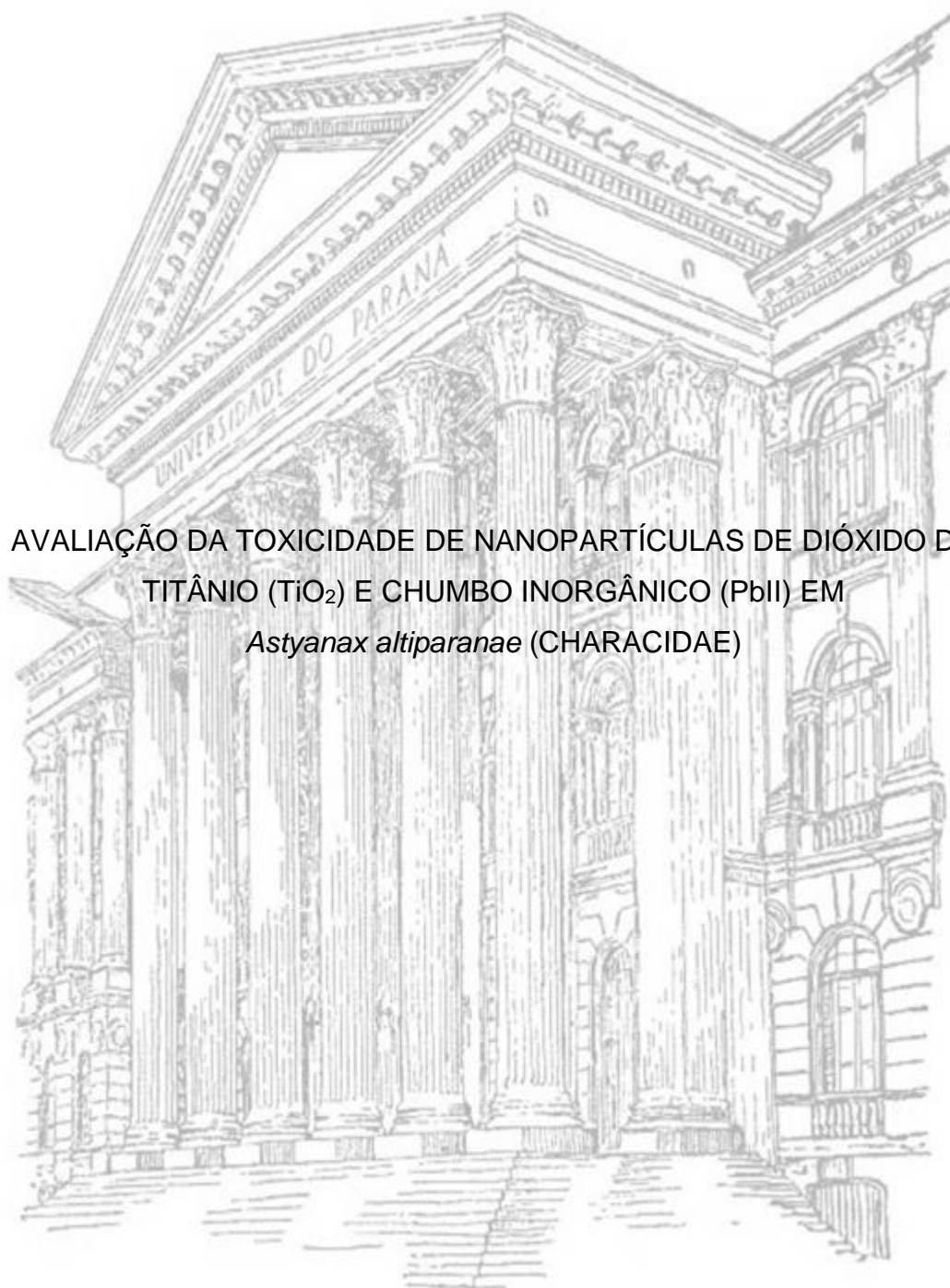


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA RORATTO LIROLA



AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE  
TITÂNIO ( $\text{TiO}_2$ ) E CHUMBO INORGÂNICO ( $\text{PbII}$ ) EM  
*Astyanax altiparanae* (CHARACIDAE)

CURITIBA

2016

JULIANA RORATTO LIROLA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE  
TITÂNIO (TiO<sub>2</sub>) E CHUMBO INORGÂNICO (PbII) EM *Astyanax altiparanae*  
(CHARACIDAE)

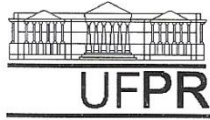
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Margarete Cestari.

CURITIBA

2016

## TERMO DE APROVAÇÃO



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

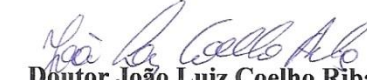



### PARECER

Os abaixo assinados, membros da banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado, a qual se submeteu **JULIANA RORATTO LIROLA**, 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, 22 de março de 2016


  
**Doutor João Luiz Coelho Ribas**  
Universidade Positivo - Membro Titular

  
**Doutora Daniela Morais Leme**  
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Membro Titular

  
**Doutora Marta Margarete Cestari**  
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Presidente

Visto

**Lupe Furtado Alle**  
Coordenadora do PPG-GEN / UFPR  
Matrícula 200309

  
**Doutora Lupe Furtado Alle**  
Coordenadora  
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha orientadora Dra. Marta Margarete Cestari, pela confiança depositada em mim, por todo o incentivo e conselhos que sempre me ajudaram a crescer profissionalmente e pessoalmente.

Aos professores da banca de acompanhamento Laercio Piacini, Cristiane Benincá e aos membros da banca de avaliação Daniela Morais Leme e João Luiz Coelho Ribas por contribuírem com meu trabalho através de suas experiências e correções.

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Genética da UFPR pelos ensinamentos e ao Murilo por sempre ajudar a todos os alunos da pós.

Ao Laboratório de Toxicologia Ambiental pela colaboração neste trabalho.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa pela quantificação do chumbo nas amostras.

À CAPES pela bolsa de estudos.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, por fazerem o ambiente de trabalho ser tão divertido. Em especial a Gabi, por todos os ensinamentos e a amizade; a Tati por toda a ajuda com os cálculos e caracterização das nanopartículas; a Tay, Laercio, Ge, Lais, Toni, Manu, Gus, Flávio, Ronaldo, Miriam e Cintya pela paciência e ajuda sempre que precisei, a Karol pela força e amizade desde a graduação e a todos os estagiários, principalmente a Fabi pela participação direta no meu trabalho.

À todos os meus amigos que de alguma forma me apoiaram, me deram força pra seguir em frente e que sempre acreditaram em mim, em especial a Denise, Rony, Inês e a minha amiga e irmã de coração Jé, por todo o amor e parceria de sempre. Ao Igor, pelo incentivo e paciência, até mesmo nos meus momentos de surto, pelas caronas nos finais de semana, por toda ajuda em tudo que precisei.

Aos meus amores de quatro patas Marry e Romeu, pela felicidade que me trazem e pelo ronronar que me acalma e tanto me faz bem.

Aos meus pais, Maria Rosa e Aparecido por toda a ajuda e pelo amor incondicional que recebi durante toda minha vida. A minha irmã Luana por sempre estar presente, pela confiança e amizade. E ao restante da minha família: avós, tios e primas, por todas as risadas e por entenderem minha ausência em diversas ocasiões.

À Deus por permitir a conclusão de mais essa etapa.

“Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo, nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas porque somos curiosos... E a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos.”

Walt Disney

## RESUMO

O aumento das indústrias juntamente ao crescimento populacional tem elevado de forma considerável os níveis de poluição no meio ambiente e o ambiente aquático é o ecossistema mais suscetível ao despejo de substâncias. Diversas alterações estruturais e fisiológicas podem ser observadas em organismos expostos a altos níveis de contaminação, e atualmente, sabe-se que as exposições a metais, como o chumbo, causam toxicidade em diversas espécies. A utilização de nanopartículas vem crescendo em diversos campos da indústria e da medicina devido a suas características físico-químicas únicas, muito atrativas para o ramo tecnológico. Porém, pouco se sabe sobre os problemas que estes nanomateriais podem causar ao ambiente e aos seres vivos e de sua interação com outros contaminantes. O objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade das nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  ( $\text{NpTiO}_2$ ) em baixas doses, isolada e associadas ao chumbo inorgânico (PbII) em peixes da espécie *Astyanax altiparanae* através de biomarcadores genéticos e bioquímicos. Os animais foram divididos em nove tratamentos: controle negativo; 5 ng/g de  $\text{NpTiO}_2$ ; 50 ng/g de  $\text{NpTiO}_2$ ; 500 ng/g de  $\text{NpTiO}_2$ ; 21  $\mu\text{g/g}$  de PbII; 5 ng/g de  $\text{NpTiO}_2$  + 21  $\mu\text{g/g}$  de PbII; 50 ng/g de  $\text{NpTiO}_2$  + 21  $\mu\text{g/g}$  de PbII; 500 ng/g de  $\text{NpTiO}_2$  + 21  $\mu\text{g/g}$  de PbII e controle positivo. Os bioensaios foram de 96 horas, via injeção intraperitoneal, exceto o controle positivo que foi de 24 horas. Os resultados demonstraram através da análise da atividade das enzimas glutatona S-transferase e superóxido dismutase que ambos os contaminantes tanto isolados quanto em associação podem causar estresse oxidativo nas células de *A. altiparanae*. O PbII induziu necrose e em consequência a essa citotoxicidade ocorreu uma proliferação celular, aumentando a frequência de eritrócitos policromáticos nos grupos expostos ao PbII sozinho e associado as  $\text{NpTiO}_2$  nas três doses. O teste do micronúcleo písceo indicou que os contaminantes não tiveram efeito mutagênico, no entanto, houve um aumento no total de alterações morfológicas nucleares totais e do tipo *Notched* nos tratamentos de 5 ng/g+Pb e 500 ng/g+Pb. Não se observou genotoxicidade no sangue e no fígado utilizando o ensaio cometa. Entretanto a maior dose dos contaminantes (500 ng/g de  $\text{NpTiO}_2$  + 21  $\mu\text{g/g}$ ) causou danos ao DNA no rim, já no cérebro os tratamentos 500 ng/g de  $\text{NpTiO}_2$  e 5 ng/g + 21  $\mu\text{g/g}$  de PbII foram genotóxicas, sendo que nesta última, observou-se também o aumento na atividade da acetilcolinesterase, bem como na maior dose de  $\text{NpTiO}_2$  isolada. Em conclusão, a espécie *A. altiparanae* demonstrou ser um bom bioindicador, pois respondeu as baixas doses testadas nesse estudo. As  $\text{NpTiO}_2$  e o PbII demonstraram ter efeitos tóxicos e estes podem ser potencializados quando os contaminantes estão em associação.

Palavras-chave: genotoxicidade; citotoxicidade; nanopartículas; dióxido de titânio; chumbo; peixes.

## ABSTRACT

The increase of industries with the high population growth has considerably increased pollution levels in the environment and the aquatic ecosystem is the most susceptible to the release of substances. Several physiological and structural changes may be observed in organisms exposed to high levels of contaminants, and currently, it is known that exposure to metals such as lead, cause toxicity in several species. The use of nanoparticles is growing in various fields of industry and medicine due to its unique physical and chemical characteristics, being attractive for the technology industry. However, little is known about the problems that these nanomaterials can cause to the environment and organisms, besides its interaction with other contaminants. The aim of this study was to evaluate the toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles (NpTiO<sub>2</sub>) in low doses, isolated and associated with inorganic lead (PbII) in fish species *Astyanax altiparanae* through genetic and biochemical biomarkers. The animals were separated in nine treatments: negative control; 5 ng / g NpTiO<sub>2</sub>; 50 ng / g NpTiO<sub>2</sub>; 500 ng / g NpTiO<sub>2</sub>; 21 µg / g PbII; 5 ng / g NpTiO<sub>2</sub> + 21 µg / g PbII; 50 ng / g NpTiO<sub>2</sub> + 21 µg / g PbII; 500 ng / g NpTiO<sub>2</sub> + 21 µg / g PbII and positive control. Bioassays were conducted for 96 hours, with intraperitoneal injection, except for the positive control which was for 24 hours. The results demonstrated that both contaminants either alone or in association can cause oxidative stress in cells of *A. altiparanae*, through the analysis of the activity of the enzyme glutathione S-transferase and superoxide. The PbII induced necrosis which induced cellular proliferation, increasing the frequency of polychromatic erythrocytes in groups exposed to PbII alone and associated with the NpTiO<sub>2</sub> in three doses. The piscine micronucleus test showed that contaminants were not mutagenic, however, there was an increase in total nuclear morphological alterations and *Notched* in treatments 5 ng / g + Pb and 500 ng / g + Pb. Genotoxicity in blood and liver evaluated through the comet assay was not observed. However, the higher dose of contaminants (500 ng / g NpTiO<sub>2</sub> + 21 µg / g) caused DNA damage in the kidney, and in the brain, treatments of 500 ng / g NpTiO<sub>2</sub> and 5 ng / g + 21 µg / g PbII were genotoxic, as well as presented an increase in the activity of acetylcholinesterase. This increase was also observed in the higher dose of NpTiO<sub>2</sub> isolated. In conclusion, *A. altiparanae* proved to be a good bioindicator, since this species respond to the low doses tested in this study. The NpTiO<sub>2</sub> and PbII have toxic effects and which were increased by the association of contaminants.

Keywords: genotoxicity; cytotoxicity; nanoparticle; titanium dioxide; lead; fish.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. FORMAS ESTRUTURAIS DO DIÓXIDO DE TITÂNIO: ANATASE, RUTILA E BRUQUITA.....	9
FIGURA 2. EXEMPLARES DE <i>Astyanax altiparanae</i> . ....	15
FIGURA 3. REAÇÕES DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASE E CATALASE.....	18
FIGURA 4. NUCLEÓIDES COM DANOS DE 0 A 4 DETECTADOS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA.....	22
FIGURA 5. NUCLEÓIDES DETECTADOS ATRAVÉS DO ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA.....	23
FIGURA 6. INJEÇÃO INTRAPERITONEAL EM <i>Astyanax altiparanae</i> .....	33
FIGURA 7. COLETA DAS AMOSTRAS .....	34
FIGURA 8. ELETROMICROGRAFIA DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO COM FORMA CRISTALINA DE ANATASE. ....	42
FIGURA 9. TAMANHO DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS SUSPENSÕES COLOIDAIAS DE 0,5 mg/L; 5 mg/L e 50 mg/L.....	43
FIGURA 10. ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST) HEPÁTICA DE <i>Astyanax altiparanae</i> .....	475
FIGURA 11. ATIVIDADE DA SUPEROXIDO DISMUTASE (SOD) HEPÁTICA DE <i>Astyanax altiparanae</i> .....	476
FIGURA 12. ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) HEPÁTICA DE <i>Astyanax altiparanae</i> .....	47
FIGURA 13. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) HEPÁTICA EM <i>Astyanax altiparanae</i> .....	48
FIGURA 14. ACETILCOLINESTERASE (AChE) CEREBRAL DE <i>Astyanax altiparanae</i> .....	49
FIGURA 15. DANOS EM ERITRÓCITOS DE <i>Astyanax altiparanae</i> DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA .....	51
FIGURA 16. DANOS EM CÉLULAS DO FÍGADO DE <i>Astyanax altiparanae</i> DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA.....	52
FIGURA 17. DANOS EM CÉLULAS DO CEREBRO DE <i>Astyanax altiparanae</i> DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA.....	53

FIGURA 18. DANOS EM CÉLULAS DO RIM DE <i>Astyanax altiparanae</i> DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA.....	54
FIGURA 19. FREQUÊNCIA (‰) DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS EM <i>Astyanax altiparanae</i> ATRAVÉS DO TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO.....	59

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS DE NANOPARTÍCULAS DE $\text{TiO}_2$ . .....	42
TABELA 2. QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO EM TECIDO HEPÁTICO DE <i>Astyanax altiparanae</i> NOS TRATAMENTOS: CONTROLE NEGATIVO, CONTAMINADO 21 $\mu\text{g/g}$ DE $\text{PbII}$ , E ASSOCIAÇÃO DE $\text{PbII}$ E $\text{NpTiO}_2$ NAS DOSES 5 $\text{ng+Pb}$ , 50 $\text{ng+Pb}$ E 500 $\text{ng+Pb}$ . .....	44
TABELA 3. FREQUENCIA DE CÉLULAS APOPTÓTICAS E NECROTICAS EM ERITROCITOS DE <i>Astyanax altiparanae</i> .....	56
TABELA 4. FREQUENCIA DE MICRONUCLEOS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITROCITOS MADUROS DE <i>Astyanax altiparanae</i> .....	58

## LISTA DE SIGLAS

ACHÉ	Acetilcolinesterase
ATC	Iodeto de acetilcolina
BET	Teoria da adsorção molecular
CAT	Catalase
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DLS	Dynamic Light Scattering
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTNB	5,5-ditio-bis-2nitro-benzoato
EN	Eritrócito normocromático
EP	Eritrócito policromático
EROs	Espécies reativas de Oxigênio
FOX	Ferrous oxidation / Xylenol orange method
GST	Glutathione S-transferase
LDV	Laser Doppler Velocimetry
LPO	Peroxidação lipídica
MN	Micronúcleos
NBT	Solução de nitrobluetetrazólio
Nps	Nanopartículas
NpTiO <sub>2</sub>	Nanopartículas de dióxido de titânio
NT	<i>Notched</i>
Pb	Chumbo
PbII	Chumbo inorgânico
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
XPS	X-Ray Photoelectron Spectroscopy

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
1.1 Contaminação aquática.....	7
1.2 Nanopartículas (Nps) .....	8
1.2.1 Nanopartículas de TiO <sub>2</sub> e sua toxicidade .....	9
1.3 Metais .....	10
1.3.1 Chumbo e sua toxicidade .....	11
1.4 Associação de nanopartículas a metais.....	12
1.5 Bioindicadores.....	13
1.5.1 <i>Astyanax altiparanae</i> (Characidae).....	14
1.6 Biomarcadores .....	15
1.6.1 Biomarcadores Bioquímicos .....	16
1.6.1.1 Glutathione S-Transferase (GST).....	16
1.6.1.2 Superóxido-dismutase (SOD).....	17
1.6.1.3 Catalase (CAT).....	17
1.6.1.4 Peroxidação Lipídica (LPO).....	18
1.6.1.5 Acetilcolinesterase (AChE) .....	19
1.6.2 Biomarcadores Genéticos.....	19
1.6.2.1 Ensaio cometa.....	20
1.6.2.2 Ensaio de difusão do DNA.....	22
1.6.2.3 Teste do micronúcleo píceo.....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1 Objetivo Geral .....	26
2.2 Objetivos específicos .....	26
<b>CAPITULO 1</b> .....	<b>27</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>29</b>
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	<b>30</b>
2.1 Preparo das suspensões de Nanopartículas de Dióxido de Titânio (NpTiO <sub>2</sub> ) e da solução de Chumbo Inorgânico (PbII).....	30
2.2 Caracterização das NpTiO <sub>2</sub> .....	31

2.3 Desenho experimental .....	31
2.4 Quantificação de chumbo em tecido hepático .....	34
2.5 Biomarcadores Bioquímicos .....	35
2.5.1 Glutationa S-Transferase (GST) .....	35
2.5.2 Superóxido-dismutase (SOD) .....	35
2.5.3 Catalase (CAT) .....	36
2.5.4 Peroxidação Lipídica (LPO) .....	36
2.5.5 Acetilcolinesterase Cerebral (AChE).....	37
2.6 Biomarcadores Genéticos .....	37
2.6.1 Ensaio Cometa .....	37
2.6.2 Ensaio de difusão do DNA .....	38
2.6.3 Teste do Micronúcleo Písceo.....	39
2.7 Análise estatística .....	40
<b>3. Resultados .....</b>	<b>41</b>
3.1 Caracterização das NpTiO <sub>2</sub> .....	41
3.2 Quantificação de chumbo no tecido hepático .....	43
3.3 Biomarcadores Bioquímicos .....	44
3.3.1 Glutationa S-Transferase (GST) .....	44
3.3.2 Superóxido dismutase (SOD) .....	45
3.3.3 Catalase (CAT) .....	46
3.3.4 Peroxidação Lipídica (LPO) .....	47
3.3.5 Acetilcolinesterase (AChE) .....	49
3.4 Biomarcadores Genéticos .....	50
3.4.1 Ensaio Cometa .....	50
3.4.1.1 Ensaio cometa – Sangue.....	50
3.4.1.2 Ensaio cometa – Fígado.....	51
3.4.1.3 Ensaio cometa - Cérebro.....	52
3.4.1.4 Ensaio cometa – Rim.....	53
3.4.2 Ensaio de Difusão do DNA .....	55
3.4.3 Teste do Micronúcleo Písceo.....	56
3.4.3.1 Frequência de <i>notched</i> .....	57
3.4.3.2 Frequência total de AMN.....	57
3.4.3.3 Frequência de eritrócitos normocromáticos e policromáticos .....	58

<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Contaminação aquática

Em consequência do aumento das atividades antropogênicas nos últimos anos, a quantidade de xenobióticos presente nos ambientes aquáticos vem aumentando consideravelmente (ARIAS *et al.*, 2007). As atividades agrícolas, industriais e domésticas utilizam mais de um terço de toda a água doce acessível, estas também são as responsáveis por gerar compostos sintéticos que contaminam as águas (FENT, 2004).

Por conta do crescimento populacional e da decorrente contaminação das águas, torna-se cada vez mais custosa a obtenção de água potável e de boa qualidade (FILIZOLA *et al.*, 2002). A distribuição populacional é desproporcional, gerando problemas para os lagos, rios, córregos, aquíferos e demais ecossistemas relacionados, devido à alta demanda de água (FITZHUGH e RICHTER, 2004).

Muitos dos resíduos gerados pelas atividades industriais e domésticas podem comprometer a qualidade da água e por consequência afetar a vida nos ecossistemas e até mesmo do homem (MOORE *et al.*, 2006). As águas utilizadas para consumo humano, em sua grande maioria tem origem de reservatórios naturais, nos quais é comum o despejo de resíduos industriais e da agricultura (FERRARO, 2009).

Os xenobióticos consistem de qualquer substância estranha ao organismo podendo gerar alterações prejudiciais e chegar aos níveis de populações, comunidades ou ecossistemas (ZAGATO e BERTOLETTI, 2006). A biota aquática está exposta a diversas substâncias tóxicas que são lançadas neste ambiente através de diferentes fontes de contaminação (ARIAS *et al.*, 2007). Tem sido observado nos últimos trinta anos, um maior interesse na detecção, no conhecimento e no controle de xenobióticos que podem causar problemas à saúde humana e aos ecossistemas (RIBEIRO, 2010).

## 1.2 Nanopartículas (Nps)

As nanopartículas apresentam sua estrutura na escala de 100 nanômetros (nm) ou menos e dentro destas estão as partículas ultra-finas de metais, óxidos de metais, não metais e cerâmicas (SCOWN, 2009). As nanopartículas possuem uma área superficial grande e em sua maioria, apresentam propriedades diferentes das partículas macroscópicas (QUINA, 2004).

As Nps feitas a partir de titânio, prata, ouro, cério, e alumínio têm sido utilizadas em muitos ramos da indústria por conta de suas características químicas e físicas únicas (PARK *et al.*, 2008). Apresentam diversas aplicações na indústria por possuir grande área de superfície, desta forma, tem um maior número de átomos quando comparadas com partículas maiores e com a mesma composição química (SCOWN, 2009).

As propriedades das Nps e de outros nanomateriais faz com que sejam muito atrativos para tecnologias medicinais e industriais, porém, pouco se sabe sobre seu potencial de impacto ao ambiente e aos organismos (MAYANARD, 2007). As mesmas características que fazem as nanopartículas interessantes para a tecnologia podem ser problemáticas quando lançadas ao ambiente (QUINA, 2004).

O ambiente aquático é o depósito natural de poluentes devido a descarga de efluentes assim, esse ambiente torna-se vulnerável à contaminação pelas nanopartículas (SCOWN, 2009). Os contaminantes emergentes são comumente encontrados em produtos utilizados no cotidiano, tais como farmacêuticos, surfactantes, produtos de cuidado pessoal e aditivos industriais, estes contaminantes chegam ao ambiente principalmente através de resíduos urbanos não tratados (PETROVIC, GONZALEZ e BARCELO, 2003).

Os nanomateriais estão incluídos nos contaminantes emergentes, os quais não são regulamentados, assim, não existem valores limite nas resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Entretanto, existe um consenso generalizado de que é necessária uma intervenção legislativa quanto aos contaminantes emergentes (PETROVIC, GONZALEZ e BARCELO, 2003). No Brasil, há um Projeto de Lei do ano 2013 que visa regulamentar a rotulagem de produtos das nanotecnologias e de produtos que fazem uso destas, porém, estamos longe de estabelecer uma legislação ambiental sobre o uso de nanomateriais. Na Espanha,

em 2012 foi elaborado um documento relacionado com a regulação, recomendações, relatórios, registro de nanomateriais e padrões pelo Centre for Nano Bio Safety and Sustainability (CNBSS) (MARTINEZ e ALVES, 2013).

### 1.2.1 Nanopartículas de $\text{TiO}_2$ e sua toxicidade

As nanopartículas de dióxido de titânio ( $\text{NpTiO}_2$ ) são uma das mais utilizadas pela indústria de tecnologia e por conta desse aumento na produção, vem sendo alvo de diversos estudos com o objetivo de avaliar sua toxicidade (CLEMENTE *et al.*, 2013). Com o aumento na utilização das nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  também tem aumentado a preocupação com seu potencial de toxicidade em humanos e seu impacto ambiental (PARK *et al.*, 2008).

O óxido de titânio existe em três fases distintas (FIGURA 1): rutila (tetragonal) formado em temperaturas superiores a 1000 °C, anatase (tetragonal) formado em baixas temperaturas, cerca de 450 °C e brookita (ortorrômbico) que é instável (COSTA *et al.*, 2006).

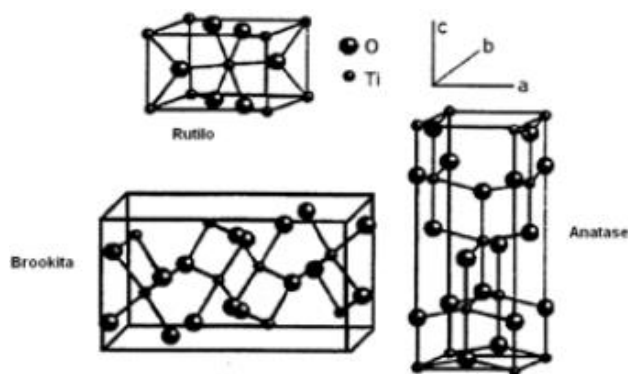


FIGURA 1. FORMAS ESTRUTURAIS DO DIÓXIDO DE TITÂNIO: ANATASE, RUTILA E BRUQUITA. FONTE: FELTRIN *et al.*, 2013.

Acredita-se que as nanopartículas entram na célula por mecanismo de endocitose (MOORE, 2006). Estudos em mamíferos demonstraram que as nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  podem se acumular em fígado, rim, baço, pulmão, coração e cérebro (LI *et al.*, 2010).

Tem sido demonstrado por diversos autores a toxicidade das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> em peixes. A exposição a concentrações mais altas como 10 e 100 mg/L de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> em embriões de *Danio rerio* demonstrou eclosão prematura das larvas (CLEMENTE *et al.*, 2013). Baixas doses de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> alteraram as atividades enzimáticas, causaram danos ao DNA e indução a apoptose em eritrócitos e hepatócitos de *Rhamdia quelen* (DELMOND, 2013 e KLINGELFUS, 2013). Em *Cyprinos carpio* foi evidenciado o acúmulo de titânio no músculo e no fígado (SUN *et al.*, 2007) e também no fígado de truta-arco-íris expostas a concentrações de 1,3 mg/kg de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (SCOWN *et al.*, 2009).

Estudos sobre os efeitos citotóxicos e genotóxicos de nanopartículas com respeito às suas características físico-químicas podem ajudar a estabelecer a toxicidade destes materiais (HAMZEH e SUNAHARA, 2013). Também é necessário buscar métodos rápidos e eficientes para avaliar o potencial risco ambiental das nanopartículas e para compreender a absorção e biodisponibilidade destes materiais, bem como uma correta interpretação da sua ecotoxicidade (HANDY *et al.*, 2012).

### 1.3 Metais

Os metais são encontrados naturalmente em pequenas quantidades no ambiente aquático, contudo, com o aumento das atividades antrópicas, as concentrações destes metais tem se elevado, contaminando estes ecossistemas (CARVALHO *et al.*, 2000). Os metais estão entre os contaminantes mais encontrados na água, dentre eles, o chumbo, cobre e cromo que chegam ao ambiente principalmente pela utilização de agrotóxicos (MACEDO e SIPAÚBA-TAVARES, 2005).

Nas últimas décadas, a contaminação de ambientes aquáticos por metais pesados tem gerado bastante preocupação devido à sua alta toxicidade e seu potencial de bioacumulação nos organismos (YADAV e TRIVED, 2009).

Os peixes sofrem acumulação de metais em seus tecidos, tanto através da absorção direta pelas brânquias quanto indireta pela alimentação (NAWAZ *et al.*, 2010). O mercúrio, cádmio e chumbo têm a capacidade de se aderir aos tecidos e

serem bioacumulados. A assimilação destes compostos aos tecidos pode ocorrer na forma de íons em solução e na forma de complexos organometálicos (BURATINI e BRANDELLI, 2006).

A ordem decrescente de periculosidade dos metais mais encontrados no ambiente é: mercúrio, prata, cobre, zinco, níquel, chumbo, cádmio, arsênio, cromo, estanho, ferro, manganês, alumínio, berílio e lítio (XIMENES, 2006).

### 1.3.1 Chumbo e sua toxicidade

O chumbo (Pb) é um composto que vem sendo utilizado há milhares de anos por ter ocorrência natural, mas com o aumento das atividades industriais, está amplamente distribuído no ambiente e se tornou um dos contaminantes mais comuns (MOREIRA e MOREIRA, 2004).

O Pb é utilizado de diversas formas: na forma de metal, ligado a outros metais, como compostos químicos ou puro. O chumbo metálico é utilizado em soldas, lâminas de proteção contra raios X, revestimento de automóveis e ainda em ligas; os óxidos de chumbo são utilizados em baterias elétricas e acumuladores, vidros e vitrificados, componentes para borracha e esmaltes; os sais de chumbo são usados em tintas e pigmentos (CETESB, 2012).

O Pb pode chegar aos ecossistemas aquáticos a partir da descarga de rejeitos industriais, agrícolas e urbanos (CARVALHO *et al.*, 2000). A principal forma de contaminação é através de efluentes industriais lançados por siderúrgicas, ele também pode ser encontrado na água da torneira por conta de sua dissolução de tubulações, soldas e conexões que contém chumbo (CETESB, 2012).

As doses muito baixas de Pb nos organismos estão relacionadas a neurotoxicidade (SILBERGELD, 1997) e diversos organismos aquáticos podem assimilar e acumular altas concentrações nas formas de compostos orgânicos, principalmente nas formas metiladas (BURATINI e BRANDELLI, 2006).

Diversos estudos em peixes expostos ao Pb têm demonstrado efeitos negativos à saúde dos animais. O chumbo tem a capacidade de induzir danos ao DNA em células renais e eritrócitos de *Hoplias malabaricus* através do ensaio cometa, além disso, também se observou nos eritrócitos um aumento na frequência

de alterações morfológicas nucleares através do teste do micronúcleo písceo e de aberrações cromossômicas (CESTARI *et al.*, 2004; FERRARO *et al.*, 2004; RAMSDORF *et al.*, 2009). Em *Astyanax serratus* também houve a indução de danos ao DNA em eritrócitos (DELMOND, 2013) e em *Colossoma macropomum* (tambaqui) foi observado sérios danos hepáticos e alterações no controle dos impulsos nervosos na concentração de 14,35 mg de Pb<sup>+2</sup>/L (OLIVEIRA, 2003).

Há evidências de que a ação genotóxica do Pb é indireta, causada pela inibição do sistema de reparo do DNA e pela produção de espécies reativas de oxigênio, contudo, também existem evidências do risco genético causados pela exposição ao Pb (GARCÍA-LESTÓN *et al.*, 2010).

A concentração de chumbo permitida no território brasileiro pelo CONAMA é de 0,03 mg/L Pb para águas de classe 1 e 2 e de 0,05 mg/L Pb para águas de classe 3 e 4 (BRASIL, 1986).

#### **1.4 Associação de nanopartículas a metais**

Íons metálicos podem interagir com membranas biológicas, sendo internalizados na célula por transportadores de íons, como por exemplo, canais de cálcio presentes na membrana celular (FELLENBERG, 1980). Já as nanopartículas possivelmente entram na célula por mecanismos de endocitose (MOORE, 2006).

Nanopartículas tem a capacidade de adsorção, dessa forma, podem carrear em sua superfície íons metálicos para dentro da célula por endocitose (HANDY *et al.*, 2008).

Alguns estudos já demonstraram que a presença de nanopartículas pode aumentar a bioacumulação de metais nos tecidos de *Cyprinus carpio*: ZHANG e colaboradores (2007) observaram aumento no acúmulo de cádmio em 146% na presença de NpTiO<sub>2</sub> quando comparado ao metal isolado; arsênio também demonstrou um aumento de 42% quando associado as NpTiO<sub>2</sub> (SUN *et al.*, 2009).

O chumbo também já tem demonstrado ter seu acúmulo em tecidos facilitado na presença das NpTiO<sub>2</sub>. Em *Astyanax serratus* houve um aumento de aproximadamente dez vezes na quantidade de chumbo no sangue nos animais expostos ao PbII associado à baixas doses de NpTiO<sub>2</sub> (DELMOND, 2013); em

*Rhamdia quelen* houve acúmulo de Pb no fígado dos animais expostos ao PbII isolado e associado as NpTiO<sub>2</sub> (KLINGELFUS, 2013). Rossi e colaboradores (2014) não observaram o acúmulo de Pb em músculo de *Hoplias malabaricus*, entretanto, no fígado foi observado a presença de Pb e de importantes alterações nesse tecido dos peixes expostos a Pb associado as NpTiO<sub>2</sub> nas doses de 0,1 e 10 mg/kg<sup>-1</sup>.

## 1.5 Bioindicadores

Bioindicador se refere à espécie sentinela, sendo estes os primeiros organismos a indicar que há contaminação em seu habitat (ADAMS, 2002). Muitos organismos sentinela vêm sendo utilizados para alertar sobre possíveis riscos ambientais dentro do ambiente aquático, os grupos de animais mais utilizados são vermes bênticos, moluscos, esponjas, anfíbios e peixes (SILVA, ERDTMANN e HENRIQUES, 2003).

Muitos estudos têm sido realizados com diversos organismos tendo como objetivo descobrir o efeito de químicos presentes no meio ambiente, e sua relação com a integridade e o funcionamento do DNA (BOMBAIL, GORDON e BATTY, 2001).

Peixes são ótimos organismos teste, pois em bioensaios apresentam uma resposta similar a dos mamíferos, como por exemplo, na metabolização de diversos carcinógenos, podem ser mantidos em laboratório e expostos a xenobióticos. Além disso, representam um dos maiores vetores de contaminação para os seres humanos, já que são utilizados na alimentação (SILVA, ERDTMANN e HENRIQUES, 2003) e é o maior e mais diverso grupo dentro dos vertebrados (POWERS, 1989).

Uma espécie de peixe ideal para ensaios de genotoxicidade de determinado poluente deve seguir alguns critérios: ser difundida em diferentes ecossistemas, se possível cosmopolita; sensível para a detecção de genotoxicidade de diversos poluentes em baixas doses; ser adequada para as condições de cultivo para experimentos em laboratório e possuir grandes populações naturais (SANCHEZ-GALAN, LINDE e GARCIA-VAZQUEZ, 1999).

### 1.5.1 *Astyanax altiparanae* (Characidae)

*Astyanax altiparanae* é conhecido popularmente como lambari-do-rabo-amarelo, lambari-relógio ou lambari-tambiú (SHIBATTA *et al.*, 2002). É uma espécie endêmica, restrita ao sudeste do Brasil e facilmente encontrada nas bacias do Rio Iguaçu, na bacia do Rio Paraná, Rio Paranapanema e do Rio Tibagi (GALVAN, 2011).

Peixes do gênero *Astyanax* pertencem à ordem Characiformes e à família Characidae, a qual engloba a maior parte dos peixes de água doce e de escamas do Brasil (BRITSKI, 1972).

Eigenmann (1921) realizou uma revisão completa sobre o gênero *Astyanax* onde foram descritas setenta e quatro espécies e subespécies encontradas no sul do Brasil, na fronteira do México, Estados Unidos, Uruguai e Argentina.

O gênero *Astyanax* inclui espécies com pequeno porte, chegando a 200 mm. A identificação das espécies dentro do gênero é possível através da forma dos dentes, do número de cúspides, da distância entre o pré-opérculo e terceiro infraorbital, a partir da contagem das escamas e de diferenças morfométricas na cabeça (GARAVELLO e SAMPAIO, 2010).

*Astyanax altiparanae* é caracterizado por apresentar o corpo prateado, onde a região ventral é esbranquiçada e a região dorsal é acinzentada, suas nadadeiras caudal, anal e pélvica são amareladas e as demais levemente amareladas ou hialinas e apresenta acima da pupila, uma mancha amarelo-ferrugem (GARUTTI e BRITSKI, 2000). Durante o período reprodutivo é possível observar diferenças morfológicas entre os sexos (FIGURA 2), onde as fêmeas apresentam corpo mais arredondado e são maiores que os machos (PORTO-FORESTI, CASTILHO-ALMEIDA e FORESTI, 2005).

Segundo Sorvig (2007), aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo tem como fonte principal de proteína o pescado. Lambaris tem uma importância econômica relevante, pois são consumidos em grande escala pelos humanos, além disso, tem uma grande importância ecológica, pois constitui uma parte significativa na dieta de vários outros peixes, aves e mamíferos aquáticos. O gênero *Astyanax* é bem aceito no consumo humano, sendo como petisco e até mesmo industrializado na forma de conserva (PORTO-FORESTI, CASTILHO-ALMEIDA e FORESTI, 2005).

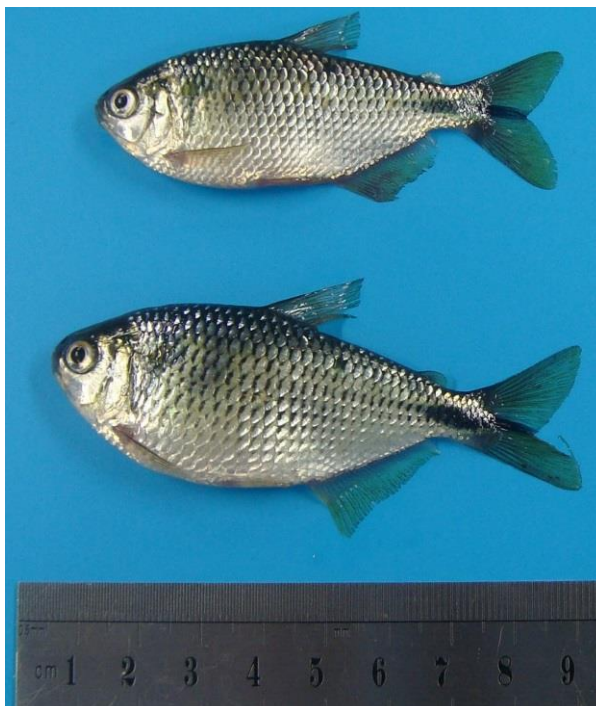


FIGURA 2. EXEMPLARES DE *Astyanax altiparanae*, MACHO NA PARTE SUPERIOR DA FIGURA E FEMEA NA INFERIOR. FONTE: A autora (2016).

## 1.6 Biomarcadores

Biomarcador é o termo utilizado para se referir as respostas biológicas do organismo de adaptação aos estressores (JESUS e CARVALHO, 2008). Os biomarcadores são amplamente utilizados como indicadores bioquímicos e fisiológicos, demonstrando a exposição à xenobióticos ou os efeitos dessa contaminação (HUGGETT *et al.*, 1992).

Existem vários objetivos no estudo de biomarcadores, tais como a avaliação da quantidade do xenobiótico absorvida pelo organismo, avaliação dos efeitos dessas substâncias químicas e ainda a avaliação da suscetibilidade individual (AMORIM, 2003).

Entre as características mais importantes dos biomarcadores, podemos destacar a possibilidade de identificar as interações do contaminante com o indivíduo e a mensuração dos efeitos subletais (JESUS e CARVALHO, 2008). É muito importante que o biomarcador molecular ou celular forneça uma avaliação

antecipada de possíveis mudanças nos níveis de população, comunidade e ecossistema (FREIRE *et al.*, 2008).

A utilização de biomarcadores como parâmetros biológicos de exposição a contaminantes pode oferecer uma estimativa de risco mais pontual, pois as substâncias químicas estão diretamente relacionadas aos efeitos na saúde dos organismos expostos (AMORIM, 2003).

### **1.6.1 Biomarcadores Bioquímicos**

Os biomarcadores bioquímicos são amplamente utilizados para peixes devido a suas respostas a substâncias tóxicas (JESUS e CARVALHO, 2008).

Alterações relacionadas aos sistemas bioquímicos e fisiológicos demonstram o início de efeitos mais sérios que podem chegar a níveis populacionais (BUCHELI e FENT, 1995).

Em peixes, o principal órgão de desintoxicação de xenobióticos é o fígado (VAN DER OOST *et al.*, 2003), neste órgão estão os indicadores bioquímicos mais utilizados, dentre elas, podemos destacar as enzimas responsáveis pela detoxificação de xenobióticos e metabólitos (LECH e VODICNIK, 1985), estas podem ter sua atividade induzida ou inibida (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

#### **1.6.1.1 Glutathione S-Transferase (GST)**

A glutathione S-transferase é considerada a principal enzima envolvida nos processos de detoxificação da fase II tanto de compostos de origem intracelular quanto de xenobióticos. Está presente em alta concentração no fígado de mamíferos e utiliza diferentes substratos, tais como xenobióticos e produtos gerados pela própria célula, como a peroxidação lipídica (TORRES *et al.*, 2004).

Esta enzima catalisa reações de conjugação do tripeptídeo glutathione, para aumentar a hidrossolubilidade e desta forma, facilitar sua excreção (HUGGETT *et al.*, 1992).

Animais aquáticos presentes em ambientes onde há xenobióticos sofrem detoxificação pela glutatona em sua forma reduzida, sendo catalisada pela enzima GST (JONSSON, 2002). A redução da glutatona diminui a capacidade da célula em destruir radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) (JESUS e CARVALHO, 2008) e a deficiência na produção dessa enzima pode gerar a lise de eritrócitos nos animais (COGO *et al.*, 2009).

#### **1.6.1.2 Superóxido-dismutase (SOD)**

A superóxido dismutase apresenta em sua composição diferentes grupos prostéticos. Nos organismos eucariontes existem duas formas dessa enzima: a forma SOD-cobre-zinco está localizada principalmente no citosol e a forma SOD-mangânês que está presente primariamente nas mitocôndrias (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A SOD é uma das principais enzimas que combate os danos oxidativos das EROs. A reação inicia-se com a redução da SOD pelo ânion superóxido, formando o oxigênio e a SOD já reduzida reage novamente com outro íon superóxido formando o peróxido de hidrogênio como produto (FIGURA 3). Este posteriormente sofre dismutação pela catalase ou pela peroxidase, dando origem a água e oxigênio (COGO *et al.*, 2009).

#### **1.6.1.3 Catalase (CAT)**

A catalase é utilizada como biomarcador para um grande grupo de xenobióticos carcinogênicos não genotóxicos no ambiente aquático (HUGGETT *et al.*, 1992), sendo também utilizada em peixes no monitoramento de áreas poluídas (COGO *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo ocasiona diversas reações de degradação dos aminoácidos e das gorduras, produzindo radicais livres e peróxidos de hidrogênio que são altamente reativos, podendo lesar a maquinaria celular (COGO *et al.*, 2009).

O peróxido de hidrogênio é altamente tóxico e tem a capacidade de atravessar as camadas lipídicas, podendo reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A CAT é um dos catalizadores mais eficientes, realizando de maneira muito rápida a quebra desse peróxido de hidrogênio, sintetizado durante o metabolismo de ácidos graxos e pelo ciclo catalítico do citocromo P-450, essa enzima facilita a remoção desse composto tóxico transformando-o em oxigênio e água (FIGURA 3) (HUGGETT *et al.*, 1992; VAN DER OOST *et al.*, 2002 e SCANDALIOS, 2005).

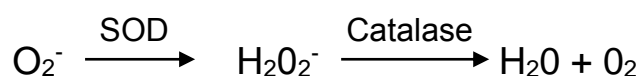


FIGURA 3. REAÇÕES DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASE E CATALASE. FONTE: A autora (2016).

#### 1.6.1.4 Peroxidação Lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica é um processo metabólico de origem natural (GAGO-DOMINGUEZ, JIANG e CASTELAO, 2007), porém estudos demonstram o seu aumento em peixes expostos a uma ampla gama de contaminantes (MARTINEZ, 2006).

A LPO está entre os principais processos moleculares envolvidos na causa de danos oxidativos em estruturas celulares e no processo de toxicidade que podem levar à morte celular (REPETTO, SEMPRINE e BOVERIS, 2008).

O processo de peroxidação lipídica é geralmente catalisado por metais de transição, onde oxidantes fortes levam a quebra dos fosfolipídios de membrana (MARTINEZ, 2006). Esse mecanismo se dá por uma reação em cadeia, onde um único radical pode se propagar em diversas reações bioquímicas deletérias (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A peroxidação causada pela presença de radicais livres juntamente ao estresse oxidativo vem sendo estudada *in vivo* (NIKI *et al.*, 2005), estando entre os mecanismos resultantes da presença de espécies reativas de oxigênio mais investigados (GAGO-DOMINGUEZ, JIANG e CASTELAO, 2007).

Os hidroperóxidos resultantes da LPO podem decompor-se em cetonas, alcanos, aldeídos e ácidos carboxílicos, formar misturas complexas e gerar aductos com o DNA (MARTINEZ, 2006).

#### **1.6.1.5 Acetilcolinesterase (AChE)**

As colinesterases são enzimas utilizadas como biomarcadores de neurotoxicidade e são divididas em: butirilcolinesterases e acetilcolinesterases (AChE) (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A acetilcolina é um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso autônomo (KLEMZ e SILVA DE ASSIS, 2005). O papel da AChE é degradar a acetilcolina, evitando assim, a propagação contínua do impulso nervoso (ROEX *et al.*, 2003)

A inibição da atividade da AChE vem sendo utilizada como diagnóstico de exposição à compostos como praguicidas, organofosforados e carbamatos, que são inibidores da sua atividade (VAN DER OOST *et al.*, 2003; JESUS e CARVALHO, 2008). Essa inibição pode interferir na atividade natatória dos peixes, e dessa forma, resultar em problemas para conseguir alimentos e na fuga de predadores (BÁLINT *et al.*, 1995).

#### **1.6.2 Biomarcadores Genéticos**

A utilização de biomarcadores genéticos em organismos aquáticos possibilita a avaliação da qualidade da água, do efeito dos poluentes e ainda possíveis alterações causadas pelo potencial tóxico ou genotóxico do contaminante no ambiente (JESUS e CARVALHO, 2008).

Biomarcadores medidos ao nível molecular tem como vantagem a possibilidade de serem aplicados em diversos organismos vivos (LAM e GRAY, 2003), além disso, eles fornecem uma avaliação antecipada antes que estes danos alcancem níveis de organização biológica, como população, comunidade e

ecossistema (FREIRE *et al.*, 2008). Estes biomarcadores precoces possibilitam a detecção de danos iniciais causados por poluentes presentes no ambiente, desta forma, torna-se uma medida preventiva contra danos mais severos (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Os danos que podem ser avaliados são aberrações cromossômicas, aductos e quebras no DNA, frequência de micronúcleos e anomalias nucleares (BOMBAIL, GORDON e BATTY, 2001). A análise desses danos em organismos expostos aos xenobióticos nos permite avaliar o potencial mutagênico e/ou carcinogênico, bem como seus possíveis efeitos sobre as populações (PANDRANGI *et al.*, 1995).

### 1.6.2.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa, ou SCGE (*Single-Cell Gel Eletrophoresis*) tem sido utilizado em estudos de genética ecotoxicológica. O nome *comet assay* foi sugerido por OLIVE, BANÁTH e DURAND (1990) devido à aparência dos nucleóides após passar pela eletroforese que lembram muito um cometa quando o DNA está danificado.

O ensaio cometa não detecta mutações, mas sim lesões genômicas que podem gerar mutação. Estas lesões podem passar por um processo de reparo, sendo desta forma corrigidas (GONTIJO *et al.*, 2003).

O princípio do teste baseia-se no fato de que se o DNA da célula estiver danificado irá conter diversos fragmentos, assim, no momento da eletroforese os fragmentos menores irão migrar mais rapidamente que os fragmentos maiores. Desta forma, células com o DNA extremamente danificado formarão muitos fragmentos com diversos tamanhos e conseqüentemente irão migrar em velocidades diferentes, formando assim um cometa (OLIVE, BANÁTH e DURAND, 1990).

Os pioneiros na técnica para quantificar os danos no DNA em células individuais a partir da eletroforese foram Ostling e Johanson (1984), entretanto só foi possível detectar quebras de fita dupla, no entanto, devido a utilização de pH neutro na solução de eletroforese, só foi possível detectar quebras de fita simples. Singh e colaboradores (1988) realizaram a eletroforese em pH alcalino (acima de 13) e com isso, foi possível detectar quebras de fita simples e de fita dupla do DNA, e ainda sítios álcali-lábeis e sítios de reparo tardio.

Nesta técnica, as células são suspensas em agarose LMP (baixo ponto de fusão) sob lâminas de microscopia de vidro previamente cobertas com agarose normal (SPEIT e HARTMANN, 1999). A solução de lise é responsável pela remoção dos conteúdos celulares, mantendo somente o núcleo.

A solução alcalina da eletroforese faz com que ocorra o relaxamento da molécula de DNA nos pontos de quebra (YENDLE *et al.*, 1997). Após o relaxamento do DNA, as lâminas são submetidas à corrida de eletroforese. A corrente elétrica provoca a migração dos fragmentos livres de DNA para fora do núcleo, assim, ao termino da eletroforese, os nucleóides com DNA intacto apresentam núcleo redondo, já as células com danos apresentam uma cauda formada pelos fragmentos de DNA (LEITE, ZANDONATO e FLUMINHAN, 2013).

Uma das metodologias mais utilizadas para avaliar o dano na molécula de DNA é feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão de sua cauda, estas são classificadas de 0 a 4, sendo 0 nenhum dano e 4 o dano máximo (FIGURA 4). A análise pode ser realizada visualmente ou através de softwares (FERRARO, 2009).

Acredita-se que o DNA migra em função do seu tamanho e também da quantidade de extremidades livres, desta forma, o tamanho da cauda do cometa aumentará proporcionalmente a quantidade de danos no DNA (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

O ensaio cometa apresenta inúmeras vantagens quando comparado a outros testes de genotoxicidade, como alta sensibilidade, rapidez e facilidade, baixo custo, necessidade de um pequeno número de células por amostra e também pode ser realizado com células que entram em contato direto com as substâncias estudadas (DHAWAN, BAJPAYEE e PARMAR, 2009). Muitas substâncias tóxicas apresentam um tecido alvo, assim, este tecido pode ser diretamente avaliado, desta forma as células com DNA danificado podem ser quantificadas individualmente (PADRANGI *et al.*, 1995).

O ensaio cometa foi desenvolvido para detectar danos no DNA de mamíferos, porém, demonstrou grande eficiência para detectar danos ocasionados por substâncias genotóxicas em organismos aquáticos (FERRARO, 2009).

Diversos estudos aplicando o ensaio cometa em peixes tem demonstrado a eficiência desse teste na detecção de efeitos genotóxicos: Padrangi e colaboradores (1995) ao utilizar as espécies de peixe *Ameirus nebulosus* e *Cyprinus carpio* encontraram grande eficácia do ensaio cometa para esses organismos; O ensaio

cometa se mostrou adequado para detectar efeitos genotóxicos em *Eingenmannia virescens* expostos a benzeno em diferentes tempos de amostragem (BÜCKER, CARVALHO e ALVES-GOMES, 2006); também se mostrou uma metodologia válida na avaliação da genotoxicidade por herbicidas em *Rhamdia quelen* (PIANCINI *et al.*, 2015); Ramsdorf e colaboradores (2009) utilizaram diferentes concentrações de chumbo inorgânico via injeção intraperitoneal em *Hoplias malabaricus* e concluíram que o ensaio cometa no sangue é o melhor método para detectar genotoxicidade.

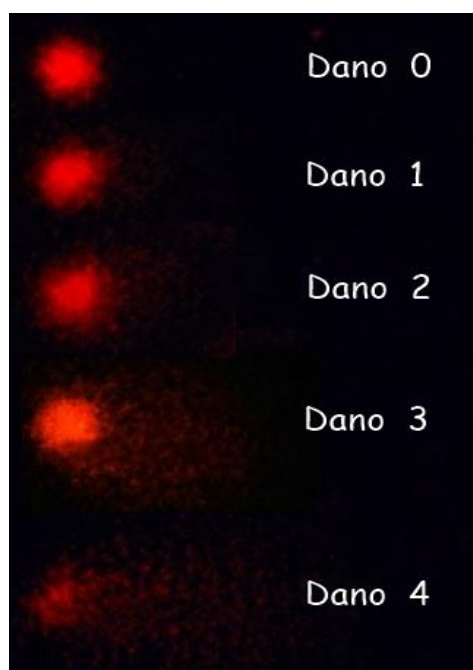


FIGURA 4. NUCLEÓIDES COM DANOS DE 0 A 4 DETECTADOS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA. FONTE: A autora (2016).

#### 1.6.2.2 Ensaio de difusão do DNA

O ensaio de difusão do DNA foi desenvolvido por Singh (2000) para linfócitos humanos e consiste de várias etapas semelhantes ao ensaio cometa, contendo as células misturadas ao gel de agarose em lâminas de microscopia e posteriormente imersas em uma solução de lise e relaxamento em tampão alcalino, porém, sem a corrida eletroforética.

No ensaio de difusão, os fragmentos de DNA com baixo peso molecular podem ser detectados, o que não acontece no ensaio cometa (FRENZILLI *et al.*,

2004). Esta técnica apresenta inúmeras vantagens, é bastante sensível, rápido e simples na detecção de apoptose em células isoladas (SINGH, 2000).

O método permite a identificação dos processos de apoptose e necrose (FIGURA 5), essas células mortas apresentam a região do núcleo claramente definida e se houver fragmentos de DNA eles ficaram dispostos ao redor do núcleo. A identificação se baseia no fato de que as células apoptóticas contêm diversos sítios alcali-lábeis (MACMANUS e BUCHAN, 2000), que ao passar por condições alcalinas expõe seus fragmentos de DNA podendo ser posteriormente analisados (SINGH, 2000).

As células apoptóticas são distinguíveis por ter uma alta fragmentação do DNA, desta forma apresentam o halo mais extenso quando comparado às células sem danos, já as células em necrose são caracterizadas por apresentar um espaço entre o halo e o núcleo com limites definidos (SESTILI, MARTINELLI e STOCCHI, 2006).

A apoptose pode ser induzida por um pequeno estímulo genotóxico, caso este estímulo seja aumentado, a célula pode morrer por necrose, pois a pressão genotóxica pode danificar macromoléculas celulares que são necessárias à apoptose (SINGH, 2005).

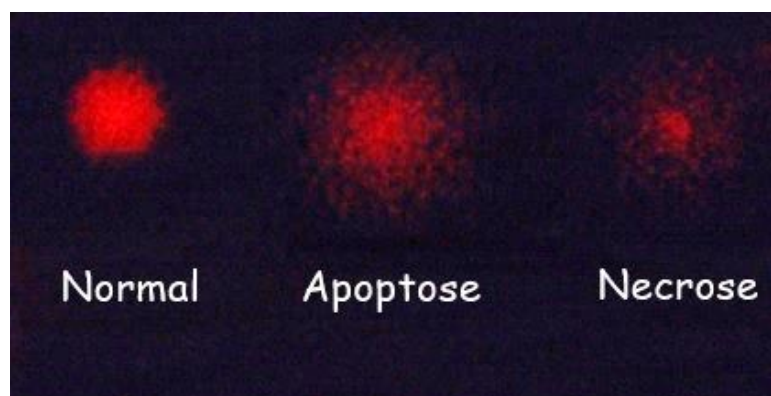


FIGURA 5. NUCLEÓIDES DETECTADOS ATRAVÉS DO ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA. CÉLULA NORMAL; CÉLULA EM APOPTOSE E CÉLULA EM NECROSE. FONTE: A autora (2016).

### 1.6.2.3 Teste do micronúcleo písceo

O teste do micronúcleo foi inicialmente desenvolvido por Schmid (1975) para medula óssea de camundongos e posteriormente modificado por Heddle e colaboradores (1973). É um ensaio *in vivo* muito utilizado na detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos (HAYASHI *et al.*, 1994) e apropriado para testes toxicológicos de rotina (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003).

Os micronúcleos são constituídos de uma pequena massa de núcleo revestidos por uma membrana nuclear e separados do núcleo principal. Sua formação ocorre por danos induzidos nas células parentais que resultam em fragmentos ou cromossomos inteiros, estes não são incorporados ao núcleo principal das células filhas após a divisão celular (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003).

Hoofman e Raat (1982) adaptaram o teste de micronúcleo para células de peixes. Eles sugerem seu uso como uma alternativa para análise de aberrações cromossômicas e ressaltam que a uniformidade das células do sangue periférico torna possível a contagem de alterações morfológicas nucleares.

O teste do micronúcleo só pode ser realizado com populações de células que ainda se dividem e que a análise seja realizada, se possível, após um único ciclo de divisão (FENECH, 2000).

CARRASCO, TILBURY e MYERS (1990) encontraram alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de peixes e as classificaram em:

- *Blebbed*: Núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina. O tamanho destas evaginações varia desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas que se assemelham ao micronúcleo, porém ainda ligada ao núcleo principal.
- *Lobed*: Núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *blebbed*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior, podendo apresentar 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 e são delimitados por membrana celular.

A técnica de micronúcleo utilizando o corante fluorescente de laranja de acridina foi modificada para peixes por Ueda e colaboradores (1992). Através dessa técnica é possível identificar os micronúcleos e ainda distinguir os eritrócitos imaturos (policromáticos) dos eritrócitos maduros (normocromáticos) (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003).

Ribeiro, Salvadori e Marques (2003) destacam como vantagens do teste de micronúcleo: a possibilidade de observar em eritrócitos imaturos o efeito do agente químico testado; sabendo que o tempo de vida de um eritrócito policromático é relativamente curto, a presença de um micronúcleo indica a indução de danos cromossômicos recentes; a fácil identificação de micronúcleos e a sua distribuição bem definida; e a indução de micronúcleos em eritrócitos é dependente do tempo e da dose da amostragem.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio (NpTiO<sub>2</sub>) em baixas doses, isolada e conjugada com chumbo inorgânico (PbII) em *Astyanax altiparanae*, utilizando diferentes biomarcadores bioquímicos e genéticos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o acúmulo de chumbo no tecido hepático de *Astyanax altiparanae* com e sem associação às NpTiO<sub>2</sub>.
- Avaliar a atividade enzimática da superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e peroxidação lipídica (LPO), para verificar danos oxidativos na espécie *Astyanax altiparanae*.
- Avaliar os possíveis efeitos neurotóxicos dos contaminantes por meio da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE).
- Avaliar as respostas genotóxicas na espécie *A. altiparanae*, através do ensaio cometa aplicado em células do sangue, fígado, rim e cérebro.
- Avaliar se os contaminantes conduzem ao processo de morte celular (apoptose e necrose) por meio do ensaio de difusão do DNA em células do sangue.
- Avaliar o efeito mutagênico dos contaminantes em células do sangue de *A. altiparanae* por meio do teste do micronúcleo píceo.
- Verificar a partir dos resultados genéticos e bioquímicos se as NpTiO<sub>2</sub> e o PbII provocam modificações prejudiciais na espécie estudada e se estas modificações são potencializadas quando existir a associação entre os contaminantes.

## CAPITULO 1

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO<sub>2</sub>) E CHUMBO INORGÂNICO (PbII) EM *Astyanax altiparanae* (CHARACIDAE)

LIROLA, J. R.<sup>1</sup>; KLINGELFUS, T.<sup>1</sup>; SILVA, L. F. O.<sup>1</sup>; DISNER, G. R.<sup>1</sup>; MONTEIRO, P. S.<sup>2</sup>; PEREIRA, L.<sup>2</sup>; SILVA DE ASSIS, H. C.<sup>2</sup>; SILVA, C. P.<sup>3</sup>; CAMPOS, S. X.<sup>3</sup>; CESTARI, M. M.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Paraná, Departamento de Genética, Curitiba, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmacologia, Curitiba, Paraná, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Química, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

## Resumo

O ambiente aquático é o mais vulnerável a contaminação pelas indústrias, visto que este recebe o despejo de substâncias, com isso, os organismos estão expostos aos mais diversos contaminantes. As nanopartículas estão incluídas nos contaminantes emergentes, para os quais não há regulamentação para seu uso e descarte, bem como ainda não se tem resultados concretos sobre seus efeitos nos seres vivos. A nanotecnologia vem crescendo muito por conta das propriedades atrativas que esses materiais apresentam, assim, é necessário compreender os mecanismos de toxicidade dos nanomateriais, bem como sua interação com outras substâncias que podem estar presentes no meio e dessa forma, auxiliar em futuras legislações sobre concentrações máximas que podem ser encontradas no ambiente. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito das nanopartículas de dióxido de titânio (NpTiO<sub>2</sub>) em baixas doses, isoladas e associadas ao chumbo inorgânico (PbII) em ensaio agudo na espécie endêmica *Astyanax altiparanae* contaminados via injeção intraperitoneal através de biomarcadores genéticos e bioquímicos. Os animais foram divididos em nove tratamentos: controle negativo; 5 ng/g de NpTiO<sub>2</sub>; 50 ng/g de NpTiO<sub>2</sub>; 500 ng/g de NpTiO<sub>2</sub>; 21 µg/g de PbII; 5 ng/g de NpTiO<sub>2</sub> + 21 µg/g de PbII; 50 ng/g de NpTiO<sub>2</sub> + 21 µg/g de PbII; 500 ng/g de NpTiO<sub>2</sub> + 21 µg/g de PbII e controle positivo. Pelas análises bioquímicas observamos que as NpTiO<sub>2</sub> e o PbII isolados e associados causaram estresse oxidativo nas células do fígado, entretanto não houve danos à biomoléculas. Também observou-se um aumento na atividade da acetilcolinesterase cerebral causada pelas NpTiO<sub>2</sub> na maior dose e em associação ao PbII na menor dose. Citotoxicidade foi observada pelo aumento de células necróticas e aumento de eritrócitos policromáticos na circulação sanguínea dos peixes expostos ao PbII isolado e em associação as NpTiO<sub>2</sub>. Nenhum dos contaminantes apresentou efeito mutagênico no teste do micronúcleo písceo, porém houve indução de alterações morfológicas nucleares totais e do tipo *Notched* nos grupos de 5 ng/g e 500 ng/g de NpTiO<sub>2</sub> associados ao PbII. A genotoxicidade foi constatada somente nas células renais, na maior dose de NpTiO<sub>2</sub> associada ao PbII e no cérebro na menor dose de NpTiO<sub>2</sub> associada ao PbII, corroborando com os dados encontrados para AChE cerebral. Em conclusão, *A. altiparanae* foi um bom indicador, pois foi sensível a baixas doses de NpTiO<sub>2</sub> e PbII e ambos os contaminantes demonstraram efeito tóxico, porém, a genotoxicidade só foi observada nos grupos de associação entre os contaminantes na menor e maior dose, indicando que seus efeitos tóxicos foram potencializados para a espécie em estudo.

Palavras-chave: genotoxicidade; citotoxicidade; ensaio cometa, teste do micronúcleo; atividade enzimática; peixes.

## 1. Introdução

Em decorrência do aumento das atividades antropogênicas, o despejo de resíduos aos ambientes aquáticos vem crescendo de forma considerável (ARIAS *et al.*, 2007), essas substâncias podem alterar a qualidade da água e dessa forma, afetar o ecossistema ali existente (MOORE *et al.*, 2006). Os nanomateriais estão incluídos nos contaminantes emergentes, para os quais não regulamentação para seu uso e descarte, entretanto, já é bem discutida a necessidade de uma legislação para essa nova classe de contaminantes (PETROVIC, GONZALEZ e BARCELO, 2003).

A utilização das nanopartículas (Nps) vem sendo bem aceita em muitos ramos da indústria, (PARK *et al.*, 2008) por conta de características como grande área de superfície e maior reatividade (SCOWN, 2009). Ainda não se sabe ao certo os impactos que a exposição aos nanomateriais podem causar aos organismos (MAYANARD, 2007), entretanto, já se tem descrito que esses materiais podem entrar na célula por mecanismos de endocitose (MOORE, 2006), podendo ainda facilitar a entrada de outros contaminantes na célula por meio de um mecanismo conhecido como cavalo de Tróia (LIMBACH *et al.*, 2007).

As nanopartículas de dióxido de titânio (NpTiO<sub>2</sub>) estão entre as mais produzidas no mundo e podem ser encontradas em três fases: anatase, rutila e bruquita (COSTA *et al.*, 2006). Por estarem presentes em diversos produtos comercializados, elas têm sido alvo de estudos sobre sua toxicidade, já sendo relatados efeitos negativos aos organismos por alguns autores (SUN *et al.*, 2007; SCOWN *et al.*, 2009 e LI *et al.*, 2010).

O chumbo (Pb) é um dos contaminantes mais comuns devido a sua ocorrência natural (MOREIRA e MOREIRA, 2004). A genotoxicidade do Pb já foi relatada por meio da produção de radicais livres e da inibição do sistema de reparo do DNA (GARCÍA-LESTÓN *et al.*, 2010), o que traz quebras no DNA que podem ser observadas pelo ensaio cometa (CESTARI *et al.*, 2004, FERRARO *et al.*, 2004; RAMSDORF *et al.*, 2009).

Peixes são ótimos bioindicadores (SILVA, ERDTMANN e HENRIQUES, 2003) e a espécie escolhida para esse estudo foi *Astyanax altiparanae*, pois é endêmica do

sudeste do Brasil e tem relevante importância ecológica e econômica (PORTO-FORESTI, CASTILHO-ALMEIDA e FORESTI, 2005).

O objetivo desse estudo foi avaliar a ação genotóxica, citotóxica e alteração de atividades enzimáticas em *Astyanax altiparanae* expostos a baixas doses de nanopartículas de dióxido de titânio (NpTiO<sub>2</sub>), isoladas e conjugadas com chumbo inorgânico (PbII).

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Preparo das suspensões de Nanopartículas de Dióxido de Titânio (NpTiO<sub>2</sub>) e da solução de Chumbo Inorgânico (PbII)**

As nanopartículas de dióxido de titânio foram obtidas da Sigma-Aldrich® (Titanium (IV) oxide nanopowder, 21 nm particle size (TEM), ≥ 99.5% trace metals basis). As NpTiO<sub>2</sub> foram diluídas em água destilada nas doses: 5 ng/g, 50 ng/g e 500 ng/g de peixe.

A sonicação foi realizada em banho ultrassônico da marca Schuster, modelo L-100, durante 6 horas, na frequência de 42 Khz. Antes de aplicar a injeção nos animais, as suspensões passaram por um ciclo de sonicação com duração de 30 minutos, na mesma frequência.

A solução de chumbo inorgânico (PbII) foi preparada com a diluição de Nitrato de chumbo (Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) da Vetec® em água destilada. A dose 21 µg/g de chumbo foi baseada em Ramsdorf *et al.* (2009).

Todas as suspensões e soluções foram preparadas de modo que o volume da dose seja de 0,01 mL/g de peixe, independente da concentração.

## 2.2 Caracterização das NpTiO<sub>2</sub>

Na caracterização do pó de NpTiO<sub>2</sub> foram utilizados os métodos de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Difração de Raio-X para verificar a estrutura cristalina; Brunauer Emmett Teller, Teoria da Adsorção Multimolecular (B.E.T.) para a área de superfície específica; Dynamic Light Scattering (DLS) para o tamanho médio e índice de Polidispersão; Electrophoresis e Laser Doppler Velocimetry (LDV) para potencial Zeta e X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) para a química de superfície.

A caracterização das suspensões foi realizada 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 utilizou-se cubeta de poliestireno, cada análise durou em média 105 s e foi obtida com um ângulo de detecção de 90 ° e laser vermelho 633 nm. 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. Por meio do índice de polidispersão foi possível calcular a % de polidispersão [% Polidispersão (% Pd) = (Pdl)<sup>1/2</sup> x 100], para verificar a homogeneidade de tamanhos de partículas presentes na suspensão coloidal, sendo considerada como suspensão homogênea quando % Pd < 20 (MALVERN, 2005).

## 2.3 Desenho experimental

Os peixes foram obtidos na Piscicultura Alevinos Itaipu, no município de Curitiba – PR e transportados até o Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, no Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. A água utilizada na aclimatação e nos bioensaios foi previamente filtrada em filtro central de inox com filtros de 5 e 1 micrômetro e carvão ativado e mantida com aeração constante.

Os exemplares de *Astyanax altiparanae* foram aclimatados em um tanque de 2.000 L durante 60 dias, em fotoperíodo natural, com temperatura aproximada de 25 °C e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial. Após a aclimação, os peixes foram transferidos para aquários de 20 L individualmente. O fotoperíodo natural foi mantido, a temperatura da água ficou em torno de 25 °C, com aeração constante onde permaneceram por mais 48 horas. Após este período, a contaminação foi iniciada e os peixes não foram alimentados durante o experimento.

Antes da contaminação os peixes foram anestesiados em benzocaína a 10% e pesados, para calcular a quantidade da solução a ser injetada no animal.

A contaminação foi por injeção intraperitoneal (FIGURA 6) de 96 horas, após esse período os animais foram eutanasiados por secção medular. Todos os tratamentos receberam duas injeções intraperitoneais, estas foram realizadas no mesmo local do corpo do peixe, sendo uma imediatamente após a outra. Nos grupos conjugados (NpTiO<sub>2</sub> + PbII), a primeira injeção foi de NpTiO<sub>2</sub> e a segunda de PbII.

Foram utilizados 15 exemplares por grupo em 9 grupos, totalizando 135 peixes. Os grupos foram subdivididos em: controle negativo (CN - com duas injeções de água destilada), controle positivo (CP - Metil Metano Sulfonato (MMS) na dose de 0,5 µg/g), PbII na dose de 21 µg/g + uma injeção de água destilada; 5 ng/g de NpTiO<sub>2</sub> + uma injeção de água destilada; 50 ng/g de NpTiO<sub>2</sub> + uma injeção de água destilada; 500 ng/g de NpTiO<sub>2</sub> + uma injeção de água destilada; 5 ng/g de NpTiO<sub>2</sub> + PbII na dose de 21 µg/g; 50 ng/g de NpTiO<sub>2</sub> + PbII na dose de 21 µg/g; 500 ng/g de NpTiO<sub>2</sub> + PbII na dose de 21 µg/g. O controle positivo (CP) foi utilizado para verificar se a corrida eletroforética no ensaio cometa estava correta.



FIGURA 6. INJEÇÃO INTRAPERITONEAL EM *Astyanax altiparanae*. FONTE: A autora (2016).

Após 96 horas de exposição, os animais foram anestesiados em benzocaína 10 %. A coleta de sangue foi realizada através de punção cardíaca com o auxílio de um hematócrito heparinizado, este foi utilizado para o teste de micronúcleo pístico, ensaio cometa e ensaio de difusão. Os exemplares de *A. altiparanae* foram mortos por sessão medular e pesados, medidos e sexados. Em seguida foi realizada uma incisão a partir do poro urogenital até a nadadeira peitoral (FIGURA 7) para retirada do fígado, rim e também o cérebro dos exemplares. Parte dos tecidos então foram processados para os biomarcadores genéticos e parte do fígado e cérebro para os biomarcadores bioquímicos.

As amostras utilizadas no ensaio cometa e de difusão foram mantidas em 1 mL de soro bovino fetal, em ausência de luz e refrigeradas a 4 °C. As amostras de fígado e cérebro utilizadas para análises bioquímicas foram armazenadas a -80 °C.

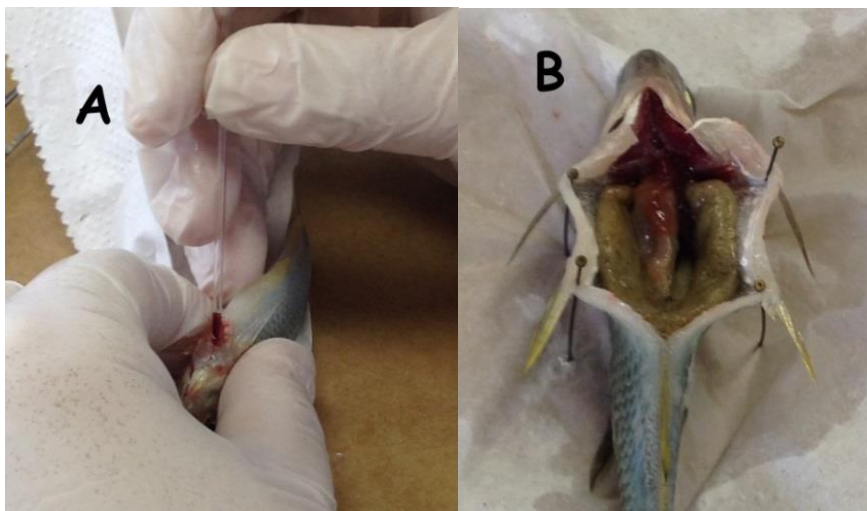


FIGURA 7. COLETA DAS AMOSTRAS. (A) COLETA DE SANGUE POR PUNÇÃO CARDÍACA. (B) COLETA DOS DEMAIS TECIDOS. FONTE: A autora (2016).

#### 2.4 Quantificação de chumbo em tecido hepático

As análises foram realizadas no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Foram realizados *pools* devido à pequena quantidade de tecido dos animais pertencentes aos tratamentos: controle negativo, 5 ng+Pb, 50 ng+Pb, 500 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O.

Foi utilizado o método US-EPA 3050B - para digestão das amostras. As amostras foram trituradas em blixer e a digestão foi feita em bloco digestor a 160 °C, adicionou-se 10 mL de HNO<sub>3</sub> 1:1, deixou-se em refluxo durante 10 minutos, depois novamente foi adicionado 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado p.a. e novamente refluxando por 30 minutos. Este processo repetiu-se até se completar a digestão e redução para 5 mL. Depois do resfriamento foi adicionado 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e repetiu-se a adição até que não houvessem mais bolhas e então, adicionou-se 10 mL de HCl concentrado p.a. e deixado em refluxo por mais 15 minutos. Foi feita a transferência das amostras para um balão volumétrico e foi removida a parte não digerida através de filtração.

A quantificação dos metais foi realizada por espectrômetro de absorção atômica de chama (Varian®, AA 240FS).

## 2.5 Biomarcadores Bioquímicos

A atividade das enzimas Glutathione S-transferase, Catalase, Superóxido-dismutase e peroxidação lipídica (LPO) no fígado de *Astyanax altiparanae* foram analisadas para verificar estresse oxidativo. A acetilcolinesterase cerebral (AChE) foi analisada para verificar neurotoxicidade.

As análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Ambiental, no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

### 2.5.1 Glutathione S-Transferase (GST)

O método foi proposto por Keen *et al.* (1976) e consiste nas seguintes etapas: as amostras de fígado foram descongeladas e diluídas na proporção 1:10 (V/V) em tampão fosfato 0,1 M com pH 6,5; em seguida pipetou-se em microplaca 20 µL de amostra, em quatro réplicas e foi adicionado 180 µL da solução de reação.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro SYNERGY HT, a 340 nm. O método consiste na conjugação do CDNB com a GSH pela ação da GST, dando origem a um tioéster que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância.

### 2.5.2 Superóxido-dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi analisada pelo método proposto por Crouch *et al.* (1981), com as seguintes etapas: foram pipetados 20 µL de cada amostra de fígado (com 25% de etanol) em microplaca; em seguida adicionado 70 µL da solução de nitrobluetetrazólio (NBT) e mais 110 µL de tampão carbonato de sódio (182 mM, pH 10,2) com hidroxilamina 67 mM.

A redução foi medida em espectrofotômetro SYNERGY HT a 560 nm e a atividade foi expressa em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$ . O princípio desse método é inibir

a redução do NBT para azul pela SOD, a partir do  $O_2^-$  formado pela hidroxilamina em solução alcalina.

### 2.5.3 Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi avaliada pela técnica descrita por Aebi (1984) que apresenta as seguintes etapas: as amostras de fígado foram descongeladas e diluídas na proporção de 1:5 (ou 5% V/V) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, depois foi pipetado 990  $\mu$ L de solução de reação em cubetas de quartzo e em seguida, adicionado 10  $\mu$ L de amostra. Foi preciso monitorar a absorbância de três réplicas para cada amostra durante 1 minuto e 30 segundos, em espectrofotômetro ULTROSPECT 4300 PRO, com comprimento de onda a 240 nm.

A atividade foi expressa em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$ . O método se baseia no consumo de peróxido de hidrogênio exógeno pela catalase, isso produz água e oxigênio que podem ser mensurados em espectrofotômetro.

### 2.5.4 Peroxidação Lipídica (LPO)

A análise da LPO foi realizada pelo ensaio *FOX (Ferrous Oxidation/ Xylenol Orange Method)*, proposto por Jiang *et al.* (1991), através da avaliação da concentração de hidroperóxidos: as amostras de fígado foram diluídas em metanol na proporção 1:1 (v/v), em seguida foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 x g a 4 °C, posteriormente, pipetou-se em microtubos 100  $\mu$ L do sobrenadante e deixou incubar por 30 minutos com 900  $\mu$ L da solução reação em metanol P.A.

A leitura foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro. O método consiste na oxidação do ferro, esse processo é mediado pela presença de peróxidos em meio ácido.

### 2.5.5 Acetilcolinesterase Cerebral (AChE)

A atividade da AChE cerebral foi avaliada pelo método descrito por Ellman *et al.* (1961), modificado por Silva de Assis (1998): as amostras foram diluídas na proporção 1:4 (v/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5; em seguida foi pipetado 50 µL de cada amostra em microplaca e adicionado 200 µL de 5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato (DTNB) (0,75 mM) e 50 µL de iodeto de acetilcolina (ATC) (9 mM).

A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm durante 3 minutos em intervalos de 15 segundos. O método se baseia em uma reação colorimétrica de coloração amarela entre o ATC e o DTNB na presença da AChE.

## 2.6 Biomarcadores Genéticos

### 2.6.1 Ensaio Cometa

A técnica foi descrita por Speit e Hartmann (1999), com ajustes realizados por Cestari *et al.* (2004), Ferraro *et al.* (2004) (para sangue) e Ramsdorf *et al.* (2009) para fígado, rim e cérebro. O procedimento para montagem das lâminas com os tecidos do consiste das seguintes etapas:

Retirar 10 µL de sangue e os demais tecidos de cada animal e acondicioná-los em frascos de microcentrífuga do tipo *ependorf* contendo 1 mL de soro bovino fetal, deixar armazenado sob refrigeração e na ausência de luz e desagregar o fígado, rim e cérebro em homogeneizador a 1500 rpm por cerca de 30 segundos.

Coletar 10 µL da suspensão celular de sangue ou 20 µL do homogeneizado obtido dos demais tecidos e misturar a 120 µL de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida a 37 °C; em seguida, colocar sobre uma lâmina previamente coberta com agarose normal; cobrir a lâmina com uma lamínula e levar a geladeira por 15 minutos; após esse tempo, retirar as lamínulas cuidadosamente e colocar as lâminas em solução de lise dentro de cubetas e manter em refrigerador por pelo menos 24 horas. Após esse período de tempo, preparar a cuba de

eletroforese mergulhando-a em gelo (4 °C) e no escuro; colocar as lâminas na cuba horizontal de eletroforese, se necessário, preencher os espaços vazios com lâminas limpas, para que corrente elétrica atravessasse todas com intensidade igual. Na cuba de eletroforese, adicionar suavemente o tampão de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir as lâminas e manter as lâminas nessa solução por 25 minutos para a desenovelamento do DNA, depois iniciar a corrida de eletroforese a 25 V e 300 mA por 25 minutos; após esse tempo, retirar as lâminas cuidadosamente e neutralizá-las com 5 mL de tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos e repetir a neutralização por mais duas vezes; secar as lâminas na posição inclinada e fixar com etanol por 5 minutos e estocar as lâminas, se necessário em geladeira. Para a coloração, adicionar 20 µL de brometo de etídio em cada lâmina, cobrir com lamínula e analisar.

A análise foi em teste cego de 100 nucleóides por lâmina, sob microscópio de epifluorescência com aumento de 400 x. Os nucleóides foram classificados segundo Collins *et al.* (1997) de acordo com o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética, sendo classificados em: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano extenso) e 4 (dano máximo).

Quantificam-se os tipos de danos e se atribuem os escores em cada classe. Os escores são obtidos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

$$\text{Escores} = (0 \times \text{n}^\circ \text{ dano } 0) + (1 \times \text{n}^\circ \text{ dano } 1) + (2 \times \text{n}^\circ \text{ dano } 2) + (3 \times \text{n}^\circ \text{ dano } 3) + (4 \times \text{n}^\circ \text{ dano } 4)$$

### **2.6.2 Ensaio de difusão do DNA**

O ensaio será realizado de acordo com a técnica descrita por Sestili, Martinelli e Stocchi (2006), no qual envolve o mesmo procedimento do ensaio cometa para a confecção das lâminas. Entretanto, as lâminas não são submetidas à corrida eletroforética, permanecendo em tampão alcalino por 10 minutos e posteriormente coradas com brometo de etídio.

### 2.6.3 Teste do Micronúcleo Písceo

O teste do micronúcleo com o corante fluorescente laranja de acridina foi realizado em eritrócitos de *Astyanax altiparanae*.

A técnica utilizada foi descrita por Ueda *et al.* (1992) com ajustes: o sangue periférico foi coletado e diluído em 1 mL de soro bovino fetal e a suspensão celular foi colocada sobre uma lâmina, previamente limpa; em seguida foi realizado o esfregaço; as lâminas foram secas ao ar ambiente *overnight* e fixadas com metanol por 10 minutos, em seguida foram lavadas em água corrente e secas ao ar.

A coloração foi realizada com laranja de acridina a 0,003 % por 2-3 minutos, em seguida cobriu-se com uma lamínula, e foi realizada a análise microscópica. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência em aumento de 1000x, em teste cego e em 2000 eritrócitos por lâmina/peixe.

#### *Identificação de eritrócitos policromáticos*

A laranja de acridina cora seletivamente eritrócitos imaturos (eritrócitos policromáticos - EP) e no microscópio de epifluorescência, os micronúcleos e demais núcleos apresentam fluorescência verde-amarelada. Os EP podem ser facilmente diferenciados dos demais, pois apresentam fluorescência vermelha no citoplasma por terem em seu conteúdo RNA.

Os critérios para a identificação de eritrócitos jovens com micronúcleos serão os seguintes: o micronúcleo não pode ultrapassar um terço do tamanho do núcleo principal; deve estar claramente separado do núcleo principal; estar no mesmo plano de foco, ter a mesma cor e mesma refringência do núcleo principal.

As alterações na forma elíptica dos núcleos dos eritrócitos que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, também são analisadas, sendo descritas como alterações morfológicas nucleares (CARRASCO, TILBURY e MYERS, 1990) e sendo contabilizadas em eritrócitos normocromáticos e policromáticos.

#### *Cálculo da frequência de eritrócitos policromáticos*

Foi calculado o escore de EP para cada 2000 eritrócitos amostrados por peixe. Os resultados foram apresentados como uma frequência (%) obtida usando-se o seguinte cálculo: (PACHECO e SANTOS, 2002).

$$\text{Frequência de eritrócitos imaturos (\%)} = \frac{\text{N}^{\circ}\text{EPs}}{\text{N}^{\circ}\text{EPs} + \text{N}^{\circ}\text{ENs}} \times 1000$$

Sendo:

N<sup>o</sup>EPs = N<sup>o</sup> eritrócitos policromáticos.

N<sup>o</sup>ENs = N<sup>o</sup> eritrócitos normocromáticos

## 2.7 Análise estatística

O Software BioEstat 5.0 foi utilizado para a realização das análises. Foi empregado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov em todos os grupos, para determinar a utilização de testes paramétricos ou não paramétricos.

Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Student-Newman-Keuls para o ensaio cometa do sangue, fígado, rim e cérebro, para o teste do micronúcleo píceo e de alterações morfológicas nucleares, frequência de eritrócitos policromáticos e para análise das enzimas SOD, GST, LPO e AChE cerebral.

O teste paramétrico ANOVA seguido do teste *t* (LSD) foi utilizado para análise estatística no ensaio de difusão do DNA e para análise da enzima CAT.

Consideraram-se valores de  $p < 0,05$  como significativos.

Os tratamentos foram divididos em seis grupos para que fosse possível observar os efeitos dos contaminantes isolados em relação ao controle negativo e se houve interação entre as diferentes doses de NpTiO<sub>2</sub> (5 ng, 50 ng e 500 ng) e o PbII (21 µg):

- (A) Controle negativo, 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O, 500 ng+H<sub>2</sub>O, controle positivo;
- (B) Controle negativo, Pb+H<sub>2</sub>O, controle positivo;
- (C) Controle negativo, 5 ng+Pb, 50 ng+Pb, 500 ng+Pb, controle positivo;
- (D) Pb+H<sub>2</sub>O, 5 ng+Pb, 5 ng+H<sub>2</sub>O.
- (E) Pb+H<sub>2</sub>O, 50 ng+Pb, 50 ng+H<sub>2</sub>O.
- (F) Pb+H<sub>2</sub>O, 500 ng+Pb, 500 ng+H<sub>2</sub>O.

### 3. Resultados

Foram utilizados ao total 135 exemplares de *Astyanax altiparanae* (75 fêmeas e 60 machos) que tiveram o tamanho médio em centímetros de  $6,10 \pm 0,69$  (média  $\pm$  desvio padrão) e peso médio em gramas de  $4,56 \pm 1,86$  (média  $\pm$  desvio padrão).

Não foram constatadas mortes nos animais e nem qualquer alteração no comportamento destes durante o tempo de contaminação.

#### 3.1 Caracterização das NpTiO<sub>2</sub>

Através dos métodos de TEM (FIGURA 8) e da Difração de Raio-X foi possível confirmar que o pó da nanopartícula utilizada possui sua composição 100 % da forma cristalina anatase. Apresentou área de superfície específica com 83.47 m<sup>2</sup>/g (B.E.T.), tamanho médio de 107 nm e tamanho de dispersão de 45 nm (DLS) e a química de superfície composta por 28.42 % de titânio e 71.58 % de oxigênio (XPS).

A suspensão coloidal 0,5 mg/L e 5 mg/mL apresentaram tamanho médio de partículas de 397,1 nm e 255,0 nm, respectivamente. E a suspensão 50 mg/mL apresentou dois tamanhos médios de partículas, 239,8 nm e 66,45 nm (FIGURA 9).

Quanto ao potencial zeta, todas as suspensões apresentaram valores de potencial zeta menores que -30mV, sendo negativos e instáveis (TABELA 1).

A porcentagem de polidispersão na suspensão coloidal de 0,5 mg/L foi de 79,56 %, na suspensão de 5 mg/mL foi de 100 % e na suspensão de 50 mg/mL a porcentagem de polidispersão foi de 58,05 %. Todas as suspensões apresentaram valores maiores que 20%, indicando a formação de sistemas heterogêneos (TABELA 1).

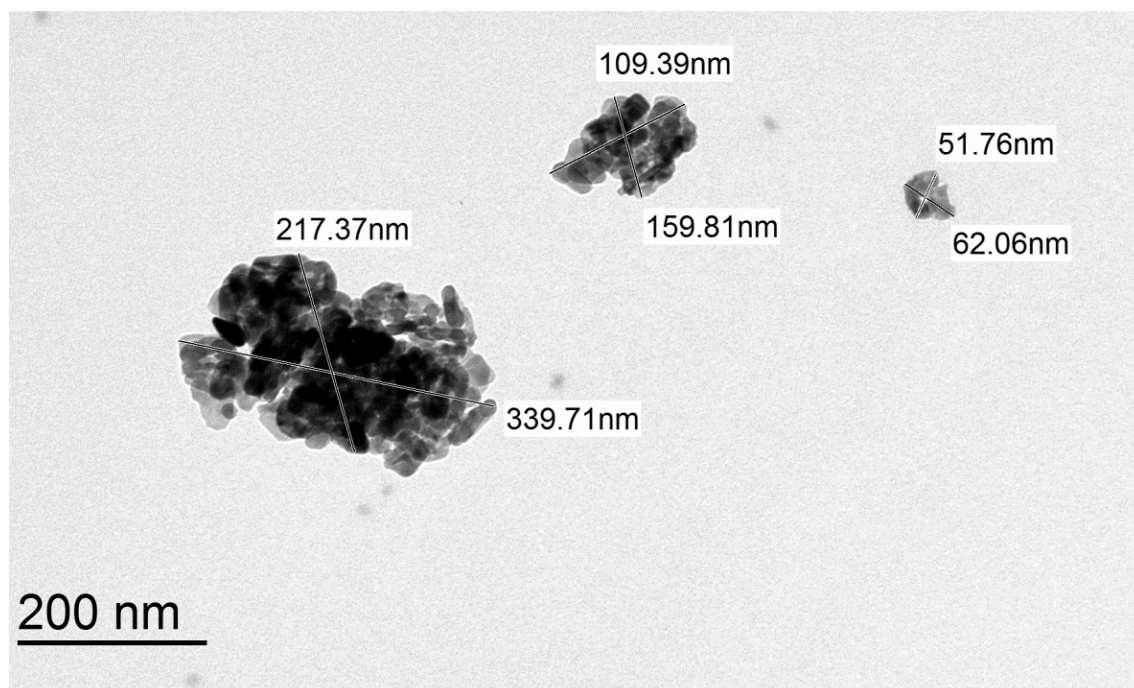


FIGURA 8. ELETROMICROGRAFIA DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO COM FORMA CRISTALINA DE ANATASE.

TABELA 1. CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES COLOIDAIS DE NANOPARTÍCULAS DE  $\text{TiO}_2$ .

CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	TAMANHO (d.nm/intensidade)	POTENCIAL ZETA (mV)	% DE POLIDISPERSÃO
0,5	397,1	-3,38	79,56
5	255,0	-5,61	100
50	239,8 e 66,45	-2,59	58,05

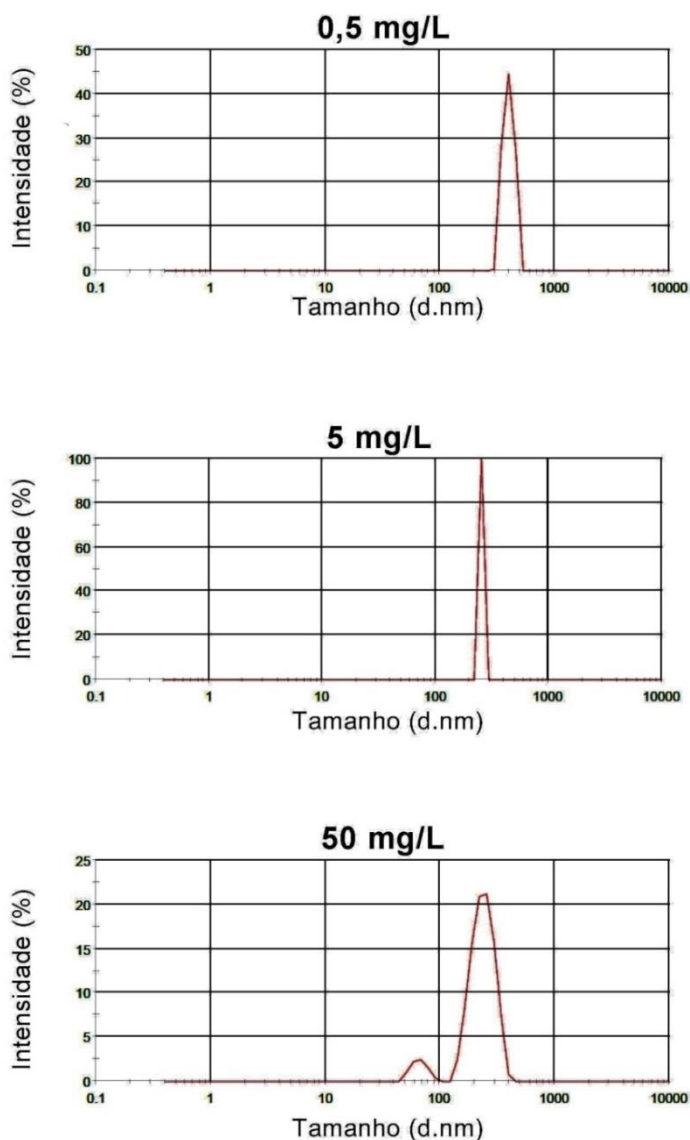


FIGURA 9. TAMANHO DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS SUSPENSÕES COLOIDAIIS DE 0,5 mg/L; 5 mg/L e 50 mg/L.

### 3.2 Quantificação de chumbo no tecido hepático

A análise química do fígado demonstrou que todos os tratamentos com PbII, tanto isolado quanto em associação as Nps apresentaram valores maiores na concentração desse metal no tecido.

O tratamento que apresentou maior acúmulo de PbII foi o de associação entre a menor dose de  $\text{NpTiO}_2$  5 ng+Pb, onde a quantidade do metal presente no tecido aumentou em 141,18 % em relação ao grupo tratado com o metal isolado. Na dose

intermediária de associação entre os contaminantes também houve um aumento no acúmulo de PbII no tecido de 39,52 % em relação ao grupo Pb+H<sub>2</sub>O. Já na maior dose de associação entre as NpTiO<sub>2</sub> e o PbII foi observado uma diminuição na quantidade de PbII absorvido pelo tecido. (TABELA 2).

TABELA 2. QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO EM TECIDO HEPÁTICO DE *Astyanax altiparanae* NOS TRATAMENTOS: CONTROLE NEGATIVO, CONTAMINADO 21 µg/g DE PbII, E ASSOCIAÇÃO DE PbII E NpTiO<sub>2</sub> NAS DOSES 5 ng+Pb, 50 ng+Pb E 500 ng+Pb.

Tratamento	conc. µg/g	RSD%
CN	ND	-
5 ng+Pb	479,52	14,2
50 ng+Pb	277,41	0,3
500 ng+Pb	153,76	6,1
Pb+H <sub>2</sub> O	198,82	8,2

ND= não detectado

RSD%= desvio padrão relativo

### 3.3 Biomarcadores Bioquímicos

#### 3.3.1 Glutathione S-Transferase (GST)

Não houve alteração na atividade da GST nos grupos expostos a NpTiO<sub>2</sub> nas doses de 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O e 500 ng+H<sub>2</sub>O quando comparado ao CN ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 10A).

No grupo Pb+H<sub>2</sub>O houve aumento da atividade da enzima GST em relação ao controle ( $p= 0.0001$ ) (FIGURA 10B).

Os tratamentos 5 ng+Pb, 50 ng+Pb e 500 ng+Pb diferiram estatisticamente do CN ( $p= 0,0001$ ;  $p= 0,0001$  e  $p= 0,0004$ ; respectivamente), indicando aumento na atividade da GST (FIGURA 10C).

A menor dose de NpTiO<sub>2</sub> 5 ng+H<sub>2</sub>O apresentou menor atividade da GST em relação tanto à dose conjugada com PbII 5 ng+Pb, quanto à dose isolada de PbII

(Pb+H<sub>2</sub>O) ( $p= 0,0004$  e  $p= 0,003$ ; respectivamente) (FIGURA 10D). Esse padrão também foi observado nas doses de 50 ng+H<sub>2</sub>O, esta diferiu de 50 ng+Pb e de Pb+H<sub>2</sub>O ( $p= 0,001$  e  $p= 0,009$ ; respectivamente) (FIGURA 10E) e também na maior dose de NpTiO<sub>2</sub>, diferindo do tratamento 500 ng+Pb e de Pb+H<sub>2</sub>O ( $p= 0,012$  e  $p= 0,031$ ; respectivamente) (FIGURA 10F).

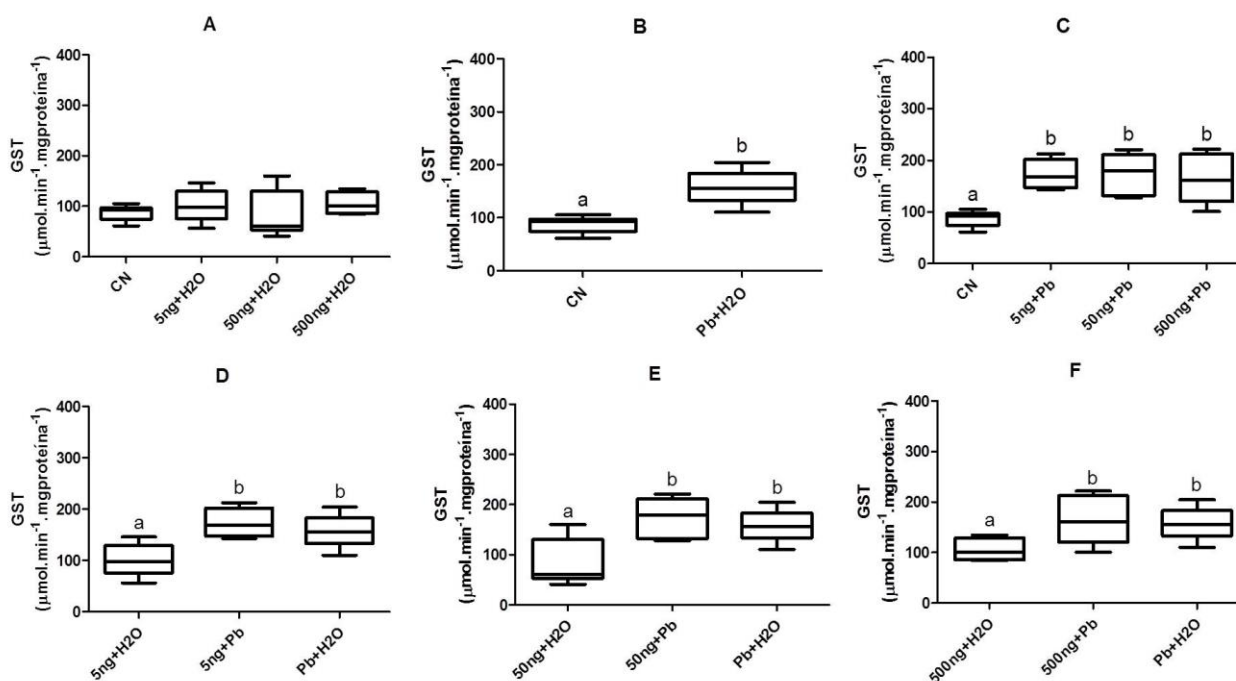


FIGURA 10. ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) HEPÁTICA DE *Astyanax altiparanae*. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS (CN, Pb+H<sub>2</sub>O, 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O, 500 ng+H<sub>2</sub>O, 5 ng+Pb, 50 ng+Pb e 500 ng+Pb) DENTRO DE CADA GRUPO (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls, sendo  $p < 0,05$  significativos.

### 3.3.2 Superóxido dismutase (SOD)

Nos grupos expostos a NpTiO<sub>2</sub> isolada nas doses 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O e 500 ng+H<sub>2</sub>O a atividade da SOD foi menor quando comparado ao CN ( $p= 0,0376$ ;  $p= 0,0003$  e  $p= 0,001$ ; respectivamente) (FIGURA 11A).

O PbII não alterou a atividade da SOD, nem isolado Pb+H<sub>2</sub>O (FIGURA 11B) e nem associado as doses de NpTiO<sub>2</sub> 5 ng+Pb, 50 ng+Pb e 500 ng+Pb (FIGURA 11C) em relação ao CN ( $p > 0,05$ ).

Os tratamentos 5 ng+H<sub>2</sub>O, 5 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O não apresentaram diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 11D).

A dose intermediária de  $\text{NpTiO}_2$  isolada 50 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  demonstrou uma menor atividade da SOD, diferindo estatisticamente da mesma dose associada ao  $\text{PbII}$  50 ng+ $\text{Pb}$  e do  $\text{Pb}+\text{H}_2\text{O}$  ( $p= 0,011$  e  $p= 0,0004$ ; respectivamente) (FIGURA 11E). Isso também ocorreu na maior dose, onde houve uma menor na atividade da enzima em 500 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  diferindo dos tratamentos 500 ng+ $\text{Pb}$  e de  $\text{Pb}+\text{H}_2\text{O}$  ( $p= 0,006$  e  $p= 0,005$ ; respectivamente) (FIGURA 11F).

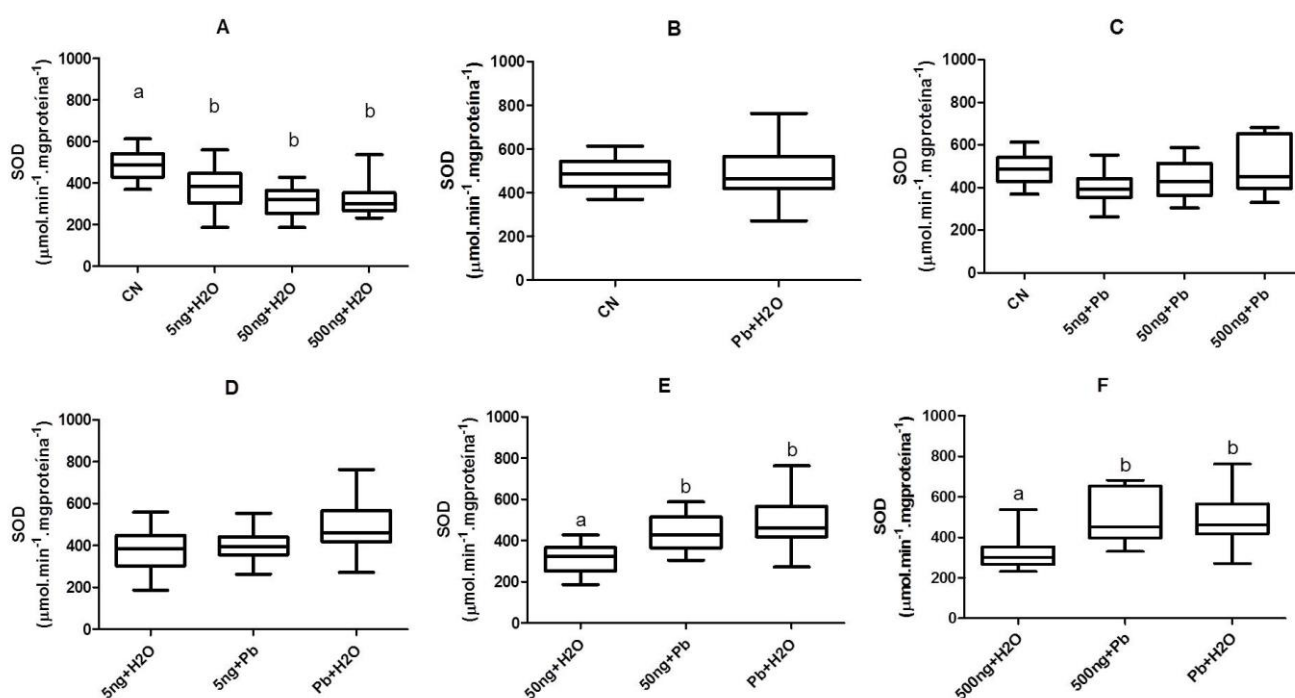


FIGURA 11. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) HEPÁTICA DE *Astyanax altiparanae*. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS (CN,  $\text{Pb}+\text{H}_2\text{O}$ , 5 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ , 50 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ , 500 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ , 5 ng+ $\text{Pb}$ , 50 ng+ $\text{Pb}$  e 500 ng+ $\text{Pb}$ ) DENTRO DE CADA GRUPO (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls, sendo  $p < 0,05$  significativos.

### 3.3.3 Catalase (CAT)

A atividade da CAT não foi alterada em nenhuma das concentrações de  $\text{NpTiO}_2$  isoladas 5 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ , 50 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  e 500 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  quando comparadas ao CN (FIGURA 12A).

O  $\text{Pb}+\text{H}_2\text{O}$  não diferiu estatisticamente do CN ( $p= 0,053$ ), porém, é possível observar uma tendência no aumento da atividade da enzima CAT (FIGURA 12B).

Os grupos que receberam as doses de NpTiO<sub>2</sub> associadas ao PbII 5 ng+Pb, 50 ng+Pb e 500 ng+Pb também não alteraram a atividade da CAT em relação ao CN ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 12C).

Os tratamentos 5 ng+H<sub>2</sub>O, 5 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O (FIGURA 12D); 50 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O (FIGURA 12E) e 500 ng+H<sub>2</sub>O, 500 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O (FIGURA 12F) não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ).

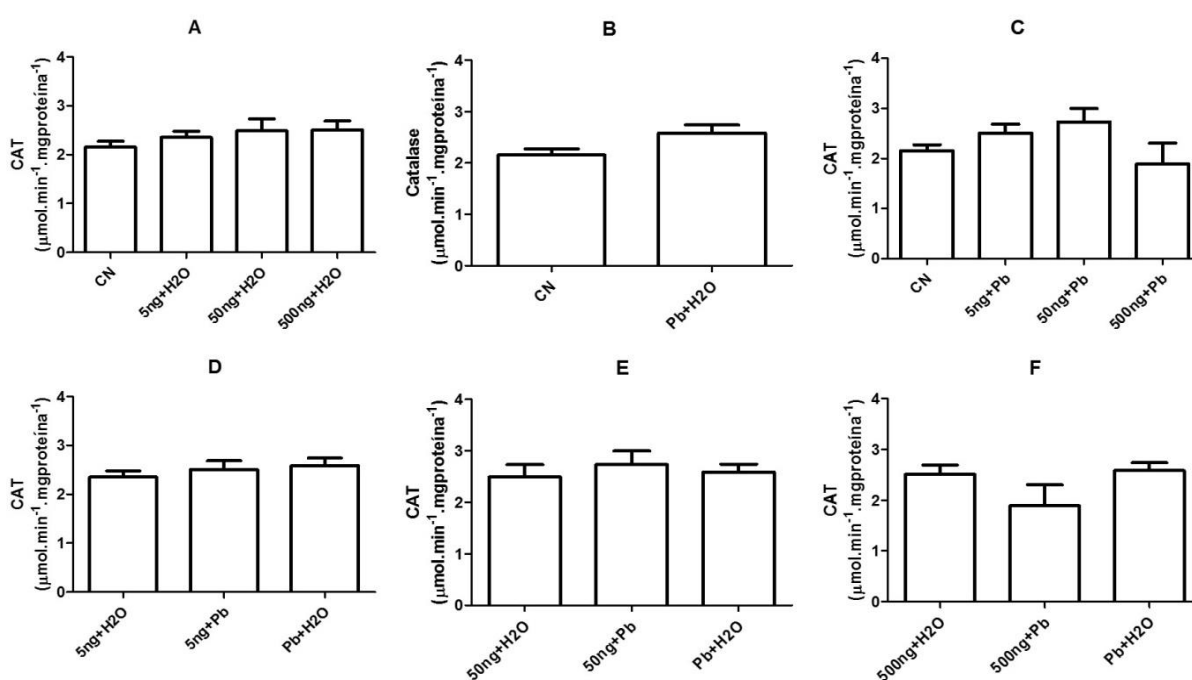


FIGURA 12. ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) HEPÁTICA DE *Astyanax altiparanae*. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS (CN, Pb+H<sub>2</sub>O, 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O, 500 ng+H<sub>2</sub>O, 5 ng+Pb, 50 ng+Pb e 500 ng+Pb) DENTRO DE CADA GRUPO (Gráficos: A, B, C, D, E e F). ANOVA seguido do teste  $t$ , sendo  $p < 0,05$  significativos.

### 3.3.4 Peroxidação Lipídica (LPO)

Não foi observada diferença significativa na lipoperoxidação em nenhum dos tratamentos expostos a NpTiO<sub>2</sub> nas doses 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O e 500 ng+H<sub>2</sub>O em comparação ao CN ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 13A).

O PbII isolado também não alterou a lipoperoxidação em quando comparados ao CN ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 13B).

Nos grupos expostos a associação dos contaminantes 5 ng+Pb, 50 ng+Pb e 500 ng+Pb não diferiram do controle negativo ( $p > 0,05$ ), porém, ocorreu uma diminuição na lipoperoxidação em 5 ng+Pb em relação a 50 ng+Pb e 500 ng+Pb ( $p=0,005$  e  $p=0,020$ ; respectivamente) (FIGURA 13C).

O tratamento 5 ng+H<sub>2</sub>O não diferiu da mesma dose em associação ao PbII 5 ng+Pb e nem do PbII isolado ( $p > 0,05$ ), porém, o grupo 5 ng+Pb apresentou uma redução significativa em relação ao Pb+H<sub>2</sub>O ( $p=0,006$ ) (FIGURA 13D).

Os grupos tratados com 50 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O (FIGURA 13E) e 500 ng+H<sub>2</sub>O, 500 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O (FIGURA 13F) não apresentaram diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ).

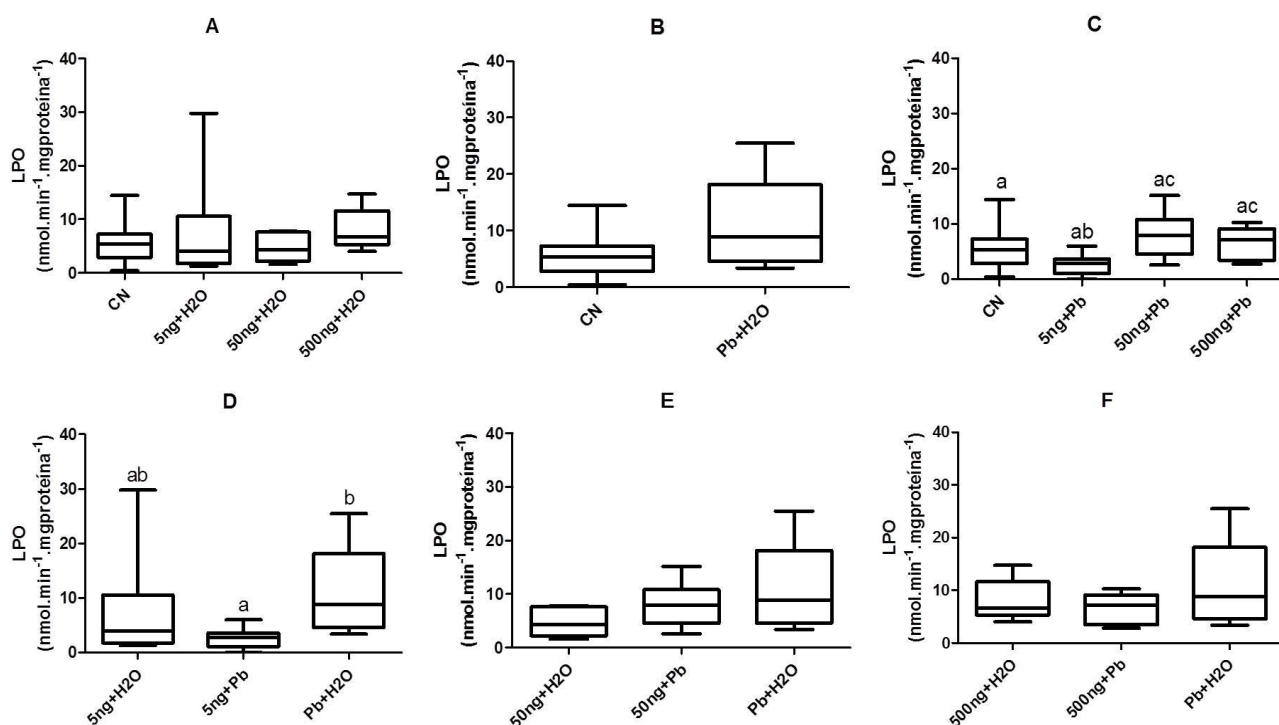


FIGURA 13. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) HEPÁTICA EM *Astyanax altiparanae*. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS (CN, Pb+H<sub>2</sub>O, 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O, 500 ng+H<sub>2</sub>O, 5 ng+Pb, 50 ng+Pb e 500 ng+Pb) DENTRO DE CADA GRUPO (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls, sendo  $p < 0,05$  significativos.

### 3.3.5 Acetilcolinesterase (AChE)

A AChE não demonstrou alteração em sua atividade nos tratamentos expostos a  $\text{NpTiO}_2$  nas doses 5 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  e 50 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  em relação ao CN ( $p > 0,05$ ), já o tratamento 500 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  aumentou a atividade da enzima quando comparada ao controle ( $p=0,004$ ) e a menor dose 5 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  ( $p=0,0004$ ) (FIGURA 14A).

O PbII também não alterou a atividade da AChE em relação ao CN ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 14B). Nos tratamentos de associação dos contaminantes, observou-se um aumento na atividade da AChE somente em 5 ng+Pb, este diferiu do CN ( $p=0,001$ ), da dose intermediária 50 ng+Pb ( $p=0,040$ ) e da maior dose 500 ng+Pb ( $p=0,011$ ) (FIGURA 14C).

O grupo de associação 5 ng+Pb apresentou maior atividade de AChE tanto em relação as  $\text{NpTiO}_2$  isolada quanto ao metal isolado nas mesmas doses ( $p=0,0001$  e  $p=0,003$ , respectivamente) (FIGURA 14D). Os tratamentos 50 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ , 50 ng+Pb e Pb+ $\text{H}_2\text{O}$  não apresentaram diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 14E). E o grupo 500 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  aumentou significativamente a atividade da enzima em relação aos grupos 500 ng+Pb e Pb+ $\text{H}_2\text{O}$  ( $p=0,031$  e  $p=0,0148$ , respectivamente) (FIGURA 14F).

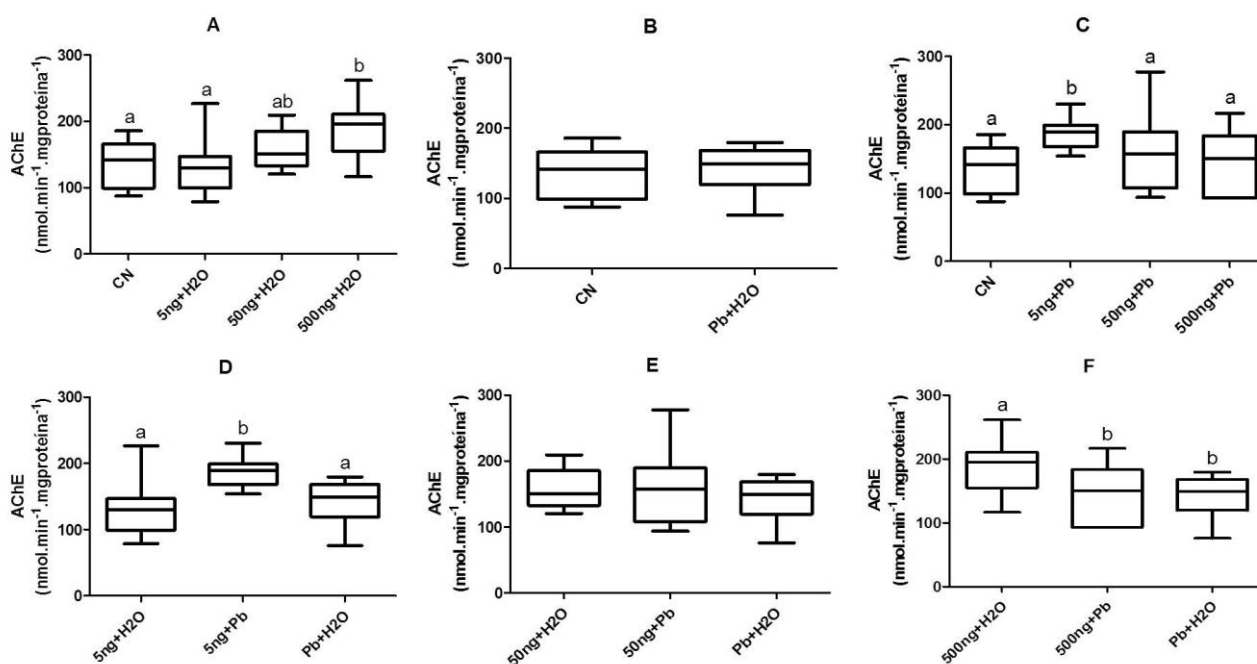


FIGURA 14. ACETILCOLINESTERASE (AChE) CEREBRAL DE *Astyanax altiparanae*. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS (CN, Pb+ $\text{H}_2\text{O}$ , 5 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ , 50 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ , 500 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ , 5 ng+Pb, 50 ng+Pb e

500 ng+Pb) DENTRO DE CADA GRUPO (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls, sendo  $p < 0,05$  significativos.

### 3.4 Biomarcadores Genéticos

#### 3.4.1 Ensaio Cometa

##### 3.4.1.1 Ensaio cometa – Sangue

Através do ensaio cometa em eritrócitos não foi observada diferença estatística entre os tratamentos expostos as nanopartículas isoladas nas doses 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O e 500 ng+H<sub>2</sub>O ( $p > 0,05$ ) em relação ao CN (FIGURA 15A).

O grupo tratado com Pb+H<sub>2</sub>O também não demonstrou um aumento de danos ao DNA quando comparado ao CN ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 15B).

Os tratamentos que receberam injeção com a associação entre os dois contaminantes não apresentaram diferença estatística em nenhuma das doses 5 ng+Pb, 50 ng+Pb e 500 ng+Pb ( $p > 0,05$ ) quando comparadas ao CN (FIGURA 15C).

A menor dose de NpTiO<sub>2</sub> isolada 5 ng+H<sub>2</sub>O apresentou maiores danos ao DNA em relação à mesma dose de NpTiO<sub>2</sub> em associação 5 ng+Pb ( $p=0,0418$ ) e do tratamento Pb+H<sub>2</sub>O ( $p=0,007$ ) (FIGURA 15D).

O tratamento 50 ng+H<sub>2</sub>O não apresentou diferença estatística em relação ao tratamento com associação dos contaminantes 50 ng+Pb ( $p > 0,05$ ), mas diferiu do grupo Pb+H<sub>2</sub>O ( $p=0,018$ ) (FIGURA 15E).

Na maior dose das NpTiO<sub>2</sub> 500 ng+H<sub>2</sub>O não foi observada diferença estatística entre os tratamentos em associação e com o PbII isolado ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 15F).

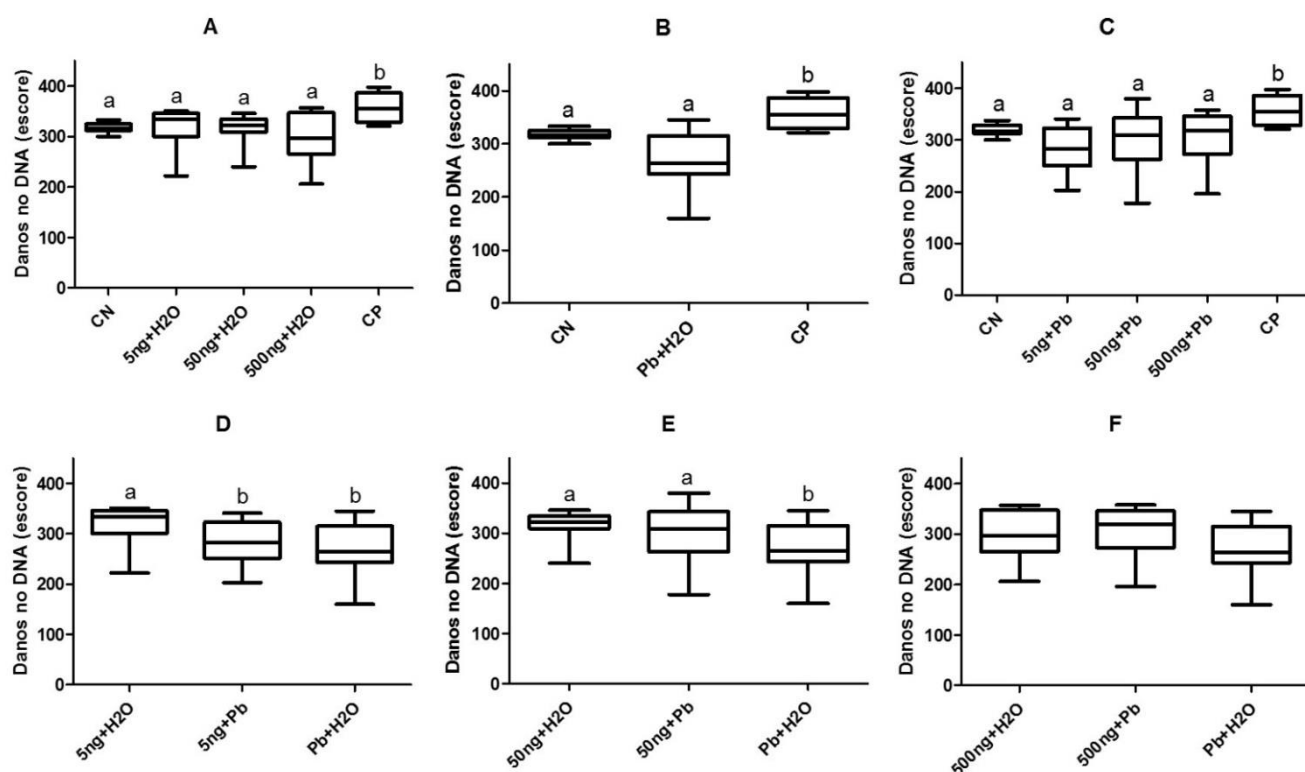


FIGURA 15. DANOS EM ERITRÓCITOS DE *Astyanax altiparanae* DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS (CN, Pb+H<sub>2</sub>O, 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O, 500 ng+H<sub>2</sub>O, 5 ng+Pb, 50 ng+Pb, 500 ng+Pb e CP) DENTRO DE CADA GRUPO (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls, sendo  $p < 0,05$  significativos.

### 3.4.1.2 Ensaio cometa – Fígado

A partir do ensaio cometa no tecido hepático não foi detectado danos no DNA nos grupos expostos as doses de NpTiO<sub>2</sub> isoladas 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O e 500 ng+H<sub>2</sub>O (FIGURA 16A).

O PbII também não aumentou significativamente os danos ao material genético em relação ao CN ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 16B).

As três doses de NpTiO<sub>2</sub> associadas ao PbII 5 ng+Pb, 50 ng+Pb e 500 ng+Pb não diferiram estatisticamente do CN (FIGURA 16C).

Os grupos tratados com 5 ng+H<sub>2</sub>O, 5 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O (FIGURA 16D); 50 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O (FIGURA 16E) e 500 ng+H<sub>2</sub>O, 500 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O (FIGURA 16F) também não apresentaram diferenças estatísticas entre si ( $p > 0,05$ ),

dessa forma, não houve aumento de danos nos grupos com associação dos xenobióticos em comparação aos expostos a apenas  $\text{NpTiO}_2$  ou apenas  $\text{PbII}$ .

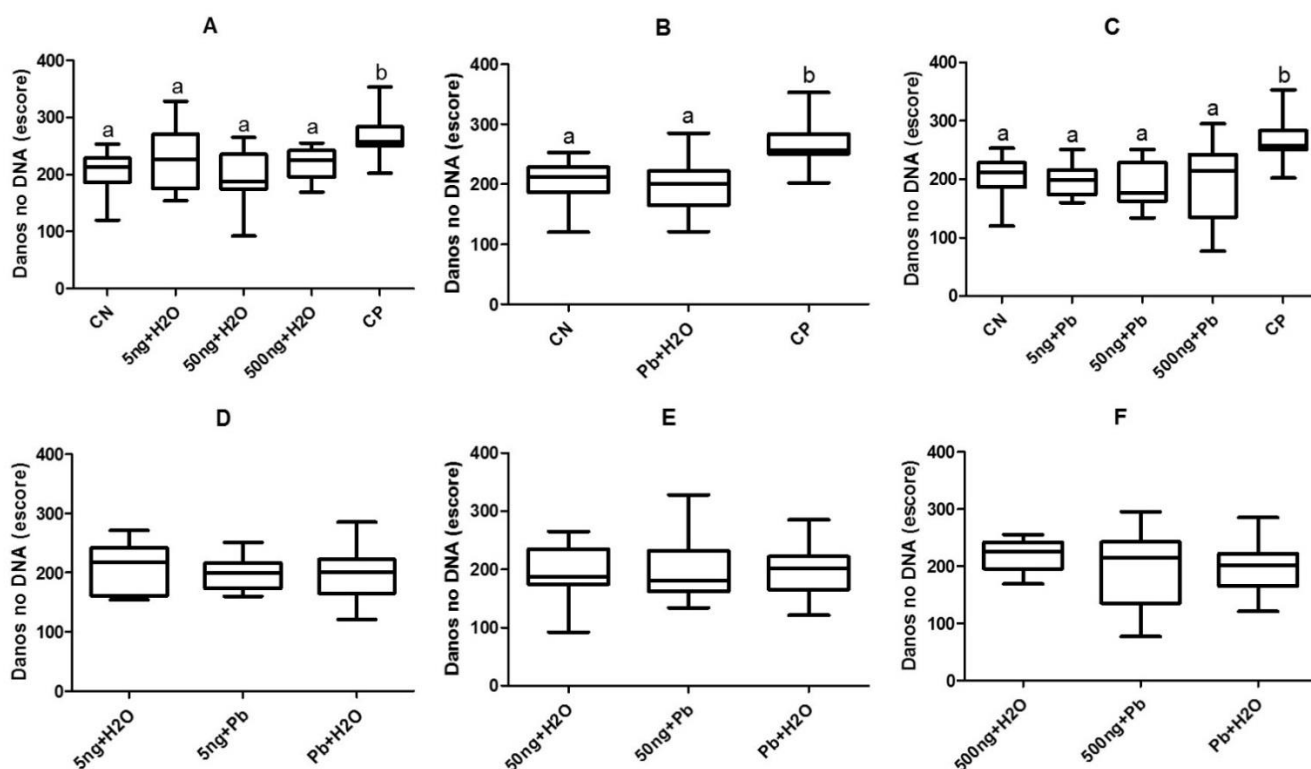


FIGURA 16. DANOS EM CÉLULAS DO FÍGADO DE *Astyanax altiparanae* DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS (CN,  $\text{Pb}+\text{H}_2\text{O}$ , 5 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ , 50 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ , 500 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ , 5 ng+ $\text{Pb}$ , 50 ng+ $\text{Pb}$ , 500 ng+ $\text{Pb}$  e CP) DENTRO DE CADA GRUPO (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls, sendo  $p < 0,05$  significativos.

### 3.4.1.3 Ensaio cometa - Cérebro

O ensaio cometa em tecido cerebral não indicou aumento de danos ao material genético em nenhuma das doses de  $\text{NpTiO}_2$  isoladas quando comparadas ao CN ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 17A).

O grupo tratado com  $\text{Pb}+\text{H}_2\text{O}$  não apresentou um aumento significativo de danos quando comparado ao CN ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 17B).

Na menor dose de associação entre  $\text{NpTiO}_2$  e  $\text{PbII}$ , 5 ng+ $\text{Pb}$  houve um aumento de danos ao DNA ( $p= 0,049$ ) em relação ao CN. A dose intermediária 50 ng+ $\text{Pb}$  e a maior dose 500 ng+ $\text{Pb}$  não diferiram estatisticamente do CN e da menor dose em associação de  $\text{NpTiO}_2$  e  $\text{PbII}$  ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 17C).

Os tratamentos 5 ng+H<sub>2</sub>O, 5 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O (FIGURA 17D); 50 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O (FIGURA 17E) e 500 ng+H<sub>2</sub>O, 500 ng+Pb e Pb+H<sub>2</sub>O (FIGURA 17F) não apresentaram diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ), não demonstrando interação entre as NpTiO<sub>2</sub> e o PbII.

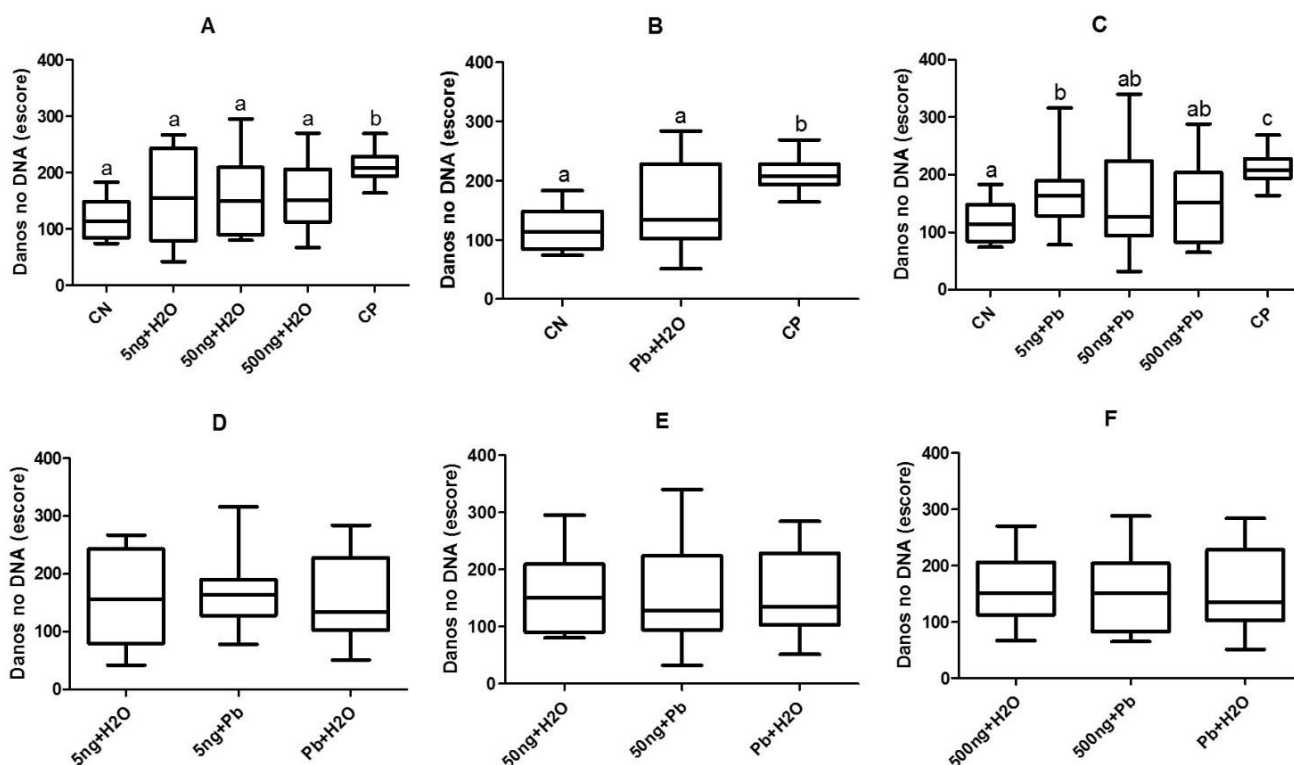


FIGURA 17. DANOS EM CÉLULAS DO CEREBRO DE *Astyanax altiparanae* DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS (CN, Pb+H<sub>2</sub>O, 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O, 500 ng+H<sub>2</sub>O, 5 ng+Pb, 50 ng+Pb, 500 ng+Pb e CP) DENTRO DE CADA GRUPO (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls, sendo  $p < 0,05$  significativos.

#### 3.4.1.4 Ensaio cometa – Rim

O ensaio cometa no tecido renal não demonstrou aumento de danos ao DNA nos tratamentos com as três doses de NpTiO<sub>2</sub> isoladas 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O e 500 ng+H<sub>2</sub>O ( $p > 0,05$ ) em relação ao CN (FIGURA 18A).

O grupo tratado com Pb+H<sub>2</sub>O também não apresentou diferença estatística quando comparado ao CN ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 18B).

A associação entre as  $\text{NpTiO}_2$  e o  $\text{PbII}$  não diferiu do CN na menor dose 5  $\text{ng+Pb}$ , na dose intermediária 50  $\text{ng+Pb}$  observamos uma tendência ( $p=0,057$ ) de aumento dos danos no material genético, já na maior dose 500  $\text{ng+Pb}$  foi observada diferença estatística ( $p=0,045$ ) quando comparado ao CN (FIGURA 18C).

Os grupos tratados com 5  $\text{ng+H}_2\text{O}$ , 5  $\text{ng+Pb}$  e  $\text{Pb+H}_2\text{O}$  (FIGURA 18D); 50  $\text{ng+H}_2\text{O}$ , 50  $\text{ng+Pb}$  e  $\text{Pb+H}_2\text{O}$  (FIGURA 18E) e 500  $\text{ng+H}_2\text{O}$ , 500  $\text{ng+Pb}$  e  $\text{Pb+H}_2\text{O}$  (FIGURA 18F) não diferiram estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ), indicando que não houve interação entre os contaminantes.

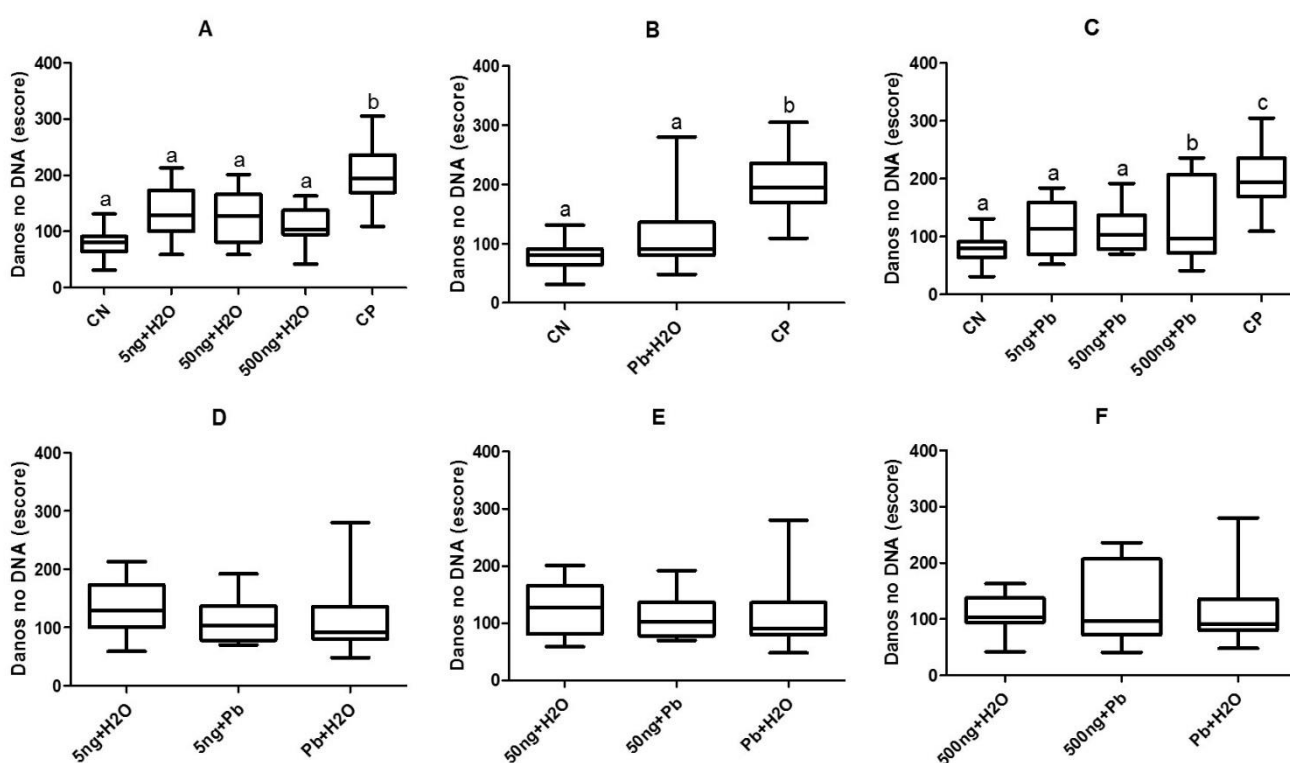


FIGURA 18. DANOS EM CÉLULAS DO RIM DE *Astyanax altiparanae* DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS (CN,  $\text{Pb+H}_2\text{O}$ , 5  $\text{ng+H}_2\text{O}$ , 50  $\text{ng+H}_2\text{O}$ , 500  $\text{ng+H}_2\text{O}$ , 5  $\text{ng+Pb}$ , 50  $\text{ng+Pb}$ , 500  $\text{ng+Pb}$  e CP) DENTRO DE CADA GRUPO (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls, sendo  $p < 0,05$  significativos.

### 3.4.2 Ensaio de Difusão do DNA

O ensaio de difusão do DNA não demonstrou indução de apoptose e nem de necrose nos animais expostos às doses de  $\text{NpTiO}_2$  isoladas 5 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ , 50 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  e 500 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  em relação ao CN ( $p > 0,05$ ) (TABELA 3A).

O grupo exposto ao Pb+ $\text{H}_2\text{O}$  não apresentou diferença em relação ao CN para apoptose. Já para necrose houve diferença entre o tratamento Pb+ $\text{H}_2\text{O}$  em relação ao CN ( $p= 0,002$ ) (TABELA 3B).

A associação entre os contaminantes em todas as doses 5 ng+Pb, 50 ng+Pb e 500 ng+Pb não apresentaram diferença estatística em relação ao CN ( $p > 0,05$ ) para apoptose e para necrose (TABELA 3C).

Os grupos tratados com Pb+ $\text{H}_2\text{O}$ , 5 ng+Pb, 5 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  (TABELA 3D) e com Pb+ $\text{H}_2\text{O}$ , 50 ng+Pb, 50 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  (TABELA 3E) não apresentaram diferenças estatísticas entre si ( $p > 0,05$ ) para apoptose e para necrose.

Houve um aumento na frequência de células apoptóticas e nos grupos expostos ao Pb+ $\text{H}_2\text{O}$  e associado a maior dose de  $\text{NpTiO}_2$  (500 ng+Pb), em relação a mesma dose de  $\text{NpTiO}_2$  isolada (500 ng+ $\text{H}_2\text{O}$ ) ( $p= 0,0121$  e  $p= 0,029$ ; respectivamente). Esse aumento também foi observado em necrose para os mesmos grupos Pb+ $\text{H}_2\text{O}$  e 500 ng+Pb ( $p= 0,0007$  e  $p= 0,004$ ; respectivamente) em relação a 500 ng+ $\text{H}_2\text{O}$  (TABELA 3F).

TABELA 3. FREQUÊNCIA DE CÉLULAS APOPTÓTICAS E NECRÓTICAS EM ERITRÓCITOS DE *Astyanax altiparanae*. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS DENTRO DE CADA GRUPO (A, B, C, D, E e F). VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA E DESVIO PADRÃO. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA.

Ensaio de Difusão (Média ± Desvio padrão)							
Tratamentos	Apoptose	Necrose	Tratamentos	Apoptose	Necrose		
<b>A</b>	Controle	0.10 ± 0.06	0.02 ± 0.00	<b>D</b>	Pb+H <sub>2</sub> O	0.14 ± 0.07	0.03 ± 0.03 <sup>a</sup>
	5 ng+H <sub>2</sub> O	0.15 ± 0.10	0.02 ± 0.02		5 ng+Pb	0.12 ± 0.10	0.02 ± 0.02 <sup>b</sup>
	50 ng+H <sub>2</sub> O	0.17 ± 0.09	0.02 ± 0.03		5 ng+H <sub>2</sub> O	0.15 ± 0.10	0.02 ± 0.02 <sup>b</sup>
	500 ng+H <sub>2</sub> O	0.20 ± 0.12	0.02 ± 0.03				
<b>B</b>	Controle	0.10 ± 0.06	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>	<b>E</b>	Pb+H <sub>2</sub> O	0.14 ± 0.07	0.03 ± 0.03 <sup>a</sup>
	Pb+H <sub>2</sub> O	0.14 ± 0.07	0.03 ± 0.03 <sup>b</sup>		50 ng+Pb	0.14 ± 0.08	0.03 ± 0.03 <sup>a</sup>
<b>C</b>	Controle	0.10 ± 0.06	0.02 ± 0.00	<b>F</b>	50 ng+H <sub>2</sub> O	0.17 ± 0.09	0.02 ± 0.03 <sup>b</sup>
	5 ng+Pb	0.12 ± 0.10	0.02 ± 0.02		Pb+H <sub>2</sub> O	0.14 ± 0.07	0.03 ± 0.03 <sup>a</sup>
	50 ng+Pb	0.14 ± 0.08	0.02 ± 0.03		500 ng+Pb	0.13 ± 0.07	0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>
	500 ng+Pb	0.13 ± 0.07	0.02 ± 0.01		500 ng+H <sub>2</sub> O	0.20 ± 0.12	0.02 ± 0.03 <sup>b</sup>

### 3.4.3 Teste do Micronúcleo Píscico

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados em relação ao CN para as frequências das alterações morfológicas nucleares (AMN) do tipo *blebed*, *lobded*, *vacuolated* e *binucleus* e na frequência de micronúcleos (TABELA 4).

### 3.4.3.1 Frequência de *notched*

A alteração morfológica nuclear do tipo *notched* não diferiu entre os três tratamentos das NpTiO<sub>2</sub> isoladas ( $p > 0,05$ ) quando comparados ao CN (TABELA 4A).

Não foi observada diferença na frequência da AMN do tipo *notched* entre o CN e o grupo Pb+H<sub>2</sub>O ( $p > 0,05$ ). (TABELA 4B).

Os grupos tratados com a associação das NpTiO<sub>2</sub> e PbII obtiveram uma maior frequência de *notched* para 5 ng+Pb e 500 ng+Pb ( $p= 0,0032$  e  $p= 0,0261$ ; respectivamente) em relação ao CN. Observou-se que o tratamento 5 ng+Pb apresentou maior frequência de *notched* que o tratamento 50 ng+Pb ( $p= 0,0495$ ) (TABELA 4C).

Para as doses de 5 ng/g, 5 ng+H<sub>2</sub>O (TABELA 4D); Pb+H<sub>2</sub>O, 50 ng+Pb, 50 ng+H<sub>2</sub>O (TABELA 4E) e Pb+H<sub>2</sub>O, 500 ng+Pb, 500 ng+H<sub>2</sub>O (TABELA 4F) não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

### 3.4.3.2 Frequência total de AMN

Considerando a frequência total de AMN, também não foram observadas diferenças entre os tratamentos contaminados com as NpTiO<sub>2</sub> isoladas nas doses de 5 ng/g, 50 ng/g e 500 ng/g ( $p > 0,05$ ) quando comparados ao CN (TABELA 4A).

O grupo tratado somente com PbII também não diferiu do CN ( $p= 0,0926$ ) (TABELA 4B).

A associação de NpTiO<sub>2</sub> e PbII não diferiu na frequência total de AMN na dose intermediária (50 ng+Pb) ( $p > 0,05$ ), mas diferiu nas doses 5 ng+Pb e 500 ng+Pb ( $p= 0,0117$  e  $p= 0,0096$ ; respectivamente) (TABELA 4C).

Os grupos tratados com Pb+H<sub>2</sub>O, 5 ng+Pb, 5 ng+H<sub>2</sub>O (TABELA 4D); Pb+H<sub>2</sub>O, 50 ng+Pb, 50 ng+H<sub>2</sub>O (TABELA 4E) e Pb+H<sub>2</sub>O, 500 ng+Pb, 500 ng+H<sub>2</sub>O (TABELA 4F) não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

TABELA 4. FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEO E DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS MADUROS DE *Astyanax altiparanae* em 2000 células contabilizadas. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS (CN, Pb+H<sub>2</sub>O, 5 Np+H<sub>2</sub>O, 50 Np+H<sub>2</sub>O, 500 Np+H<sub>2</sub>O, 5 Np+Pb, 50 Np+Pb, 500 Np+Pb e CP) DENTRO DE CADA GRUPO (A, B, C, D, E e F). VALORES EXPRESSOS EM MEDIANA E QUARTIS (25%; 75%). LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ( $p < 0,05$ ) ENTRE OS TRATAMENTOS.

Frequência de MN e de AMN em eritrócitos maduros (Mediana e Quartis - 25%;75%)								
Tratamentos	Micronúcleo	<i>Blebbbed</i>	<i>Lobed</i>	<i>Notched</i>	<i>Vacuolated</i>	<i>Binucleus</i>	Total AMN	
<b>A</b>	Controle	0 (0; 0)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	1 (0; 2,5)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	2 (0; 3,5)
	5 ng+H <sub>2</sub> O	0 (0; 0)	1 (0; 1)	0 (0; 0)	3 (1; 5)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	3 (1,5; 6)
	50 ng+H <sub>2</sub> O	0 (0; 0)	1 (0; 2,5)	0 (0; 0)	1 (1; 4,5)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	5 (1; 7,5)
	500 ng+H <sub>2</sub> O	0 (0; 0)	0 (0; 2)	0 (0; 0)	3 (2; 6)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	3 (2; 9,5)
<b>B</b>	Controle	0 (0; 0)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	1 (0; 2,5)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	2 (0; 3,5)
	Pb+H <sub>2</sub> O	0 (0; 0)	1 (0; 2)	0 (0; 0)	2 (1; 4)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	3 (2; 6)
<b>C</b>	Controle	0 (0; 0)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	1 (0; 2,5) <sup>a</sup>	0 (0; 0)	0 (0; 0)	2 (0; 3,5) <sup>a</sup>
	5 ng+Pb	0 (0; 0)	0 (0; 2)	0 (0; 0)	3 (2; 7,5) <sup>c</sup>	0 (0; 0)	0 (0; 0)	4 (3; 10) <sup>b</sup>
	50 ng+Pb	0 (0; 0)	0 (0; 1,5)	0 (0; 0)	2 (0; 3) <sup>ab</sup>	0 (0; 0)	0 (0; 0,5)	3 (0,5; 5,5) <sup>a</sup>
	500 ng+Pb	0 (0; 0)	2 (0,5; 2,5)	0 (0; 0)	4 (1; 6,5) <sup>b</sup>	0 (0; 0)	0 (0; 0)	5 (3,5; 9,5) <sup>b</sup>
<b>D</b>	Pb+H <sub>2</sub> O	0 (0; 0)	1 (0; 2)	0 (0; 0)	2 (1; 4)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	3 (2; 6)
	5 ng+Pb	0 (0; 0)	0 (0; 2)	0 (0; 0)	3 (2; 7,5)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	4 (3; 10)
	5 ng+H <sub>2</sub> O	0 (0; 0)	1 (0; 1)	0 (0; 0)	3 (1; 5)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	3 (1,5; 6)
<b>E</b>	Pb+H <sub>2</sub> O	0 (0; 0)	1 (0; 2)	0 (0; 0)	2 (1; 4)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	3 (2; 6)
	50 ng+Pb	0 (0; 0)	0 (0; 1,5)	0 (0; 0)	2 (0; 3)	0 (0; 0)	0 (0; 0,5)	3 (0,5; 5,5)
	50 ng+H <sub>2</sub> O	0 (0; 0)	1 (0; 2,5)	0 (0; 0)	1 (1; 4,5)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	5 (1; 7,5)
<b>F</b>	Pb+H <sub>2</sub> O	0 (0; 0)	1 (0; 2)	0 (0; 0)	2 (1; 4)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	3 (2; 6)
	500 ng+Pb	0 (0; 0)	2 (0,5; 2,5)	0 (0; 0)	4 (1; 6,5)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	5 (3,5; 9,5)
	500 ng+H <sub>2</sub> O	0 (0; 0)	0 (0; 2)	0 (0; 0)	3 (2; 6)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	3 (2; 9,5)

### 3.4.3.3 Frequência de eritrócitos normocromáticos e policromáticos

A frequência de eritrócitos policromáticos (EP) não foi alterada em nenhum dos tratamentos que receberam as NpTiO<sub>2</sub> isoladamente ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 19A).

Ocorreu um aumento na frequência de EP no grupo contaminado com PbII isolado ( $p = 0,0042$ ) quando comparado ao CN (FIGURA 19B).

Nos grupos de associação entre os contaminantes 5 ng+Pb, 50 ng+Pb, 500 ng+Pb foi demonstrado o aumento na frequência de EP ( $p= 0,0061$ ;  $p= 0,0176$ ;  $p= 0,0178$ ; respectivamente) em relação ao CN (FIGURA 19C).

Na dose de 5 ng/g de NpTiO<sub>2</sub> isolada, associada ao PbII e quando comparada ao chumbo isolado, não foi observada diferença significativa, porém, é possível observar uma tendência de aumento na frequência de EP ( $p= 0,0556$ ) (FIGURA 19D). Nos grupos Pb+H<sub>2</sub>O, 50 ng+Pb, 50 ng+H<sub>2</sub>O também é possível identificar uma tendência no aumento da frequência de eritrócitos jovens ( $p= 0,052$ ) (FIGURA 19E). Na maior dose das NpTiO<sub>2</sub>, houve um aumento significativo de eritrócitos jovens no grupo tratado com 500 ng+Pb em relação ao tratado com as nanopartículas isoladas ( $p= 0,0281$ ) esse aumento também foi observado em Pb+H<sub>2</sub>O quando comparado ao grupo tratado com 500 ng+H<sub>2</sub>O ( $p= 0,0073$ ) (FIGURA 19F).

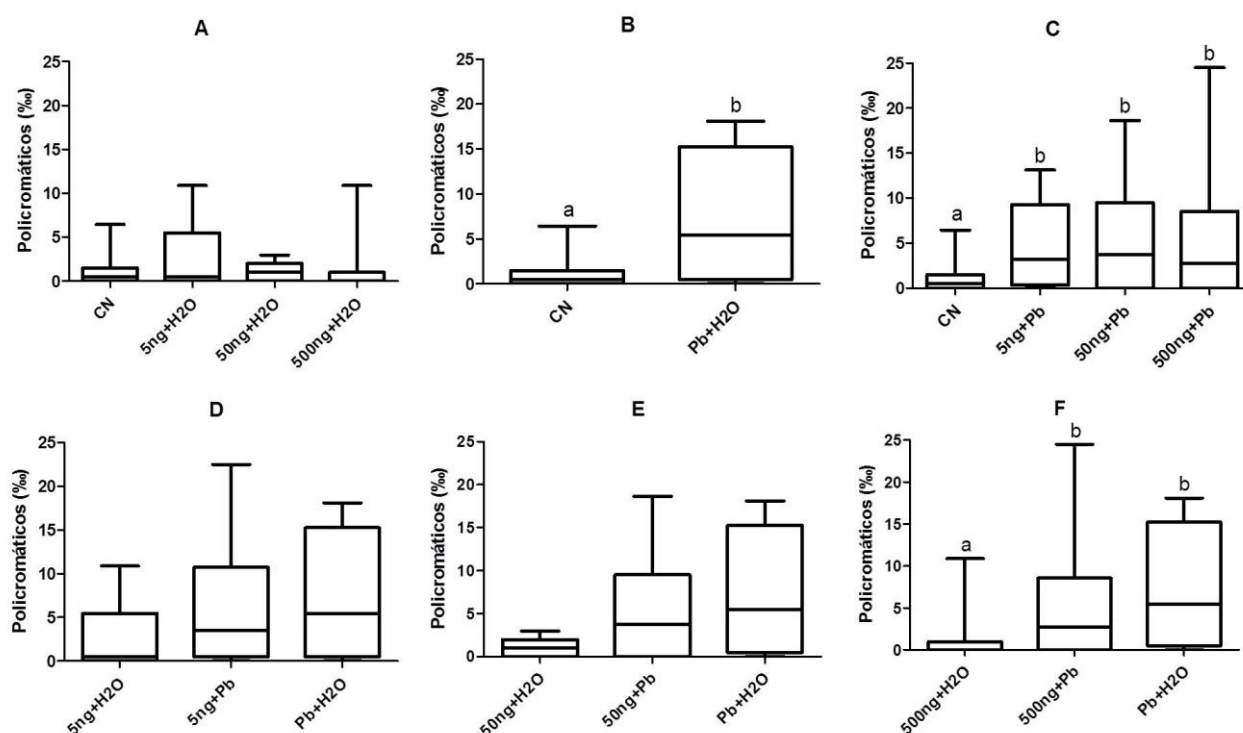


FIGURA 19. FREQUÊNCIA (%<sub>00</sub>) DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS EM *Astyanax altiparanae* ATRAVÉS DO TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS (CN, Pb+H<sub>2</sub>O, 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O, 500 ng+H<sub>2</sub>O, 5 ng+Pb, 50 ng+Pb, 500 ng+Pb e CP) DENTRO DE CADA GRUPO (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls, sendo  $p < 0,05$  significativos.

## 4 DISCUSSÃO

A forma de  $\text{NpTiO}_2$  anatase é a mais estável na escala nanométrica, isso faz com que seja a mais utilizada em aplicações na indústria de nanotecnologia (BRANDÃO, 2010), além disso, a anatase tem demonstrado ser a forma mais tóxica, causando genotoxicidade e citotoxicidade (HIRAKAWA *et al.*, 2004 e JIM *et al.*, 2010). Características como a composição química, o tamanho médio das nanopartículas e a área de superfície alteram sua atividade biológica (PASCHOALINO, MARCONE e JARDIM, 2010).

A magnitude do potencial zeta fornece uma indicação das condições de estabilidade do sistema. Se todas as partículas apresentam um potencial zeta suficientemente elevado, ou seja, mais positivo do que +30mV ou mais negativo do que -30mV, elas vão se repelir, garantindo a estabilidade da dispersão. Se as partículas possuem valor de potencial zeta baixo, entre +30mV e -30mV, então não haverá forças suficientes para evitar que as partículas se aproximem, estando sujeitas à floculação, ocorrendo instabilidade na dispersão (MALVERN, 2005). Os valores de potencial zeta encontrados -3,38; -5,61 e -2,59 mV indicam que as suspensões apresentaram carga negativa em sua superfície e que são instáveis, podendo assim, formar agregados entre si, ou se agregarem ao Pb.

Os tamanhos médios das partículas nas suspensões foram de: 397,1 nm em 0,5 mg/L; 255,0 nm em 5 mg/mL e dois picos de tamanho em 50 mg/mL, 239,8 nm e 66,45 nm, demonstrando que ocorreu a formação de aglomerados entre elas e que grande parte dessas partículas não estavam em escala nanométrica. Esses aglomerados são promovidos por interações hidrofóbicas decorrentes de mudanças no pH e na força iônica (PASCHOALINO, MARCONE e JARDIM, 2010). É importante ressaltar que as partículas menores tem maior facilidade para atravessar membranas e causar danos às células. (GURR *et al.*, 2005 e SINGH *et al.*, 2009).

O índice de polidispersão indica a dispersão dos tamanhos, demonstrando o grau de afastamento entre os valores medidos, ou seja, quanto menor é o índice de polidispersão, menor é a dispersão em torno da média (PRATA, 2011). A porcentagem de polidispersão fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos de partículas, como os valores encontrados foram

maiores que 20% em todas as suspensões podemos concluir que se formaram sistemas heterogêneos, compostos por diferentes tamanhos de partículas.

Quando entram na célula, as nanopartículas podem gerar espécies reativas de oxigênio, causando estresse oxidativo em organelas e podendo levar a disfunções celulares (PASCHOALINO, MARCONE e JARDIM, 2010), essa é a hipótese atual mais aceita para explicar o mecanismo de toxicidade das Nps (JIM *et al.*, 2010). Íons de chumbo também podem induzir estresse oxidativo nas células e até causar danos às biomoléculas (HONG *et al.*, 2007 e PATRA, SWARUP e DWIVEDI, 2001).

As NpTiO<sub>2</sub> facilitaram o acúmulo de chumbo no fígado, aumentando em 141% a quantidade do metal na menor dose de associação entre os contaminantes e em 39% na dose intermediária, resultados semelhantes foram encontrados em vísceras de *Cyprinus carpio* contaminadas via exposição hídrica a doses maiores do que as utilizadas no nosso trabalho (10 mg/L) de NpTiO<sub>2</sub>, no qual os autores demonstraram que as nanopartículas aumentaram em 146% a bioacumulação de cádmio nesse tecido (ZHANG *et al.*, 2007); em contaminação hídrica com arsênio também se observou um aumento desse metal no estômago, intestino, brânquias e ainda um acúmulo de 42% em vísceras de *Cyprinus carpio* quando em associação a 10 mg/L de NpTiO<sub>2</sub> (SUN *et al.*, 2007 e SUN *et al.*, 2009). O Pb também já demonstrou ter afinidade por tecidos moles, em *Hoplias malabaricus* contaminadas com NpTiO<sub>2</sub> e Pb via trófica, foi observado um acúmulo do metal no fígado destes animais (ROSSI *et al.*, 2014). É importante ressaltar que as doses de NpTiO<sub>2</sub> utilizadas via injeção intraperitoneal são menores do que as utilizadas em exposição hídrica e trófica, apesar disso, facilitaram a bioacumulação do metal no fígado de *A. altiparanae*.

O fígado é o principal órgão envolvido na biotransformação de xenobióticos (VAN DER OOST *et al.*, 2003), sendo um órgão essencial na detoxificação, no metabolismo e na excreção de substâncias tóxicas do corpo (HINTON e LAURÉN, 1990). Como mecanismo de defesa celular contra danos oxidativos temos as enzimas antioxidantes, as principais são as glutatona, superóxido dismutase e catalase (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos pelas análises bioquímicas, como a da glutatona S-transferase, demonstraram um aumento da atividade enzimática nos tratamentos expostos ao chumbo isolado e em associação com as nanopartículas, já os tratamentos com as NpTiO<sub>2</sub> isoladas não alteraram a atividade da enzima. Isso

demonstra que o PbII foi responsável pelo aumento na atividade da GST, como demonstrado nos estudos com *Clarias gariepinus* coletados de um rio com histórico de contaminação por metais pesados, entre eles o Pb, observou-se um aumento no nível de glutathiona presente no fígado (FAROMBI, ADELOWO e AJIMOKO, 2007). Em outros estudos, Delmond (2013), Klingelfus (2013) e Rossi (2013), verificaram que houve aumento na atividade da GST nos grupos expostos ao PbII e em associação com as NpTiO<sub>2</sub>. O aumento da atividade enzimática frente à exposição a metais pode ocorrer em situações de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), funcionando como um mecanismo de detoxificação (ONUKI *et al.*, 2002 e JONSSON e AOYAMA, 2010).

A superóxido dismutase teve uma inibição em sua atividade nos grupos expostos a NpTiO<sub>2</sub>, nas três doses 5 ng+H<sub>2</sub>O, 50 ng+H<sub>2</sub>O e 500 ng+H<sub>2</sub>O e não foi alterada na presença do PbII, indicando que as NpTiO<sub>2</sub> podem causar estresse oxidativo nas células. Resultados semelhantes foram encontrados em *Astyanax serratus* expostos a 5 e 50 mg/kg de NpTiO<sub>2</sub> onde houve inibição da SOD, e no grupo tratado com 40mg/kg de Pb não foi alterada, porém, na associação entre NpTiO<sub>2</sub> e PbII também foi observada inibição na atividade da enzima (DELMOND, 2013), o que não ocorreu no presente estudo. Em ratos expostos a 1 mg Pb<sup>2+</sup>/kg também não foi observada alteração da enzima SOD (PATRA, SWARUP e DWIVEDI, 2001).

A enzima catalase é um dos mais eficientes catalizadores naturais podendo decompor o peróxido de hidrogênio de maneira extremamente rápida, em cerca de 10<sup>7</sup> min<sup>-1</sup> por conta da toxicidade deste composto (SCANDALIOS, 2005). Nesse trabalho não foi verificada alteração em nenhum dos grupos expostos as NpTiO<sub>2</sub> e ao PbII. Estudos com *Oreochromis niloticus* e com ratos expostos a diferentes concentrações de chumbo também não demonstraram alteração na atividade da CAT (PATRA, SWARUP e DWIVEDI, 2001 e DIAS, 2015); já em estudo realizado com *Scophthalmus maximus* a atividade da CAT foi diminuída após exposição crônica ao Pb (NUNES *et al.*, 2014).

Se as defesas antioxidantes da célula não forem eficazes, as espécies reativas de oxigênio podem danificar as biomoléculas e levar a apoptose (JIM *et al.*, 2010). A lipoperoxidação lipídica é a deterioração oxidativa dos lipídios da membrana celular (HAO, WANG e XING, 2009), NpTiO<sub>2</sub> e PbII não induziram danos aos lipídios nas condições experimentais testadas. Considerando que ambos os

contaminantes tem a capacidade de causar estresse oxidativo, a ausência de alterações na LPO pode indicar que as enzimas antioxidantes de *A. altiparanae* foram eficazes na eliminação das espécies reativas de oxigênio.

Diversos contaminantes são conhecidos por inibir a atividade da acetilcolinesterase, como organofosforados, carbamatos, hidrocarbonetos e também os metais pesados, incluindo o Pb (KLEMZ e SILVA DE ASSIS, 2005; RABITTO *et al.*, 2005 e JONSSON e AOYAMA, 2010), entretanto, os resultados demonstraram um aumento da atividade da AChE na menor dose da NpTiO<sub>2</sub> associada ao PbII (5 ng+Pb) e também na maior dose (500 ng+H<sub>2</sub>O), isto poderia ser explicado devido a maior quantidade de partículas em tamanho nanométrico (66,45 nm), as quais teriam a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica e entrar no sistema nervoso central dos animais (BOYLE *et al.*, 2013). Em peixes, pouco se sabe sobre os mecanismos de ativação da AChE, embora essa ativação possivelmente esteja relacionada com a quantidade de acetilcolina presente na fenda sináptica (KAIZER *et al.*, 2009). Dessa forma, para a AChE cerebral, podemos considerar que as NpTiO<sub>2</sub> interagiram com o Pb, podendo assim, ter facilitado sua entrada na célula. Estudos demonstram que as Nps no cérebro, podem induzir estresse oxidativo, inflamação e apoptose, além disso, já há relatos de que a exposição as NpTiO<sub>2</sub> induzem à sutis patologias cerebrais em peixes (FEDERICI *et al.*, 2007; WIN-SHWE e FUJIMAKI, 2011).

O ensaio cometa, demonstrou que o chumbo quando isolado não foi genotóxico nos tecidos sangue, fígado, cérebro e rim na espécie *Astyanax altiparanae*. Vale ressaltar, que o ensaio cometa contabiliza somente nucleóides intactos e com uma “cabeça” definida, assim, a ausência de danos no DNA de eritrócitos pode ser explicado pela alta citotoxicidade do PbII, e conseqüente morte destas células, comprovado com o ensaio de difusão do DNA e pelo aumento de eritrócitos policromáticos como resposta do organismo à reposição celular. A ação genotóxica do PbII já foi demonstrado em outros trabalhos para a espécie *Hoplias malabaricus* exposta a mesma dose 21 µg/g em diferentes tempos e vias de exposição. Estes trabalhos demonstraram que o ensaio cometa no sangue é o método mais indicado na avaliação da exposição aguda ao PbII, detectando danos causados por doses muito baixas (CESTARI *et al.*, 2004; FERRARO *et al.*, 2004; RAMSDORF *et al.*, 2009). No presente trabalho, embora tenhamos utilizado a mesma dose de chumbo, a espécie em questão foi outra, com hábitos alimentares e

comportamento diferentes dos trabalhos acima citados, ocasionando assim respostas diferentes. Apesar disto, hoje sabemos que o Pb pode aumentar os danos ao DNA ocasionando quebras de fita simples que podem dar origem a quebras de fita dupla (OBE *et al.*, 2002), entretanto, o efeito genotóxico do Pb está mais relacionado a mecanismos indiretos. A ligação covalente de íons de Pb ao DNA ou às proteínas presentes nos cromossomos podem pôr em risco os processos de replicação e reparo, além disso, esses íons podem inibir a DNA-polimerase e ligase, e dessa forma ocasionar erros na síntese de DNA (MONTALDI, 1985; WU *et al.*, 2002 e WOZNIAK e BLASIAK, 2003). Assim, a toxicidade do Pb pode ocorrer pela ligação Pb-DNA, pela inibição de proteínas que contém grupos sulfidrilas e pela indução de EROS (HONG *et al.*, 2007).

As três doses de NpTiO<sub>2</sub> isoladas aplicadas em *A. altiparanae*, não apresentaram genotoxicidade utilizando o ensaio cometa em nenhum dos tecidos analisados (sangue, fígado, cérebro e rim). Em doses mais elevadas do que as testadas neste estudo, as NpTiO<sub>2</sub> já demonstraram efeitos genotóxicos em fibroblastos de pulmão de hamster chinês expostos a 200 mg/L (HAMZEH e SUNAHARA, 2013); Trouiller e colaboradores (2009) observaram um aumento de 34% de quebras no DNA em glóbulos de ratos expostos a 500 mg/kg de NpTiO<sub>2</sub> e danos oxidativos ao DNA no fígado, entretanto, nas concentrações 1 mg/kg e 5 mg/kg não foram observados danos ao DNA nos pulmões de ratos, demonstrando somente uma resposta inflamatória (NAYA *et al.*, 2012).

Um dos possíveis mecanismos de genotoxicidade das NpTiO<sub>2</sub> é o estresse oxidativo, consequência da interação entre as Nps e os componentes celulares (BUZEA, BLANDINO e ROBBIE, 2007; LIMBACH *et al.*, 2007; VEVERS e JHA, 2008; TROUILLER *et al.*, 2009 e JIM *et al.*, 2010). As NpTiO<sub>2</sub> causaram estresse oxidativo nas células de *A. altiparanae*, como demonstrado pelas análises bioquímicas, porém, como neste trabalho não foi utilizada a digestão enzimática na técnica do ensaio cometa, não foram observados possíveis danos oxidativos ao DNA causados por EROs (HANDY *et al.*, 2012). No entanto, Reeves e colaboradores (2008) realizando o ensaio cometa com a adição das enzimas Endonuclease III e DNA-glicosilase que convertem pirimidinas e purinas oxidadas em rupturas de filamentos no DNA, observaram danos oxidativos na molécula em células de *Carassius auratus* expostas a doses de NpTiO<sub>2</sub> maiores do que as testadas aqui.

A associação entre os contaminantes não diferiram para sangue e fígado em nenhuma das doses, mas o cérebro diferiu na dose 5 ng+Pb, corroborando com os resultados encontrados na AChE para esta mesma dose. Já o rim diferiu na dose 500 ng+Pb. Assim, podemos concluir que nessas doses o PbII foi adsorvido à superfície das Nps e tiveram seus efeitos tóxicos potencializados nestes tecidos. Tanto as Nps quanto o PbII tem a capacidade de produzir radicais livres na célula, podendo gerar dano oxidativo ao DNA (HONG *et al.*, 2007), entretanto esses efeitos não foram observados nos contaminantes isolados, este fato pode ser explicado pelo "mecanismo cavalo de Tróia", no qual as Nps transportariam altos níveis de elementos-traço para dentro das células e liberariam esses íons no ambiente celular, aumentando a toxicidade desses compostos (LIMBACH *et al.*, 2007; LUOMA *et al.*, 2008). Maiores doses de Nps tem maior capacidade de se agregar (CHOWDHURY, HONG e WALKER, 2010), isso poderia explicar a ausência de danos na concentração 50 ng+Pb; enquanto que na maior dose 500 ng+Pb foi observado danos ao rim devido a presença de muitas partículas menores que 100 nm (TABELA 1), que vão apresentar maior toxicidade, podendo causar inflamação, instabilidade genômica e citotoxicidade (REEVES *et al.*, 2008). As NpTiO<sub>2</sub> originarão as EROs, se a defesa antioxidante da célula não for eficaz, levam a danos que podem se manifestar na forma de genotoxicidade ou morte celular (SUN *et al.*, 2009 e JIM *et al.*, 2010), dessa forma, podemos concluir que a ausência de danos no DNA do fígado, apesar deste ser descrito como um órgão alvo para a ação das Nps (HANDY *et al.*, 2008), pode ser devido à eficiência das enzimas antioxidantes na espécie *A. altiparanae* ou pelo curto período de exposição aos contaminantes.

O ensaio de difusão do DNA demonstrou que o PbII foi citotóxico, induzindo o processo de necrose, já as NpTiO<sub>2</sub> não diferiram do controle para apoptose e nem para necrose. A necrose pode acontecer quando as células passam por um forte estímulo genotóxico que seja capaz de danificar macromoléculas celulares (SINGH, 2005). O acetato de chumbo demonstrou-se citotóxico para linfócitos do sangue periférico em humanos, demonstrando uma diminuição dose-dependente na viabilidade celular (WOZNIAK e BLASIAK, 2003). A necrose é um processo destrutivo que induz inflamação e lesões nos tecidos (VAMANU *et al.*, 2008) e os efeitos altamente tóxicos do Pb já são conhecidos há muitos anos, podendo ser aneugênico, clastogênico e também mutagênico (ÇAVAS, 2008), entretanto, podem variar pela espécie em estudo, pela dose e tempo de exposição (PAIN, 1995). Há

evidências de que a citotoxicidade mediada por NpTiO<sub>2</sub> se dá pelo estresse oxidativo, onde as EROs poderão aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial e induzir à morte celular por apoptose ou necrose (VAMANU *et al.*, 2008 e JIN *et al.*, 2010). A morte celular causada por Nps é relatada na literatura em concentrações mais elevadas do que as testadas no nosso estudo: Hamzeh e Sunahara (2013) analisaram a viabilidade celular em fibroblastos de pulmão de hamsters e observaram que na concentração 1 mg/L de NpTiO<sub>2</sub>, não houve alteração, já em 100 mg/L diminuiu em 50% e também foi observado indução de apoptose e necrose; Park e colaboradores (2008) observaram uma diminuição na viabilidade celular dose-dependente em 5, 10, 20 e 40 µg/mL em células epiteliais brônquicas humanas; Vamanu e colaboradores (2008) observaram apoptose e necrose em células humanas de linhagem monoblástica expostos a 2 e 4 mg/mL de NpTiO<sub>2</sub>.

No Teste do Micronúcleo Písceo, a frequência de eritrócitos policromáticos foi aumentada em todos os grupos que receberam injeção de PbII, assim, podemos reafirmar que esse metal foi citotóxico, como observado no ensaio de difusão do DNA e pela indução da proliferação celular. O chumbo pode levar a uma diminuição de eritrócitos no sangue de peixes, podendo ser considerado um indicador de citotoxicidade (ÇAVAS, 2008), dessa forma, esse aumento de eritrócitos jovens provavelmente ocorreu para compensar a quantidade de células necróticas presentes na corrente sanguínea destes animais.

O número de micronúcleos encontrados foi baixo, e não foi observado indução pelas NpTiO<sub>2</sub> e nem pelo PbII. Vevers e Jha (2008) também não encontraram aumento na frequência de MN causados pelas NpTiO<sub>2</sub> na linhagem de células RTG-2, bem como Ramsdorf e colaboradores (2009) não encontraram micronúcleos em *Hoplias malabaricus* expostos a 7, 21, 63 e 100 µg/g de PbII. A frequência espontânea de micronúcleos em eritrócitos de peixes é muito baixa (FERRARO *et al.*, 2004) porque este não é o tecido hematopoiético nos peixes, além disso, a quantidade de MN pode variar entre diferentes espécies (GUSTAVINO *et al.*, 2001).

O total de AMN e a alteração do tipo *notched*, apresentaram um aumento nos tratamentos em associação nas 5 ng+Pb e 500 ng+Pb, já as NpTiO<sub>2</sub> e o PbII isolados não diferiram do controle, estes resultados demonstram que as Nps possivelmente levaram os íons de Pb para dentro das células, potencializando assim

seu efeito tóxico. Çavas (2008) expôs *Carassius auratus auratus* a acetado de chumbo nas concentrações de 10 µg/L, 50 µg/L e 100 µg/L em diferentes tempos e observou aumento na frequência de AMN somente após 144 horas de exposição, indicando assim, que 96 horas não foi o suficiente para o PbII induzir a formação de AMN. Delmond (2013) também observou um aumento da frequência de *notched* em *Astyanax serratus* expostos a NpTiO<sub>2</sub> associados a PbII nas doses de 0,5 µg/kg; 5 µg/kg e 50 µg/kg. Apesar de ainda não ser descrita uma correlação entre as AMN e efeitos genotóxicos, os resultados sugerem fortemente que essas alterações podem ser uma manifestação dos efeitos dos xenobióticos (FERRARO *et al.*, 2004), e que o núcleo *notched* pode estar relacionado com aneuploidias (CARRASCO, TILBURY e MYERS, 1990).

Vale ressaltar que as doses utilizadas neste estudo foram na ordem de nanogramas por grama do peso do animal e mesmo assim demonstraram efeitos tóxicos, corroborando com dados já descritos para baixas doses de NpTiO<sub>2</sub> e de Pb, podendo alterar diferentes biomarcadores e ter os efeitos tóxicos dos contaminantes potencializados quando em associação (ROSSI *et al.*, 2014). Como já citado, não há legislação para o uso de nanomateriais e o descarte desses produtos no ambiente aquático é inevitável, tornando-se necessário conhecer os mecanismos de toxicidade destes materiais, bem como sua interação com os demais xenobióticos presentes no ambiente aquático.

Enquanto o Pb já tem seus mecanismos de toxicidade bem descritos, até mesmo para peixes, os mecanismos das Nps ainda não foram completamente elucidados (XIONG *et al.*, 2011). O estresse oxidativo é uma das hipóteses mais aceitas para explicar o efeito tóxico das nanopartículas (JIM *et al.*, 2011) como evidenciado aqui para *A. altiparanae*, podendo ter consequências mais severas se as defesas antioxidantes da célula não forem eficazes.

Os ensaios mais promissores para a ecogenotoxicologia de nanomateriais são o ensaio cometa e o teste do micronúcleo, lembrando que é importante utilizar diferentes órgãos a fim de estabelecer qual deles é o alvo de sua toxicidade (HANDY *et al.*, 2012). Entretanto, a grande maioria dos estudos encontrados na literatura utilizando Nps são *in vitro*, e os poucos *in vivo*, utilizam principalmente pequenos mamíferos, assim, ainda são necessários muitos estudos para que possamos compreender os mecanismos de toxicidade destes materiais, visto que os dados publicados são muito contraditórios devido às diferenças nas fases cristalinas, do

tamanho das Nps, das doses testadas, dos protocolos para preparo das suspensões e das diferentes células e espécies utilizadas.

Esse trabalho objetivou-se a analisar diversos biomarcadores em diferentes órgãos, a fim de buscar a compreensão dos mecanismos tóxicos desse nanomaterial e sua interação com os elementos-traço em uma espécie de peixe nativa brasileira (*Astyanax altiparanae*) que vem demonstrando ser um bom bioindicador (GALVAN, 2011; GHISI e OLIVEIRA, 2013; GALVAN, 2015 e BETTIM *et al.*, 2016) por apresentar alta sensibilidade mesmo em baixas doses e em exposição aguda aos contaminantes.

## 5. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que *Astyanax altiparanae* respondeu no ensaio agudo a baixas doses dos contaminantes, indicando que essa espécie pode ser considerada um bom bioindicador.

As nanopartículas de dióxido de titânio facilitaram o acúmulo do chumbo inorgânico no fígado de *A. altiparanae*.

As NpTiO<sub>2</sub> e o PbII ocasionaram estresse oxidativo nas células do fígado, alterando a atividade das enzimas Glutathione S-Transferase e Superóxido Dismutase.

A associação entre as NpTiO<sub>2</sub> e o PbII demonstrou genotoxicidade na maior dose (500 ng + Pb) no rim de *A. altiparanae*. Em contrapartida foi a menor dose de associação dos contaminantes (5 ng + Pb) que apresentou genotoxicidade no cérebro e também provocou alteração na atividade da acetilcolinesterase cerebral, esta última também foi alterada na maior concentração de NpTiO<sub>2</sub> isolada (500 ng/g + H<sub>2</sub>O).

O PbII isolado demonstrou citotoxicidade ocasionando necrose através do ensaio de difusão do DNA, da mesma forma, esse metal tanto isolado quanto em associação com as Nps aumentou o número de eritrócitos policromáticos na circulação sanguínea dos peixes, como mecanismo de reposição celular.

A associação entre os contaminantes na menor (5 ng/g + 21 µg PbII/g) e maior dose (500 ng/g + 21 µg PbII/g) induziu à formação de alterações morfológicas nucleares pelo teste do micronúcleo písceo, destacando a forma *notched*.

De modo geral, a associação entre os contaminantes causou estresse oxidativo, citotoxicidade e genotoxicidade no rim e cérebro, demonstrando que as NpTiO<sub>2</sub> carregaram o PbII para dentro das células, potencializando seus efeitos tóxicos.

## 6. REFERÊNCIAS

Adams, S.M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress: introduction and overview. In: Adams, S.M. (Ed.), *Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress*. **American Fisheries Society**, Bethesda, p. 1-11, 2002.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121–126, 1984.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI R.; BAPTISTA D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, n. 1, p.61-72, 2007.

BÁLINT, T.; SZEGLETES, T.; SZEGLETES, Z.; HALASY, K.; NEMCSOK, J. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. **Aquatic Toxicology**, v. 33, n. 3/4, p. 279-295, 1995.

BETTIM, F. L.; GALVAN, G. L.; CESTARI, M. C.; YAMAMOTO, C. I.; SILVA DE ASSIS, H. C. Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline. **Chemosphere**, v. 144, p. 1467–1474, 2016.

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

BOYLE, D.; AL-BAIRUTY, G. A.; RAMSDEN, C. S.; SLOMAN, K. A.; HENRY, T. B.; HANDY, R. D. Subtle alterations in swimming speed distributions of rainbow trout exposed to titanium dioxide nanoparticles are associated with gill rather than brain injury. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 116– 127, 2013.

BRANDÃO, F.D. **Identificação, quantificação e controle de defeitos em monocristais e nanopartículas de TiO<sub>2</sub>**. Dissertação de mestrado em física, UFMG, Belo Horizonte, 2010.

BRASIL (1986). **Resolução do CONAMA Nº. 20**, de 18 de junho de 1986. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Alterada pela Resolução Nº 274, de 2000. Revogada pela Resolução Nº 357, de 2005. Brasília, p. 11356-11361.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. In: Poluição e Piscicultura. Faculdade de Saúde Pública da USP, **Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura**, São Paulo, p.79-108, 1972.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, Iss. 3, 1995.

BURATINI, S. V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**, 2.ed. Editora Rima. p. 54-86, 2006.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.

BUZEA, C.; BLANDINO, I. I. P.;ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, 2007.

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

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

ÇAVAS, T. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 352–358, 2008.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L. S. S.; MOURA, M. A. M.; JONSSON, C. M.; FRACETO, L. F. Exposição de embriões de *Danio rerio* a Nano-TiO<sub>2</sub> sob diferentes condições de iluminação. Embrapa Instrumentação, **VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**, São Carlos, 2013.

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

CETESB, Ficha de Informação Toxicológica. Chumbo e seus compostos. Divisão de Toxicologia, **Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental**. 2012. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/chumbo.pdf>.

CHOWDHURY, I.; HONG, Y.; WALKER, S. L. Container to characterization: Impacts of metal oxide handling, preparation, and solution chemistry on particle stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 368, p. 91–95, 2010.

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

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.

COSTA, A. C. F. M.; VILAR, M. A.; LIRA, H. L.; KIMINAMI, R. H. G. A. KIMINAMI, L. GAMA. Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. **Cerâmica**, v. 52, p. 255-259, 2006.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R. A.; GALBRAITH BUSE, G. M. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, p. 235–241, 1981.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, p. 5-32, 2009.

DELMOND, K. A. **Genotoxicidade e estresse oxidativo em *Astyanax serratus* (Characidae) expostos ao Chumbo Inorgânico (Pb II) e Nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO<sub>2</sub>) isolados e em associação**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

DIAS, D. D. **Avaliação do estresse oxidativo e atividade da  $\delta$ -aminolevulínico desidratase em tecidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exposta a chumbo e benzo[a]pireno.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2015.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. **Memoirs Museum of Comparative Zoology**, v. 43, p. 209-310, 1921.

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

FAROMBI, E. O.; ADELOWO, O. A.; AJIMOKO, Y. R. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 4, n. 2, p. 158-165, 2007.

FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415–430, 2007.

FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas de poluição ambiental.** Ed. Pedagógica Editora Springer Ltda. São Paulo, 1980.

FELTRIN, J.; SARTOR, M. N.; DE NONI Jr, A.; BERNARDIN, A. M.; HOTZA, D.; LABRINCHA, J. A. Superfícies fotocatalíticas de titânia em substratos cerâmicos. Parte I: Síntese, estrutura e fotoatividade. **Cerâmica**, v. 59, p. 620-632, 2013.

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

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

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

FERRARO, M.V.M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FILIZOLA, H. F.; FERRACINI, V. L.; SANS, L. M. A.; GOMES, M. A. F.; FERREIRA, C. J. A. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaíra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 659-667, 2002.

FITZHUGH, T. W.; RICHTER, B. D. Quenit urban thirst: growing cities and their impacts on freshwater ecosystems. **BioScience**, v. 54, p. 741-754, 2004.

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

FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I.; NIGRO, M.; FÖRLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborgharbour. **Mutation Research**, v. 552, p. 187-195, 2004.

GAGO-DOMINGUEZ, M.; JIANG, X.; CASTELAO, J. E. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2007.

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

GALVAN, G. L. **Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo e gasolina: integrando relevantes organismos e biomarcadores.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

GARAVELLO, J. C., SAMPAIO, F.A.A., Five new species of genus *Astyanax* (Baird & Girard) 1854 from Rio Iguaçu, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). **Brazilian Journal Biology**, vol. 70, n. 3, p. 847-865, 2010.

GARCÍA-LESTÓN, J.; MÉNDEZ, J.; PÁSARO, E.; LAFFON, B. Genotoxic effects of lead: Na updated review. **EnvironmentInternational**, v. 36, p. 623–63, 2010.

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

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C. Evidence of contamination in the main body of the public water supply of Campo Mourão-PR: an analysis from a bioindicator of environmental quality. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 2, p. 13-22, 2013.

GONTIJO, Á. M. M. C.; BARRETO, R. E.; SPEIT, G.; REYES, V. A. V.; VOLPATO, G. L.; SALVADORI, D. M. F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research**, v. 534, p. 165-172, 2003.

GURR, J. R.; WANG, A. S.S.; CHEN, C. H.; JAN, K. Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicology**, v. 213, p. 66–73, 2005.

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

HAMZEH, M.; SUNAHARA, G. I. In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 864–873, 2013.

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.

HANDY, R. D.; BRINK, N. V. D.; CHAPPELL, M.; MUHLING, M.; BEHRA, R.; DUSINSKA, M.; SIMPSON, P.; AHTIAINEN, J.; JHA, A. N.; SEITER, J.; BEDNAR, A.; KENNEDY, A.; FERNANDES, T. F.; RIEDIKER, M. Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far? **Ecotoxicology**, v. 21, p. 933–972, 2012.

HAO, L.; WANG, Z.; XING, B. Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 1459–1466, 2009.

HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MACGREGOR, J. T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D. H.; KIRSH-VOLDERS, K.; OLESON, F. B.; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 312, p. 293–304, 1994.

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

HIRAKAWA, K.; MORI, M.; YOSHIDA, M.; OIKAWA, S.; KAWANISHI, S. Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide. **Free Radical Research**, v. 38, n. 5, p. 439–447, 2004.

HINTON, D. E. LAURÉN, D. J. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**, v.8, p. 51-66, 1999.

HONG, F.; WU, C.; LIU, C.; WANG, L.; GAO, F.; YANG, F.; XU, J.; LIU, T.; XIE, Y.; LI, X. Direct evidence for interaction between lead ions and kidney DNA from silver crucian carp. **Chemosphere**, v. 68, p. 1442–1446, 2007.

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

HUGGET, R. J.; UNGER, M. A.; SELIGMAN, P. F.; VALKIRS, A. O. The marine biocide tributyltin. **Environmental Science & Technology**, v. 26, p. 233-410, 1992.

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

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

JIN, C.; TANG, Y.; YANG, F. G.; LI, X. L.; XU, S.; FAN, X. Y.; HUANG, Y. Y.; YANG, Y. J. Cellular Toxicity of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles in Anatase and Rutile Crystal Phase. **Biological Trace Element Research**, v. 141, p. 3–15, 2011.

JONSSON, C. M.; FERRACINI, V. L.; PARABA, L. C.; RANGEL, M.; AGUIAR, S.R. Alterações bioquímicas e acúmulo em pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 441-446, 2002.

JONSSON, C. M. AOYAMA, H. Alteração da atividade enzimática em organismos aquáticos por poluentes de origem agrícola: uma abordagem geral e sobre a suscetibilidade da fosfatase ácida. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 920-928, 2010.

KAIZER, R. R.; LORO, V. L.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; TABALDI, L. A.; ROSA, C. S.; GARCIA, L. O.; BECKER, A. G.; BALDISSEROTTO, B. NTPDase and acetylcholinesterase activities in silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Heptapteridae) exposed to interaction of oxygen and ammonia levels. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 635-640, 2009

KEEN, J. H., HABIG, W. H., JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione Stransferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183–6188, 1976.

KLEMZ, C.; SILVA DE ASSIS, H. C. EFEITOS DO ENDOSULFANO NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE DE CASCUDO (*Ancistrus multispinnis*, FISH, TELEOSTEI). **Revista Acadêmica**, v. 3, n. 4, p. 51-58, 2005.

KLINGELFUS, T. **Efeitos tóxicos de Nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO<sub>2</sub>) e Chumbo Inorgânico (PbII) em *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

LAM P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 182–186, 2003.

LECH, J. J.; VODICNIK, M. J. Biotransformation. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. Hemisphere Publishing Corporation, p. 526-557, 1985.

LEITE K.A.S.; ZANDONATO, V.V.; FLUMINHAN, A. Avaliação da genotoxicidade provocada por fatores ambientais em *Tradescantia pallida* cv *purpurea* através do ensaio cometa. **Periódico eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 11, p. 399-417, 2013.

LI, N.; LINGLAN, M.; WANG, J.; ZHENG, L.; I. U, J.; DUAN, Y.; LIU, H.; ZHAO, X.; WANG, S.; WANG, H.; HONG, F.; XIE, Y. Interaction Between Nano-Anatase TiO<sub>2</sub> and Liver DNA from Mice In Vivo. **Nanoscale Res Lett**, v. 5, p. 108–115, 2010.

LIMBACH, L. K.; WICK, P.; MANSER, P.; GRASS, R. N.; BRUININK, A.; STARK, W. J. Exposure of Engineered Nanoparticles to Human Lung Epithelial Cells: Influence of Chemical Composition and Catalytic Activity on Oxidative Stress. **Environmental Science e Technology**, v. 41, p. 4158-4163, 2007.

LUOMA, S. M. Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges? **Woodrow Wilson International Center for Scholars**, 2015.

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

MACMANUS, J. P. E BUCHAN, A. M. Apoptosis after experimental stroke: Factor fashion? **Journal of Neurotrauma**, v. 17, n. 10, 2000.

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

MARTINEZ, C. B. R. **Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da Água**. 2006. Disponível em: <http://www.uel.br/laboratorios/lefa/Par%C3%A2metros%20bioqu%C3%ADmicos%20de%20peixes%20para%20avalia%C3%A7%C3%A3o%20da%20qualidade%20da%20%C3%A1gua,%202006.pdf>. 2006.

MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, O. L. Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 32-36, 2013.

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.

MONTALDI, A. Interaction of nitrilotriacetic acid with heavy metals in the induction of sister chromatid exchanges in cultured mammalian cells. **Environmental Mutagenesis**, v. 7, p. 381-390, 1985.

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

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

NAYA, M.; KOBAYASHI, N.; EMA, M.; KASAMOTO, S.; FUKUMURO, M.; TAKAMI, S.; NAKAJIMA, M.; HAYASHI, M.; NAKANISHI, J. *In vivo* genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 1-6, 2012.

NAWAZ, S.; NAGRA, S. A.; SALEEM, Y. PRIYDARSHI, A. Determination of heavy metals in freshwater fish species of the River Ravi, Pakistan compared to farmed fish varieties. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 167, p. 461–471, 2010.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 668–676, 2005.

NUNES, B.; BRANDÃO, F.; SÉRGIO, T.; RODRIGUES, S.; GONÇALVES, F.; CORREIA, A. T. Effects of environmentally relevant concentrations of metallic compounds on the flatfish *Scophthalmus maximus*: biomarkers of neurotoxicity, oxidative stress and metabolism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 12, p. 7501-7511, 2014.

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

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.

OLIVEIRA, C. P. F. **Efeito de cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – Am, sobre o tabaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818).** Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, 2003.

ONUKEI, J. ALMEIDA, E. A. MEDEIROS, M. H. G. MASCIO, P. D. Inhibition of 5-aminolevulinic acid-induced DNA damage by melatonin, N1 -acetyl-N2 -formyl-5-methoxykynuramine, quercetin ou resveratol. **Journal of Pineal Research**, v. 38, p. 107-115, 2005.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. L. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291-298, 1984.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 331–347, 2002.

PAIN, D. J. Lead in the environment. In: HOFFMAN, D. J. *et al.* (Eds.). **Handbook of ecotoxicology**. Boca raton: LEWIS, Capo 16. (1995).

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline Single Cell Gel (Comet) Assay and genotoxicity monitoring using Bullheads and Carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 345-356, 1995.

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

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

PATRA, R. C.; SWARUP, D.; DWIVEDI, S. K. Antioxidant effects of  $\alpha$  tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. **Toxicology**, v, 162, p. 81-88, 2001.

PETROVIC, M.; GONZALEZ, S.; BARCELO, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 685-696, 2003.

PIANCINI, L.D.S.; SANTOS, G.S.; TINCANI, F.H.; CESTARI, M.M. Piscine micronucleus test and the comet assay reveal genotoxic effects of Atrazine herbicide in the neotropical fish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 10, n. 1, p. 55-60, 2015.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Editora UFSM, p. 105-120, 2005.

POWERS, D. A Fish as model systems. **Science**. v. 246, p. 352- 358, 1989.

PRATA, W. M. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas carreadoras de proteínas como potenciais adjuvantes para uso em vacinas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

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

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

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

REEVES, J. F.; DAVIES, S. J.; DODD, N. J. F.; JHA, A. N. Hydroxyl radicals ( $\bullet$ OH) are associated with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. **Mutation Research**, v. 640, p. 113–122, 2008.

REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**, v. 51, p. 953-978, 2012.

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

RIBEIRO, V.E. **Avaliação da qualidade da água do Rio São Francisco no segmento entre Três Marias e Pirapora – MG: metais pesados e atividades antropogênicas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

ROEX, EWM, KEIJZERS, R, VAN GESTEL, CAM. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 451-460, 2003.

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

ROSSI, S. C.; MELA, M.; BOSCHEN, S. L.; CUNHA, C.; NETO, F.F.; RIBEIRO, C. A. O.; NEVES, A. P. P.; SILVA DE ASSIS, H. C. Modulatory effect of nano TiO<sub>2</sub> on Pb in *Hoplias malabaricus* thophically exposed. **Environmental Toxicology and Phamacology**, v 38, p 71-78, 2014.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A.R.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: Differential sensitivity to heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, p. 301-304, 1999.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

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

SCOWN, T. **Up take and Effects of Nanoparticles in Fish**. Tese de doutorado – University of Exeter. Exeter, Inglaterra, 2009.

SESTILI, P.; MARTINELLI, C.; STOCCHI, V. The fast halo assay: an improved method to quantify genomic DNA strand breakageat the single-cell level. **Mutation research**, v. 607, p. 205–14, 2006.

SHIBATTA, O. A.; ORSI, M. L.; BENNEMANN, S. T.; SILVA-SOUZA, A. T. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. A. **Bacia do rio Tibagi**. Londrina, 2002.

SILBERGELD, E. Preventing lead poisoning in children. **Annual Review of Public Health**, v. 18, p. 187–210, 1997.

SILVA, J.; ERDTMANN B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Alcance, p. 171-177, Porto Alegre, 2003.

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

SINGH, N.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.

SINGH, N. P. A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 328–337, 2000.

SINGH, N. P. Apoptosis Assessment by the DNA Diffusion Assay. **Methods in Molecular Medicine**, v. 111, p. 55-67, 2005.

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

SORVIG, A. Aquicultura: uma alternativa necessária à demanda do mercado de pescados. **Revista eletrônica The Wharton School**, 2007.

SPEIT, G. HARTMANN, A. The comet assay (Single-cell gel test), A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson, D.S. (Ed.), **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols – Eukaryotic Systems**, v. 113, Human Press, Totowa, p. 203-211, 1999.

SUN, H.; ZHANG, X.; NIU, Q.; CHEN, Y.; CRITTENDEN, J. C. Enhanced Accumulation of Arsenate in Carp in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles. **Water Air Soil Pollut**, v. 178, p. 245–254, 2007.

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

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24 n. 2, p. 243-248, 2004.

TROUILLER, B.; RELIENE, R.; WESTBROOK, A.; SOLAIMANI, P.; SCHIESTL, R. H. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability In vivo in Mice. **Cancer research**, v. 69, 2009.

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

VAMANU, C. I.; CIMPAN, M. R.; HOL, P. J.; SORNES, S.; LIE, S. A.; GJERDET, N. R. Induction of cell death by TiO<sub>2</sub> nanoparticles: Studies on a human monoblastoid cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1689–1696, 2008.

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

VEVERS, W. F.; JHA, A. N. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on fish cells in vitro. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 410–420, 2008.

XIMENES, J. F. **Enciclopédia Ambiental– Poluição Industrial**. Disponível em: <http://www.encyclopediambiental.hpg.ig.com.br> 2006.

XIONG, D.; FANG, T.; YU, L.; SIMA, X.; ZHU, W. Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 1444–1452, 2011.

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

YENDLE, J. E.; TINWELL, H.; ELLIOT, B. M.; ASHBY, J. The genetic toxicity of time: importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. **Mutation research**, v. 375, p. 125-136, 1997.

ZAGATTO, P.A. e BERTOLETTI, E. (ED.). **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, p. 341, 2006.

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

WIN-SHWE, T. T.; FUJIMAKI, H. Nanoparticles and neurotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 6267-6280, 2011.

WOZNIAK, K.; BLASIAK, J. In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA–protein cross-links. **Mutation Research**, v. 535, p. 127–139, 2003.

WU, F. Y.; CHANG, P. W.; WU, C. C.; KUO, H. W. Correlations of Blood Lead with DNA-Protein Cross-Links and Sister Chromatid Exchanges in Lead Workers. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 287–290, 2002.

## APÊNDICES

### Preparações prévias: Ensaio Cometa e Difusão do DNA

#### *Preparo das lâminas com cobertura de agarose*

- a) Dissolver 1,5 g de agarose normal em 100 mL de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas;
- b) Colocar para aquecer;
- c) Após fervura, deixar solidificar a temperatura ambiente;
- d) Picar a agarose em e ferver;
- e) Repetir as etapas “c” e “d”;
- f) Levar para banho-maria a 70°C, o banho deve ficar no nível da agarose;
- g) Mergulhar as lâminas, previamente limpas com etanol, na agarose até alcançar a parte esmerilhada. Procurar fazer uma camada fina de agarose;
- h) Retirar a lâmina e limpar com papel o lado oposto da parte esmerilhada;
- i) Secar “overnight” em temperatura ambiente. Estas lâminas podem ser estocadas por várias semanas.

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

- a) Dissolver 0,1 g de agarose de baixo ponto de fusão em 20 mL de PBS;
- b) Colocar para aquecer com agitação constante;
- c) Desligar o aquecedor quando levantar fervura e manter a agitação até diminuir a temperatura da agarose;
- d) Desligar o agitador e deixar solidificar a temperatura ambiente;
- e) Manter na geladeira até o momento do uso.

#### *PBS*

- 0,2 g de cloreto de potássio – KCl (PM 74,55);
- 0,2 g de fosfato de potássio monobásico – KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (PM 136,09);
- 8 g de cloreto de sódio - NaCl (PM 58,44);

- 1,15 g de hidrogêniofosfatodisódico anidro -  $\text{NaHPO}_4$  (PM 141,96);
- 1000 mL de água deionizada.

- a) Preparar em balão volumétrico de 1000 mL;
- b) Acrescentar água até alcançar a marca do balão volumétrico;
- c) Acertar o pH para 7,4;
- d) Estocar em refrigerador.

#### *Solução de Lise – Estoque*

Para 1000 mL:

- 890 mL de água destilada;
- 146,1 g de Cloreto de Sódio -  $\text{NaCl}$  (2,5 M);
- 37,2 g de Ácido Etilenodiaminotetracético - EDTA (100 mM; PM 372,24);
- 1,2 g TRIS 10 mM (PM 121,14);
- 8 g de Hidróxido de Sódio sólido ( $\text{NaOH}$  PM 40,0).

- a) Dissolver os reagentes em 890 mL de água;
- b) Acertar o pH com  $\text{NaOH}$  até atingir pH 10;
- c) Adicionar 10 g de laurilsarcosinato de sódio e misturar bem lentamente para evitar a formação de grumos.

#### *Solução de Lise – Uso*

Para 100 mL:

- 1 mL de Triton X – 100;
- 10 mL DMSO;
- 89 mL solução estoque.

- a) Adicionar todos os reagentes em uma proveta de 100 mL;
- b) Agitar e manter no escuro.

*Solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) (300 mM):*

- 19,2 g de NaOH;
- 48 mL de água deionizada.

a) Agitar.

*Solução de EDTA (200 Mm) - Ácido Etilenodiaminotetracético – Estoque*

- 14,89 mL de EDTA;
- 200 mL de água deionizada.

a) Acertar o pH para 10 com pastilhas de NaOH;

b) A solução pode ser estocada.

*Tampão de Eletroforese*

- 1600 mL de água destilada gelada (4°C);
- 8 mL de EDTA (200 Mm);
- 48 mL da solução de NaOH.

a) Agitar;

b) Acertar o pH para maior 13 com pastilhas de NaOH.

*Tampão de Neutralização*

- 51,04 g de TRIS;
- 1000 mL de água deionizada.

a) Agitar;

b) Acertar o pH para 7,5 com Ácido clorídrico (HCL).

*Solução de Coloração Brometo de Etídio – Estoque*

- 10 mg de Brometo de Etídio;
- 50 mL de água deionizada.

*Solução de Coloração – Uso*

- 1 mL de solução estoque;
- 9 mL de água deionizada.

*Descontaminação das lâminas*

- 1 L de água;
- 13,6g de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ );
- 67 mL de ácido hipofosforoso ( $\text{H}_3\text{PO}_2$ ).

- a) Deixar as lâminas expostas à luz por uma semana;
- b) Após este período colocar de molho na solução de descontaminação por 24 horas;
- c) Neutralizar a solução com bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ );
- d) Lavar as lâminas utilizando luvas.