo de alterações morfológicas nucleares ou pelo seu total (micronúcleo + alterações morfológicas nucleares). Também não houve aumento na frequência de eritrócitos imaturos em nenhum dos tratamentos quando relacionados ao controle negativo, indicando que as doses administradas, isoladas e associadas, não causaram uma indução de renovação celular.

A baixa indução de micronúcleos neste trabalho pode estar relacionada com a dose e/ou com o tempo de exposição ao contaminante. O curto período de exposição (72 e 96 horas) aos contaminantes pode não ser suficiente para apresentar efeitos citotóxicos, devido à fatores como longevidade dos eritrócitos, tempo de maturação e eritropoiese (UDROIU, 2006). Outra possibilidade é a indução de lesões ser mascarada por uma ação citotóxica, ou seja, a ausência de células com núcleo alterado ser devido à morte celular (DAS e NANDA, 1986; BRUNETTI et al., 1988). Vignardi et al. (2015) observaram aumento na frequência de micronúcleo no tratamento com injeções intraperitoneais de 1,5µg/g e 3µg/g de NpTiO₂ em *Trachinotus carolinus* sendo que a resposta obtida mostrou relação com a dose e com o tempo de exposição. Na exposição com 3µg/g de NpTiO₂ Vignardi *et al.* (2015) observaram um aumento na frequência de micronúcleos, porém em 72 horas houve a redução que o autor relacionou com o ciclo celular, apoptose, necrose ou outra forma de morte celular causada por ação enzimática, devido a falha no sistema de reparo do DNA, ou ainda devido a outros eventos relacionados à formação de micronúcleos.

Enquanto o teste do micronúcleo píceo não é considerado de grande sensibilidade por ser analisado em eritrócitos, que são células circulantes do sangue, o ensaio cometa é considerado de grande sensibilidade e capaz de detectar danos ao DNA causado por diversos agentes xenobióticos em baixas concentrações. Ao aplicar

este ensaio em diferentes tecidos é possível avaliar se o contaminante em questão tem ação tecido-específico, seja por ação direta ou pela ação de seus metabólitos. Diferentes tecidos podem acumular metais dependendo da característica do contaminante e da espécie estudada (SUIÇMEZ et al., 2006). Assim, a escolha dos tecidos para o ensaio cometa deve priorizar sua habilidade em metabolizar o agente xenobiótico de estudo, assim como sua capacidade de bioacumulação. Neste estudo, a escolha dos tecidos considerou possíveis tecido-alvos, de chumbo e NpTiO_2 , que já foram relatados pela literatura (DURAL et al., 2007; KUMAR et al., 2007; TÜRKEMEN et al., 2008; MA et al., 2009; TÜRKEMEN et al., 2009; ZANG et al., 2010; SYCHEVA et al.; 2011; ZHANG et al., 2012; VIGNARDI et al., 2015). Por existirem poucos estudos com as NPTiO_2 em peixes, principalmente em peixes nativos brasileiros, optamos por realizar o ensaio cometa nos eritrócitos, nas células do rim, fígado e cérebro. Estes tecidos também foram selecionados por já existirem estudos em peixes que utilizaram o ensaio cometa em diversos órgãos para animais contaminados com metais (CESTARI et al., 2004; FERRARO et al., 2004; RAMSDORF et al., 2009).

O ensaio cometa nos eritrócitos de *Rhamdia quelen* apresentou diferença significativa entre o tratamento de chumbo com os controles. O grupo de peixes expostos ao chumbo apresentou danos ao DNA semelhante ao grupo controle positivo. Cestari et al. (2004) e Ferraro et al. (2004) ao expor indivíduos da espécie *Hoplias malabaricus*, via trófica e Ramsdorf et al. (2009) via intraperitoneal, ao chumbo inorgânico (PbII), observaram significativos danos ao material genético. A genotoxicidade deste metal parece ocorrer indiretamente através da inibição do sistema de reparo de DNA e a produção de radicais livres, porém estes dados ainda são contraditórios (GARCÍA-LESTÓN et al., 2010). A análise das NpTiO_2 , nas doses NP1(0,5ng/g) e NP2 (5ng/g), apresentaram diferença em relação ao grupo CN2, sendo semelhantes à quantidade de danos observados no grupo controle positivo. Vignardi et al. (2015) ao expor via intraperitoneal, espécimes de *T. carolinus*, à NpTiO_2 nas doses 1,5 $\mu\text{g/g}$ e 3 $\mu\text{g/g}$, observaram danos ao material genético, concluindo que estes danos estavam relacionados com a dose e o tempo de exposição (24, 48 e 72 horas). A dose mais alta de NpTiO_2 , 50ng/g, no presente estudo não apresentou diferença em relação aos demais tratamentos de nanopartículas. Os demais conjuntos de análises, como a associação de NpTiO_2+Pb , ou a análise de cada dose entre conjugados e isolados, também não apresentaram diferença estatística.

Handy *et al.* (2008) citam o fígado e o rim, em peixes, como órgãos que executam a excreção de compostos exógenos, como as nanopartículas. A excreção dessas pode ocorrer pelo fígado, quando presentes, serem transportadas para a bile, ou filtradas pelo rim. Peixes podem depositar metais no fígado, conseqüentemente para Handy *et al.* (2008), parece lógico que as nanopartículas possam ter o mesmo efeito e formar depósitos hepáticos. Shi *et al.* (2013) afirmam que as nanopartículas administradas pelas vias intravenosa ou intraperitoneal tendem a se acumular principalmente no fígado.

Vignard *et al.* (2015) concluíram em seu trabalho, com *T. carolinus*, que NpTiO₂ tem efeito citotóxico principalmente para tecidos hepático e renal. Scown *et al.* (2009) injetou uma única dose de 1.3µg/g de NpTiO₂ em exemplares de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), e observou que após 6 horas da administração da dose a concentração de titânio no rim aumentou expressivamente e permaneceu assim até o 21º dia de depuração. Após 90 dias de depuração, os níveis de titânio no rim reduziram significativamente. Além disso, a quantidade da NpTiO₂ encontrada no fígado foi 15 vezes menor que a mensurada no rim, porém não houve evidências de redução desta quantidade durante os 90 dias.

O ensaio cometa de células renais não apresentou diferença entre os grupos expostos ao Pb e o CN2. Porém, nos grupos em que a NpTiO₂ foi administrada isoladamente, NP1 (0,5ng/g) e NP3 (50ng/g) foram observados mais danos ao material genético quando comparados ao CN2. A análise dos tratamentos em que houve a associação da NpTiO₂ com o Pb evidenciou um aumento de danos no grupo NP2+Pb (5ng/g NpTiO₂ + 40µg/g Pb) ao ser comparado ao CN2. Apesar do grupo NP2+Pb ter apresentado um aumento de danos, não houve diferença ao comparar com o grupo NP2 e com o grupo Pb, não evidenciando nenhum tipo de interação. O mesmo resultado foi obtido na análise da associação da maior dose com os isolados. Entretanto, o grupo exposto a associação de NP1+Pb apresentou menor quantidade de danos em relação ao grupo com a nanopartícula isolada, porém o tratamento conjugado não diferiu do chumbo. Esta análise mostrou que quando associados, nanopartícula de dióxido de titânio (0,05ng/g) e chumbo (40µg/g), a mistura tem o potencial genotóxico é reduzido em relação aos isolados.

Apesar dos relatos na literatura sobre a afinidade da NpTiO₂ e do chumbo no fígado, o ensaio cometa realizado com células hepáticas não mostrou diferenças

significativas entre os tratamentos isolados ou em associação. A toxicidade do chumbo, no fígado, pode não ter sido evidenciada devido ao tempo de exposição, que foi de 72 horas, diferente do trabalho realizado por Ramsdorf *et al.* (2009) que demonstrou dano nas células hepáticas após 96 horas de exposição. Portanto, verificamos que 24 horas a menos de exposição, no presente trabalho, não demonstrou danos ao DNA das células hepáticas, apesar da dose (40µg/g) ter sido superior à menor dose (21µg/g) das realizadas por Ramsdorf *et al.* (2009). Destacamos então, que o tempo de exposição é extremamente importante em bioensaios e que tempos inferiores à 96 horas podem fornecer resultados sem diferença estatística com o grupo controle para tecido hepático.

Os dados obtidos através do ensaio cometa de cérebro, evidenciam um aumento de danos ao DNA no tratamento com chumbo, em relação ao controle negativo. As nanopartículas isoladas (NP1, NP2 e NP3) não mostraram diferença em seus escores quando comparadas ao CN2. O grupo NP1+Pb apresentou menor quantidade de quebras no DNA quando comparada às associações das duas maiores doses. Essa mesma associação mostrou menor genotoxicidade quando comparada aos tratamentos de NP1 e Pb.

Neste trabalho não foram observados efeitos de dose-resposta, ou danos causados pelo excesso de espécies reativas de oxigênio, como é observado em diversos trabalhos na literatura.

A maioria dos estudos são realizados com pequenos mamíferos, roedores, ainda há poucos trabalhos com peixes, principalmente com associação de nanopartículas e outras substâncias. Estudos com espécies, metodologias, biomarcadores, concentrações, doses, tempo e vias de exposição diferentes podem gerar dados controversos, como é observado na literatura. As espécies utilizadas variam desde fungos, anelídeos, moluscos, crustáceos, peixes até camundongos, sejam em ensaios *in vivo* ou *in vitro* (FEDERICI *et al.*, 2007; HAO, ZHENYU e BOASHAN, 2009; CANESI *et al.*, 2010; CUI *et al.*, 2010; KIM *et al.* 2010; BIGORGNE *et al.*, 2012; SHENG *et al.*, 2014; SRIKANTH *et al.*, 2015).

As doses utilizadas no presente trabalhos foram muito menores que as encontradas na literatura. Comparada a menor concentração utilizada por Ma *et al.* (2010) em injeção intraperitoneal de roedores, a maior dose do presente trabalho é 100 vezes inferior. Em relação a outro trabalho com peixes, Vignardi *et al.* (2015)

utilizaram doses 30 vezes maiores que a NP3 utilizada no presente estudo. Além da dose, alguns autores alertam para a importância da caracterização das nanopartículas, inclusive com estudos relacionando o tamanho das partículas com efeitos como: alteração na expressão de genes, atividade de enzimas e moléculas relacionadas aos mecanismos de defesa antioxidantes, e até mesmo morte celular.(WANG et al., 2008a; WANG et al., 2008b; ZHANG et al., 2012; VARELA-VALENCIA et al., 2014).

Ainda faltam dados na literatura que permitam elucidar as causas de algumas alterações encontradas, por isso faz-se necessário mais estudos acerca do efeito das nanopartículas aos organismos, bem como a possível interação com outras moléculas. Os resultados deste trabalho contribuem para a construção de um banco de dados mais sólido para estudos com nanopartículas. O presente estudo mostrou que as NpTiO_2 , em doses muito inferiores às citadas na literatura, quando administradas via intraperitoneal de forma isolada, ou concomitante com o chumbo, na espécie *Rhamdia quelen*, podem causar efeitos genotóxicos e alterações na atividade de enzimas em exposições agudas.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que para a administração de substâncias via intraperitoneal, deve ser considerado o volume a ser injetado como uma variável importante. Para a espécie *Rhamdia quelen*, a administração de duas injeções, mesmo que em dias diferentes, causou alterações na atividade de AChE e GST e nos níveis de GSH e LPO.

Este estudo também demonstrou que a exposição à nanopartículas de dióxido de titânio em baixas doses, através de injeção intraperitoneal, em indivíduos da espécie *Rhamdia quelen*, alterou a atividade de algumas enzimas como a GST e AChE muscular, a concentração de LPO e GSH, assim como causou danos ao DNA de eritrócitos, células renais e cerebrais. A interação das nanopartículas com os íons metálicos não ficou muito nítida, apesar de ter apresentado alterações na atividade de algumas enzimas, e danos ao DNA em rim e cérebro, porém, nem todos os tratamentos associados mostraram o mesmo tipo de efeito quando comparadas com as $NpTiO_2$ e o Pb isoladas. Apesar de ser o órgão relacionado com a desintoxicação, o fígado não apresentou diferença entre os tratamentos quando avaliados pelos danos ao DNA, porém os biomarcadores bioquímicos mostram maior sensibilidade detectando algumas alterações entre os tratamentos.

As nanopartículas não apresentaram-se como potencialmente mutagênicas, uma vez que os dados não evidenciaram a indução na formação de micronúcleos ou de outras alterações morfológicas nucleares. Porém, fatores como as baixas doses e o curto tempo de exposição podem ser a razão ausência da formação de alterações nucleares.

A literatura sobre nanopartículas, sua toxicidade e possíveis interações com outros contaminantes, ainda são muito contraditórios, pois o comportamento deste nanomaterial é difícil de prever devido às suas propriedades físico-químicas. Neste trabalho, também foram gerados muitos dados que não corroboram com a literatura, um dos motivos pode ser referente às doses utilizadas, as quais comparada com alguns estudos, podem ser até 100 vezes menores. Assim, mais estudos são necessários para compreender quais concentrações, tamanhos de nanopartículas e vias de exposição que são relevantes ao ambiente e que podem gerar efeitos tóxicos

em diferentes espécies, e talvez encontrar um padrão de resposta à exposição a nanopartículas.

7 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

ATLI, G.; ALPTEKIN, O.; TÜKEL, S.; CANLI, M. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 218–224, jun. 2006.

ATLI, G.; CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 33-38, 2008.

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

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

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; RODRIGUES, L. B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R. M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A. B.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v. 34: n.15, p.1565-1469, 2003.

BATISTA, E. D. S.; COSTA, A. G. V.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Adição da

vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 525–535, 2007.

BAYSOY, E.; ATLI, G.; GÜRLER, C. Ö.; DOGAN, Z.; EROGLU, A.; KOCALAR, K.; CANLI, M. The effects of increased freshwater salinity in the bioavailability of metals (Cr, Pb) and effects on antioxidant systems of *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 249-253, 2012.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v. 415, n. 3, p. 167-184, 1998.

BIGORGNE, E.; FOUCAUD, L.; CAILLET, C.; GIAMBÉRINI, L.; NAHMANI, J.; THOMAS, F.; RODIUS, F. Cellular and molecular responses of *E. fetida* coelomocytes exposed to TiO₂ nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 7, p. 1-17, 2012.,

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

BORM, P., ROBBINS, D., HAUBOLD, S., The Potential Risks of Nanomaterials: A Review Carried out for ECETOC Particle. **FibreToxicology**, vol. 3, n. 1, p. 1743–8977, 2006.

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

BRUNETTI, R.; MAJONE, F.; GOLLA, I.; BELTRAME, C. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. **Marine Ecology-Progress Series**, v.44, p. 65–68, 1988.

BUCHELI, T. B.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology**, v. 25, p. 201-268, 1995.

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

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

CAMPANA, O.; SARASQUETE, C.; BLASCO, J. Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 1, p. 116-125, 2003.

CAMPBELL, P.G.S.; STOKES, P.M. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.42, 2034 - 2049, 1985.

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

CANESI, L.; FABBRI, R.; GALLO, G.; VALLOTTO, D.; MARCOMINI, A.; POJANA, G. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 168-177, 2010.

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

CAS. CHEMICAL ABSTRAT SERVICE. Disponível em: www.cas.org. Acesso em: 23/02/2016.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.19, p.107-111, 2005.

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

CHANDRASEKARA, H.U.; PATHIRATNE, A. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 144–149, 2005.

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.

CHO, Y. S.; CHOI, B. N.; KIM, K. H.; KIM, S. K.; KIM, D. S.; BANG, I. C.; NAM, Y. K. Differential expression of Cu/Zn superoxide dismutase mRNA during exposures to heavy metals in rockbreem (*Oplegnathus fasciatus*). **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p.667–679, 2006.

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

CONAMA - **Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357/05.** Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Brasília, SEMA, 2005.

CUI, Y.; GONG, X.; DUAN, Y.; LI, N.; HU, R.; LIU, H.; HONG, M.; ZHOU, M.; WANG, L.; WANG, H.; HONG, F. Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. **Journal of hazardous materials**, v. 183, n. 1, p. 874-880, 2010.

CZAJKA, M.; SAWICKI, K.; SIKORSKA, K.; POPEK, S.; KRUSZEWSKI, M.; KAPKA-SKRZYPCZAK, L. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. **Toxicology In Vitro**, v. 29, n. 5, p. 1042-1052, 2015.

DAS, R. K.; NANDA, N. K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. **Mutation Research letters**, v. 175, n. 2, p. 67-71, 1986.

DE LIMA, D.; ROQUE, G.M.; DE 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.

DELLA TORRE, C.; BALBI, T.; GRASSI, G.; FRENZILLI, G.; BERNARDESCHI, M.; SMERILLI, A.; GUIDI, P.; CANESI, L.; NIGRO, M.; MONACI, F.; SCARCELLI, V.;

ROCCO, L.; FOCARDI, S.; MONOPOLI, M.; CORSI, I. Titanium dioxide nanoparticles modulate the toxicological response to cadmium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 297, p. 92-100, 2015.

DURAL, M; GÖKSU, M. Z. L.; ÖZAK, A. A. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. **Food chemistry**, v. 102, n. 1, p. 415-421, 2007.

ELLMAN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 2, p. 129-137, 2012.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 1, n. 6, p. 529-539, 2001.

EROGLU, A.; DOGAN, Z.; KANAK, E.G.; ATLI, G.; CANLI, M. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3229-3237, 2015.

ESCHER, B.I., SIGG L. Chemical speciation of organics and of metals at biological interfaces. In: van Leeuwen HP, Köster W, editors. **Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces**, p. 205–269, 2004.

ESTERBAUER, H. Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. **Free Radicals in Liver Injury**, Oxford, p. 29-47, 1984.

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

FANG, Y. Z., ZHENG, R. L. **Theory and application of free radical biology**. Beijing: Science Press. 122–161, 2002.

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

Oxidative Stress, and Other Physiological Effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 415–430, 2007.

FERRARO, M V M; FENOCCHIO, A S; MANTOVANI, M S; OLIVEIRA RIBEIRO, C; CESTARI, M M. 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.

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

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.

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.

GARCÍA-LESTÓN, J.; MÉNDEZ, J.; PÁSARO, E.; LAFFON, B. Genotoxic effects of lead: an updated review. **Environment International**, v. 36, n. 6, p. 623-636, 2010.

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

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

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

GUILOSKI, I. C.; ROSSI, S. C.; SILVA, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C. Insecticides biomarker responses on a freshwater fish *Corydoras paleatus* (Pisces: Callichthyidae). **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 48, n. 4, p. 272-277, 2013.

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

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136–147, 2000.

HAFEMAN, D. G.; SUNDE, R. A.; HOEKSTRA, W. C. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **Journal of nutrition**, v. 104,n. 4, p. 580–587, 1974.

HAI, D.Q.; VARGA, I.S.; MATKOVICS, B. Effects of an organophosphate on the antioxidant systems of fish tissues. **Acta Biologica Hungarica**, v.46, p. 39-50, 1995.

HANDY, R.D.; EDDY, F.B. Transport of solutes across biological membranes in eukaryotes: an environmental perspective. In: VAN LEEUWEN, H.P; KÖSTER, W. (Ed.). **Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces**. West Sussex, UK: John Wiley & Sons; p. 337–56, 2004.

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

HAO, L.; ZHENYU, W.; BAOSHAN, X. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 10, p. 1459-1466, 2009.

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

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

HU, R.; ZHENG, L.; ZHANG, T.; GAO, G.; CUI, Y.; CHENG, J.; HONG, M.; TANG, M.; HONG, F. Molecular mechanism of hippocampal apoptosis of mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 191, n. 1, p. 32-40, 2011.

IARC. **International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. ADVISORY GROUP TO PLAN VOLUME 100:A Review of human carcinogens.** France: 2006. Disponível em: monographs.iarc.fr/ENG/Publications/internrep/07-001.pdf.

JEBALI, J.; BANINI, M.; GUERBEJ, H.; ALMEIDA, E.A.; BANNAOUI, A.; BOUSSETTA, H. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 93-98, 2006.

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, n.2, p. 384–389, 1992.

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

JOHNSTON, B.D., SCOWN, T.M., MOGER, J. Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to Fish. **Environmental Science Technology**, v.44, n.3, p. 1144 – 1151, 2010.

KAVITHA, P.; RAO, J. V. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 2, p. 182-188, 2007.

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.

KENDALL, R.J.; ANDERSON, T.A.; BAKER, R.J.; BENS, C.M.; CARR, J.A.; CHIODO, L.A.; COBB III, G.P.; DICKERSON, R.L.; DIXON, K.R.; FRAME, L.T.;

HOOPER, M.J.; MARTIN, C.F.; MCMURRY, S.T.; PATINO, R.; SMITH, E.E.; THEODORAKIS, C.W. Ecotoxicology. In: KLAASSEN, C.D. (Ed.), **Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poison**. 6^a ed. McGraw-Hill, New York, p. 1013–1045, 2001.

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, n. 10, p. 2268-2272, 2010.

KLEMZ, C.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of endosulfan on acetylcholinesterase activity of "Cascudo" (*Ancistrus multispinnis*, Fish, Teleostei). **Revista Acadêmica**, v.3, p. 51–58, 2005.

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

KUMAR, P.; PRASAD, Y.; PATRA, A.K.; SWARUP, D. Levels of cadmium and lead in tissues of freshwater fish (*Clarias batrachus* L.) and chicken in Western UP (India). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, n. 4, p. 396-400, 2007.

KUMAR, A.; DHAWAN, A. Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 11, p. 1883-1900, 2013.

LAM, C.W., JAMES, J.T., McCLUSKEY, R. A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, n. 3, p. 189–217, 2006.

LANGE, A.; AUSSEIL, O.; SEGNER, H. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **Toxicology & Pharmacology : CBP**, v. 131, n. 3, p. 231–243, 2002.

LEAVER, M.J.; WRIGHT, J.; GEORGE, S. G. Structure and expression of a cluster of glutathione S-transferase genes from a marine fish, the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Biochemical Journal**, v. 321, n. 2, p. 405-412, 1997.

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 nanoparticules. **Toxicology Letters**, v. 195, p. 161–8, 2010.

LIU, R.; LIANG, P. Determination of trace lead in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after preconcentration with nanometer titanium dioxide immobilized on silica gel. **Journal of hazardous materials**, v. 152, n. 1, p. 166-171, 2008.

MA, L.; LIU, J.; LI, N.; WANG, J.; DUAN, Y.; YAN, J.; LIU, H.; WANG, H.; HONG, F. Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity. **Biomaterials**, v. 31, n. 1, p. 99-105, 2010.

MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer Nano Series User Manual**, Issue 2.2, Worcestershire-UK, 2005.

MARIONNET, D., DESCHAUX, P.; REYNAUD, S. Possible of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). **Fish Shellfish Immunol**, v. 21, p. 80-91, 2006.

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

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

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation *in vivo*: Strengths and limitation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-226, 2000.

MENARD, A.; DROBNE, D.; JEMEC, A. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of *in vivo* data. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 3, p. 677-684, 2011.

MERIAN, E. **Metals and their compound in the environment: occurrence, analysis and biological relevance**. Weinheim Verlag Chemie, Weinheim, p 1438, 1991.

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

MORTON, D.B.; JENNINGS, M.; BUCKWELL, A.; EWBANK, R.; GODFREY, C.; HOLGATE, B.; INGLIS, I.; JAMES, R.; PAGE, C.; SHARMAN, I.; VERSCHOYLE, R.;

WESTALL, L.; WILSON, A.B. Refining procedures for the administration of substances. **Laboratory animals**, p. 35, 2001.

MURRUNI, L.; LEYVA, G.; LITTER, M. I. Photocatalytic removal of Pb (II) over TiO₂ and Pt–TiO₂ powders. **Catalysis Today**, v. 129, n. 1, p. 127-135, 2007.

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

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

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

OSBORNE, O.J.; JOHNSTON, B.D.; MOGER, J.; BALOUSHA, M.; LEAD, J.R.; KUDOH, T.; TYLER, C.R. Effects of particle size and coating on nanoscale Ag and TiO₂ exposure in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 8, p. 1315-1324, 2013.

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

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

PAYNE, J.F.; FANCEY L.; RAHIMTULA, A.; PORTER, E. Review and perspective on the use of mixed function oxygenase enzymes in biological monitoring. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 86,p. 233-240, 1987.

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

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

PURUSHOTHAMAN, S.; RAGHUNATH, A.; DHAKSHINAMOORTHY, V.; PANNEERSELVAM, L.; PERUMAL, E. Acute exposure to titanium dioxide (TiO₂) induces oxidative stress in zebrafish gill tissues. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 96, n. 6, p. 890-905, 2014.

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

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

RAMSDEN, C.S.; SMITH, T.J.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. **Ecotoxicology**, v.18, p.939–951, 2009.

RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A; COSTA, J. R. M; CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.158, n. 1-4, p. 77-85, 2009.

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

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, n. 1, p. 116-122, 2011.

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

SALIU, J.K.; BAWA-ALLAH, K.A. Toxicological effects of lead and zinc on the antioxidant enzyme activities of post juvenile *Clarias gariepinus*. **Resources and Environment**, v. 2, n. 1, p. 21-26, 2012.

SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 2, p. 295-301, 2003.

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

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

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968.

SHAONAN, L.; XIANCHUAN, X.; GUONIAN, Z.; YAJUN, T. Kinetic characters and resistance to inhibition of crude and purified brain acetylcholinesterase of three freshwater fishes by organophosphates. **Aquatic Toxicology**, v.68, p.293-299, 2004

SHENG, L.; WANG, L.; SU, M.; ZHAO, X.; HU, R.; YU, X.; HONG, J.; LIU, D.; XU, B.; ZHU, Y.; WANG, H.; HONG, F. Mechanism of TiO₂ nanoparticle-induced neurotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental toxicology**, 2014.

SHI, H.; MAGAYE, R.; CASTRANOVA, V.; ZHAO, J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 15, 2013.

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

SILVA DE ASSIS, H. e. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung von Gewasserverschmutzungen**. 1998, 99 f. Tese de Doutorado apresentada na Universidade Técnica de Berlim, Alemanha.

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

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

SONG, B.; LIU, J.; FENG, X.; WEI, L.; SHAO, L. A review on potential neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2015.

SRIKANTH, K.; PEREIRA, E.; DUARTE, A.C.; AHMAD, I.; RAO, J.V. Assessment of cytotoxicity and oxidative stress induced by titanium oxide nanoparticles on Chinook salmon cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 20, p. 15571-15578, 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 environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.M. JR.; BERGMAN, H.L.(Ed.) **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological markers of antropogenic stress**. Eds. Lewis Publishers, p.235-334, 1992.

SU, J.; LI, B.; CHENG, S.; ZHU, Z.; SANG, X.; GUI, S.; XIE, Y.; SUN, Q.; CHENG, Z.; CHENG, J.; HU, R.; SHEN, W.; XIA, Q.; ZHAO, P.; HONG, F. Phoxim-induced damages of *Bombyx mori* larval midgut and titanium dioxide nanoparticles protective role under phoxim-induced toxicity. **Environmental toxicology**, v. 29, n. 12, p. 1355-1366, 2014.

SUIÇMEZ, M.; KAYIM, M.; KÖSEOĞLU, D.; HASDEMİR, E. Toxic effects of lead on the liver and gills of *Oncorhynchus mykiss* WALBAUM 1792. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 77, n. 4, p. 551-558, 2006.

SUN, H., ZHANG, X., NIU, Q. Enhanced Accumulation of Arsenate in Carp in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 178, n. 1-4, p. 245–254, 2007.

SUZUKI, H.; IKEDA, N.; KOBAYASHI, K.; TERASHIMA, Y.; SHIMADA, Y.; SUZUKI, T.; HAGIWARA, T.; HATAKEYAMA, S.; NAGAOKA, K.; YOSHIDA, J.; SAITO, Y.; TANAKA, J.; HAYASHI, M. 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/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 583, n. 2, p. 133-145, 2005.

TAO, S.; LIU, C.; DAWSON, R.; CAO, J.; LI, B. Uptake of particulate lead via the gills of fish (*Carassius auratus*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 37, p. 352-357, 1999.

TAVARES, A. M. et al. Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. **Toxicology In Vitro**, v. 28, p. 60–69, 2014.

TÜRKMEN, M.; TÜRKMEN, A.; TEPE, Y.; ATES, A.; GÖKKUS, K. Determination of metal contaminations in sea foods from Marmara, Aegean and Mediterranean seas: Twelve fish species. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 794-800, 2008.

TÜRKMEN, M.; TÜRKMEN, A.; TEPE, Y.; TÖRE, Y.; ATES, A. Determination of metals in fish species from Aegean and Mediterranean seas. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 233-237, 2009.

TURNER, P.V.; BRABB, T.; PEKOW, C.; VASBINDER, M.A. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 600-613, 2011.

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

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

USEPA. **Nanomaterial case studies: nanoscale titanium dioxide in water treatment and in topical sunscreen**. United States Environmental Protection Agency .US EPA, Research Triangle Park, NC, 2010.

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, p. 57-149, 2003.

VARELA-VALENCIA, R.; GÓMEZ-ORTIZ, N.; OSKAM, G.; DE COSS, R.; RUBIO-PIÑA, J.; RÍO-GARCÍA, M.D.; ALBORES-MEDINA, A.; ZAPATA-PERES, O. The effect of titanium dioxide nanoparticles on antioxidant gene expression in tilapia

(*Oreochromis niloticus*). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 4, p. 1-12, 2014.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, v. 44, n. 1, p. 69–84, 1997.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CERATTO, N.; PANFOLI, I. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. **Cellular and Molecular Biology**, v. 46, p. 407-417, 2000.

VIGNARDI, C.P.; HASUE, F.M.; SARTÓRIO, P.V.; CARDOSO, C.M.; MACHADO, A.S.D.; PASSOS, M.J.A.C.R.; SANTOS, T.C.A.; NUCCI, J.M.; HEWER, T.L.R.; WATANABE, I.; GOMES, V.; PHAN, N.V. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 218-229, 2015.

VIRGENS, A. C. DAS. **Biomarcadores enzimáticos, hematológicos e histológicos em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.) em resposta à exposição ao acefato, difenoconazol e sulfluramida**. Brasil. Centro Universitário Vila Velha, 2009.

WANG, J.; LIU, Y.; JIAO, F.; LAO, F.; LI, W.; GU, Y.; LI, Y.; GE, C.; ZHOU, G.; LI, B.; ZHAO, Y.; CHAI, Z.; CHEN, C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. **Toxicology**, v. 254, n. 1, p. 82-90, 2008a.

WANG, J.; CHEN, C.; LIU, Y.; JIAO, F.; LI, W.; LAO, F.; LI, Y.; LI, B.; GE, C.; ZHOU, G.; GAO, Y.; ZHAO, Y.; CHAI, Z. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. **Toxicology Letters**, v. 183, n. 1, p. 72-80, 2008b.

WARHEIT, D.B.; HOKE, R.A.; FINLAY, C.; DONNER, E.M.; REED, K.L.; SAYES, C.M. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. **Toxicology Letters**, v. 171, p. 99-110, 2007.

White Book on Nanotechnologies. **Studies in Nanoparticles, Nanostructures, and Nanocomposites in the Russian Federation, in Mater**. Pervogo vseros. soveshch. uchenykh, inzhenerov i proizvoditelei v oblasti nanotekhnologii (Proc. First All Russia

Congress of Scientists, Engineers, and Manufacturers in Nanotechnology), Moscow: LKI, p. 344, 2008.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. *In*: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (eds). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. Ed Rima, São Carlos-SP, 2006.

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

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

ZHU, X., CHANG, Y., CHEN, Y. Toxicity and Bioaccumulation of TiO₂ Nanoparticle Aggregates in *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 209–215, 2010.