Caroline Patrício Vignardi

Avaliação da genotoxicidade da nanopartícula de dióxido de titânio em juvenis de pampas, *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766), através de métodos citogenotóxicos

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Phan Van Ngan

**Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico**

Avaliação da genotoxicidade da nanopartícula de dióxido de titânio em juvenis de pampos, *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766), através de métodos citogenotóxicos

Versão corrigida

Caroline Patrício Vignardi

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências,
área de Oceanografia Biológica.

Julgada em ____/____/____

Prof. Dr. Phan Van Ngan

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

**Dedico este trabalho
a Deus Pai, Filho e Espírito Santo,
que me curou, que esteve, está
e sempre estará ao meu lado
capacitando- me**

**“Confie em Deus de todo o coração
e não se apoie na sua própria inteligência.
Lembre-se de Deus em tudo o que fizer,
e Ele lhe mostrará o caminho certo”**

Provérbios 3, 5-6

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	15
II.1. <u>Objetivo geral</u> :.....	15
II.2. <u>Objetivos específicos</u>	15
III. MATERIAL E MÉTODOS	17
III.1. <u>Material</u>	17
III.2. <u>Coleta dos animais</u>	17
III.3. <u>Manutenção dos animais</u>	18
III.4. <u>Caracterização da nano-TiO₂</u>	19
III.4.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	19
III.4.2. Difração de raios X (DRX).....	20
III.5. <u>Injeção de nano-TiO₂</u>	21
III.6. <u>Coleta de material biológico</u>	22
III.7. <u>Viabilidade de eritrócitos</u>	22
III.8. <u>Controle positivo</u>	24
III.9. <u>Ensaio cometa</u>	24
III.9.1. Preparação das lâminas e coleta de sangue.....	25
III.9.2. Lise.....	26
III.9.3. Relaxamento do DNA	27
III.9.4. Eletroforese	27
III.9.5. Neutralização.....	28
III.9.6. Coloração por prata.....	28
III.9.7. Análise dos cometas	29
III.10. <u>Teste de Micronúcleo (MN) e outras Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE)</u>	31
III.11. <u>Deteção da nano-TiO₂ nos tecidos</u>	33
III.12. <u>Análises estatísticas</u>	34
IV. RESULTADOS.....	36
IV.1. <u>Caracterização da nano-TiO₂</u>	36
IV.1.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	36
IV.1.2. Difração de raios X (DRX)	37

IV.2. <u>Viabilidade de eritrócitos</u>	39
IV.3. <u>Controle positivo</u>	40
IV.4. <u>Ensaio genotóxicos</u>	43
Experimento 1.....	44
IV.4.1. Ensaio cometa.....	44
IV.4.1.1. Índice de Dano (ID)	44
IV.4.1.1.a. Efeitos das dosagens.....	44
IV.4.1.1.b. Efeitos dos períodos de exposição	47
IV.4.1.2. Análise de imagem.....	49
IV.4.1.2.a. Efeitos das dosagens.....	49
IV.4.1.2.b. Efeitos dos períodos de exposição	58
IV.4.2. Teste de Micronúcleo (MN) e outras Anormalidades Nucleares Eritrocitárias(ANE).....	62
IV.4.2.a. Efeitos das dosagens	62
IV.4.2.b. Efeitos dos períodos de exposição.....	71
Experimento 2.....	72
IV.4.3. Ensaio Cometa	72
IV.4.3.1. Índice de Dano (ID)	72
IV.4.3.1.a. Efeitos das dosagens.....	72
IV.4.3.1.b. Efeitos dos períodos de exposição	76
IV.4.3.2. Análise de Imagem.....	77
IV.4.3.2.a. Efeitos das dosagens.....	77
IV.4.3.2.b. Efeitos dos períodos de exposição	86
IV.4.4. Teste de Micronúcleo (MN) e outras Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE).....	89
IV.4.4.a. Efeitos das dosagens	89
IV.4.4.b. Efeitos dos períodos de exposição.....	98
IV.5. <u>Detecção da nano-TiO₂ nos tecidos</u>	99
V. DISCUSSÃO	108
VI. CONCLUSÕES	130
VII. BIBLIOGRAFIA	132

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição em categorias dos produtos disponíveis no mercado que contém nanomateriais. Adaptada a partir do banco de dados Woodrow Wilson, janeiro 2009 (http://www.nanotechproject.org).	2
Figura 2. Catálogo de classes de danos de cometas de pampas: A: Classe 0: Intacto; B: Classe 1: Pouco danificado; C: Classe 2: Danificado; D: Classe 3: Muito danificado; E: Classe 4: Severamente danificado. Fotos: Caroline Patrício Vignardi.....	31
Figura 3. Catálogo de MN e outras Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE), sendo A: normal, B: micronúcleo, C: reniforme, D: lobado, E: segmentado, F: bolha. Fotos: Caroline Patrício Vignardi.....	33
Figura 4. Histograma da distribuição em função de tamanhos das nano-TiO ₂ utilizadas neste trabalho.	36
Figura 5. Eletromicrografia de nano-TiO ₂ ultrassonicadas em solução salina (15 µg/ml) em aumento de 50.000 vezes.....	37
Figura 6 A. Difratoograma de raios X da amostra de nano-TiO ₂ utilizada no presente estudo.....	38
Figura 6 B. Destaque do resultado apresentado na figura 40A, referente aos picos de difração correspondentes as fases rutilo e anatase	38
Figura 7. Porcentagem de eritrócitos viáveis encontrados nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H ₂ O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com a dosagem de 3,0µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0 TiO ₂). Asterisco indica diferença significativa (p<0,01)	39
Figura 8. Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas das lâminas utilizadas como controle (Ctrl) e das lâminas expostas à H ₂ O ₂ nas concentrações de 10 µM e 20 µM. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)	40
Figura 9. Média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas das lâminas utilizadas como controle (Ctrl) e das lâminas expostas à H ₂ O ₂ nas concentrações de 10 µM e 20 µM. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)	41
Figura 10. Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas das lâminas utilizadas como controle (Ctrl) e das lâminas expostas à H ₂ O ₂ nas concentrações de 10 µM e 20 µM. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)	42
Figura 11. Média e desvio padrão dos IDs dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H ₂ O) e salina (Ctrl Sal) e dos grupos injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO ₂) e	

3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0 TiO ₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)	45
Figura 12. Média e desvio padrão dos IDs dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H ₂ O) e salina (Ctrl Sal) e dos grupos injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO ₂) e 3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0 TiO ₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)	46
Figura 13. Média e desvio padrão dos IDs dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H ₂ O) e salina (Ctrl Sal) e dos grupos injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO ₂) e 3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0 TiO ₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)	47
Figura 14. Variação da média e desvio padrão dos IDs dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H ₂ O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO ₂) e 3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0 TiO ₂). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).	48
Figura 15. Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H ₂ O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens 1,5 (1,5 TiO ₂) e 3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0 TiO ₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)	50
Figura 16. Média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H ₂ O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens 1,5 (1,5 TiO ₂) e 3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0 TiO ₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).	51
Figura 17. Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H ₂ O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens 1,5 (1,5 TiO ₂) e 3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0 TiO ₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)	52
Figura 18. Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H ₂ O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO ₂) e 3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0 TiO ₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)	53
Figura 19. Média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H ₂ O) e salina (Ctrl Sal) e dos os peixes injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO ₂) e 3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0	

TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)..... 54

Figura 20. Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) 55

Figura 21. Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) 56

Figura 22. Média e desvio padrão da porcentagem de DNA caudal dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)..... 57

Figura 23. Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)... 58

Figura 24. Variação da média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos grupos de mesmo tratamento em função dos períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) 59

Figura 25. Variação de média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)... 60

Figura 26. Variação de média e desvio padrão de momento caudal dos cometas dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)..... 61

Figura 27 A. Frequências de anormalidades nucleares eritrocitárias e de seus componentes encontradas nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e

salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. ANE=Anormalidade Nuclear Eritrocitária, MN=Micronúcleo, L=Lobado, S=Segmentado, R=Reniforme, B=Bolha. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)..... 64

Figura 27 B. Destaque dos resultados apresentados na figura 23 A, referentes a Micronúcleo, Lobado e Segmentado..... 64

Figura 28 A. Frequências de anormalidades nucleares eritrocitárias e de seus componentes encontradas nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. ANE=Anormalidade Nuclear Eritrocitária, MN=Micronúcleo, L=Lobado, S=Segmentado, R=Reniforme, B=Bolha. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)..... 67

Figura 28 B. Destaque dos resultados apresentados na figura 24 A, referentes a Micronúcleo, Lobado e Segmentado..... 67

Figura 29 A. Frequências de anormalidades nucleares eritrocitárias e de seus componentes encontradas nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. ANE=Anormalidade Nuclear Eritrocitária, MN=Micronúcleo, L=Lobado, S=Segmentado, R=Reniforme, B=Bolha. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)..... 70

Figura 29 B. Destaque dos resultados apresentados na figura 25 A, referentes a Micronúcleo, Lobado e Segmentado..... 70

Figura 30. Variação da frequência e desvio padrão das anormalidades nucleares eritrocitárias dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) 71

Figura 31. Média e desvio padrão dos IDs dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)..... 73

Figura 32. Média e desvio padrão dos IDs dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)..... 74

- Figura 33.** Média e desvio padrão dos IDs dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)..... 75
- Figura 34.** Variação de média e desvio padrão de IDs dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) 76
- Figura 35.** Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) 77
- Figura 36.** Média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). 78
- Figura 37.** Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). 79
- Figura 38.** Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). 80
- Figura 39.** Média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). 81
- Figura 40.** Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). 82

- Figura 41.** Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). 83
- Figura 42.** Média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). 84
- Figura 43.** Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). 85
- Figura 44.** Variação da média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). 86
- Figura 45.** Variação da média e desvio padrão da % de DNA na cauda dos cometas dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). 87
- Figura 46.** Variação da média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). 88
- Figura 47 A.** Frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias e de seus componentes encontradas nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com a dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. ANE=Anormalidade Nuclear Eritrocitária, MN=Micronúcleo, L=Lobado, S=Segmentado, R=Reniforme, B=Bolha. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05). 91
- Figura 47 B.** Destaque dos resultados apresentados na figura 43 A, referentes a Micronúcleo, Lobado e Segmentado. 91

Figura 48 A. Frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias e de seus componentes encontradas nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H ₂ O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com a dosagens de 1,5 (1,5 TiO ₂) e 3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0 TiO ₂) no período de 48 horas. ANE=Anormalidade Nuclear Eritrocitária, MN=Micronúcleo, L=Lobado, S=Segmentado, R=Reniforme, B=Bolha. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).....	94
Figura 48 B. Destaque dos resultados apresentados na figura 44 A, referentes a Micronúcleo, Lobado e Segmentado.....	94
Figura 49 A. Frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias encontradas e de seus componentes nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H ₂ O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com a dosagens de 1,5 (1,5 TiO ₂) e 3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0 TiO ₂) no período de 72 horas. ANE=Anormalidade Nuclear Eritrocitária, MN=Micronúcleo, L=Lobado, S=Segmentado, R=Reniforme, B=Bolha. Letras diferentes indicam diferença significativa	97
Figura 49 B. Destaque dos resultados apresentados na figura 45 A, referentes a Micronúcleo, Lobado e Segmentado.....	97
Figura 50. Variação da frequência e desvio padrão de anormalidades nucleares eritrocitárias dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controles água (Ctrl H ₂ O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO ₂) e 3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe (3,0 TiO ₂). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).	99
Figura 51 A. Ultraestrutura de células do rim de pampo sem injeção de nano-TiO ₂ , nas 72 horas. Magnificação 25.000 vezes. N: núcleo. C: citoplasma. M: mitocôndria. CM: crista mitocondrial.....	100
Figura 51 B. Ultraestrutura de células do rim de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 25.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO ₂ . N: núcleo. C: citoplasma. M: mitocôndria. CM: crista mitocondrial	101
Figura 51 C. Ultraestrutura de células do rim de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 30.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO ₂ . N: núcleo. C: citoplasma	101
Figura 52 A. Ultraestrutura de células do fígado de pampo sem injeção de nano-TiO ₂ , nas 72 horas. Magnificação 15.000 vezes. N: núcleo. C: citoplasma. M: mitocôndria.	102
Figura 52 B. Ultraestrutura de células do fígado de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 12.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO ₂ . N: núcleo. C: citoplasma. M: mitocôndria	103

Figura 52 C. Ultraestrutura de células do fígado de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 20.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO ₂ . C: citoplasma. M: mitocôndria	103
Figura 53 A. Ultraestrutura de células da brânquia de pampo sem injeção de nano-TiO ₂ , nas 72 horas. Magnificação 5.000 vezes. Cr: cromatina	104
Figura 53 B. Ultraestrutura de células da brânquia de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 5.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO ₂ . Cd: condrócito. FB: célula do filamento branquial	105
Figura 53 C. Ultraestrutura de células da brânquia de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 10.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO ₂ . N: núcleo. C: citoplasma	105
Figura 54 A. Ultraestrutura de células do músculo de pampo sem injeção de nano-TiO ₂ , nas 72 horas. Magnificação 12.000 vezes. S: sarcoplasma	106
Figura 54 B. Ultraestrutura de células do músculo de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 10.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO ₂ . S: sarcoplasma	107

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar comigo em todos os momentos, desde minha entrada no IO, fazendo-me escolher o orientador, o lab, o projeto certos, até o fim. Por todas as conquistas, facilidades e dificuldades, sabedoria, oportunidades, pelo imenso amor e misericórdia por todos nós!

Ao Phan, meu orientador, professor, educador, pesquisador, vietcong, companheiro, amigo, quem tive a graça de conhecer, conviver, aprender. Professor, obrigada por ter me aceitado, por confiar em mim, por estar sempre ao meu lado, por todas as oportunidades (principalmente pela viagem à Antártica), por tudo!!! Espero um dia poder chegar a excelência de suas qualidades! O sr. estará sempre no meu coração!

Às secretárias da pós: Ana, Sil e Le, pela amizade, força, paciência, pelos toques de extrema experiência e competência, pelas risadas, carinho, preocupação, enfim, obrigada por tudo, amigas! S2 Vocês estarão sempre no meu coração S2

À CAPES pela bolsa concedida.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação da USP pelo auxílio na viagem ao COLACMAR 2011.

Ao Vic e Zezé pelas ajudas imensuráveis, trabalhos de campo, no lab, por todo ensinamento, correções da dissertação, noites sem dormir, por todas as conversas, amizade. Obrigada Vic, pela confiança de me levar para a Antártica, pelas monitorias, filosofias, risadas, orações!! Você é demais!!!

Ao prof. Watanabe, Sonia, Edson (ICB-USP) por toda ajuda na caracterização e detecção da nano-TiO₂ nos tecidos, pela amizade, por todo conhecimento transmitido, pela excelência em trabalhar e ajudar.

À profa. Marcia, prof. Gian, Daniele, Antonio Carlos, Tarsis (IF-USP) pela colaboração na caracterização do nosso material, pela atenção, por toda ajuda, pelos ensinamentos, conversas, vocês superaram minhas expectativas!

Aos professores Eidge, Flavio e toda equipe pelas ajudas, disponibilização da utilização do lab, do microscópio, mesmo com reservas inusitadas e em feriados. Vocês engrandeceram minhas análises de uma forma incrível! MUITÍSSIMO obrigada!

Ao IO-USP pela disponibilização de TUDO que precisávamos para executar nosso trabalho. Tenho orgulho e honra em poder dizer que me formei neste instituto! MUITÍSSIMO obrigada!!!

Aos queridos amigos do lab: Fabão, padrinho, que me ajudou em tudo, com broncas, piadas, tudo que sei sobre trabalho de campo é devido a ele até o nascimento da primeira versão. Fabão, você é legal pra ca...ramba! Pri, Margo, Álex, Jú, Amiga amada enviada por Deus, Augusto (S2 querido baby S2), Arthur, Barbara, Deb, Dani, aos antigos Maysa, Natali, Fabio magro, Thais Ribas, pela amizade fortificada a cada dia, companheirismo, ensinamentos, discussões, incentivos, abraços, piadas (Prisciosa =D), correções da dissertação, trabalhos de campo, no lab, noites sem dormir, noites “dormidas” no lab, confiança, amor e carinho. Darlings, vocês foram essenciais na minha vida. Mesmo trabalhando com assuntos diferentes, vocês sabem tanto quanto eu sobre o presente trabalho, porque sempre me ajudaram sem medidas! Álex, obrigada por me lembrar nos momentos certos que somos do tamanho de nossos sonhos!

À querida amiga Thais Santos quero agradecer especialmente por tudo, desde a primeira vez que pisei no IO, foi uma pessoa que me ajudou em todos os momentos da minha vida! Todos mesmo!!! Eu agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida e peço para nunca mais tirar, pelo contrário, estreitar cada vez mais nossa amizade!! Eu gosto muito de você e te admiro demais!!

A todos os amigos da pós, das disciplinas, da graduação, pelas informações e conhecimentos compartilhados, pelas descontrações na Bio, pelo incentivo e ajuda em diversos assuntos. Em especial ao Johnny, companheiro amado, que me ajudou em tudo e mais um pouco, pela compreensão, por me colocar sempre pra cima, ensinando-me, mostrando o caminho certo com suas próprias atitudes, pelo amor, carinho e confiança.

Aos queridos amigos da base de Ubatuba: Ricardo, Fernando, Ayrton, Daico, Osiel, Mi, Lincoln, Roberto, Manoel, Marquinho, Marcio, Adriano, Celso, D. Cida, Vania, Bete, Orlando, Nilton, Cassia, Jonathan, Caio, Cida, Sula, Gleice, Sandra, Jamisson, Cristiano, Zé Maria, Renato, por todo envolvimento e

execução do trabalho, vocês tornaram tudo mais fácil e legal! Grandes amigos pro que der e vier!!!

A todos os amigos e funcionários do IO, em especial Wagner, Rai, Cidinha, Esair, Claudia, Ro (Rogéria), Eduardo, Humberto, Ari, Miranda, Jura, Zé Carlos, Piauí, Edinho, Humberto, Valter, Ayrton, Iberê, Nilson, Jair, Maysa, Marta, Flávia, Valter, David, Cidinha, D. Cida, André, Luiz, Caia, Marlene e Miriam (DOB), Didi, Bertão, Lilian, Seu Pedro, André (secretaria da graduação) por todo apoio, amizade, compreensão, incentivo, conversas, carinho e ajuda! As meninas da limpeza: Sheila, Fátima, Lourdes, obrigada por tudo!!!

A todos os professores do IO, em especial a Luz, Mario, Ceci, Sonia, Daniel, Rubens, June, Paulo e Turra, pelas contribuições, amizade, ensinamentos, conversas, incentivo, ao bom dia de cada dia.

Aos amigos antárticos, aos que se foram e aos que ficaram, por serem tão especiais e fazerem parte desta experiência única e inesquecível de minha vida acadêmica.

Ao Cassius por toda trajetória, companhia, confiança, ensinamentos, descontrações, viagens, por ter cuidado das nenês com tanto amor e carinho, por ter feito parte da minha vida.

À Edna, Ritinha, Gelda, por facilitarem minha vida e me ajudarem em tudo que podiam!

Às amigas irmãs Mimis, Lu, Blé, Pam e Pri pela eterna amizade, compreensão, amor, carinho, viagens, clubs da Lulu. Amo vocês!!!

Às minhas filhotas (cachorrinhas) Ariel e Mallody, fiéis companheiras que tornam minha vida mais leve, alegre e feliz!

À toda minha família, em especial as primas Bia e Mo e tia Ro, pelas conversas, incentivo, amor, interesse. Amo muito!

Ao tio Ivo, por tantos ensinamentos em minha vida, cultura, sabedoria, incentivo, mas também muita piada, bobagens e risadas. Que Deus o tenha, tio!

À minha família, Ivano, Jucelem, Michele, Andressa e Igor, por serem as pessoas que mais confiaram em mim, dando-me suporte em todos os setores e em todos os momentos de minha vida, sempre com amor incondicional. Agradeço a Deus por ter me abençoado com uma família tão linda, amada e principalmente temente a Deus. Vocês são tudo pra mim!!! Dre, obrigada pela

ideia inicial de pesquisar o protetor solar! Sem esta ideia, nada disso sairia. Obrigada por nos ensinar tanto sobre os animais e aumentar nosso amor por eles! Mih, obrigada pelo apartamento, que foi meu doce lar durante toda esta trajetória! Obrigada por toda ajuda! MAMIS, você é meu porto seguro, minha melhor amiga!!!

A todos que oraram por mim nos momentos difíceis, todos que me ajudaram direta ou indiretamente, que Deus os retribua em dobro.

E que fique claro que as palavras aqui citadas não são suficientes para expressar minha imensa e eterna gratidão a todos os envolvidos neste sonho realizado, que é muito muito muito mais que a obtenção de um título.

RESUMO

Nanopartículas possuem características físico-químicas úteis para o uso humano, com aplicação na ciência, tecnologia, medicina e produtos de uso diário. A fabricação e a variedade destes produtos vêm crescendo rapidamente, gerando uma preocupação quanto ao risco de exposição aos efeitos tóxicos da contaminação por nanopartículas. Vários efeitos adversos, derivados da exposição de nanopartículas foram descritos tanto para organismos terrestres como aquáticos, porém efeitos genotóxicos ainda são pouco conhecidos para organismos marinhos. Para avaliar a citogenotoxicidade da nanopartícula de dióxido de titânio no peixe marinho *T. carolinus*, foram administradas injeções intraperitoneais com dosagens de 1,5 e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe. Amostras de sangue foram coletadas para realização do teste de micronúcleo (MN) e outras anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) e ensaio cometa (pH>13), 24, 48 e 72 horas após a injeção. Foram investigadas a viabilidade de eritrócitos e a possibilidade de acumulação da nano-TiO₂ nos tecidos dos peixes injetados com a maior dosagem, após 72 horas, pelo teste de exclusão do azul de tripano e por microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram que a nano-TiO₂ é uma substância possivelmente capaz de entrar nas células e induzir efeito genotóxico e citotóxico para esta espécie, por provocar uma diminuição na viabilidade de eritrócitos, um aumento no dano ao DNA e formação de MN e outras ANE. De acordo com nosso conhecimento, este é o único trabalho sobre a genotoxicidade de nano-TiO₂ em um peixe marinho.

Palavras chave: citogenotoxicidade, ensaio cometa, micronúcleo, anormalidade nuclear, peixe marinho, nanotoxicologia, TiO₂.

ABSTRACT

Nanoparticles have physicochemical characteristics useful for human use, with applications in science, technology, medicine and everyday products. The manufacture and variety of these products have been growing rapidly, creating a concern about the risk of exposure to the toxic effects of contamination by nanoparticles. Several adverse effects of exposure to nanoparticles have been reported for both terrestrial and aquatic organisms, but genotoxic effects are still poorly known for marine organisms. To evaluate the citogenotoxicity of titanium dioxide nanoparticles (nano-TiO₂) in marine fish *T. carolinus*, the substance was administered with intraperitoneal injections at dosages of 1,5 and 3,0 µg-nano-TiO₂/gram-of-fish. Blood samples were collected for the tests of micronucleus (MN) and other erythrocytes nuclear abnormalities (ENA) and comet assay (pH> 13), 24, 48 and 72 hours after injection. We also investigated the viability of erythrocytes and the possibility of accumulation of nano-TiO₂ in the tissues of fish injected with the highest dose after 72 hours using trypan blue exclusion test and transmission electron microscopy. The results showed that the nano-TiO₂ is a substance that can possibly be able to enter cells and induce cytotoxic and genotoxic effect for this species, by causing a decrease in the viability of erythrocytes, an increase in DNA damage and formation of MN and other ANE. As far as we know, this is the only work done on the genotoxicity of nano-TiO₂ in a marine fish.

Key words: citogenotoxicity, comet assay, micronucleus, nuclear abnormalities, marine fish, nanotoxicology, TiO₂.

I. INTRODUÇÃO

Nanopartículas são substâncias com pelo menos uma das dimensões medindo entre 1 e 100 nanômetros (nm) (MOORE, 2006; HANDY et al., 2008b; LOPES et al., 2012). As substâncias naturais com tamanhos nanométricos existem na terra há milhões de anos e têm sido utilizadas pelo homem há milhares de anos. Por exemplo, o Carbon Black, um produto da combustão incompleta de combustíveis fósseis e da vegetação, forma a fuligem (NOWACK; BUCHELI, 2007) e também já foi utilizado por nossos ancestrais em pinturas rupestres (MÜLLER, 2007).

Nanopartículas artificiais são produtos mais recentes da nanotecnologia. Estas partículas, devido aos seus minúsculos tamanhos, apresentam características físico-químicas benéficas para o uso humano, e têm sua aplicação nos produtos de uso diário, nas ciências, na tecnologia e na medicina humanas.

No Brasil, o Governo Federal criou em 19 de agosto de 2005 o Programa Nacional de Desenvolvimento da Nanociência e Nanotecnologia, demonstrando a importância econômica e científica que a área tem para o desenvolvimento do país (MCTI, 2005).

A produção e a variedade destes produtos vêm crescendo rapidamente, assim como o crescimento da nanotecnologia, uma engenharia que abrange o desenvolvimento e a utilização destas substâncias (DAUGHTON, 2004; MOORE, 2006; HANDY et al., 2008; SINGH et al., 2009).

Estimativas recentes indicam a existência de cerca de 800 produtos comerciais contendo nanopartículas no mercado mundial. A distribuição em categorias de utilização de 600 produtos está disposta na figura 1.

Figura 1: Distribuição em categorias dos produtos disponíveis no mercado que contém nanomateriais. Adaptada a partir do banco de dados Woodrow Wilson, janeiro 2009 (<http://www.nanotechproject.org>).

Devido a sua imensa aplicabilidade e utilização, foram descritas várias vias de entrada de nanopartículas no ambiente (SIMONET; VALCÁRCEL, 2008; TIEDI et al., 2008; NOWACK; BUCHELI, 2007; NAVARRO et al., 2008), entre as quais as mais citadas são aterros sanitários ou usinas de tratamento

de águas residuais, desgaste de materiais que contenham nanopartículas, liberação acidental durante a produção ou o transporte.

A exposição às nanopartículas nos seres humanos também é muito provável acontecer por meio da alimentação, migração das embalagens para o alimento, ingestão de água, cadeia alimentar, aplicação de cosméticos diretamente sobre a pele (TIEDI et al., 2008) e por exposição ao ar, solo ou água. Indiretamente, as nanopartículas podem ser acumuladas através da ingestão de plantas que as absorveram ou animais que as acumularam, considerando a possibilidade de biomagnificação na cadeia alimentar (EPA, 2005).

Com o desenvolvimento da indústria de nanotecnologia, é inevitável que seus produtos e subprodutos se acumulem no ambiente aquático por diferentes rotas (MOORE, 2006; OWEN; DEPLEDGE, 2005). De acordo com Owen; Depledge (2005), a entrada de nanopartículas nesse ambiente deve-se principalmente a fontes industriais e/ou não industriais. Fontes não industriais incluem produtos de consumo (por exemplo cosméticos e protetores solares) entrando tanto por meios diretos, através da remoção de nanopartículas contidas nos produtos, pela lavagem e banho, como indiretos, via esgoto, lixiviação dos aterros ou solo contaminado com lodo de esgoto e fontes atmosféricas de combustão de resíduos.

Uma vez encontradas no ambiente aquático, o comportamento das nanopartículas pode ser alterado pela chuva ou outros eventos climáticos (FARRÉ et al., 2009) que alteram dramaticamente a hidrologia, presença de matéria orgânica, partículas e / ou salinidade da água. Muitas nanopartículas tendem a interagir também com a matéria orgânica e coloides naturais

presentes nos sistemas aquáticos, o que provavelmente vai afetar a sua biodisponibilidade para os organismos (HANDY et al., 2008a).

Existem algumas diferenças fundamentais nas características físico-químicas entre a água doce e o ambiente marinho, em interfaces sedimento-água em comparação com a coluna d' água, gerando implicações quanto ao destino, comportamento e exposição de nanopartículas aos organismos. É bem provável que organismos marinhos, organismos que vivem em águas duras e espécies bentônicas que vivem na interface do sedimento, sejam expostos aos agregados de nanopartículas (HANDY et al., 2008), que apesar de serem menos móveis, podem contaminar o sedimento e ocasionar a absorção por esses animais (NOWACK; BUCHELI, 2008). Desta forma, o comportamento e consequentemente a exposição das nanopartículas pode ser diferente nos diversos habitats onde os organismos aquáticos são encontrados.

A contaminação por nanopartículas nos organismos aquáticos pode ocorrer através da ingestão direta e também através da interface epitelial, tais como brânquias, órgão olfatório ou parede corporal. Além disso, organismos aquáticos desenvolvem processos de alta eficiência, como endocitose e fagocitose, para ingestão de partículas em escala nano e micrométrica (CANESI et al., 2008).

Dentro da célula, as nanopartículas podem ser acumuladas e provocar efeitos tóxicos em nível celular (OBERDÖRSTER et al., 2005) ou em nível de organismo (AVAKIAN et al., 2002; ARMSTRONG et al., 2004).

O tamanho minúsculo, a grande área superficial e a habilidade de gerar espécies reativas de oxigênio são os fatores mais importantes na toxicidade das nanopartículas (NEL et al., 2006). Assim sendo, mesmo fornecendo

benefícios para a indústria, há uma preocupação crescente de que as substâncias anteriormente consideradas biologicamente inertes possam, de fato, tornarem-se tóxicas em um estado nanoparticulado devido a sua maior reatividade e, possivelmente, sua maior facilidade de penetração nas células (REEVES et al., 2008).

Recentemente, o número de publicações específicas sobre nanotoxicologia tem ganhado menor impulso em comparação a nanotecnologia. A maioria destes estudos avaliou principalmente a citotoxicidade, assim, em muitos casos, doses muito elevadas de exposição foram necessárias. No entanto, estas investigações negligenciaram as alterações celulares sutis que podem surgir em concentrações mais baixas, que não podem resultar em morte celular, mas podem contribuir em riscos para a saúde humana (SINGH et al., 2009).

Células normais são capazes de reparar as lesões no DNA com precisão através de um ou mais processos diferentes. O DNA danificado e não reparado pode acarretar em defeitos na transcrição e replicação da molécula, resultando em uma série de transtornos, incluindo a morte celular, câncer e mudanças hereditárias via mutagênese, com sérias implicações ecológicas e evolutivas (KORNHAUSER et al., 1991). A manutenção da integridade do genoma e a capacidade de reparação do DNA decorrente de danos que ocorrem devido a fatores internos e externos são, portanto, um dos requisitos de qualquer organismo para sobreviver e manter a estabilidade das espécies.

Dentre os métodos citogenotóxicos para detectar os efeitos das genotoxinas em organismos vivos, o teste de micronúcleo (MN) e o ensaio cometa são amplamente utilizados devido à sensibilidade e facilidade de

aplicação, especialmente quando se utiliza sangue de peixes e hemolinfa de crustáceos, que possuem células nucleadas.

Os micronúcleos são consequência da quebra dos cromossomos ou disfunção do fuso mitótico. Existem, de fato, quatro mecanismos pelo qual as estruturas reconhecidas como micronúcleos e anormalidades nucleares podem surgir: perda mitótica de fragmentos acêntricos; uma variedade de consequências mecânicas de ruptura cromossômica e troca; perda mitótica de cromossomos inteiros; e apoptose (HEDDLE et al., 1991; AL-SABTI; METCALFE, 1995). Um aumento na frequência dos micronúcleos é considerado como um resultado de danos cromossômicos e genômicos causados por clastogenicidade (MERSH et al., 1996). Em peixes, alguns autores utilizam, além dos micronúcleos, outros tipos de anormalidades nucleares, denominadas bolha, segmentado, lobado e reniforme (CARRASCO et al., 1990; PACHECO; SANTOS, 1997), considerando o conjunto destas lesões como um biomarcador sensível à toxicidade genética.

O teste de MN é frequentemente empregado em conjunto com a eletroforese em gel de uma única célula (SCGE), comumente chamado de ensaio cometa, para avaliar a genotoxicidade de uma substância ou de alterações do meio ambiente. Essa técnica permite a visualização rápida e a medição de diversos tipos de danos ao DNA ao nível de célula individual. O ensaio cometa sob condições alcalinas permite uma detecção mais sensível de danos ao DNA, incluindo quebras de fita única (SSBs), fita dupla (DSB), sítios lábeis a álcalis que são expressos em quebras de fita simples e quebras de fita simples associadas a reparos por excisão incompleta (SINGH et al., 1988). Sob determinadas condições, o ensaio pode também detectar a reticulação DNA-

DNA e DNA-proteína, que na ausência de outros tipos de lesões do DNA, aparece como uma diminuição relativa da migração de DNA em comparação com os controles simultâneos (HARTMANN et al., 2003).

Tanto a técnica de micronúcleo quanto a de cometa vêm sendo aplicadas no monitoramento biológico, ecológico e nos estudos de danos ao DNA causados pelas genotoxinas em muitos organismos terrestres e aquáticos. Estas técnicas estão dentre as mais utilizadas para estudar genotoxicidade de nanopartículas (LANDSIEDEL et al., 2009). Além disso, o teste de micronúcleo e o ensaio cometa são técnicas firmemente estabelecidas no Laboratório de Ecofisiologia de Peixes do Instituto Oceanográfico da USP, onde o presente estudo foi realizado.

As nanopartículas podem apresentar genotoxicidade causando danos ao DNA indiretamente, através da promoção do estresse oxidativo e resposta inflamatória. Alternativamente, se o tamanho for pequeno o suficiente, elas podem passar através das membranas celulares, tendo acesso ao núcleo, onde podem interagir diretamente com o DNA, causando danos a esta molécula. Além disso, caso as nanopartículas se acumulem dentro de uma célula, mas não necessariamente com acesso ao núcleo, elas ainda podem entrar em contato direto com o DNA durante a mitose, quando o envoltório nuclear se desorganiza, gerando grandes chances do surgimento de aberrações (SINGH et al., 2009). Algumas nanopartículas, incluindo nano-TiO₂, apresentam fotogenotoxicidade, aumentando os danos ao DNA na exposição à radiação ultravioleta (REEVES et al., 2008).

Estudos recentes constataam a citotoxicidade e/ou genotoxicidade causadas pelas nanopartículas em diferentes organismos, desde micro-

organismos (BARRENA et al., 2009), algas (MIAO et al., 2009), invertebrados (GAGNÉ et al., 2008) e vertebrados (WANG et al., 2007; REEVES et al., 2008; BERNARDESCHI et al., 2010). O crescimento da utilização dos produtos e a ampliação da aplicação de nanopartículas, portanto, aumentam o risco de exposição aos seus efeitos tóxicos tanto para os seres humanos como também para o ambiente.

Recentemente, foi encontrada a transferência de nanopartículas através de cadeia alimentar para vários níveis tróficos. Nano-Quantum dots biotinilados foram transferidos entre protozoários e rotíferos (HOLBROOK et al., 2008). Outra evidência de quantum dots foi encontrada em um cadeia simples entre alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e zooplâncton (*Ceriodaphnia dubia*) (BOULDIN et al., 2008). Zhu et al. (2010) encontraram resultados que forneceram uma evidência direta da transferência de nano-TiO₂ em um modelo simplificado de uma cadeia alimentar de água doce, que incluiu um organismo de baixo nível trófico (*Daphnia magna*) e um organismo de alto nível trófico (*Danio rerio*).

Apesar da transferência de nanopartículas através da cadeia trófica ainda não ter sido demonstrada em organismos marinhos, representantes do plâncton e bentos são suscetíveis a esta contaminação. Nanopartículas de prata mostraram-se tóxicas para o fitoplâncton *Thalassiosira weissflogii*, uma espécie marinha de zona costeira. O crescimento de células, atividade fotossintética e a produção celular de clorofila foram severamente afetados por esta nanopartícula (MIAO et al., 2009). Há também a indução de processos inflamatórios em hemócitos de bivalves expostos a nanopartículas de carbono (CANESI et al., 2008). Outra exposição às nanopartículas de carbono e dióxido

de titânio resultou em danos celulares, danos ao DNA e mortalidade de poliquetas (GALLOWAY et al., 2010).

Estudos de nanopartículas no Brasil são bem diversificados, compreendendo as áreas da física (BERNARDI et al. 2009; DA SILVA et al., 2011), química (BRONDANI et al., 2009; BERGAMASCO et al., 2011), medicina (ALVES et al., 2007; SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010; SOUZA et al., 2011) e indústria aplicada (MARCIANO et al., 2009; BINI et al., 2012).

Na área biológica, Pinto et al. (2010) utilizaram o modelo *Saccharomyces cerevisiae* para investigar danos no DNA, reparação e metagênese induzida por nano-TiO₂ associada com radiação ultravioleta B (UVB) *in vitro*, através de amostras de plasmídeos incubados com enzimas Fpg, Nth, XthA, Nfo e T4 endonuclease V e *in vivo*, através da exposição de estirpes do tipo selvagem e mutantes. Os autores observaram que a nano-TiO₂ irradiada com UVB potencializa o efeito oxidativo, gerando danos ao DNA possivelmente por meio das reações de Fenton, envolvendo a produção de danos na base do DNA. Vaz et al. (2011) avaliaram os efeitos de toxicidade aguda de nanopartículas de óxido de cobre no microcrustáceo *Mysidopsis juniae*. Os resultados sugeriram que não houve relação dose-resposta considerável na taxa de mortalidade ou no comportamento adverso dos misidáceos após 96 horas. Britto et al. (2012) investigaram os potenciais riscos de nanomateriais de carbono (fulereno e fullerol) após a exposição à UV da luz solar. Para avaliar os efeitos desses nanomateriais foto-ativados, os autores analisaram parâmetros de estresse oxidativo em brânquias funcionais extraídas do peixe *Cyprinus carpio*. Os resultados mostram que o fullereno pode ser

tóxico, com ou sem a incidência de luz, e a radiação UV parece desempenhar um papel chave na toxicidade ambiental dos nanomateriais de carbono através da formação de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). Resultados preliminares do presente trabalho procederam em um resumo expandido onde Vignardi et al. (2011) avaliaram o potencial genotóxico da nano- TiO_2 no peixe marinho *Trachinotus carolinus*, encontrando genotoxicidade para estes peixes nas dosagens testadas (1,5 e 3,0 μg -nano TiO_2 /grama-de-peixe).

A concentração de nanopartículas na água do mar não foi monitorada, mas a região costeira é considerada como o último depósito de muitas nanopartículas que estão sendo produzidas em larga escala (CANESI et al., 2010). Estas descobertas demonstram que a contaminação por nanopartículas pode causar problemas sérios para os ecossistemas e apontam a necessidade de estudos sobre esta contaminação em organismos marinhos.

Nanopartículas de dióxido de titânio (nano- TiO_2), utilizadas no presente estudo, são uma das nanopartículas artificiais que têm sido amplamente utilizadas como pigmento branco na produção de tintas, papéis, plásticos, materiais de revestimento laminado, soldagem e corante alimentar. São cada vez mais empregadas em outros produtos industriais, como cosméticos e produtos farmacêuticos (BINGHAM et al., 2001; LOMER et al., 2002; GELIS et al., 2003; WANG et al., 2007). Por possuírem propriedades fotocatalíticas, estas nanopartículas também são usadas como desinfetante ambiental e de águas residuais (CHO et al., 2004). Além disso, têm sido aproveitadas na terapia fotodinâmica em carcinoma de células do cólon humano (ZHANG; SUN, 2004).

Neste contexto, a utilização da nano-TiO₂ como ingredientes em produtos domésticos e cosméticos e seu uso em sistemas de tratamento de águas residuais, destaca uma potencial fonte de contaminação ao ambiente aquático (CHO et al., 2004; OGINO et al., 2007), e por ser um produto de ampla utilização na nanotecnologia, provavelmente já esteja presente no ambiente, embora os níveis atuais sejam pouco conhecidos.

Segundo Mueller; Nowack (2008), as estimativas para os níveis de nano-TiO₂, provenientes de diversos materiais (plásticos, cosméticos, tintas, equipamentos esportivos, eletrônicos, etc.), presentes em um ambiente aquático na Suíça, com base em abordagens de modelagem, têm sugerido concentrações entre 0,7-16 µg/L. A modelagem mostra que a concentração de nano-TiO₂ em água pode representar um risco para a vida aquática. Johnson et al. (2011) utilizaram a informação comercial sobre o consumo de protetor solar e taxas de remoção para redes de tratamento de esgoto para as regiões Anglian e Thames no sul da Inglaterra e encontraram 8,8 mg/L como maior valor para a região Thames, supondo-se que uma em cada quatro pessoas usaram a aplicação recomendada de protetor solar durante um período de fluxo baixo de utilização. Kaegi et al. (2008), em um estudo realizado na Suíça, encontraram concentrações tão elevadas quanto 600 µg/L de titânio. Os autores estudaram quantidade de titânio utilizado como pigmento de tinta, provenientes de um escoamento de uma fachada pintada em 2006, e também a quantidade de titânio em um escoamento urbano, mostrando pela primeira vez que partículas de TiO₂ são liberadas em quantidades significativas para o meio aquático.

Nos organismos aquáticos, a citotoxicidade e/ou genotoxicidade da nano-TiO₂ foi observada em algas - *Thalassiosira weissflogii* (MIAO et al., 2009), crustáceos – *Daphnia magna* (LOVERN; KLAPER, 2006), peixes – *Oncorhynchus mykiss* (FEDERICI et al., 2007; VEVERS; JHA, 2008) e *Carassius auratus* (REEVES et al., 2008) e golfinho – *Tursiops truncatus* (BERNARDESCHI et al., 2010).

Os peixes são considerados um bom material para estudo citogenotóxico, pois apresentam vantagens não só por possuírem eritrócitos nucleados, o que possibilita a aplicação de muitas técnicas com amostras sanguíneas sem a necessidade de macerar ou separar enzimaticamente células de tecidos sólidos, mas também porque são bioconcentradores, apresentam resposta a baixas concentrações de poluentes ambientais e geralmente respondem a agentes tóxicos similarmente a vertebrados superiores (STEGEMAN; LECH, 1991; PHAN et al., 2007). Os peixes desempenham importante papel no fluxo de energia dos ecossistemas costeiros (DU PREEZ et al., 1990), além de serem um recurso na alimentação humana de alto valor proteico. Conhecimentos sobre genotoxicidade de poluentes nestes animais são importantes para conservação do ecossistema e da saúde humana.

Os juvenis de pampo, espécie escolhida para o presente trabalho, habitam regiões subtropicais, distribuindo-se no Atlântico ocidental, desde Massachusetts, Estados Unidos, até a costa das Américas Central e do Sul (HOESE; MOORE, 1977). Alimentam-se principalmente de invertebrados como poliquetas, pequenos moluscos, anfípodes, camarões, além de ovos de peixes e pequenos peixes (BERRY; IVERSEN, 1966; BELLINGER; AVAULT, 1971,

HEILMAN; SPIELER, 1999). São encontrados em grande abundância durante os meses de verão (BELLINGER; AVAULT, 1971) nas zonas de arrebentação e, quando adultos, podem ser encontrados na zona nerítica e também em alto mar. Este ciclo de vida torna o peixe vulnerável à poluição costeira e também faz com que ele seja um possível transportador de poluentes entre a região costeira e oceânica. Esta espécie pode tolerar diversas condições ambientais (JORY et al., 1985), é de fácil coleta e manutenção em cativeiro além de ter sido utilizada para estudar a genotoxicidade de diversas substâncias realizadas no Laboratório de Ecofisiologia de Organismos Marinhos (SANTOS et al., 2006).

Dessa forma, resultados obtidos neste trabalho poderão ser uma contribuição para os estudos das nanopartículas em peixes marinhos e ainda servir como base para podermos abordar problemas da interação nanopartículas – organismos – ambiente marinho, como também a transferência de contaminação pela nanopartícula do ambiente costeiro para o ambiente pelágico.

II. OBJETIVOS

II. 1. Objetivo geral:

- Avaliar a genotoxicidade da nano-TiO₂ em juvenis do peixe marinho costeiro *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766), utilizando métodos citogenotóxicos.

II. 2. Objetivos específicos

- Caracterizar a nano-TiO₂ utilizada nos experimentos através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), para mensurar o tamanho da nanopartícula e Difração de Raios X (DRX), para determinar o tamanho do cristalito e a composição das fases.
- Avaliar a viabilidade de eritrócitos de peixes submetidos à injeção intraperitoneal com a dosagem de 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe, 72 horas após a injeção.
- Avaliar, através do ensaio cometa, o nível de dano ao DNA de eritrócitos de peixes submetidos à injeção intraperitoneal com duas dosagens diferentes (1,5 e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe), 24, 48 e 72 horas após a injeção.

- Avaliar a frequência de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares eritrocitárias de peixes submetidos à injeção intraperitoneal com duas dosagens diferentes (1,5 e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$), 24, 48 e 72 horas após a injeção.
- Detectar sob microscópio eletrônico de transmissão possível acumulação de nano- TiO_2 nos tecidos de fígado, rim, músculo e brânquias de peixes submetidos à injeção intraperitoneal com dosagem 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$, 72 horas após a injeção.

III. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo consiste em dois experimentos, denominados experimento 1 e experimento 2. O experimento 1 foi realizado nos meses de abril e maio de 2010 e o experimento 2, repetição do experimento 1, foi realizado nos meses de novembro e dezembro de 2010. Os dois experimentos foram realizados usando os mesmos procedimentos.

III. 1. Material

A espécie utilizada neste estudo, *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766), pertence à família Carangidae, sendo conhecida popularmente no Brasil como pampo, pampo-amarelo, pampo-verdadeiro, cangueiro, pampo-real, dentre outros.

Esta espécie foi escolhida para o presente trabalho por ser um peixe de grande valor comercial e esportivo, possuir ampla distribuição geográfica e exercer um importante papel ecológico.

III. 2. Coleta dos animais

Foram efetuados arrastos paralelos à linha de costa numa profundidade inferior a 1,5m nas praias da Enseada e do Lázaro no município de Ubatuba/SP. Estas praias foram consideradas próprias para banho durante todo o período de coleta (CETESB, 2010).

Foi utilizada uma rede do tipo picaré, com malhagem de 15mm nas bordas e 10mm no centro, nó a nó, a fim de se obter juvenis da espécie. Imediatamente após a captura, os peixes foram selecionados através de uma triagem visual para separação dos indivíduos do gênero *Trachinotus*. O pampo possui o corpo prateado com o dorso cinza azulado, eventualmente apresentando coloração amarela na parte ventral. O corpo é longilíneo e a cabeça exibe uma acentuada curvatura de forma romboide. Possui uma boca protuberante subterminal e pequena, distante dos raios branquiais (BELLINGER; AVAULT, 1971). Após a seleção visual, os pampos foram colocados em tanques de cinquenta litros com água da mesma área de coleta, aerada através de bombas portáteis à pilha e transportados até a base de pesquisa “Clarimundo de Jesus” do IOUSP. Outros organismos coletados juntamente com o pampo foram devolvidos vivos logo após a triagem.

III. 3. Manutenção dos animais

Na base de pesquisa, os peixes foram levados para galpões vinílicos, onde foi realizada a aclimação à temperatura da água a 22°C, temperatura essa mantida durante todo experimento. Após este período, foi efetuada uma segunda seleção para separação de indivíduos da espécie *T. carolinus* e também para seleção de peixes com comprimento médio de 7 cm.

A seguir, os peixes foram transferidos para tanques de 500 litros, com aeração constante. A higienização e renovação da água foram diárias. A água do mar utilizada para a manutenção dos experimentos foi filtrada por 3 filtros, sendo o primeiro de 20 µm, o segundo de 5 µm e o último de 1 µm. Os

indivíduos permaneceram nestas condições por cinco dias antes do início dos experimentos, para redução do estresse de captura e aclimação às condições de cativeiro. Durante este período, foram alimentados *ad libitum* diariamente com ração comercial de composição 45% proteica, conforme as necessidades do gênero (HEILMAN; SPIELER, 1999).

III. 4. Caracterização da nano-TiO₂

III. 4.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A caracterização da nano-TiO₂ foi realizada no laboratório de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB I) e foi executada segundo Patri et al. (2009) com modificações aqui apresentadas.

Para selecionar a melhor suspensão a ser utilizada com nosso material, foram preparadas 4 suspensões de duas concentrações de nano-TiO₂ em álcool e em solução salina fisiológica (g/L: 7,8 NaCl; 0,18 NaCl; 0,166 CaCl₂; 0,095 MgCl₂; 0,084 NaHCO₃; 0,06 NaH₂PO₄), de acordo com Hoar; Hickman Jr., (1967): A) 8 µg-nano-TiO₂/ml em álcool etílico PA; B) 15 µg-nano-TiO₂/ml em álcool etílico PA; C) 8 µg-nano-TiO₂/ml em solução salina; D) 15 µg-TiO₂/ml em solução salina. As suspensões foram ultrassonicadas por 20 minutos em potência de sonicação 4Watts (RMS). Após esse período, com o sonicador (Misonix Inc., modelo XL 2000) ainda em funcionamento, foram retirados 5 µl de cada suspensão e em seguida colocados sobre telas de MET de 200 malhas (mesh) recobertas com lâmina de carbono. As telas então foram armazenadas por 24 horas em câmara seca, a temperatura ambiente, para

evaporação da solução de suspensão. A análise foi feita em um microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol 1010 e Morgani 268D. Foram tomadas eletromicrografias com aumento de 50.000 vezes da suspensão de 15 μg -nano-TiO₂/ml em solução salina (solução D), que apresentou melhores resultados entre as suspensões testadas, disponibilizando um total de 153 nanopartículas aptas a serem analisadas (não sobrepostas ou aglomeradas). O diâmetro foi medido utilizando o programa de análise de imagem Comet Score™ Version 1.5, que possibilitou determinar pelo menos uma dimensão da nanopartícula.

III. 4.2. Difração de raios X (DRX)

As medidas de DRX foram feitas no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da USP. A nano-TiO₂ é um polimorfo, podendo ser encontrada em três fases: rutilo, anatase e bruquita (COSTA et al., 2006). O nanopó comercial utilizado neste estudo (Sigma-Aldrich®, catálogo No. 677469) foi caracterizado por meio da técnica de difração de raios X (Rigaku-X-ray diffractometer, Ultima IV, tipo θ - θ) para identificação das fases e determinação do tamanho dos cristalitos utilizando-se a equação de Scherrer (KLUG; ALEXANDER, 1962). O feixe de raios X, produzido pelo tubo móvel de cobre ($\lambda_{K\alpha} = 0,15418 \text{ nm}$), varreu a amostra variando o ângulo de incidência θ , acoplado ao ângulo de difração 2θ , com passo de $\Delta 2\theta = 0,05^\circ$, tempo de contagem de 10 segundos por passo, a partir de $2\theta_{\min} = 20^\circ$.

III. 5. Injeção de nano-TiO₂

A suspensão utilizada para a injeção foi preparada no mesmo dia da aplicação para evitar possível excesso de aglomeração e contaminação do ambiente. Para a solução salina (solução fisiológica isotônica), utilizou-se água destilada autoclavada, de acordo com protocolo de Hoar; Hickman Jr (1967) para teleósteos marinhos, com pH final 7,4 e temperatura 22°C.

Foram preparadas duas suspensões com 150mg (suspensão 1) e 300 mg (suspensão 2) de nano-TiO₂ em 1 litro de solução fisiológica isotônica e em seguida ultrassonicadas por 20 minutos (4 Watts) para dispersão das nanopartículas.

Para avaliar os efeitos de duas dosagens de 1,5 e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe e de três períodos de exposição 24, 48 e 72 horas, foram utilizados quatro grupos para cada período, composto por cinco peixes cada, sendo dois controles e dois injetados, denominados como controle água (Ctrl H₂O), controle salina (Ctrl Sal), 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂).

No início de cada experimento, os animais foram transferidos para os aquários experimentais com 40 litros de água cada, de forma a garantir 2 litros por grama de peixe, onde permaneceram por 24 horas em jejum. A aeração artificial e a temperatura de 22°C foram mantidas constantes durante todo o período de exposição.

O volume da suspensão injetada foi determinado em função da massa (g) do peixe. Peixes do grupo controle água foram mantidos sem tratamento, ou seja, não foi aplicada nenhuma injeção; nos peixes do grupo controle salina

foi aplicada uma injeção intraperitoneal de 10 µL de solução salina por grama de peixe; nos peixes do grupo 1,5 TiO₂ foi aplicada uma injeção intraperitoneal de 10 µL por grama de peixe da suspensão 1; nos peixes do grupo 3,0 TiO₂ foi aplicada uma injeção intraperitoneal de 10µL por grama de peixe da suspensão 2. As doses selecionadas foram baseadas no trabalho de Scown et al. (2009).

O restante das soluções contendo TiO₂ foi devidamente descartado na fossa séptica construída para esta finalidade na base do Instituto Oceanográfico em Ubatuba.

III. 6. Coleta de material biológico

No fim de cada período de exposição de 24, 48 e 72 horas, o sangue dos animais foi coletado através do ducto de Cuvier ou por punção cardíaca, com auxílio de agulhas e seringas descartáveis, para o ensaio cometa e teste de micronúcleos e outras anormalidades nucleares eritrocitárias.

Os animais foram então espinhados, com consequente ruptura do sistema nervoso central e foram tomadas as medidas de peso total (g) e comprimento total (cm).

III. 7. Viabilidade de eritrócitos

Para a avaliação da viabilidade dos eritrócitos utilizados nos experimentos citogenotóxicos e para validar os resultados obtidos, foram utilizados três grupos de 5 peixes cada para o teste de exclusão de azul de

tripano. Peixes de um grupo foram injetados com dosagem de 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2$ /grama-de-peixe. Peixes dos outros dois grupos foram utilizados como controle água e controle salina. Após um período de exposição de 72 horas, uma amostra de sangue de cada peixe foi coletada e diluída em 1 ml de tampão fosfato salino (PBS g/L: 8 NaCl, 0,2 KCl, 3,58 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,24 KH_2PO_4 , pH 7,4) e em seguida centrifugada com um centrifugador clínico por 4 minutos à 3000 rpm. O sobrenadante foi removido e foi adicionado um volume de PBS equivalente ao volume do sangue, misturando delicadamente para ressuspensão das células. Prontamente foi adicionado um volume de corante azul de tripano a 4% equivalente ao volume da suspensão do sangue com PBS. Aguardaram-se 2 minutos para haver tempo hábil do corante entrar nas células com membranas danificadas. A seguir, alíquotas de 5 μl da suspensão de cada peixe foram pipetadas em câmara de Neubauer e após a decantação das células, foi realizada a contagem de 300 células, que foram classificadas como coradas (rompidas) e não coradas (intactas). Os resultados foram apresentados em porcentagem. A contagem foi realizada dentro de 5 minutos, contados a partir do carregamento da câmara de Neubauer.

Imediatamente após a coleta de sangue, os peixes foram sacrificados e tecidos de rim, fígado, músculo e brânquias foram coletados e preservados para a realização da análise de detecção de titânio através da MET, no laboratório de Anatomia do ICB-USP.

III. 8. Controle positivo

O peróxido de hidrogênio, mais conhecido como água oxigenada (H_2O_2), foi escolhido como substância genotóxica para realizar o controle positivo do ensaio cometa em juvenis de pampo (*T. carolinus*), sendo uma substância utilizada rotineiramente em nosso laboratório para essa finalidade. A suspensão de sangue utilizada neste teste é proveniente dos peixes do grupo controle água (Ctrl H_2O) do experimento 1.

A exposição ao H_2O_2 30% diluído em PBS até as concentrações finais de 10 e 20 μM foi feita nas células já incluídas em agarose, diretamente nas lâminas de vidro, antes de serem submetidas à etapa de lise do ensaio cometa, conforme descrito por Wojewódzka et al. (2002). Cada lâmina recebeu uma quantidade suficiente de peróxido para cobrir toda a sua superfície e a incubação ocorreu no escuro, à temperatura de 4°C por 30 minutos. Ao término do período de exposição, as lâminas foram lavadas por 10 vezes com PBS em abundância.

Após esta etapa, as lâminas foram submetidas ao restante do procedimento do ensaio cometa, conforme descrito na seção III.9.

III. 9. Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado conforme descrito por Singh et al. (1988) com modificações baseadas nos protocolos de Tice et al. (2000) e Gontijo; Tice (2003).

III. 9.1. Preparação das lâminas e coleta de sangue

Lâminas de vidro lisas com extremidade fosca foram devidamente limpas e imersas em álcool etílico por alguns minutos e secas com panos absorventes. Agarose de ponto de fusão normal (NMP) foi dissolvida em água destilada na concentração de 1,5% e colocada em chapa com aquecimento para sua completa dissolução. Esta solução foi utilizada para confeccionar a primeira camada de gel a ser aplicada nas lâminas. A primeira camada é necessária, pois atua como base para melhor adesão da segunda camada nas lâminas, que contém o material celular. Como esta agarose apresenta endurecimento total por volta de 37°C, esta solução foi mantida em banho-maria em temperatura de 60°C para seu uso.

Para fazer a primeira camada, cada lâmina foi mantida sobre chapa com aquecimento moderado. Foram colocados 200 µL da solução de agarose (NMP) sobre cada lâmina e espalhados ao longo desta com auxílio de outra lâmina de vidro lapidada, em fina camada. As lâminas com a primeira camada foram secas em temperatura ambiente por pelo menos 24 horas sobre uma superfície plana e horizontal.

Imediatamente após o término de cada período experimental, 10 microlitros de sangue foram coletados de cada peixe, diluídos em 1 ml de tampão fosfato salino (PBS, pH 7.4) e refrigerados, obtendo-se a suspensão celular eritrocitária de cada indivíduo. Durante os procedimentos de manipulação do material celular, foi evitada a iluminação natural e de lâmpadas fluorescentes, para que não houvesse a radiação de ondas de comprimento ultravioleta. A temperatura do laboratório foi mantida entre 17 a 19°C. Toda a

suspensão celular, bem como as soluções utilizadas, foram mantidas resfriadas a 4°C na geladeira ou sobre gelo durante a manipulação do material.

Para a preparação da solução da segunda camada, agarose de baixo ponto de fusão (LMP) foi dissolvida em PBS na concentração de 1,0 %, em chapa com aquecimento para sua completa dissolução e mantida por cerca de 20 minutos em banho-maria a 37°C, temperatura que mantém o gel líquido.

Da suspensão de células sanguíneas em PBS, 20 µL foram diluídos em 120 µL de agarose LMP e 120 µL desta solução foram depositados sobre a lâmina revestida com a primeira camada. Em seguida, uma lamínula de vidro (24X60mm) foi delicadamente colocada sobre o gel, espalhando-o por toda extensão da lâmina, formando a segunda camada. As lâminas com a segunda camada foram dispostas horizontalmente em uma bandeja e colocadas na geladeira (4°C) por 20 minutos para o endurecimento do gel. As lamínulas foram, então, delicadamente retiradas. Foram confeccionadas três lâminas por peixe.

III. 9.2. Lise

Foi utilizada uma solução de lise gelada, contendo alta concentração de sais e de detergente (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10; Triton X-100 e DMSO 10% adicionados logo antes do uso). As lâminas foram dispostas verticalmente em uma cubeta de vidro e cobertas com solução de lise gelada e mantidas imersas a 4°C por duas horas. Com este procedimento, as membranas das células sanguíneas, do núcleo e organelas foram rompidas

e os componentes citoplasmáticos e proteínas nucleares foram dissolvidos e retirados.

Ao término da lise, as lâminas foram retiradas da solução e dispostas inclinadas em uma bandeja forrada com papel absorvente para escorrer o excesso da solução. Em seguida, foram lavadas com água destilada gelada para completa remoção da solução de lise e dos componentes celulares indesejáveis para a realização do ensaio.

III. 9.3. Relaxamento do DNA

As lâminas foram então dispostas na própria cuba eletroforética e imersas por 5 minutos em solução refrigerada a 4°C de tampão alcalino de eletroforese pH>13 (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM), para o desenrolamento ou relaxamento do DNA.

III. 9.4. Eletroforese

Finalizada a etapa do relaxamento do DNA, as lâminas foram então submetidas à eletroforese. A cuba, construída em nosso laboratório, possui 25 cm de distância entre os eletrodos, de forma a ser utilizado aproximadamente 450 mL de tampão. A voltagem foi ajustada a 20 V (0,80V/cm) e amperagem a 300 mA, com tempo de corrida de 20 minutos. Ao término da eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e dispostas inclinadas para escorrer em uma bandeja forrada com papel absorvente, por cerca de um minuto.

III. 9.5. Neutralização

A neutralização das lâminas foi feita em seguida, por imersão de 15 minutos em tampão neutro (Tris 0,4 M, pH 7,5) gelado, de forma a recobrir todo o gel da lâmina. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes de 5 minutos cada e em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada para, ao final, serem submersas em solução de etanol 100% a 4°C e colocadas para secar em temperatura ambiente por cerca de duas horas.

III. 9.6. Coloração por prata

A coloração por prata foi baseada no protocolo descrito por García et al. (2004). As lâminas foram dispostas em uma cubeta de vidro preenchida com solução de fixação (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5%, glicerol 5%) durante 10 minutos, em seguida lavadas três vezes com água destilada por 1 minuto cada e colocadas para secar em temperatura ambiente por pelo menos 24 horas. Para a coloração, todas as soluções foram pré-aquecidas a 37°C e mantidas nesta temperatura durante todo o processo. As lâminas foram hidratadas por imersão em cubeta com água destilada na mesma temperatura das soluções por 2 minutos.

A solução trabalho de coloração foi preparada imediatamente antes do uso, sendo obtida através das soluções estoque, misturando com vigorosa agitação 34 mL de solução de carbonato de sódio 5%, com 66 mL de solução de nitrato de prata (nitrato de amônio 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido tungstosilícico 0,25%, formaldeído 0,15%). As lâminas foram imediatamente

cobertas por esta solução trabalho de coloração e mantidas em banho-maria a 37°C, ao abrigo da luz, por cerca de 2 minutos. Após este período, a intensidade da coloração foi monitorada ao microscópio óptico até que os cometas se apresentassem corados. Assim que a coloração dos cometas atingiu a intensidade desejada, as lâminas foram colocadas horizontalmente em um suporte apropriado para realização do processo de interrupção.

As lâminas foram então cobertas por uma solução de ácido acético 1% por 5 minutos e em seguida dispostas em uma cubeta para serem lavadas com água destilada por 5 minutos. Finalizado o procedimento, as lâminas foram colocadas para secar por completo, em temperatura ambiente, por pelo menos 24 horas.

III. 9.7. Análise dos cometas

No laboratório, as lâminas confeccionadas em trabalho de campo foram examinadas ao microscópio óptico de luz e os cometas de duas lâminas por peixe foram fotografados em aumento de 200X para análise dos danos causados ao DNA. Para cada peixe, um total de 100 células foi aleatoriamente analisado, de modo a percorrer toda a lâmina. Entretanto, cometas junto à margem das lâminas e cometas próximos ou junto à bolhas de ar foram evitados, por serem regiões onde as migrações durante a eletroforese podem ocorrer de maneira irregular.

No ensaio cometa, para a interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido em duas partes: cabeça e cauda. A partir do núcleo, fragmentos de DNA migram no sentido do anodo durante a eletroforese. Quanto mais intensa

for a quebra, menor será o tamanho dos fragmentos e maior a extensão da migração e, por consequência, maior o comprimento da cauda e menor a cabeça. Desta forma, para analisar os danos causados ao DNA, é possível utilizar um esquema no qual os cometas obtidos são classificados em função do tamanho da cabeça e comprimento e largura da cauda. Neste trabalho, os cometas foram classificados em cinco classes enumeradas de 0 a 4, conforme descritas por Gomes et al. (2012). Nesta classificação, a classe 0 corresponde aos cometas considerados intactos, sem danos causados pela substância, e a classe 4 corresponde aos cometas com danos máximos (Figura 2). O número de cometas de cada classe é contado para cada peixe, e o Índice de Dano (ID) foi calculado como a somatória dos produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe (n) e o dígito denominador da classe (0, 1, 2, 3 e 4).

$$\text{Índice de Dano (ID)} = 0 (\text{n Classe 0}) + 1 (\text{n Classe 1}) + 2 (\text{n Classe 2}) + 3 (\text{n Classe 3}) + 4 (\text{n Classe 4}).$$

O valor do ID, assim, varia de 0, nos peixes com DNA de todos os cometas intactos, a 400, nos peixes com DNA de todos os cometas danificados ao máximo.

Figura 2: Catálogo de classes de danos de cometas de pampas: Classe 0: Intacto; Classe 1: Pouco danificado; Classe 2: Danificado; Classe 3: Muito danificado; Classe 4: Severamente danificado. Fotos: Caroline Patrício Vignardi.

Nos cometas, os danos ao DNA foram também aferidos utilizando um programa de análise de imagem, Comet Score™ Version 1.5, disponibilizado na página www.autocomet.com, pela Tri Tek Corporation. Para cada cometa, o programa analisa 17 parâmetros relacionados ao dano no DNA, dos quais os três mais utilizados na literatura, o comprimento do cometa, a porcentagem de DNA na cauda e o momento da cauda foram selecionados para serem apresentados neste trabalho. Para cada peixe foi analisado um total de 50 cometas.

III. 10. Teste de Micronúcleo (MN) e outras Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE)

Após os períodos de exposições, o sangue foi imediatamente coletado dos animais através do ducto de Cuvier ou por punção cardíaca com auxílio de agulhas e seringas descartáveis. Com este tecido, foram feitas duas lâminas de esfregaço por peixe, com auxílio de uma lamínula de câmara de Newbauer lapidada.

Imediatamente após a confecção, as lâminas foram secas rapidamente com ajuda de um pequeno ventilador, fixadas em metanol absoluto por 10 minutos e colocadas para secar à temperatura ambiente.

Para a coloração, as lâminas foram colocadas em um suporte apropriado e foram cobertas por solução Giemsa 10%, preparada no ato, por 40 minutos. Em seguida, escoou-se o corante e as lâminas foram rapidamente submersas em água destilada por três vezes para retirar o

excesso do corante, secas ao ar e posteriormente recodificadas e analisadas aleatoriamente sob fotomicroscópio, com um aumento de 1000X.

As lâminas foram analisadas para a obtenção da frequência de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares eritrocitárias (Figura 3). Micronúcleo (MN) apresenta-se como um pequeno corpo não refringente contendo DNA, localizado no citoplasma, de cor e forma semelhantes às do núcleo, mas sem ligação com o mesmo. Ocorrem devido à ruptura cromossômica e disfunção do fuso. As outras anormalidades nucleares eritrocitárias analisadas são: Reniforme (R), que apresenta forma semelhante a um rim; Lobado (L), no qual o núcleo é dividido em dois lobos, Segmentado (S), que apresenta o núcleo separado por uma constrição em partes não necessariamente do mesmo tamanho e Bolha (B), que apresenta uma evaginação relativamente pequena do envelope nuclear (CARRASCO et al., 1990; PHAN et al., 2007).

Figura 3: Catálogo de MN e outras Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE), sendo A: normal, B: micronúcleo, C: reniforme, D: lobado, E: segmentado, F: bolha. Fotos: Caroline Patrício Vignardi.

Foram examinados 1000 eritrócitos de cada peixe e os dados obtidos foram utilizados para calcular a frequência (%) de micronúcleos e de anormalidades nucleares encontradas, conforme as fórmulas:

Frequência de MN = $f(\text{MN}) = \text{MN}/1000$

Frequência de R = $f(\text{R}) = \text{R}/1000$

Frequência de L = $f(\text{L}) = \text{L}/1000$

Frequência de S = $f(\text{S}) = \text{S}/1000$

Frequência de B = $f(\text{B}) = \text{B}/1000$

Frequência de ANE = $f(\text{ANE}) = (\text{MN} + \text{R} + \text{L} + \text{S} + \text{B})/1000$

onde: MN, R, L, S e B são, respectivamente, número de micronúcleos, reniformes, lobados, segmentados e bolhas, encontrados em 1000 eritrócitos examinados.

As fotografias e análises foram realizadas no laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP (Pirassununga/SP).

III. 11. Detecção da nano-TiO₂ nos tecidos

Esta análise foi realizada no laboratório de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB I). Para observação e detecção da nano-TiO₂ no interior dos tecidos, utilizamos material de peixes provenientes do teste de viabilidade de eritrócitos (seção III. 7.).

Imediatamente após a coleta de sangue para este teste, os animais foram espinhados, com consequente ruptura do sistema nervoso central, e tecidos de rim, fígado, músculo e brânquia foram coletados e fixados em solução glutaraldeído 3% em solução tampão fosfato de sódio a 0,1M e pH 7,4.

Os fragmentos foram seccionados e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 2% em tampão fosfato de sódio durante 2 horas a 4°C.

Em seguida, foram lavados com solução salina 0,9%. Após este procedimento, foram colocados em solução aquosa de acetato de uranila a 0,5% overnight. A seguir, os tecidos foram desidratados em séries crescentes de alcoóis a partir de 50% até o absoluto e iniciou-se a infiltração em resina Spurr na proporção de 1:2 (Spurr:etanol) durante 3 horas, 1:1 overnight, 3:1 por 3 horas e resina pura overnight, à temperatura ambiente. Após este período, novamente trocou-se a resina colocando resina pura, permanecendo em estufa a 37°C por 1 hora. Ao término deste processo, foi feita a inclusão do material, ficando na estufa por 24 horas a 60-70°C.

Após a polimerização, foi feita a trimagem dos blocos e obtidos cortes semifinos de 1-3 µm em ultramicrotomo Reichert Ultra Cut utilizando faca de vidro. As secções foram coradas em azul de toluidina para o exame ao microscópio de luz e localização das áreas de interesse. Os cortes ultrafinos de 60 nm de espessura foram obtidos com faca de diamante e coletados em telas de 200 malhas (mesh). Em seguida, as telas foram contrastadas com a solução de acetato de uranila 4% e citrato de chumbo 0,4%, examinadas e capturadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010 e Morgani 268D.

III. 12. Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas, foram utilizados testes ANOVA não paramétricos de Kruskal-Wallis para verificar se existe ou não diferença entre os grupos e testes de comparação múltipla de Duncan (ZAR, 1996) para identificar os grupos com diferenças.

Para avaliar a possibilidade de juntar os dados dos grupos de tratamentos correspondentes do experimento 1 e do experimento 2, a homogeneidade de variância dos dados de micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocitárias e dados de ensaio cometa foram verificados pelo teste de Qui-quadrado e teste de Levene, respectivamente (PARKER, 1979).

As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV. 1. Caracterização da nano-TiO₂

IV. 1.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A distribuição da porcentagem de ocorrência de diferentes tamanhos das nano-TiO₂ utilizadas neste trabalho está na figura 4. A distribuição é monomodal, com 80% das nanopartículas analisadas apresentando tamanho no intervalo de 11 e 40 nanômetros; 27% dentro de 11-20 nm, 26% compreendendo de 21-30nm e 27% de 31-40 nm. A média total dos tamanhos encontrados foi 30, 97 nm.

Figura 4: Histograma da distribuição em função de tamanhos das nano-TiO₂ utilizadas neste trabalho.

A ilustração das nano-TiO₂ utilizadas neste trabalho está apresentada na figura 5. A suspensão foi ultrassonicada em solução salina (15 µg/ml) e as

fotomicrografias foram capturadas através de microscópio eletrônico de transmissão. Nestas condições, as nanopartículas encontram-se na forma isolada, denominada partícula primária, e na forma de aglomerados/agregados, consideradas como um conjunto de partículas que são mantidas juntas por forças fracas e fortes, incluindo van der Waals e forças eletrostáticas (OBERDÖRSTER et al., 2005).

Figura 5: Eletromicrografia de nano-TiO₂ ultrassonicadas em solução salina (15 µg/ml) em aumento de 50.000 vezes.

IV. 1.2. Difração de raios X (DRX)

O difratograma de raios X da nano-TiO₂, apresentado na figura 6 A, mostra a formação da fase cristalina anatase (54,61%) e rutilo (45,39%), cujos picos de difração correspondentes estão identificados no difratograma da figura 6 B. Estão presentes as duas fases, sendo o primeiro pico de difração a fase anatase e o segundo pico a fase rutilo.

De acordo com a equação de Scherrer (KLUG; ALEXANDER, 1962), quanto maior a largura a meia altura, menor o tamanho do cristalito. Neste contexto, pode-se observar que os resultados obtidos exibem picos de difração que mostraram considerável alargamento, indicando, assim, a característica nanométrica das partículas do nanopó de TiO_2 . O tamanho de cristalito médio calculado usando-se a equação de Scherrer foi 65 nm para rutilo e de 32 nm para anatase.

Figura 6 A: Difratoograma de raios X da amostra de nano- TiO_2 utilizada no presente estudo.

Figura 6 B: Destaque do resultado apresentado na figura 40A, referente aos picos de difração correspondentes as fases rutilo e anatase.

IV. 2. Viabilidade de eritrócitos

Os resultados encontrados para a viabilidade de eritrócitos estão apresentados na figura 7. Em todos os tratamentos, a porcentagem de eritrócitos considerados viáveis (intactos) foi superior a 80%. Não houve diferença significativa entre a viabilidade de eritrócitos dos grupos controles. A viabilidade de eritrócitos do grupo injetado com a dosagem de 3,0 μg -nano- TiO_2 /grama-de-peixe, no entanto, foi significativamente menor ($p < 0,01$) em comparação com a viabilidade de eritrócitos dos controles.

Figura 7: Porcentagem de eritrócitos viáveis encontrados nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com a dosagem de 3,0 μg -nano- TiO_2 /grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Asterisco indica diferença significativa ($p < 0,01$).

IV. 3. Controle positivo

Os resultados da exposição *in vitro* ao peróxido de hidrogênio foram analisados através do programa Comet Score™ Version 1.5. Dos dezesseis parâmetros gerados pelo programa, foram escolhidos o comprimento da cauda (μm), % de DNA na cauda e momento da cauda para avaliar o efeito da exposição em função dos tratamentos e os resultados foram apresentados nas figuras 8, 9 e 10, respectivamente. Foram utilizadas duas concentrações de 10 e 20 μM de solução perhidrol 30%, e o controle.

A variação do comprimento caudal em função dos tratamentos está apresentada na figura 8. Não houve diferença significativa entre comprimento caudal do controle (Ctrl) e o comprimento caudal da concentração 10 μM . O comprimento caudal da concentração 20 μM foi significativamente maior que o comprimento caudal do controle e da concentração 10 μM ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente).

Figura 8: Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas das lâminas utilizadas como controle (Ctrl) e das lâminas expostas à H_2O_2 nas concentrações de 10 μM e 20 μM . Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Podemos observar na figura 9 que as % de DNA caudal das concentrações 10 μ M e 20 M foram significativamente maiores ($p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente) que a % de DNA caudal do controle. A % de DNA caudal da maior concentração foi significativamente maior ($p<0,05$) que a % de DNA caudal da menor concentração.

Figura 9: Média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas das lâminas utilizadas como controle (Ctrl) e das lâminas expostas à H_2O_2 nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Não houve diferença significativa entre o momento caudal do controle e a concentração 10 μM (figura 10). O momento caudal da concentração 20 μM foi significativamente maior ($p < 0,01$) que o momento caudal do controle e o momento caudal da concentração 10 μM .

Figura 10: Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas das lâminas utilizadas como controle (Ctrl) e das lâminas expostas à H_2O_2 nas concentrações de 10 μM e 20 μM . Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

IV. 4. Ensaios genotóxicos

Os resultados dos dois experimentos realizados (experimento 1 e experimento 2) para a avaliação da genotoxicidade estão apresentados separadamente devido à heterogeneidade de variância dos dados de parâmetros correspondentes nos seguintes tratamentos:

Tratamentos:	Parâmetros discrepantes entre as amostras:
Controle água 24 horas:	ID, MN e ANE
Controle água 48 horas:	Comprimento caudal e momento caudal
Controle água 72 horas:	Comprimento caudal
Controle salina 48 horas:	Comprimento caudal e momento caudal
Controle salina 72 horas:	MN e ANE
1,5 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe 24 horas:	MN e ANE
1,5 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe 48 horas:	% de DNA caudal
1,5 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe 72 horas:	% de DNA caudal
3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe 24 horas:	% de DNA caudal, momento caudal
3,0 µg-nano-TiO ₂ /grama-de-peixe 72 horas:	% de DNA caudal, momento caudal

Experimento 1

Não foram observados óbitos em nenhum tratamento do experimento. As médias do comprimento total e as médias do peso dos indivíduos de todos os grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas. A média do comprimento total de todos os indivíduos foi de 8,71 cm ($\pm 0,86$) e a média do peso foi de 7,77 g ($\pm 2,34$). As médias da temperatura da água foi 22°C com flutuação de ± 1 , salinidade 35, teor de oxigênio 5,77 mg/L ($\pm 0,08$), pH 8.0 com flutuação de $\pm 0,5$, durante o experimento.

IV. 4.1. Ensaio Cometa

IV. 4.1.1. Índice de Dano (ID)

IV. 4.1.1.a. Efeitos das dosagens

Os danos ao DNA causados pelas nano-TiO₂ mensurados pelo Índice de Dano (ID) nas 24, 48 e 72 horas de exposição estão apresentados nas figuras 11, 12 e 13, respectivamente. Em todos os períodos, as diferenças entre os IDs do controle água (Ctrl H₂O) e os IDs do controle salina (Ctrl Sal) não foram significativas.

No período de 24 horas (figura 11), não houve diferença significativa entre os controles. Os IDs dos grupos injetados apresentaram maior valor em relação aos dos controles. O ID da dosagem 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foi significativamente maior ($p<0,05$) que o ID dos demais tratamentos. A figura mostra uma clara tendência de um aumento gradual e dependente da dosagem.

Figura 11. Média e desvio padrão dos IDs dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos grupos injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

No período de 48 horas, como mostra a figura 12, não houve diferença significativa entre os controles como também entre os grupos injetados. Os IDs dos grupos injetados (1,5 TiO_2 e 3,0 TiO_2) foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que os IDs dos grupos controles (Ctrl H_2O e Ctrl Sal).

Figura 12. Média e desvio padrão dos IDs dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H_2O) e salina (Ctrl Sal) e dos grupos injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO_2) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO_2) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

No período de 72 horas, as diferenças entre os IDs dos grupos injetados e os IDs dos controles são menos marcantes. Foi somente observada diferença significativa entre o ID do grupo injetado com 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{g-peixe}$ e o ID do grupo controle água (figura 13).

Figura 13. Média e desvio padrão dos IDs dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos grupos injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

IV. 4.1.1.b. Efeitos dos períodos de exposição

A variação das médias dos IDs dos grupos de mesmo tratamento em diferentes períodos de exposição está apresentada na figura 14.

Os IDs dos controles água e salina não apresentaram diferença significativa entre os períodos de exposição 24, 48 e 72 horas. O ID do grupo injetado com 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ apresentou um aumento

significativo ($p < 0,05$) nas 48 horas em relação às 24 horas. Nas 72 horas, o ID do mesmo grupo apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,01$) em relação ao ID nas 48 horas, chegando ao nível do ID de 24 horas e ID dos controles.

O ID do grupo injetado com $3,0 \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$, nas 48 horas, apresentou uma queda não significativa comparando com ID do mesmo grupo nas 24 horas. Nas 72 horas, o ID deste grupo caiu ao nível significativamente menor de ID do grupo nas 48 horas ($p < 0,05$) e do grupo nas 24 horas ($p < 0,01$).

Figura 14. Variação da média e desvio padrão dos IDs dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 ($1,5 \text{ TiO}_2$) e $3,0 \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ ($3,0 \text{ TiO}_2$). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

IV. 4.1.2. Análise de Imagem

Através do programa Comet Score™ Version 1.5, mensuramos o comprimento caudal (μm), % de DNA caudal e momento caudal. Esses parâmetros estão dentre os mais utilizados na literatura.

IV. 4.1.2.a. Efeitos das Dosagens

Os resultados referentes ao período de 24 horas dos três parâmetros acima mencionados estão apresentados nas figuras 15, 16 e 17, respectivamente.

Após 24 horas, o comprimento caudal dos grupos controles não apresentou diferença significativa entre si. O comprimento caudal dos grupos utilizados como controles (Ctrl H₂O e Ctrl Sal) foi significativamente menor ($p<0,001$) que o dos grupos injetados. O comprimento caudal do grupo injetado com a dosagem 3,0 $\mu\text{g-nanoTiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foi significativamente maior ($p<0,001$) que o comprimento caudal do grupo injetado com 1,5 $\mu\text{g-nanoTiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 15).

Figura 15: Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Após 24 horas, a porcentagem de DNA caudal dos controles não foi significativamente diferente entre si. A % de DNA caudal dos grupos injetados apresentou um valor significativamente maior ($p < 0,001$) que os valores dos controles. A % DNA caudal do grupo injetado com dosagem 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foi significativamente maior ($p < 0,01$) que a do grupo injetado com a dosagem 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 16).

Figura 16: Média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Após 24 horas, não foi observada diferença significativa entre o momento caudal dos controles. O momento caudal dos controles (Ctrl H₂O e Ctrl Sal) foi significativamente ($p < 0,001$) menor que o momento caudal dos grupos injetados. O momento caudal do grupo injetado com a maior dosagem foi significativamente maior ($p < 0,001$) que o momento caudal do grupo injetado com 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (figura 17).

Figura 17: Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A variação das médias do comprimento caudal, % de DNA caudal e do momento caudal, no período de 48 horas, está apresentada nas figuras 18, 19 e 20, respectivamente.

Após 48 horas, não foi observada diferença significativa entre os grupos injetados como também entre os controles. O comprimento caudal (μm) dos grupos utilizados como controles (Ctrl H₂O e Ctrl Sal) foi significativamente menor ($p < 0,001$) que o comprimento caudal dos grupos injetados com as dosagens 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 18).

Figura 18: Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Após 48 horas, não foi observada diferença significativa entre a % de DNA caudal dos grupos controles como também entre os grupos injetados. Os grupos injetados apresentaram uma % de DNA caudal significativamente maior ($p < 0,001$) que a % de DNA caudal dos grupos controles (figura 19).

Figura 19: Média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos os peixes injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Após 48 horas, não foi observada diferença significativa entre o momento caudal dos controles como também entre o mesmo parâmetro nos grupos injetados. O momento caudal dos controles (Ctrl H₂O e Ctrl Sal) foi significativamente menor ($p < 0,0001$) que o momento caudal dos grupos injetados (figura 20).

Figura 20: Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A variação das médias do comprimento caudal, % de DNA caudal e momento caudal dos grupos com tratamentos diferentes, no período de 72 horas, está apresentada nas figuras 21, 22 e 23, respectivamente.

Após 72 horas, o comprimento caudal dos grupos injetados (1,5 TiO₂ e 3,0 TiO₂) foi significativamente maior ($p<0,01$) que o comprimento caudal do grupo controle água (Ctrl H₂O). Não foi observada diferença significativa no comprimento caudal entre o grupo injetado com a dosagem de 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe e grupo controle salina. A maior dosagem (3,0 TiO₂) apresentou comprimento caudal significativamente maior ($p<0,05$) em relação ao comprimento caudal dos demais tratamentos (figura 21).

Figura 21: Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Nas 72 horas, a % de DNA caudal do grupo controle salina mostrou um aumento significativo ($p<0,001$) em relação à do controle água. A % de DNA caudal dos grupos injetados foi significativamente maior ($p<0,05$) que a do grupo controle água. A % de DNA caudal do grupo injetado com dosagem 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foi significativamente maior ($p<0,05$) que a dos grupos controles água e salina. Não há diferença significativa entre % de DNA caudal dos grupos injetados (figura 22).

Figura 22: Média e desvio padrão da porcentagem de DNA caudal dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Nas 72 horas, o momento caudal do grupo controle salina mostrou um aumento não significativo em relação ao do controle água. O momento caudal dos grupos injetados foi significativamente maior ($p<0,05$) que o do grupo controle água. Não há diferença significativa no momento caudal entre o grupo injetado com dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ e grupo controle salina. O momento caudal do grupo injetado com 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ é significativamente maior que o momento caudal de todos os outros grupos (figura 23).

Figura 23: Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos peixes utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos peixes injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

IV. 4.1.2.b. Efeitos dos períodos de exposição

A variação das médias do comprimento caudal dos grupos de mesmo tratamento, nos diferentes períodos de exposição, está na figura 24.

O comprimento caudal dos grupos controle água não apresentou diferença significativa em relação aos períodos de exposição. O comprimento caudal do grupo controle salina apresentou diferença significativa ($p<0,01$) em relação a todos os períodos de exposição, com o período de 72 horas apresentando maior valor. O comprimento caudal dos grupos injetados com 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ demonstrou uma diminuição significativa ($p<0,01$) no grupo de 72 horas em relação aos grupos de 24 e 48 horas de exposição. O comprimento caudal dos grupos injetados com 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ demonstrou uma diminuição significativa ($p<0,05$) no grupo de 72 horas em relação ao grupo de 24 horas de exposição.

Figura 24. Variação da média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos grupos de mesmo tratamento em função dos períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

A variação das médias da % de DNA caudal dos grupos de mesmo tratamento, nos períodos de exposição diferentes, está apresentada na figura 25. Não há diferença significativa na % de DNA caudal entre os grupos controle água e entre os grupos injetados com a dosagem de 3,0 $\mu\text{g/g}$ -nanoTiO₂/grama-de-peixe em relação aos períodos de exposição. A % de DNA caudal dos grupos controle salina mostrou um aumento significativo ($p < 0,001$) no período de 72 horas em relação aos de 24 e 48 horas. A % de DNA caudal do grupo injetado com a dosagem 1,5 μg -nano-TiO₂/grama-de-peixe foi significativamente maior ($p < 0,001$) nos períodos de 48 e 72 horas em comparação ao período de 24 horas.

Figura 25. Variação de média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 μg -nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

As médias do momento caudal dos grupos de mesmo tratamento em diferentes períodos de exposição estão apresentadas na figura 26. Não foi observada diferença significativa entre os períodos de exposição nos grupos controle água (Ctrl H₂O). O momento caudal dos grupos controle salina (Ctrl Sal) mostrou um aumento significativo ($p<0,001$) no período de 72 horas em relação aos períodos de 24 e 48 horas. Nos grupos injetados com a dosagem 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe, o momento caudal no período de 48 horas foi significativamente maior ($p<0,05$) em relação aos demais períodos. O momento caudal dos grupos injetados com a dosagem de 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe, nas 24 horas, apresentou uma diminuição significativa ($p<0,05$) em relação ao momento caudal dos grupos expostos por 48 e 72 horas.

Figura 26. Variação de média e desvio padrão de momento caudal dos cometas dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

IV. 4.2. Teste de Micronúcleo (MN) e outras Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE)

IV. 4.2.a. Efeitos das dosagens

As frequências (‰) de anormalidades nucleares eritrocitárias encontradas em todos os tratamentos nos períodos de exposição de 24, 48 e 72 horas estão apresentadas nas figuras 27 A e B, 28 A e B e 29 A e B, respectivamente.

No período de 24 horas (figura 27 A), não foi observada diferença significativa na frequência de ANE entre os grupos controles. A frequência de ANE dos grupos injetados foi significativamente maior ($p < 0,001$) que a frequência dos grupos controles. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) apresentou uma frequência de ANE significativamente maior ($p < 0,001$) que a frequência do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$.

A frequência de MN não apresentou diferença significativa entre os controles. A frequência do grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) mostrou um aumento significativo ($p < 0,01$) em relação a mesma frequência dos grupos controles e do grupo injetado com a dosagem 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$. A frequência do grupo injetado com 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ não apresentou diferença significativa em relação a frequência dos controles (figura 27 B).

A frequência de núcleos lobados não apresentou diferença significativa entre os controles. A frequência de núcleos lobados do grupo injetado com a

maior dosagem (3,0 TiO_2) mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação a frequência dos grupos controles e a frequência do grupo injetado com a dosagem 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$. O grupo injetado com 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ não apresentou diferença significativa com as frequências dos controles (figura 27 B).

A frequência de núcleos segmentados não revelou diferença significativa entre os controles. As frequências dos grupos injetados com as dosagens 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foram significativamente maiores ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) que as frequências dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) apresentou uma frequência de núcleos segmentados significativamente maior ($p < 0,001$) que a frequência do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 27 B).

As frequências de núcleos reniformes e núcleos bolhas não revelaram diferença significativa entre os controles. As frequências dos grupos injetados foram significativamente maiores ($p < 0,001$) que as frequências dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) apresentou uma frequência de núcleos reniformes e bolhas significativamente maior ($p < 0,001$) que a frequência do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 27 A).

Figura 27 A: Frequências de anormalidades nucleares eritrocitárias e de seus componentes encontradas nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. ANE=Anormalidade Nuclear Eritrocitária, MN=Micronúcleo, L=Lobado, S=Segmentado, R=Reniforme, B=Bolha. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 27 B: Destaque dos resultados apresentados na figura 23 A, referentes a Micronúcleo, Lobado e Segmentado.

As variações das frequências de ANE encontradas no período de 48 horas (figura 28 A) foram semelhantes às encontradas no período de 24 horas. A frequência de ANE não revelou diferença significativa entre os controles. As frequências dos grupos injetados foram significativamente maiores ($p < 0,001$) que as dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem ($3,0 \text{ TiO}_2$) apresentou um valor de ANE significativamente maior ($p < 0,001$) que o ANE do grupo injetado com a dosagem de $1,5 \text{ } \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$.

A frequência de MN não apresentou diferença significativa entre os controles. A frequência de MN do grupo injetado com a maior dosagem ($3,0 \text{ TiO}_2$) mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle e ao grupo injetado com a dosagem $1,5 \text{ } \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$. A frequência do grupo injetado com $1,5 \text{ } \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ não apresentou diferença significativa com a frequência dos controles (figura 28 B).

A frequência de núcleos lobados não apresentou diferença significativa entre os controles. A frequência de núcleos lobados do grupo injetado com a maior dosagem ($3,0 \text{ TiO}_2$) mostrou um aumento significativo ($p < 0,001$) em relação aos grupos controles e ao grupo injetado com a dosagem $1,5 \text{ } \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$. A frequência do grupo injetado com $1,5 \text{ } \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ não apresentou diferença significativa com a frequência dos controles (figura 28 B).

A frequência de núcleos segmentados não revelou diferença significativa entre os controles. As frequências dos grupos injetados com as dosagens $1,5 \text{ } \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ e $3,0 \text{ } \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foram significativamente maiores ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) que as frequências dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem ($3,0 \text{ TiO}_2$)

apresentou uma frequência de núcleos segmentados significativamente maior ($p<0,001$) que a frequência do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2$ /grama-de-peixe (figura 28 B).

A frequência de núcleos reniformes e bolhas não revelaram diferença significativa entre os controles. Os grupos injetados apresentaram frequências significativamente maiores ($p<0,001$) que as dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) apresentou uma frequência de núcleos reniformes e bolhas significativamente maior ($p<0,001$) que a do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2$ /grama-de-peixe (figura 28 A).

Figura 28 A: Frequências de anormalidades nucleares eritrocitárias e de seus componentes encontradas nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. ANE=Anormalidade Nuclear Eritrocitária, MN=Micronúcleo, L=Lobado, S=Segmentado, R=Reniforme, B=Bolha. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 28 B: Destaque dos resultados apresentados na figura 24 A, referentes a Micronúcleo, Lobado e Segmentado.

Os resultados referentes ao período de 72 horas estão apresentados nas figuras 29 A e B. A frequência de ANE não revelou diferença significativa entre os controles. As frequências dos grupos injetados foram significativamente maiores ($p < 0,001$) que as frequências dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem ($3,0 \text{ TiO}_2$) apresentou um valor de ANE significativamente maior ($p < 0,001$) que o valor de ANE do grupo injetado com a dosagem de $1,5 \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 29 A).

A frequência de MN não apresentou diferença significativa entre os controles. A frequência de MN do grupo injetado com a dosagem $1,5 \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles e ao grupo injetado com a maior dosagem (figura 29 B).

A frequência de núcleos lobados não apresentou diferença significativa entre os controles. A frequência de núcleos lobados dos grupos injetados mostrou um aumento significativo ($p < 0,001$) em relação aos grupos controles. As frequências de núcleos lobados dos grupos injetados com as dosagens $1,5 \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ e $3,0 \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foram significativamente maiores ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) que as frequências nos controles. Não houve diferença significativa entre frequência de lobado nos grupos injetados (figura 29 B).

A frequência de núcleos segmentados não revelou diferença significativa entre os controles. As frequências dos grupos injetados com as dosagens $1,5 \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ e $3,0 \mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foram significativamente maiores ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) que as frequências dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem ($3,0 \text{ TiO}_2$) apresentou uma frequência de núcleos segmentados significativamente

maior ($p<0,05$) que a frequência do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 29 B).

A frequência de núcleos reniformes não revelou diferença significativa entre os controles. As frequências dos grupos injetados foram significativamente maiores ($p<0,001$) que as frequências dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) apresentou uma frequência de núcleos reniformes significativamente maior ($p<0,001$) que a frequência do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 29 A).

A frequência de núcleos bolhas não revelou diferença significativa entre os controles. As frequências dos grupos injetados foram significativamente maiores ($p<0,001$) que as frequências dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) apresentou uma frequência de núcleos bolha significativamente maior ($p<0,05$) que a frequência do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 29 A).

Figura 29 A: Frequências de anormalidades nucleares eritrocitárias e de seus componentes encontradas nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. ANE=Anormalidade Nuclear Eritrocitária, MN=Micronúcleo, L=Lobado, S=Segmentado, R=Reniforme, B=Bolha. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 29 B: Destaque dos resultados apresentados na figura 25 A, referentes a Micronúcleo, Lobado e Segmentado.

IV. 4.2.b. Efeitos dos períodos de exposição

A variação da frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) em função dos períodos de exposição está apresentada na figura 30. A variação da frequência nos controles, água e salina, não foi significativa. Na dosagem 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$, a frequência de ANE do período de 48 horas foi significativamente maior ($p<0,001$) que a ANE do período de 24 horas e a frequência de ANE do período de 72 horas foi significativamente maior ($p<0,001$) em relação às frequências dos períodos de 24 e 48 horas. Na dosagem de 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$, a frequência nas 72 horas foi significativamente maior ($p<0,05$) que a frequência nas 24 horas. A frequência nas 48 horas não apresentou diferença significativa em relação as 24 e 72 horas.

Figura 30. Variação da frequência e desvio padrão das anormalidades nucleares eritrocitárias dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Experimento 2

Neste segundo experimento, também não foram observados óbitos em nenhum tratamento. As médias do comprimento total e as do peso dos indivíduos de todos os grupos experimentais não revelaram diferenças significativas. A média do comprimento total de todos os indivíduos foi de 7,31 cm ($\pm 1,10$) e a do peso foi de 5,04 g ($\pm 2,57$). A média da temperatura da água foi 22°C com flutuação ± 1 , salinidade 35, teor de oxigênio dissolvido 5,77 mg/L ($\pm 0,08$), pH 8.0 com flutuação $\pm 0,5$, durante o experimento.

IV. 4.3. Ensaio Cometa

IV. 4.3.1. Índice de Dano (ID)

IV. 4.3.1.a. Efeitos das Dosagens

Os dados de danos ao DNA causados pela nano-TiO₂ após 24, 48 e 72 horas de exposição e mensurados pelo Índice de Dano (ID) estão apresentados nas figuras 31, 32 e 33, respectivamente.

No período de 24 horas (figura 31), não houve diferença significativa entre os IDs dos controles. O ID do grupo injetado com a dosagem de 3,0 μg -nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) revelou diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparado ao ID dos controles (Ctrl H₂O e Ctrl Sal). O ID do grupo injetado com a dosagem de 1,5 μg -nano-TiO₂/grama-de-peixe (1,5 TiO₂) apresentou um valor intermediário, sendo maior que o ID dos controles e menor que o ID do grupo injetado com a maior dosagem, porém estas diferenças não foram significativas.

Figura 31: Média e desvio padrão dos IDs dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e dos grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 μg -nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

No período de 48 horas, como mostra a figura 32, o ID do grupo controle salina apresentou um aumento não significativo em relação ao ID do controle água. Não houve diferença significativa entre o ID do controle salina e o ID do grupo injetado com 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$. O ID deste grupo é significativamente diferente ($p<0,05$) do ID do controle água. O ID do grupo injetado com a maior dosagem apresentou diferença significativa em relação ao ID dos controles ($p<0,01$) e ao ID dos injetados com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ ($p<0,05$).

Figura 32: Média e desvio padrão dos IDs dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

No período de 72 horas, não foi detectada diferença significativa entre os IDs dos controles. Os IDs dos grupos injetados com as dosagens de 1,5 e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foram significativamente ($p<0,001$) maiores que os dos controles (figura 33). Não houve diferença significativa entre IDs dos grupos injetados.

Figura 33: Média e desvio padrão dos IDs dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

IV. 4.3.1.b. Efeitos dos períodos de exposição

A variação das médias dos IDs dos grupos com mesmo tratamento em diferentes períodos de exposição está apresentada na figura 34. Os IDs dos controles água e salina não apresentaram diferença significativa entre os períodos de exposição 24, 48 e 72 horas. O ID do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$, após 72 horas, apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) em relação aos IDs dos períodos 24 e 48 horas. O ID do grupo injetado com a dosagem de 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$, no período de 72 horas, foi significativamente ($p<0,05$) maior que o do período de 48 horas.

Figura 34: Variação de média e desvio padrão de IDs dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

IV. 4.3.2. Análise de Imagem

IV. 4.3.2.a. Efeitos das Dosagens

As variações das médias do comprimento caudal (μm), % de DNA caudal e momento caudal dos cometas obtidos no período de 24 horas, estão apresentados nas figuras 35, 36 e 37, respectivamente.

Após 24 horas, não houve diferença significativa entre o comprimento caudal dos controles (Ctrl H₂O e Ctrl Sal). Também não houve diferença significativa entre o comprimento caudal dos grupos injetados com nano-TiO₂. O comprimento caudal dos grupos injetados foi significativamente maior ($p < 0,01$) que comprimento caudal dos controles (figura 35).

Figura 35: Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Após 24 horas, não houve diferença significativa entre a % de DNA caudal dos grupos controles (figura 36). A % de DNA caudal do grupo injetado com 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foi significativamente maior ($p<0,001$) que % de DNA caudal dos controles. A % de DNA caudal do grupo injetado com a dosagem de 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ apresentou uma diminuição significativa ($p<0,01$) em relação à % de DNA caudal do grupo injetado com a menor dosagem (1,5 TiO_2), chegando ao nível dos controles.

Figura 36: Média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO_2) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO_2) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Após 24 horas, não houve diferença significativa entre o momento caudal dos controles (figura 37). Ambos foram significativamente menores ($p<0,01$) que o momento caudal do grupo injetado com 1,5 μg -nano- TiO_2 /grama-de-peixe. O momento caudal do grupo injetado com maior dosagem (3,0 TiO_2) foi significativamente menor ($p<0,05$) que o momento caudal do grupo injetado com menor dosagem (1,5 TiO_2).

Figura 37: Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO_2) e 3,0 μg -nano- TiO_2 /grama-de-peixe (3,0 TiO_2) no período de 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

As variações das médias do comprimento caudal (μm), % de DNA caudal e momento caudal, em função dos tratamentos, referentes ao período de 48 horas, estão apresentadas nas figuras 38, 39 e 40, respectivamente. Os resultados foram semelhantes aos resultados obtidos no período de 24 horas.

Após 48 horas, não houve diferença significativa entre comprimento caudal dos grupos controles. O comprimento caudal dos controles foi significativamente menor que o dos grupos injetados com as dosagens de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ ($p<0,05$) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ ($p<0,01$). O comprimento caudal entre os grupos injetados não apresentou diferença significativa (figura 38).

Figura 38: Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

A variação das médias da % de DNA caudal dos grupos de diferentes tratamentos no período de 48 horas está apresentada na figura 39. Não houve diferença significativa entre a % de DNA caudal dos grupos controles. A % de DNA caudal dos controles foi significativamente menor ($p<0,01$) que a % de DNA caudal do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$. A % de DNA caudal do grupo injetado com a dosagem de 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ apresentou uma diminuição chegando ao nível comparável à % de DNA caudal dos controles e significativamente menor ($p<0,001$) que % de DNA caudal do grupo injetado com 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$.

Figura 39: Média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

A variação das médias do momento caudal dos grupos de diferentes tratamentos no período de 48 horas está apresentada na figura 40. Não houve diferença significativa entre o momento caudal dos grupos controles. O momento caudal do controle água foi significativamente menor ($p < 0,05$) que momento caudal do grupo injetado com a dosagem 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$. Não foi observada diferença significativa entre momento caudal dos grupos injetados.

Figura 40: Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

As variações das médias do comprimento caudal (μm), % de DNA caudal e momento caudal, em função dos tratamentos, referentes ao período de 72 horas estão apresentadas nas figuras 41, 42 e 43, respectivamente.

Após 72 horas, não foi observada diferença significativa entre o comprimento caudal dos grupos controles (figura 41). O comprimento caudal dos grupos controles foi significativamente menor ($p<0,01$) que o comprimento caudal dos grupos injetados. O comprimento caudal do grupo injetado com a dosagem de 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foi significativamente maior ($p<0,05$) que o comprimento caudal do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$.

Figura 41: Média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

A variação das médias da % de DNA caudal em função dos tratamentos, no período de 72 horas, está apresentada na figura 42. Não houve diferença significativa entre % de DNA caudal dos grupos controles. As % de DNA caudal dos grupos injetados com 1,5 TiO_2 e 3,0 TiO_2 foram maiores que as dos controles ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). Houve uma diminuição significativa ($p < 0,01$) da % de DNA caudal do grupo injetado com maior dosagem (3,0 TiO_2) em relação a % de DNA caudal do grupo injetado com menor dosagem (1,5 TiO_2).

Figura 42: Média e desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO_2) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO_2) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A variação das médias do momento caudal dos grupos com tratamentos diferentes nas 72 horas está na figura 43. Não houve diferença significativa entre o momento caudal dos grupos controles como também entre o momento caudal dos grupos injetados. O momento caudal dos grupos injetados foi significativamente diferente ($p<0,01$) do momento caudal dos grupos controles.

Figura 43: Média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e de grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

IV. 4.3.2.b. Efeitos dos Períodos de Exposição

A variação das médias do comprimento caudal dos grupos de mesmo tratamento em função dos períodos de exposição está apresentada na figura 44. Não houve diferença significativa entre o comprimento caudal dos grupos controles como também entre o comprimento caudal dos grupos injetados com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ em função de períodos de exposição. O comprimento caudal do grupo injetado com a dosagem 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foi significativamente maior ($p<0,05$) no período de 72 horas em relação aos períodos de 24 e 48 horas.

Figura 44. Variação da média e desvio padrão do comprimento da cauda dos cometas dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

A variação das médias da % de DNA caudal dos grupos de diferentes tratamentos nos diferentes períodos de exposição está apresentada na figura 45. Não houve diferença significativa entre a % de DNA caudal dos controles água em função dos períodos de exposição. A % de DNA caudal do grupo controle salina aumentou significativamente ($p<0,01$) nos períodos de 48 e de 72 horas em comparação ao valor de % de DNA caudal nas 24 horas. Não houve diferença significativa entre % de DNA caudal em função de períodos de exposição dos grupos injetados com dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$. A % de DNA caudal do grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) foi significativamente maior ($p<0,05$) no período de 72 horas em comparação aos demais períodos.

Figura 45. Variação da média e desvio padrão da % de DNA na cauda dos cometas dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

A variação das médias do momento caudal dos grupos de mesmo tratamento em função dos períodos de exposição está apresentada figura 46.

Não foi observada diferença significativa no momento caudal entre os períodos de exposição para os grupos controle água (Ctrl H₂O) e o grupo injetado com a dosagem de 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe. O momento caudal do grupo controle salina (Ctrl Sal) mostrou um aumento significativo ($p<0,05$) no período de 48 horas em relação aos períodos de 24 e 72 horas. No grupo injetado com a dosagem 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe, o momento caudal nos períodos de 24 e 72 horas foi significativamente maior ($p<0,05$) em relação ao período de 48 horas.

Figura 46. Variação da média e desvio padrão do momento da cauda dos cometas dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controle água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

IV. 4.4. Teste de Micronúcleo (MN) e outras Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE)

IV. 4.4.a. Efeitos das Dosagens

As frequências (‰) de anormalidades nucleares eritrocitárias encontrada nos grupos de tratamentos diferentes, nos períodos de exposição de 24, 48 e 72 horas estão apresentadas nas figuras 47 A e B, 48 A e B e 49 A e B, respectivamente. Nestas figuras, é possível observar que as frequências de anormalidades nucleares dos grupos controles (Ctrl H₂O e Ctrl Sal) são significativamente menores ($p < 0,05$) que as frequências de anormalidades nucleares de todos os grupos de tratamentos, em todos os períodos.

No período de 24 horas (figura 47 A), não houve diferença significativa na frequência de ANE entre os controles. As frequências de ANE dos grupos injetados foram significativamente maiores ($p < 0,001$) que as de ANE dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO₂) apresentou um valor de ANE significativamente maior ($p < 0,001$) que o de grupo injetado com a dosagem de 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe.

Não houve diferença significativa entre as frequências de MN dos grupos controles como também entre as frequências de MN do grupo injetado com 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe e as dos controles. A frequência de MN do grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO₂) mostrou um aumento significativo ($p < 0,01$) em relação à de MN dos grupos controles e ao grupo injetado com a dosagem 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (figura 47 B).

Não houve diferença significativa da frequência de núcleos lobados entre os controles. A frequência de núcleos lobados dos controles não apresentou diferença significativa entre a frequência de núcleos lobados do grupo injetado com 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe. A frequência de núcleos lobados do grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO₂) mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação a frequência de núcleos lobados dos grupos controles e ao grupo injetado com a dosagem 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (figura 47 B).

A frequência de núcleos segmentados dos controles não revelou diferença significativa entre si. A frequência de núcleos segmentados do grupo injetado com a dosagem 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe e do grupo injetado com a dosagem 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe foi significativamente maior que a frequência de núcleos segmentados dos controles ($p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente). O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO₂) apresentou uma frequência de núcleos segmentados significativamente maior ($p < 0,001$) que a frequência do grupo injetado com a dosagem de 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (figura 47 B).

As frequências de núcleos reniformes e bolhas dos controles não revelaram diferença significativa entre si e são significativamente menores ($p < 0,001$) que a mesma frequência dos grupos injetados. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO₂) apresentou uma frequência de núcleos reniformes e bolhas significativamente maior ($p < 0,001$) que a frequência do grupo injetado com a dosagem de 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (figura 47 A).

Figura 47 A: Frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias e de seus componentes encontradas nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com a dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 24 horas. ANE=Anormalidade Nuclear Eritrocitária, MN=Micronúcleo, L=Lobado, S=Segmentado, R=Reniforme, B=Bolha. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 47 B: Destaque dos resultados apresentados na figura 43 A, referentes a Micronúcleo, Lobado e Segmentado.

As variações das frequências (%) de anormalidades nucleares eritrocitárias e de seus componentes encontrada em todos os tratamentos no período de 48 horas está na figura 48 A e B.

As variações encontradas no período de 48 horas foram semelhantes às encontradas no período de 24 horas. A frequência de ANE não revelou diferença significativa entre os controles. ANE dos grupos injetados foram significativamente maiores ($p < 0,001$) que ANE dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) apresentou um valor de ANE significativamente maior ($p < 0,001$) que o valor do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 48 A).

Não houve diferença significativa nas frequências de MN entre os controles. Frequência de MN do grupo injetado com 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ não apresentou diferença significativa com a frequência de MN dos controles. A frequência de MN do grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles e ao grupo injetado com a dosagem 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 48 B).

Não houve diferença significativa na frequência de núcleos lobados entre os controles. Não houve diferença significativa na frequência de núcleos lobados entre o grupo injetado com 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ e os grupos controles. A frequência de núcleos lobados do grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) mostrou um aumento significativo ($p < 0,001$) em relação aos grupos controles e ao grupo injetado com a dosagem 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 48 B).

A frequência de núcleos segmentados não revelou diferença significativa entre os controles. As frequências de núcleos segmentados dos grupos injetados com as dosagens de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ e 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ foram significativamente maiores que a mesma frequência dos controles ($p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente). O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) apresentou uma frequência de núcleos segmentados significativamente maior ($p<0,001$) que a do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 48 B).

A frequência de núcleos reniformes e bolhas não revelaram diferença significativa entre os controles. As frequências de núcleos reniformes e bolhas dos grupos injetados foram significativamente maiores ($p<0,001$) que a mesma frequência dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) apresentou uma frequência de núcleos reniformes e bolhas significativamente maior ($p<0,001$) que a do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 48 A).

Figura 48 A: Frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias e de seus componentes encontradas nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com a dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 48 horas. ANE=Anormalidade Nuclear Eritrocitária, MN=Micronúcleo, L=Lobado, S=Segmentado, R=Reniforme, B=Bolha. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

Figura 48 B: Destaque dos resultados apresentados na figura 44 A, referentes a Micronúcleo, Lobado e Segmentado.

As variações das frequências (%) de anormalidades nucleares eritrocitárias e de seus componentes encontradas em todos os tratamentos do período de 72 horas está na figura 49 A e B.

A frequência de ANE não revelou diferença significativa entre os controles. ANE dos grupos injetados foram significativamente maiores ($p < 0,001$) que ANE dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) apresentou um valor de ANE significativamente maior ($p < 0,001$) que o valor do grupo injetado com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ (figura 49 A).

Não houve diferença significativa entre a frequência de MN dos grupos controles. Não houve diferença significativa entre frequência de MN do grupo injetado com 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ e a frequência de MN dos grupos controles. A frequência de MN do grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO_2) mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles. Os grupos injetados não apresentaram diferença significativa na frequência de MN (figura 49 B).

Não houve diferença significativa entre a frequência de núcleos lobados dos grupos controles. O grupo injetado com a dosagem 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ e o grupo injetado com a dosagem de 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$ apresentaram frequências de núcleos lobados significativamente maiores que as mesmas frequências dos controles ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). Não houve diferença significativa entre a frequência de núcleos lobados dos grupos injetados (figura 49 B).

A frequência de núcleos segmentados não revelou diferença significativa entre os grupos controles. As frequências de núcleos segmentados

dos grupos injetados com as dosagens 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe foram significativamente maiores que a mesma frequência dos controles ($p<0,001$ e $p<0,01$, respectivamente). O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO₂) não apresentou diferença significativa entre o grupo injetado com a dosagem de 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (figura 49 B).

A frequência de núcleos reniformes não revelou diferença significativa entre os controles. As frequências de núcleos reniformes dos grupos injetados foram significativamente maiores ($p<0,001$) que a mesma frequência dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO₂) apresentou uma frequência de núcleos reniformes significativamente maior ($p<0,001$) que a do grupo injetado com a dosagem de 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (figura 49 A).

A frequência de núcleos bolhas não revelou diferença significativa entre os controles. As frequências de núcleos bolhas dos grupos injetados foram significativamente maiores ($p<0,001$) que a mesma frequência dos controles. O grupo injetado com a maior dosagem (3,0 TiO₂) apresentou uma frequência de núcleos bolhas significativamente maior ($p<0,05$) que a mesma frequência do grupo injetado com a dosagem de 1,5 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (figura 49 A).

Figura 49 A: Frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias encontradas e de seus componentes nos grupos utilizados como controles água (Ctrl H₂O) e salina (Ctrl Sal) e nos grupos injetados com as dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂) no período de 72 horas. ANE=Anormalidade Nuclear Eritrocitária, MN=Micronúcleo, L=Lobado, S=Segmentado, R=Reniforme, B=Bolha. Letras diferentes indicam diferença significativa.

Figura 49 B: Destaque dos resultados apresentados na figura 45 A, referentes a Micronúcleo, Lobado e Segmentado.

IV. 4.4.b. Efeitos dos períodos de exposição

A variação das médias das frequências de anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) e de seus componentes dos grupos de mesmo tratamento em função dos períodos de exposição está apresentada na figura 50. Não houve diferença significativa entre a frequência de ANE dos controles nos diferentes períodos de exposição. Nos grupos injetados com a dosagem de 1,5 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$, a frequência de ANE mostra uma clara tendência de uma variação dependente do período de exposição. Nesta dosagem, a frequência de ANE nas 72 horas foi significativamente maior ($p < 0,001$) em relação aos períodos de 24 e 48 horas, e a frequência de ANE nas 48 horas, por sua vez, foi significativamente maior ($p < 0,001$) em relação às 24 horas. Esta tendência foi menos marcante nos grupos injetados com a dosagem de 3,0 $\mu\text{g-nano-TiO}_2/\text{grama-de-peixe}$. Nesta dosagem, somente a frequência de ANE do grupo com o período de exposição de 72 horas foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a mesma frequência do grupo com o menor período de exposição (24 horas).

Figura 50. Variação da frequência e desvio padrão de anormalidades nucleares eritrocitárias dos grupos de mesmo tratamento em função de períodos de exposição. Controles água (Ctrl H₂O); controle salina (Ctrl Sal); peixes injetados com dosagens de 1,5 (1,5 TiO₂) e 3,0 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (3,0 TiO₂). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

IV. 5. Detecção da nano-TiO₂ nos tecidos

As ultraestruturas dos tecidos de rim, fígado, brânquia e músculo estão apresentadas nas figuras 51 (A-C), 52 (A-C), 53 (A-C) e 54 (A e B), respectivamente.

As imagens da microscopia eletrônica de transmissão do rim mostraram uma aparente absorção de nano-TiO₂ principalmente no citoplasma, mas também algumas foram encontradas no núcleo (figura 51 C). Nano-TiO₂ foi encontrada no interior de organelas como mitocôndrias, nas cristas mitocondriais (figura 51 B). Não foi observada nano-TiO₂ em imagens de tecido de animais do grupo controle (figura 51 A).

Figura 51 A: Ultraestrutura de células do rim de pampo sem injeção de nano-TiO₂, nas 72 horas. Magnificação 25.000 vezes. N: núcleo. C: citoplasma. M: mitocôndria. CM: crista mitocondrial.

Figura 51 B: Ultraestrutura de células do rim de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 25.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO₂. N: núcleo. C: citoplasma. M: mitocôndria. CM: crista mitocondrial.

Figura 51 C: Ultraestrutura de células do rim de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 30.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO₂. N: núcleo. C: citoplasma.

As imagens da microscopia eletrônica de transmissão do fígado mostraram uma aparente absorção de nano-TiO₂ principalmente no citoplasma (figura 52 C), mas também algumas foram encontradas no interior de mitocôndrias (figura 52 B). Não foi observada nano-TiO₂ em imagens de tecido de animais do controle (figura 52 A).

Figura 52 A: Ultraestrutura de células do fígado de pampo sem injeção de nano-TiO₂, nas 72 horas. Magnificação 15.000 vezes. N: núcleo. C: citoplasma. M: mitocôndria.

Figura 52 B: Ultraestrutura de células do fígado de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 12.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO₂. N: núcleo. C: citoplasma. M: mitocôndria.

Figura 52 C: Ultraestrutura de células do fígado de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 20.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO₂. C: citoplasma. M: mitocôndria.

As imagens da microscopia eletrônica de transmissão da brânquia mostraram uma aparente absorção de nano-TiO₂ em células de filamento branquial (figura 53 B) e no citoplasma e núcleo (figura 53 C). Não foi observada nano-TiO₂ em imagens de tecido de animais do controle (figura 53 A).

Figura 53 A: Ultraestrutura de células da brânquia de pampo sem injeção de nano-TiO₂, nas 72 horas. Magnificação 5.000 vezes. Cr: cromatina.

Figura 53 B: Ultraestrutura de células da brânquia de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 5.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO₂. Cd: condrocito. FB: célula do filamento branquial.

Figura 53 C: Ultraestrutura de células da brânquia de pampo injetado com 3 µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 10.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO₂. N: núcleo. C: citoplasma.

As imagens da microscopia eletrônica de transmissão do músculo mostraram uma aparente absorção de nano-TiO₂ no retículo sarcoplasmático (figuras 54 B e C). Não foi observada nano-TiO₂ em imagens de tecido de animais do controle (figura 54 A).

Figura 54 A: Ultraestrutura de células do músculo de pampo sem injeção de nano-TiO₂, nas 72 horas. Magnificação 12.000 vezes. S: sarcoplasma.

Figura 54 B: Ultraestrutura de células do músculo de pampo injetado com 3 μg -nano-TiO₂/grama-de-peixe nas 72 horas. Magnificação 10.000 vezes. As setas indicam a nano-TiO₂. S: sarcoplasma.

V. DISCUSSÃO

As nano-TiO₂ estão dentre os óxidos metálicos mais utilizados em produtos industriais como cosméticos, protetores solares, produtos alimentícios, tintas e drogas (SHUKLA et al., 2011). Estas nanopartículas podem apresentar distintas fases em um único produto, sendo as fases rutilo e anatase de grande importância comercial, o que representa 90% e 10% do mercado, respectivamente (PARK et al., 2011).

As análises de DRX feitas na amostra do material utilizado neste estudo detectaram uma mistura de duas fases principais, rutilo e anatase (figuras 6 A e B). Esta informação é muito importante visto que os tipos de fases da nano-TiO₂ estão intimamente ligados à sua toxicidade (KAKINOKI et al., 2004; GURR et al., 2005). A mistura de rutilo e anatase é considerada mais tóxica em relação às mesmas fases em seu estado individual (GURR et al., 2005; GERLOFF et al., 2012). Em parte, a genotoxicidade encontrada neste trabalho pode provavelmente estar relacionada a esta mistura.

Sabe-se que o tamanho nanométrico também influencia no grau de toxicidade da nano-TiO₂ (SINGH et al., 2009; GERLOFF et al., 2012). A média do tamanho das nanopartículas aqui utilizadas, detectada através da MET, está de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante (Sigma-Aldrich®, catálogo No. 677469) e dentro dos limites que consideram um material como nanométrico, ou seja, com pelo menos uma dimensão compreendendo 1-100 nanômetros. Esta média está bem próxima do tamanho médio de nanopartículas utilizadas em diversos estudos com organismos aquáticos e foi

considerada potencialmente tóxica na maioria dos trabalhos encontrados (FEDERICI et al., 2007; HAO et al., 2009; VEVERS; JAH, 2008).

Estudos sobre o potencial tóxico da nano-TiO₂ ainda são recentes, mas estão emergindo cada vez mais e abordando diversos organismos, desde bactérias até vertebrados. Entretanto, até o presente momento, este é o primeiro trabalho que avalia o potencial genotóxico da nano-TiO₂ em peixe marinho, de acordo com nosso conhecimento.

O uso tão difundido da nano-TiO₂ da nanotecnologia pode levar a uma liberação significativa para o ambiente aquático, que é considerado o destino final de poluentes, causando um aumento potencial de contaminação (HALL et al., 2009). A principal rota de entrada de nanopartículas em organismos aquáticos é através da passagem direta por meio das brânquias ou por outras superfícies epiteliais externas (OBERDÖRSTER, 2005). Handy et al. (2008) mencionam também uma possível entrada pelo epitélio gástrico. Tendo em vista os efeitos adversos das nanopartículas ao ambiente aquático e aos seus organismos, é de extrema importância o estudo voltado para este ambiente.

Estudos recentes demonstraram que a absorção de nanopartículas pode ocorrer por vários processos, tais como pinocitose, fagocitose, ou endocitose, mediada por um receptor (FOSTER et al., 2001; DAVDA; LABBASETWAR, 2002; MISSIRLIS et al., 2006).

Os resultados de uma possível absorção da nano-TiO₂ nos tecidos dos peixes aqui utilizados, averiguados através da MET, revelaram um aparente acúmulo principalmente nos tecidos de rim, fígado e brânquias, com uma sutil quantidade visível no músculo (figuras 51, 52, 53 3 54). As imagens obtidas são semelhantes às apresentadas nos trabalhos de Patri et al. (2009) e Shukla

et al. (2010), que também encontraram nano-TiO₂ nos tecidos estudados. Porém, são necessárias outras análises, por exemplo, a análise com raio X por dispersão de energia e microscopia eletrônica por varredura, para uma confirmação da identificação da nano-TiO₂.

Hackenberg et al. (2010) estudaram os efeitos da nano-TiO₂ em células humanas da mucosa nasal e encontraram uma taxa moderada dessas nanopartículas no compartimento intracelular, observado através da MET. Os agregados intracelulares estavam rodeados por vesículas, indicando endocitose como o principal mecanismo de absorção celular. Os autores também observaram uma invasão da nano-TiO₂ para dentro do núcleo celular.

Embora as nanopartículas tenham a capacidade de atravessar a membrana, o mecanismo exato desta passagem não é claro. De acordo com Geiser et al. (2005), 40 nm parece ser uma dimensão crítica, uma vez que partículas de até 40 nm conseguem entrar no espaço intracelular por endocitose. Entretanto, o trabalho de Shukla et al. (2010) mostrou que nano-TiO₂ de 50 nm são capazes de entrar no citoplasma e núcleo de células epidérmicas humanas. No presente trabalho, cerca de 75% das nano-TiO₂ apresentaram tamanho médio entre 11-40 nm (figura 4).

Zhang et al. (2007) e Wang et al. (2011) sugerem que as nanopartículas podem ser transportadas para outros órgãos do peixe por difusão e circulação sanguínea.

Casals et al. (2008) comentam que nanopartículas absorvidas através da pele ou por uma administração intravenosa, em geral, faz com que ocorra uma eliminação da corrente sanguínea para serem depositadas no fígado (mais de 90%) e nos rins (até 9%).

Considerando uma possível absorção de nanopartículas pelas células, estas podem aumentar a sua toxicidade devido à interferência com a fisiologia celular e sua função (JOHNSTON et al., 2009).

A quantidade e os tecidos em que as nanopartículas se encontram parece estar relacionado com o tipo de exposição utilizado. Scown et al. (2009) expuseram truta arco-íris à nano-TiO₂, via injeção intravenosa, e encontraram titânio acumulado no rim e fígado, com o fígado apresentando uma quantidade 15 vezes menor em relação ao rim. Xiong et al. (2011) expuseram peixe zebra à nano-TiO₂ via imersão na água e concluíram que o fígado é o principal alvo das nanopartículas. Já Ramsden et al. (2009), ao exporem trutas via dieta alimentar com nano-TiO₂, mostraram uma mensurável acumulação de titânio nas brânquias, intestino, fígado, cérebro e baço.

Em nosso experimento, a possível acumulação de nano-TiO₂ administrada intraperitonealmente foi investigada apenas em brânquia, rim, fígado e músculo. A acumulação no rim, fígado e músculo, se confirmada, pode ter sido através de mecanismos de absorção direta da nano-TiO₂ injetada na cavidade abdominal. A acumulação nas brânquias, no entanto, requer uma absorção de nano-TiO₂, que entraram na circulação sanguínea, ou por uma absorção direta de nano-TiO₂ que passaram da cavidade abdominal para a cavidade branquial através da membrana que separa estas duas cavidades.

O potencial das nanopartículas em reagir com sistemas biológicos tem sido reconhecido nos últimos anos, gerando uma série de estudos de (eco) toxicidade destes poluentes emergentes (MENARD et al., 2011).

Contudo, os esforços estão concentrados em organismos de água doce (MATRANGA; CORSI, 2012). Aruoja et al. (2009) e Hartmann et al.

(2010), por exemplo, estudaram os efeitos tóxicos de nano-TiO₂ em algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Lovern; Klaper (2006), Heinlaan et al. (2008) e Zhu et al. (2010) utilizaram invertebrados (*Daphnia magna*) para avaliar os efeitos dessas nanopartículas. As espécies de peixes de água doce utilizadas para avaliar os diversos efeitos da nano-TiO₂ são *Danio rerio* (GRIFFITT et al., 2008; ZHU et al., 2008; CHEN et al., 2011; CHEN et al., 2011; XIONG et al., 2011; WANG et al., 2011), *Oncorhynchus mykiss* (FEDERICI et al., 2007; VEVERS; JHA, 2008; RAMSDEN et al., 2009; SCOWN et al., 2009), *Cyprinus carpio* (ZHANG et al., 2007 e HAO et al., 2009), *Pimephales promelas* (HALL et al., 2009 e JOVANOVIĆ et al., 2011), *Carassius auratus* (REEVES et al., 2008) e *Oryzias latipes* (PATERSON et al., 2011).

A espécie aqui utilizada, além de contribuir com informações a respeito de organismos marinhos, foi uma excelente escolha para a realização dos testes aplicados neste trabalho por diversos motivos: é um peixe de fácil manutenção em cativeiro; mostrou-se adequado ao estudo de dano ao DNA eritrocitário; apresentou uma alta viabilidade de eritrócitos, quando expostos à nano-TiO₂; demonstrou sensibilidade para detectar a toxicidade da substância testada sem apresentar letalidade; apresentou resistência à técnica utilizada para a exposição.

Este peixe é bastante apreciado pela qualidade de sua carne para o consumo humano (CARVALHO FILHO, 1992; CERVIGÓN, 1993; WEIRICH; RICHE, 2006). Informações sobre a toxicidade de substâncias presentes no ambiente obtidas de animais que podem ser consumidos pelos seres humanos são muito importantes, principalmente se essas substâncias puderem ser transferidas pela cadeia alimentar.

Alguns autores estudaram a transferência de nanopartículas pela cadeia trófica (HOLBROOK et al., 2008) e concluíram que a absorção alimentar pode ser uma potencial rota de contaminação de nanopartículas para organismos aquáticos de níveis tróficos superiores. A transferência de nano-TiO₂ de um crustáceo (*Daphnia magna*) para um peixe de água doce (*Danio rerio*) foi demonstrada por Zhu et al. (2010).

Os estudos *in vivo* que avaliam os efeitos de nano-TiO₂ utilizam diversos tipos de exposição. Para mamíferos, os principais são injeção intravenosa, inalação, via cutânea e oral. Para organismos aquáticos, a principal via de exposição é a epitelial, colocando o peixe diretamente na água contaminada (imersão). Porém, nanopartículas no meio aquático tendem à aglomeração. Essa aglomeração é suscetível a variação dependendo da temperatura, pH, força iônica, salinidade, eventos climáticos e presença de matéria orgânica, podendo influenciar na sua estabilidade e gerar implicações na captação pelos organismos aquáticos (HANDY et al., 2008). Essas variações dificultam a utilização deste método, uma vez que as nanopartículas aglomeradas aumentam em tamanho e peso, podendo perder suas propriedades físico-químicas, essenciais para sua determinação toxicológica. Além disso, nanopartículas aglomeradas tornam-se mais fáceis para afundar, podendo causar a alteração das concentrações iniciais na água, implicando na necessidade de reposição da nanopartícula em questão, provocando um maior estresse aos peixes devido ao manejo, além do aumento da quantidade de material poluído e de descarte.

Para testar a genotoxicidade de diferentes substâncias em espécies de peixes, a injeção intraperitoneal é o método mais comum de exposição em

condições de laboratório, pois há muitos fatores que são difíceis de controlar e que poderiam influenciar na absorção do produto se outros protocolos de administração fossem empregados (AL-SABTI, METCALFE, 1995).

Ayllon; Garcia-Vazquez (2000) avaliaram a formação de micronúcleos e outras anormalidades nucleares eritrocitárias em duas espécies de peixe (*Phoxinus phoxinus* e *Poecilia latipinna*) expostas a substâncias genotóxicas (colchicina, ciclofosfamida e mitomicina C), visando contribuir para a adequação do teste de micronúcleo em peixes e validar a utilização da injeção intraperitoneal em testes de genotoxicidade em laboratório. Os autores concluíram que a injeção intraperitoneal pode ser um protocolo adequado de administração de rotina em testes de genotoxicidade com peixes, baseando-se na contagem de micronúcleos.

No presente trabalho, o tipo de exposição escolhida foi via injeção intraperitoneal, considerando a importância fundamental de se obter informações sobre a cinética da presente nanopartícula numa dosagem conhecida. Scown et al. (2009) escolheu a injeção intravenosa para expor a nano-TiO₂ na espécie de peixe *Oncorhynchus mykiss*, porém a utilização desta metodologia foi descartada em nosso trabalho devido à dificuldade de aplicação, pois os peixes utilizados possuíam um tamanho muito pequeno.

Shin et al. (2010) expuseram ratos à nano-TiO₂ via injeção intraperitoneal (1mg/rato) e encontraram indução de processos inflamatórios em cérebros sépticos. Jovanovic et al. (2011) também utilizaram injeção intraperitoneal no peixe *Pimpehales promelas*, injetando 10µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe. Seus resultados mostraram uma potencial interferência

na resposta do sistema imunológico, evidenciado através de alterações observadas na expressão dos genes e da função dos neutrófilos.

Há uma grande diferença entre as dosagens/concentrações utilizadas de um autor para outro, assim como de um animal para outro. Experimentos com ratos utilizaram desde 5mg-nano-TiO₂/Kg (FABIAN et al., 2008; CUI et al. 2011) até 500mg-nano-TiO₂/Kg (PATRI et al., 2009 e TROUILLER et al., 2009).

Experimentos com peixes utilizaram concentrações desde 0.1mg-nano-TiO₂/L até 500mg-nano-TiO₂/L. Federici et al. (2007) utilizaram concentrações de 0.1, 0.5 e 1.0mg-nano-TiO₂/L para avaliar a integridade dos órgãos e os efeitos fisiológicos em trutas, *Oncorhynchus mykiss*. Os resultados sugerem que as nano-TiO₂ causaram toxicidade respiratória, distúrbio no metabolismo de elementos-traço como zinco e cobre e estresse oxidativo.

Zhu et al. (2008) realizaram um bioensaio embriolarval com peixe zebra (*Danio rerio*) utilizando uma concentração máxima de 500mg-nano-TiO₂/L para observar e descrever os parâmetros toxicológicos como sobrevivência das larvas, taxa de eclosão e malformações, após 96 horas de exposição. Os resultados revelaram efeitos tóxicos sobre os embriões e larvas de peixe-zebra.

Scown et al. (2009) administraram duas dosagens intravenosas de 100µg e 1,3mg-nano-TiO₂/Kg-de-peixe (*Oncorhynchus mykiss*) para investigar a distribuição nos tecidos e a toxicidade desta nanopartícula. Os resultados mostraram que, na truta, uma exposição elevada de dose única de nano-TiO₂ através da corrente sanguínea faz com que ocorra uma acumulação de nano-TiO₂ nos rins, mas com efeito mínimo sobre a função renal.

Muitas das dosagens/concentrações estudadas são discrepantes quando comparadas com as estimativas de concentração no ambiente aquático

apresentadas por Mueller, Nowack (2008). Esses autores realizaram uma quantificação baseada em uma análise de fluxo de nanopartículas liberadas a partir de produtos de consumo para o ar, para o solo e para a água, na Suíça. Foram avaliadas as concentrações ambientais previstas (PEC) e comparadas com as concentrações previsivelmente sem efeitos (PNEC), derivadas da literatura, para estimar um possível risco. Os valores de PEC para nano-TiO₂ na água são 0,7-16µg/L, próximo ou superior ao valor PNEC para nano-TiO₂ (<1µg/L). Os resultados deste estudo permitem, pela primeira vez, uma avaliação quantitativa das nanopartículas no meio ambiente e sugerem estudos mais detalhados sobre a nano-TiO₂. Johnson et al. (2011) estimaram a quantidade de TiO₂ liberada por protetores solares em regiões da Inglaterra, encontrando 1,1 mg/L para a região Anglian e 2,2 mg/L para a região Thames.

Kaegi et al. (2008), entretanto, em um estudo também realizado na Suíça, apresentaram evidências diretas da liberação de nano-TiO₂ sintéticas de aplicações urbanas no meio aquático. As nano-TiO₂ foram traçadas a partir de pinturas de fachadas exteriores à descarga em águas superficiais. As concentrações para a superfície de escoamento (600 mg/L) e esgoto bruto (100 e 3000 mg/L de Ti) tornam mais realistas as concentrações/dosagens utilizadas na maioria dos experimentos com nano-TiO₂. Este estudo de Kaegi et al. (2008) mostra pela primeira vez que as nano-TiO₂ são liberadas em quantidades significativas para o meio aquático.

As dosagens utilizadas neste estudo são provenientes de soluções preparadas com concentrações de 150 e 300mg-nano-TiO₂/L, portanto, 2 vezes menor que as concentrações que podem ser encontradas no ambiente, descritas por Kaegi et al. (2008), demonstrando que as dosagens aqui

utilizadas podem ser consideradas ecologicamente relevantes. Além disso, essas dosagens não foram letais para a espécie de pampo *T. carolinus*, permitindo um estudo com período de exposição superior a 24 horas.

Os períodos de exposição utilizados neste estudo foram escolhidos levando em consideração o bem estar dos animais e a necessidade de uma exposição mais prolongada. Singh et al. (2009) apontam que as investigações que consideraram exposições superiores a 24 horas são muito escassas.

Um estudo feito por Zhu et al. (2010) mostrou que a nano-TiO₂ exerceu uma toxicidade mínima para *Daphnia* após 48 horas de exposição, mas causou uma alta toxicidade quando o tempo de exposição foi estendido para 72 horas. Neste contexto, o período de 3 dias de exposição como período mais prolongado de nosso experimento pode contribuir para a obtenção de maiores informações sobre a genotoxicidade da nano-TiO₂ no peixe marinho *T. carolinus*.

Nano-TiO₂ é um potencial gerador de espécies reativas de oxigênio (ROS) tanto na presença de radiação UV (BLAKE et al., 1999; ARMELAO et al., 2007; GOTTSCHALK et al., 2009; AUFFAN et al., 2009) quanto na sua ausência (GURR et al., 2005, REEVES et al., 2008, KANG et al., 2008, KARLSSON et al., 2008, PARK et al., 2008). Recentemente, Shukla et al. (2011) apontam o estresse oxidativo (produção de ROS) como sendo o principal parâmetro da toxicidade da nano-TiO₂.

Os mecanismos precisos de toxicidade da nano-TiO₂ e outras nanopartículas metálicas são, em grande parte, desconhecidos (GRIFFITT et al., 2008), mas estudos recentes têm mostrado que a toxicidade das nanopartículas é geralmente determinada por propriedades como tamanho da

partícula, forma, propriedades da superfície e razão superfície/volume (NAVARRO et al., 2008; HEINLAAN et al., 2008, GHOSH et al., 2010).

No presente trabalho, a genotoxicidade da nano-TiO₂ foi avaliada baseando-se na importância de se estudar o potencial de uma substância nova ser capaz de causar danos ao DNA de diversos organismos, uma vez que estes danos podem levar a alterações genéticas na ausência de morte celular e desencadear câncer (KORNHAUSER et al., 1991). Além disso, as genotoxinas também podem causar um impacto sobre a fertilidade e a saúde das gerações subsequentes se surgirem perturbações em células reprodutivas (SINGH et al., 2009).

Os testes de genotoxicidade e, assim, a avaliação do potencial carcinogênico ou mutagênico de novas substâncias é um elemento central de avaliação de risco para qualquer composto químico (SINGH et al., 2009).

Em relação aos estudos relacionados à genotoxicidade da nano-TiO₂, Vevers; Jha (2008) e Reeves et al. (2008) utilizaram o ensaio cometa para avaliar o potencial genotóxico da nano-TiO₂ em cultura de células de peixe, e observaram um aumento no dano ao DNA ao exporem a nanopartícula à UV-A. Shukla et al. (2011) também utilizaram o ensaio cometa para avaliar o efeito da nano-TiO₂ em células epidérmicas humanas, encontrando uma correlação direta entre a produção de espécies reativas de oxigênio e dano oxidativo ao DNA. Gopalan et al. (2009), através do ensaio cometa, encontraram dose-dependência no aumento do dano ao DNA em células espermáticas humanas e linfócitos e fotogenotoxicidade em linfócitos. Karlsson et al. (2008) utilizaram o ensaio cometa em um estudo com células epiteliais pulmonares humanas e encontraram um aumento dose-dependente nos danos ao DNA, induzidos pela

nano-TiO₂. Gurr et al. (2005) utilizaram o ensaio cometa e o teste de micronúcleo para avaliar a genotoxicidade da nano-TiO₂ em célula epitelial brônquica humana e encontraram dano oxidativo ao DNA e a indução de formação de micronúcleos. Rahman et al. (2002) realizaram o teste de micronúcleo e encontraram um aumento significativo na formação de micronúcleos em células embrionárias de hamster sírio expostas à nano-TiO₂. Resultados de Kang et al. (2008), obtidos pelo teste de micronúcleo, sugerem um aumento dose-dependente na frequência de micronúcleos e geração de ROS, ativando a p53 mediada por sinais de pontos de verificação de danos ao DNA em linfócito sanguíneo periférico humano.

Os resultados do ensaio cometa e micronúcleo do presente estudo demonstram que as nano-TiO₂ possuem um potencial de danificar o DNA de eritrócitos do peixe marinho *T. carolinus*, confirmado em ambos os experimentos.

As dosagens de nano-TiO₂ utilizadas causaram um aumento significativo no índice de dano ao DNA dos peixes em pelo menos um dos períodos de exposição. Esse aumento significa que o DNA foi quebrado e foram formados fragmentos detectáveis pelo ensaio cometa. Estas quebras podem ter ocorrido devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), característica dessa nanopartícula. As espécies reativas de oxigênio, especialmente o radical hidroxila ($\bullet$ OH), têm a capacidade de atacar o DNA através de vários mecanismos diferentes, gerando quebras de fita simples (SSB) e quebras de fitas duplas (DSB), lesões oxidativas de bases e outras lesões no DNA (PETERSEN; NELSON, 2010).

As extensões dos danos ocasionados ao DNA, avaliadas visualmente através do ID do experimento 1, mostraram que no grupo injetado com a maior dosagem as extensões dos danos foram maiores em relação ao grupo injetado com a menor dosagem apenas nas primeiras 24 horas (figura 11), ou seja, na maior parte do tempo, nas 48 e 72 horas, o índice de dano dos grupos injetados foi semelhante (figuras 12 e 13). Nos resultados do experimento 2, o ID do grupo injetado com a maior dosagem também foi maior que o do grupo injetado com a menor dosagem somente em um dos períodos, nas 48 horas (figura 32). Esta semelhança encontrada nos IDs dos grupos injetados pode ter ocorrido devido à proximidade das dosagens, implicando na importância de estudos com dosagens mais espaçadas.

Os resultados mostraram também que no experimento 1 os IDs diminuíram significativamente no maior período (figura 13), enquanto que no experimento 2 os IDs aumentaram conforme aumentou o período de exposição (figura 33). Esta diminuição observada no experimento 1 pode ter ocorrido devido à não detecção de fragmentos muito pequenos, ou ao reparo do DNA, que poderia ocorrer em período precedente à coleta do material em estudo (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998) ou também devido a presença de uma menor quantidade de lesões de fitas duplas (DSB). Estas são consideradas as mais letais ao DNA e, em comparação com outros tipos de danos, são intrinsecamente mais difíceis para reparar (KHANNA; JACKSON, 2001). Já no experimento 2, as quebras podem ter sido maiores, permitindo uma melhor detecção. Entretanto, de acordo com os resultados dos demais parâmetros, o reparo ao DNA parece ter sido tardio ou insuficiente, não sendo detectado um decréscimo nos IDs no maior período de exposição. Variações dessa natureza

são perfeitamente compreensíveis e esperadas e podem ser ocasionadas por diversos fatores comuns às repostas biológicas tais como diferenças individuais, diferentes históricos ambientais dos lotes utilizados, período de coleta, entre outros.

Os controles apresentaram sempre resultados excelentes. Não houve diferença significativa entre os controles em nenhum tratamento de nenhum dos experimentos, exceto no comprimento caudal e na % de DNA caudal dos cometas do experimento 1 no período de 72 horas (figuras 21 e 22), nos quais o comprimento caudal e a % de DNA caudal do controle salina foram significativamente maiores do que os do controle água. Como esta diferença ocorreu em apenas 2 dos 31 parâmetros analisados, não consideramos esta ocorrência como uma indicação de que a injeção de solução salina possa ter causado efeito genotóxico.

Os resultados do comprimento caudal, obtidos pelo programa de análise de imagem, reforçam os resultados encontrados pelas análises dos IDs. Ambas as dosagens causaram um aumento significativo no comprimento caudal, ou seja, a extensão da cauda foi maior, havendo mais quebras ocasionadas no DNA, formando uma maior quantidade de fragmentos que foram detectados pelo programa.

O comprimento caudal do grupo injetado com a maior dosagem foi significativamente maior que o do grupo injetado com a menor dosagem nas 24 e 72 horas do experimento 1 (figuras 15 e 21), enquanto que no experimento 2, o comprimento caudal dos grupos injetados com a maior dosagem foi significativamente maior que o dos grupos injetados com a menor dosagem nas 72 horas (figura 41). Esses dados sugerem que a análise pelo programa se

mostrou mais sensível para detectar as diferenças entre as dosagens, em comparação à análise visual e também sugere uma diferença significativa entre a maior dose em relação à menor.

No experimento 1, o comprimento caudal de ambos os grupos injetados diminuiu a partir das 48 horas, reforçando os resultados de ID do experimento 1 (figura 24). No experimento 2, ocorreu um aumento significativo do comprimento caudal nas 72 horas, o que confere com os resultados do ID do experimento 2 (figura 44). Os resultados referentes ao comprimento caudal apoiam os resultados encontrados no ID. De acordo com Collins et al. (2004), existe uma considerável correlação entre os tipos de análise (visual e pelo programa de análise de imagem), o que pode explicar esta proximidade encontrada em nossos resultados.

Os resultados referentes à porcentagem de DNA mostraram que em ambos os experimentos, ambas as dosagens causaram, em pelo menos um dos períodos, um aumento significativo na % de DNA caudal, demonstrando que a nano-TiO₂, mesmo em concentrações não letais, tem capacidade de danificar o DNA.

No experimento 1, os resultados mostram que nos grupos injetados com a maior dosagem, a % de DNA caudal foi maior que a dos grupos injetados com a menor dosagem apenas nas primeiras 24 horas, ou seja, na maior parte do tempo (nas 48 e 72 horas), a % de DNA caudal dos grupos injetados foi semelhante (figuras 16, 19, 22). Esses resultados conferem com os resultados do ID do experimento 1. No experimento 2, houve uma diferença significativa na % de DNA caudal entre os grupos injetados, em todos os períodos de exposição. A % de DNA caudal dos grupos injetados com a menor

dosagem foi significativamente maior que a dos grupos injetados com a maior dosagem (figuras 36, 39, 42). Isto pode ter ocorrido devido à possibilidade dos fragmentos de DNA dos grupos injetados com a maior dosagem serem tão pequenos a ponto de não serem mensurados pelo programa.

Os resultados mostraram também que no experimento 1, a % de DNA caudal dos grupos injetados com a menor dosagem foi maior nos períodos de exposição maiores (figura 25). No experimento 2, também houve um aumento na % de DNA caudal de ambos os grupos injetados (figura 45), porém este aumento foi significativo apenas no grupo injetado com a maior dosagem. Estes resultados revelam que tanto a menor quanto a maior dosagem administradas podem aumentar os danos causados ao DNA aumentando significativamente a % DNA na cauda com o passar do tempo, sugerindo a necessidade de estudos com períodos de exposição mais prolongados para avaliar a persistência dos efeitos das doses administradas.

O momento caudal é o produto do comprimento caudal e da % de DNA caudal. Os resultados do experimento 1 e do experimento 2 mostraram um aumento significativo no momento caudal dos grupos injetados. Estes resultados conferem com os resultados do comprimento caudal e da % de DNA caudal do experimento 1 e do experimento 2, apresentando uma variação semelhante.

O momento caudal dos grupos injetados com a maior dosagem foi significativamente maior que o dos grupos injetados com a menor dosagem nas 24 e 72 horas do experimento 1 (figuras 17 e 23). Já no experimento 2, o grupo injetado com a menor dosagem apresentou um momento caudal maior em relação ao grupo injetado com a maior dosagem nas 24 horas (figura 37). Esta

diferença entre os grupos injetados pode ser devido a intervenção do alto valor da % de DNA caudal do grupo injetado com a menor dosagem encontrado no experimento 2.

No experimento 1, o momento caudal de ambas as dosagens diminuiu significativamente no maior período de exposição (figura 26), reforçando os resultados do ID e do comprimento caudal do experimento 1. No experimento 2, o momento caudal de ambas as dosagens apresentaram um aumento com o passar do tempo (figura 46), o que confere com os resultados do ID e do comprimento caudal do experimento 2.

Neste estudo, através das análises dos resultados do ensaio cometa com ID obtido pelo método visual e três diferentes parâmetros gerados pelo programa de análise de imagem, observamos que os parâmetros que melhor corresponderam foram o ID e o comprimento caudal, sendo este último ainda mais sensível para avaliar a diferença entre os grupos injetados.

Os resultados obtidos com o teste de micronúcleo mostraram que, em ambos os experimentos, os grupos injetados com a maior dosagem apresentaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em relação aos grupos injetados com a menor dosagem em todos os períodos de exposição, exceto no período de 72 horas (figuras 27 B, 28 B, 29 B, 47 B, 48 B e 49 B). Este aumento implica que esta dosagem provocou um aumento do dano ao DNA que provavelmente não foi reparado, formando estruturas citoplasmáticas denominadas micronúcleos. Estas estruturas são formadas durante a anáfase, cujas cromátides, fragmentos acêntricos e até cromossomos inteiros não são transportados pelas fibras do fuso para polos

opostos, não sendo inclusos nos núcleos das células filhas (SCHMID, 1975; FENECH, 2000).

Os grupos injetados com a menor dosagem, em ambos os experimentos, apresentaram um aumento na frequência de micronúcleos no maior período de exposição, sendo este aumento significativo no experimento 1 (figuras 29 B e 49 B), sugerindo que mesmo na menor dosagem, com um período de exposição mais prolongado, ainda podem ocorrer a formação de micronúcleos, reforçando a necessidade de estudos com períodos de exposição mais prolongados.

Estes resultados sugerem também que este teste foi sensível à detecção de formação de micronúcleos em função das dosagens e que nos grupos injetados com a menor dosagem, o reparo ao DNA provavelmente ocorreu de forma mais efetiva em relação à maior dosagem, não formando micronúcleos nas 24 e 48 horas (figuras 27 B, 28 B, 47 B e 48 B) de ambos os experimentos.

Além da formação de micronúcleos, também podem ocorrer outras alterações morfológicas nucleares, coletivamente chamadas de anormalidades nucleares eritrocitárias, que são utilizadas por vários autores como indicadores de efeitos genotóxicos de substâncias químicas (CARRASCO et al., 1990; AYLLON; GRACÍA VAZQUEZ, 2000; PACHECO; SANTOS, 2002; ÇAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2003; BARŠIENĖ et al., 2006).

Os resultados do presente estudo referentes ao total de anormalidades nucleares eritrocitárias (frequência de ANE) de ambos os experimentos apresentaram um aumento significativo deste parâmetro em ambos os grupos injetados em todos os períodos de exposição (figuras 27 A, 28 A, 29 A, 47 A,

48 A e 49 A). Com esses resultados, pode-se observar que as frequências de ANEs são excelentes indicadores dos efeitos genotóxicos causados pela nano-TiO₂, mostrando-se sensível até mesmo na menor dosagem.

Pode-se observar também que houve uma diferença significativa entre os grupos injetados, com uma maior frequência de ANE nos grupos injetados com a maior dosagem em todos os períodos de exposição de ambos os experimentos.

Nos dois experimentos, a frequência de ANE de ambas as dosagens aumentou significativamente com o passar do tempo (figuras 30 e 50). Isto significa que quanto maior o período de exposição, maior foi a ocorrência de anormalidades nucleares eritrocitárias, reforçando os resultados obtidos pelo ensaio cometa e também a necessidade de estudos com períodos mais prolongados.

Dentre as frequências de ANEs estudadas, as que se mostraram mais sensíveis foram as frequências de núcleos reniforme e bolha, por apresentarem maior frequência em relação às demais anormalidades em todos os períodos de exposição de ambos os experimentos.

Os danos causados ao DNA demonstrados através do ensaio cometa e teste de micronúcleos e outras anormalidades nucleares eritrocitárias dos grupos injetados com nano-TiO₂ permitem a conclusão de que a nano-TiO₂ é genotóxica para juvenis de pampo nas condições experimentais utilizadas neste trabalho.

Resultados obtidos pelo teste de exclusão do corante azul de tripano do presente trabalho foram satisfatórios ao apresentarem uma viabilidade de eritrócitos superior a 80% em todos os tratamentos (figura 7). Tice et al. (2000)

recomendam que, para conduzir o ensaio cometa, as doses que induzem menos de 70% de viabilidade, ou seja, mais de 30% de células mortas por citotoxicidade, devem ser evitadas devido ao potencial de artefatos. Neste contexto, os eritrócitos utilizados foram adequados para os ensaios citogenotóxicos conduzidos neste estudo.

Também podemos observar nestes resultados de viabilidade que a dosagem de 3,0µg-nano-TiO₂/grama-de-peixe (maior dosagem utilizada nos ensaios genotóxicos) apresenta uma porcentagem de células viáveis significativamente menor que os grupos utilizados como controles, sugerindo uma possível citotoxicidade para os eritrócitos de pampo. Kang et al. (2008) utilizaram o teste de exclusão do corante azul de tripano para avaliar a viabilidade de linfócitos do sangue periférico humano e encontraram citotoxicidade da nano-TiO₂ ao exporem as células nas concentrações 0, 20, 50 e 100 µg/mL de nano-TiO₂ por 0, 12, 24 e 48 horas. Os autores demonstram uma significativa diminuição dose e tempo-dependente da viabilidade celular na presença da nano-TiO₂.

Park et al. (2011) expuseram queratinócitos humanos à nano-TiO₂ nas concentrações 50, 100 e 150 ppm durante 24 horas. Os resultados revelaram que as concentrações 100 e 150 ppm, na ausência de radiação UVA, causaram uma diminuição dose-dependente da viabilidade celular, medida pelo ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).

Os resultados aqui apresentados demonstram que a nano-TiO₂ é uma potencial substância genotóxica e possivelmente citotóxica para os eritrócitos do peixe marinho *T. carolinus* em experimentos realizados em laboratório.

Entretanto, as informações a respeito da relação entre nanopartículas e ambiente marinho são escassas.

O presente trabalho estudou somente o efeito genotóxico de uma nanopartícula, nano-TiO₂, em juvenis de uma única espécie de peixe marinho, o pampo. Os resultados obtidos demonstram que o peixe marinho pode ser vulnerável a uma contaminação de nano-TiO₂, reforçando a necessidade de estudos mais amplos, abrangendo mais espécies, mais estágios de ciclo de vida, mais aspectos toxicológicos de outras nanopartículas em peixes marinhos.

Ao mesmo tempo, os resultados também apontam a necessidade de um monitoramento de contaminação ambiental por nanopartículas. Nos ecossistemas marinhos, os peixes ocupam um papel importante na cadeia alimentar. A transferência trófica de nanopartículas entre os organismos marinhos ainda não foi estudada, mas esta transferência foi encontrada entre os organismos de água doce. Os dados isolados, no ambiente marinho, indicam a contaminação com diversos efeitos toxicológicos de nanopartículas em organismos de vários níveis tróficos (MIAO et al., 2009; CANESI et al., 2008 e GALLOWAY et al., 2010). No que refere a vulnerabilidade, a nano-TiO₂ foi avaliada em peixe (o presente estudo) e no golfinho (BERNARDESCHI et al., 2010).

Estes dados apontam a necessidade de um estudo detalhado sobre este assunto, visto que a transferência trófica marinha de nanopartículas, caso exista, pode fazer com que a contaminação marinha atinja o ser humano. Neste contexto, a descoberta da vulnerabilidade a nano-TiO₂ em um peixe que muda de habitat conforme os estágios de seu ciclo de vida, como no caso do

pampo, tem uma importância especial. Peixes com esta característica podem agir como um transportador de contaminação de um habitat para o outro.

Dada a incerteza sobre a segurança das nanopartículas, é imperativo que nós entendamos os perigos que as cercam, para posteriormente minimizar os potenciais riscos toxicológicos associados a elas, não só para proteger a saúde humana e o ambiente, mas também para evitar danos à indústria da nanotecnologia, em longo prazo.

VI. CONCLUSÕES

- Dentro das condições utilizadas neste trabalho, as nano-TiO₂ não causaram mortalidade aos juvenis de *T. carolinus*.
- Nano-TiO₂ são genotóxicas para *T. carolinus*, provocando danos ao DNA e indução da formação de micronúcleos e outras anormalidades nucleares eritrocitárias. A indução da formação de outras anormalidades nucleares eritrocitárias foi dose e tempo dependente.
- O ensaio cometa e o teste de micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocitárias mostraram ser ferramentas eficientes de avaliação do efeito genotóxico das nano-TiO₂ para esta espécie de peixe marinho.
- A frequência de ANE foi um excelente indicador dos efeitos genotóxicos na nano-TiO₂, com sensibilidade para doses baixas.
- Há indicação de que a nano-TiO₂ é capaz de entrar nas células e possivelmente acumular nos tecidos de rim, fígado, brânquias e músculo desta espécie de peixe marinho.
- Há indicação de que a nano-TiO₂ apresenta uma potencial citotoxicidade para a espécie estudada.

- O pampo mostrou ser sensível aos efeitos das nano-TiO₂, podendo ser usado como um bom bioindicador para estudar estes efeitos no monitoramento ambiental.
- Resultados obtidos neste trabalho demonstram que as nano-TiO₂ podem implicar em um risco potencial aos organismos marinhos e que mais pesquisas voltadas para este ambiente são necessárias.

VII. BIBLIOGRAFIA

- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.*, v. 343, p. 121-135.
- ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. 2007. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *Int. J. Pharm.*, v. 341, p. 215–220.
- ARMELAO, L.; BARRECA, D.; BOTTARO, G.; GASPAROTTO, A.; MACCATO, C.; MARAGNO, C. 2007. Photocatalytic and antibacterial activity of TiO₂ and Au/TiO₂ nanosystems. *Nanotechnology*, v. 18, p. 7.
- ARMSTRONG, B.; HUTCHINSON, E.; UNWIN, J.; FLETCHER, T. 2004. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.*, v. 112, p. 970-978.
- ARUOJA, V.; DUBOURGUIER, H. C.; KASEMETS, K.; KAHRU, A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci. Total Environ.*, v. 407, p. 1461-1468.
- AUFFAN, M.; ROSE, L.; BOTTERO, J-Y.; LOWRY, G. V.; JOLIVET, J-P.; WIESNER, M. R. 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotech.*, v. 4, p. 634-641.
- AVAKIAN, M.D.; DELLINGER, B.; FIEDLER, H.; GULLET, B.; KOSHLAND, C.; MARKLUND, S.; OBERDORSTER, G.; SAFE, S.; SAROFIM, A.; SMITH, K.R.; SCHWARTZ, D.; SUK, W. A. 2002. The origin, fate, and health effects of combustion by-products: a research framework. *Environ. Health Perspect.*, v. 110, p. 1155-1162.
- AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat. Res.*, v. 467 p. 177–186.
- BARRENA, R.; CASALS, E.; COLÓN, J.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A.; PUNTES, V. 2009. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, v. 75, p. 850–857.

- BARŠIENĖ, J.; DEDONYTĖ, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKĖNAITĖ, L.; ANDERSEN, O. K. 2006. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquat. Toxicol.*, v. 78, p. S99-S104.
- BELLINGER, J. W.; AVAULT, J. W. 1971. Food habits of juvenile pompano (*Trachinotus carolinus*) in Louisiana. *Trans. Am. Fish. Soc.*, v. 100(3), p. 486-494.
- BERGAMASCO, R.; DA SILVA, F. V.; ARAKAWA, F. S.; YAMAGUCHI, N. U.; REIS, M. H. M.; TAVARES, C. J.; DE AMORIM, M. T. P. S.; TAVARES, C. R. G. 2011. Drinking water treatment in a gravimetric flow system with TiO₂ coated membranes. *Chem. Eng. J.*, v. 174, p. 102–109.
- BERNARDESCHI, M.; GUIDI, P.; SCARCELLI, V.; FRENZILLI, G.; NIGRO, M. 2010. Genotoxic potential of TiO₂ on bottlenose dolphin leukocytes. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 396, p. 619–623.
- BERNARDI, M. I. B.; FEITOSA, C. A. C.; PASKOCIMAS, C. A.; LONGO, E.; PAIVA-SANTOS, C. O. 2009. Development of metal oxide nanoparticles by soft chemical method. *Ceram. Int.*, v. 35, p. 463–466.
- BERRY, F.; IVERSEN, E. S. 1966. Pompano: Biology of Fisheries and Farming Potential. **In:** Proceedings of the Gulf Caribbean Fisheries Institute, 19th Annual Session, p. 116-128.
- BINGHAM, E.; CORHSEN, B.; POWELL, C. 2001. Patty's Toxicology: Toxicology issues related to metals: neurotoxicology and radiation metals and metal compounds. 5th edition. v. 2. New York: John Wiley & Sons. 819 p.
- BINI, R. A.; MARQUES, R. F. C.; SANTOS, F. J.; CHAKER, J. A.; JAFELICCI Jr., M. 2012. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxysilanes. *J. Magn. Magn. Mater.*, v. 324, p. 534–539.
- BLAKE, D. M.; MANESS, P.-C.; HUANG, Z.; WOLFRUM, E. J.; HUANG, J.; JACOBY, W. A. 1999. Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells. *Separ. Purif. Meth.*, v. 28, p. 1–50.

- BOULDIN, J. L.; INGLE, T. M.; SENGUPTA, A.; ALEXANDER, R.; HANNIGAN, R. E.; BUCHANAN, R. A. 2008. Aqueous toxicity and food chain transfer of Quantum DOTs in freshwater algae and *Ceriodaphnia dubia*. Environ. Toxicol. Chem., v. 27, p. 1958–1963.
- BOUTINGUIZA, M.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, B.; DEL VAL, J.; COMESAÑA, R.; LUSQUIÑOS, F.; POU, J. 2011. Laser-assisted production of spherical TiO₂ nanoparticles in water. Nanotechnology, v. 22, 195606, 7 p.
- BRITTO, R. S.; GARCIA, M. L.; ROCHA, A. M.; FLORES, J. A.; PINHEIRO, M. V. B.; MONSERRAT, J. M.; FERREIRA, J. L. R. 2012. Effects of carbon nanomaterials fullerene C60 and fullerol C60(OH)_{18–22} on gills of fish *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) exposed to ultraviolet radiation. Aquat. Toxicol., v. 114–115, p. 80–87.
- BRONDANI, D.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. 2009. Biosensor based on platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid and laccase for determination of adrenaline. Sens. Actuators, B: Chem., v. 140, p. 252–259.
- CANESI, L.; CIACCI, C.; BETTI, M.; FABBRI, R.; CANONICO, B.; FANTINATI, A.; MARCOMINI, A.; POJANA, G. 2008. Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. Environ. Internat., v. 34, p. 1114–1119.
- CANESI, L.; FABBRI, R.; GALLO, G.; VALLOTTO, D.; MARCOMINI, A.; POJANA, G. 2010. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). Aquat. Toxicol., v. 100, p. 168-177.
- CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Can. J. Fish. Aquat. Sci., v. 47, p. 2123-2136.
- CARVALHO FILHO, A. 1992. Peixes da costa brasileira. São Paulo: Ed. Marca D'água. 304 p.
- CASALS, E.; VÁZQUEZ-CAMPOS, S.; BASTÚS, N. G.; PUNTES, V. 2008. Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. Trends Analyt. Chem., vol. 27, p. 672-683.

- ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.*, v. 538, p. 81-91.
- CERVIGÓN, F. 1993. Los peces marinos de Venezuela. Caracas, Venezuela: Fundación Científica Los Roques. 497 p.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo: Qualidade das praias do município de Ubatuba. 2010. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/123-classificacao-semanal---2010>>. Acesso em: 02 junho 2011.
- CHEN, J.; DONG, X.; XIN, Y.; ZHAO, M. 2011. Effects of titanium dioxide nanoparticles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. *Aquat. Toxicol.*, v. 101, p. 493–499.
- CHEN, T.-H.; LIN, C.-Y.; TSENG, M.-C. 2011. Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Pollut. Bull.*, v. 63, p. 303–308.
- CHO, M.; CHUNG, H.; CHOI, W.; YOON, J. 2004. Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Water Res.*, v. 38, p. 1069–77.
- COLLINS, A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*, v. 26(3), p. 249-61.
- COSTA, A. C. F. M.; VILAR, M. A.; LIRA, H. L.; KIMINAMI, R. H. G. A.; GAMA, L. 2006. Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO₂. *Cerâmica*, v. 52, p. 255-259.
- CUI, Y.; LIU, H.; ZHOU, M.; DUAN, Y.; LI, N.; GONG, X.; HU, R.; HONG, M.; HONG, F. 2011. Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO₂ nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 96, p. 221-229.
- DA SILVA, L. F.; MAIA, L. J. Q.; BERNARDI, M. I. B.; ANDRÉS, J. A.; MASTELARO, V. R. 2011. An improved method for preparation of SrTiO₃ nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.*, v. 125, p. 168–173.

- DAUGHTON, C. G. 2004. Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environ. Impact Asses.*, v. 24, p. 711–732.
- DAVDA, J.; LABHASETWAR, V. 2002. Characterization of nanoparticles uptake by endothelial cells. *Int. J. Pharm.*, v. 233, p. 51–59.
- DU PREEZ, H. H.; MCLACHLAN, A.; MARAIS, J. F.; COCKCROFT, A. C. 1990. Bioenergetics of fishes in a high-energy surf-zone. *Mar. Biol.*, v. 106, p. 1-12.
- EPA - U.S. Environmental Protection Agency. 2005. Nanotechnology White Paper. S. P. Council, 121p.
- FABIAN, E.; LANDSIEDEL, R.; MA-HOCK, L.; WIENCH, K.; WOHLLEBEN, W.; VAN RAVENZWAAY, B. 2008. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch. Toxicol.*, v. 82(3), p. 151-157.
- FARRÉ, M.; GAJDA-SCHRANTZ, K.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. 2009. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 393, p. 81-95.
- FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.*, v. 84, p. 415–430.
- FENECH, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.*, v. 455, p. 81–95.
- FOSTER, K. A.; YAZDANIAN, M.; AUDUS, K. L. 2001. Microparticulate uptake mechanism of in-vitro cell culture models of the respiratory epithelium. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 53, p. 57–66.
- GAGNÉ, F. ; AUCLAIR, J. ; TURCOTTE, P. ; FOURNIER, M. ; GAGNON, C. ; SAUVE, S. ; BLAISE, C. 2008. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquat. Toxicol.*, v. 86, p. 333–340.

- GALLOWAY, T.; LEWIS, C.; DOLCIOTTI, I.; JOHNSTON, B. D.; MOGER, J.; REGOLI, F. 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environ. Pollut.*, v. 158, p. 1748-1755.
- GARCÍA, O.; MANDINA, T.; LAMADRID, A. I.; DIAZ, A.; REMIGIO, A.; GONZALEZ, Y.; PILOTO, J.; GONZALEZ, J. E.; ALVAREZ, A. 2004. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat. Res.*, v. 556, p. 25-34.
- GEISER, M.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; KAPP, N.; SCHÜRCH, S.; KREYLING, W.; SCHULZ, H.; SEMMLER, M.; HOF, V. I.; HEYDER, J.; GEHR, P. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Health Perspect.*, v. 113 (11), p. 1555–1560.
- GELIS, C.; GIRARD, S.; MAVON, A.; DELVERDIER, M.; PAILLOUS, N.; VICENDO, P. 2003. Assessment of the skin photoprotective capacities of an organo-mineral broad-spectrum sunblock on two ex vivo skin models, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, v. 19, p. 242–253.
- GERLOFF, K.; FENOGLIO, I.; CARELLA, E.; KOLLING, J.; ALBRECHT, C.; BOOTS, A. W.; FORSTER, I.; SCHINS, R. P. F. 2012. Distinctive toxicity of TiO₂ rutile/anatase mixed phase nanoparticles on Caco-2 cells. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 25, p. 646–655.
- GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. 2010. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. *Chemosphere*, v. 81, p. 1253–1262.
- GOMES, V.; PASSOS, M. J. A. C. R.; SANTOS, T. C. A.; CAMPOS D. Y. F.; USSAMI, K. A.; HASUE, F. M.; PHAN, V. N. 2012. DNA strand breaks in caged Antarctic coastal fish (*Trematomus newnesi*), following exposure to the waters in front of the Brazilian Antarctic Research Station “Comandante Ferraz”. *Pesq. Antárt. Bras.*, v. 5, p. 61-70.
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. 2003. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **In:** RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.). *Mutagênese ambiental*. Canoas (RS): Editora Ulbra, p. 247-279.

- GOPALAN, R. C.; OSMAN, I. F.; AMANI, A.; DE MATAS, M.; ANDERSON, D. 2009. The effect of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles in the comet assay with UVA photoactivation of human sperm and lymphocytes. *Nanotoxicology*, v. 3, p. 33-39.
- GOTTSCHALK, F.; SONDERER, T.; SCHOLZ, R. W.; NOWACK, B. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.*, v. 43, p. 9216–9222.
- GRIFFITT, R. J.; LUO, J.; GAO, J.; BONZONGO, J. C.; BARBER, D. S. 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 27, p. 1972- 1978.
- GURR, J. R.; WANG, A. S.; CHEN, C. H.; JAN, K. Y. 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, v. 213, p. 66-73.
- HACKENBERG, S.; FRIEHS, G.; FROELICH, K.; GINZKEY, C.; KOEHLER, C.; SCHERZED, A.; BURGHARTZ, M.; HAGEN, R.; KLEINSASSER, N. 2010. Intracellular distribution, geno- and cytotoxic effects of nanosized titanium dioxide particles in the anatase crystal phase on human nasal mucosa cells. *Toxicol. Lett.*, v. 195, p. 9–14.
- HALL, S.; BRADLEY, T.; MOORE, J. T.; KUYKINDALL, T.; MINELLA, L. 2009. Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO₂ particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO₂ toxicity. *Nanotoxicology*, v. 3, p. 91-97.
- HANDY, R. D.; HENRY, T. B.; SCOWN, T. M.; JOHNSTON, B. D.; TYLER, C. R. 2008. Manufactured nanoparticles: Their uptake and effects on fish-a mechanistic analysis. *Ecotoxicology*, v. 17, p. 396–409.
- HANDY, R. D.; KAMMER, F. V. D.; LEAD, J. R.; HASSELLÖV, M.; OWEN, R.; CRANE, M. 2008a. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, v. 17, p. 287–314.
- HANDY, R. D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. 2008b. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, v. 17, p. 315–325.

- HAO, L.; WANG, Z.; XING, B. 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). J. Environ. Sci., v. 21, p. 1459-1466.
- HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. Mutagenesis, v. 18 (1), p. 45–51.
- HARTMANN, N. B.; VON DER KAMMER, F.; HOFMANN, T.; BAALLOUSHA, M.; OTTOFUELLING, S.; BAUN, A. 2010. Algal testing of titanium dioxide nanoparticles--testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability. Toxicology, v. 269, p. 190-197.
- HARTWIG, A. 1998. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. Toxicol. Lett., v. 102-103, p. 235-239.
- HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARYS, Ph.; MACGREGOR, J. T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. Environ. Mol. Mutag. v. 18, p. 277-291.
- HEINLAAN, M.; IVASK, A.; BLINOVA, I.; DUBOURGUIER, H. C.; KAHRU, A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. Chemosphere, v. 71, p. 1308–1316.
- HEILMAN, M. J.; SPIELER, R. E. 1999. The daily feeding rhythm to demand feeders and the effects of time meal-feeding on the growth of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. Aquaculture, v. 180, p. 53-64.
- HOAR, W. S.; HICKMAN Jr, C. P. 1967. A laboratory companion for general and comparative physiology. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 256 p.
- HOESE, H. D.; MOORE, R. H. 1977. Fishes of the Gulf of Mexico, Texas, Louisiana, and adjacent waters. College Station: Texas A & M University Press. 327 p.
- HOLBROOK, R. D.; MURPHY, K. E.; MORROW, J. B.; COLE, K. D. 2008. Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web. Nat. Nanotechnol., v. 3, p. 352–355.

- JOHNSON, A. C.; BOWES, M. J.; CROSSLEY, A.; JARVIE, H. P.; JURKSCHAT, K.; JÜRGENS, M. D.; LAWLOR, A. J.; PARK, B.; ROWLAND, P.; SPURGEON, D.; SVENDSEN, C.; THOMPSON, I. P.; BARNES, R. J.; WILLIAMS, R. J.; XU, N. 2011. An assessment of the fate, behaviour and environmental risk associated with sunscreen TiO₂ nanoparticles in UK field scenarios. *Sci. Total Environ.*, v. 409(13), p. 2503–2510.
- JOHNSTON, H. J.; HUTCHISON, G. R.; CHRISTENSEN, F. M.; PETERS, S.; HANKIN, S.; STONE, V. 2009. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Part. Fibre Toxicol.*, v. 6, p. 33.
- JORY, D.; IVERSEN, E.; LEWIS, R. 1985. Culture of the fishes of the genus *Trachinotus* (Carangidae) in the Western Atlantic. *J. World Maric. Soc.*, v. 16, p. 87-94.
- JOVANOVIC, B.; ANASTASOV, L.; ROW, E. W.; ZHANG, Y.; CLAPP, A. R.; PALI, D. 2011. Effects of nanosized titanium dioxide on innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 74, p. 675–683.
- KAEGI, R.; ULRICH, A.; SINNET, B.; VONBANK, R.; WICHSER, A.; ZULEEG, S.; SIMMLER, H.; BRUNNER, S.; VONMONT, H.; BURKHARDT, M.; BOLLER, M. 2008. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ. Pollut.*, v. 156, p. 233-239.
- KAKINOKI, K.; YAMANE, K.; TERAOKA, R.; OTSUKA, M.; MATSUDA, Y. 2004. Effect of relative humidity on the photocatalytic activity of titanium dioxide and photostability of famotidine. *J. Pharm. Sci.*, v. 93(3), p. 582–589.
- KANG, S. J.; KIM, B. M.; LEE, Y. J.; CHUNG, H. W. 2008. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 49, p. 399-405.
- KARLSSON, H. L.; CRONHOLM, P.; GUSTAFSSON, J.; MOLLER, L. 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 21, p. 1726-1732.

- KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.*, v. 27, p. 247-254.
- KISIN, E. R.; MURRAY, A. R.; KEANE, M. J.; SHI, X. C.; SCHWEGLER-BERRY, D.; GORELIK, O.; AREPALLI, S.; CASTRANOVA, V.; WALLACE, W. E.; KAGAN, V. E.; SHVEDOVA, A. A. 2007. Single-walled carbon nanotubes: geno-and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J. Toxicol. Environ. Health*, v. 70(24), p. 2071-2079.
- KLUG, H.; ALEXANDER, L. 1962. X-ray diffraction procedures. For polycrystalline and amorphous materials. 2nd edition. New York: John Wiley & Sons. 966 p.
- KORNHAUSER, A.; WAMER, W. G.; LAMBERT, L. L. 1991. Light-induced dermal toxicity: Effects on the cellular and the molecular level. **In:** MARZULLI, F. N.; MAIBACH, H. I. (Eds). *Dermal-toxicology*. 4th edition. New York: Hemisphere, p. 527-569.
- LANDSIEDEL, R.; KAPP, M. D.; SCHULZ, M.; WIENCH, K.; OESCH, F. 2009. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations-many questions, some answers. *Mutat. Res.*, v. 681, p. 241–258.
- LOMER, M. C.; THOMPSON, R. P.; POWELL, J. J. 2002. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 61, p. 123–130.
- LOPES, I.; RIBEIRO, R.; ANTUNES, F. E.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; RASTEIRO, M. G.; SOARES, A. M. V. M.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. 2012. Toxicity and genotoxicity of organic and inorganic nanoparticles to the bacteria *Vibrio fischeri* and *Salmonella typhimurium*. *Ecotoxicology*, v. 21(3), p. 637-648.
- LOVERN, S. B.; KLAPER, R. 2006. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 25, p. 1132–1137.
- MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação: Programa Nacional de Nanotecnologia. 2005. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/27137.html>>. Acesso em: 15 setembro 2011.

- MARCIANO, F. R.; LIMA-OLIVEIRA, D. A.; DA-SILVA, N. S.; DINIZ, A. V.; CORAT, E. J.; TRAVA-AIROLDI, V. J. 2009. Antibacterial activity of DLC films containing TiO₂ nanoparticles. *J. Colloide Interface Sci.*, v. 340, p. 87–92.
- MATRANGA, V.; CORSI, I. 2012. Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches. *Mar. Environ. Res.*, v. 76, p. 32-40.
- MENARD, A.; DROBNE, D.; JEMEC, A. 2011. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. *Environ. Pollut.*, v. 159, p. 677-684.
- MERSH, J.; BEAUVAIS, M. N.; NAGEL, P. 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutat. Res.*, v. 371, p. 47–55.
- MIAO, A. J.; SCHWEHR, K. A.; XU, C.; ZHANG, S. J.; LUO, Z.; QUIGG, A.; SANTACHI, P. H. 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ. Pollut.*, vol. 157, p. 3034-3041.
- MISSIRLIS, D.; KAWAMURA, R.; TIRELLI, N.; HUBBELL, J. A. 2006. Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 29, p. 120–129.
- MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.*, v. 399, p. 135-147.
- MOORE, M. 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.*, v. 32, p. 967–976.
- MUELLER, N. C.; NOWACK, B. 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ. Sci. Technol.*, v. 42, p. 4447-4453.
- MÜLLER, N. 2007. Nanoparticles in the environment risk assessment based on exposure-modelling - What concentrations of nano titanium dioxide, carbon nanotubes and nano silver are we exposed to? Diploma thesis. ETH Zurich, Department of Environmental Sciences, 97 p.

- NAVARRO, E.; BAUN, A.; BEHRA, R.; HARTMANN, N. B.; FILSER, J.; MIAO, A. J.; QUIGG, E. A.; SANTOSCHI, P. H.; SIGG, L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, v. 17, p. 372-386.
- NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, v. 311, p. 622-627.
- NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.*, v. 150, p. 5-22.
- OBERDÖRSTER, G.; MAYNARD, A.; DONALDSON, K.; CASTRANOVA, V.; FITZPATRICK, J.; AUSMAN, K.; CARTER, J.; KARN, B.; KREYLING, W.; LAI, D.; OLIN, S.; MONTEIRO-RIVIERE, N.; WARHEIT, D.; YANG, H. 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: Elements of a screening strategy. Part. *Fibre Toxicol.*, v. 2, p. 8.
- OGINO, C.; KANEHIRA, K.; SASAI, R.; SONEZAKI, S.; SHIMIZU, N. 2007. Recognition and affective degradation of 17[β]-estradiol by anti-estradiol-antobody-immobilized TiO₂ nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* v. 104, p. 339-342.
- OWEN, R.; DEPLEDGE, M. 2005. Nanotechnology and the environment: risks and rewards. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 50(6), p. 609–612.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. 1997. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 38, p. 252–259.
- PARK, H.-O.; MIRI, Y.; KANG, S. K.; YANG, S. I.; KIM, Y.-J. 2011. Comparison of cellular effects of titanium dioxide nanoparticles with different photocatalytic potential in human keratinocyte, HaCaT cells. *Mol. Cell. Toxicol.*, v. 7, p. 67-75.
- PARK, E. J.; YI, J.; CHUNG, K. H.; RYU, D. Y.; CHOI, J.; PARK, K. 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol. Lett.*, v. 180, p. 222-229.
- PARKER, R. E. 1979. *Introductory statistics for biology*. Bedford Square, London: Edward Arnold Ltd., 122 p.

- PATERSON, G.; ATARIA, J. M.; HOQUE, M. E.; BURNS, D. C.; METCALFE, C. D. 2011. The toxicity of titanium dioxide nanopowder to early life stages of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, v. 82, p. 1002–1009.
- PATRI, A.; UMBREIT, T.; ZHENG, J.; NAGASHIMA, K.; GOERING, P.; FRANCKE-CARROLL, S.; GORDON, E.; WEAVER, J.; MILLER, T.; SADRIEH, N.; McNEIL, S.; STRATMEYER, M. 2009. Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice. *J. Appl. Toxicol.*, v. 29, p. 662–672.
- PETERSEN, E. J.; NELSON, B. C. 2010. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 398, p. 613–650.
- PHAN, V. N.; GOMES, V.; PASSOS, M. J. A. C. R.; ROCHA, A. J. S.; USSAMI, K. A.; CAMPOS, D. Y. F.; PEREIRA, B. A. 2007. Biomonitoring of the genotoxic potencial (micronucleous and erythrocyte nucleous abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station “Comandante Ferraz”, King George Island. *Polar Biol.*, v. 30, p. 209–217.
- PINTO, A. V.; DEODATO, E. L.; CARDOSO, J. S.; OLIVEIRA, E. F.; MACHADO, S. L.; TOMA, H. K.; LEITÃO, A. C.; DE PÁDULA, M. 2010. Enzymatic recognition of DNA damage induced by UVB-photosensitized titanium dioxide and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for oxidatively DNA damage generation. *Mutat. Res.*, v. 688, p. 3–11.
- RAHMAN, Q.; LOHANI, M.; DOPP, E.; PEMSEL, H.; JONAS, L.; WEISS, D. G.; SCHIFFMANN, D. 2002. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ. Health Perspect.*, v. 110, p. 797–800.
- RAMSDEN, C. S.; SMITH, T. J.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology*, v. 18, p. 939–951.

- REEVES, J. F.; DAVIES, S. J.; DODD, N. J. F.; JHA, A. N. 2008. Hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$) are associated with titanium dioxide (TiO_2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat. Res.*, v. 640, p. 113–122.
- SANTOS, T. C. A.; PHAN, V. N.; PASSOS, M. J. A. C. R.; GOMES, V. 2006. Effects of naphthalene on metabolic rate and ammonia excretion of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 335, p. 82-90.
- SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. 2010. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 62, p. 560–575.
- SCHMIDT, W. 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.*, v. 31, p. 9-15.
- SCOWN, T. M.; AERLE, R. V.; JOHNSTON, B. D.; CUMBERLAND, S.; LEAD, J. R.; OWEN, R.; TYLER, C. R. 2009. High doses of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles accumulate in the kidneys of rainbow trout but with no observable impairment of renal function. *Toxicol. Sci.*, v. 109(2), p. 372–380.
- SIMONET, B. M.; VALCÁRCEL, M. 2008. Monitoring nanoparticles in the environment. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 393, p. 17-21.
- SINGH, N. P.; MACCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, v. 175, p. 184-191.
- SINGH, N.; MANSHIAN, B.; JENKINS, G. J. S.; GRIFFITHS, S. M.; WILLIAMS, P.M.; MAFFEIS, T. G. G.; WRIGHT, C. J.; DOAK, S. H. 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, v. 30, p. 3891–3914.
- SHIN, J. A.; LEE, E. J.; SEO, S. M.; KIM, H. S.; KANG, J. L.; PARK, E. M. 2010. Nanosized titanium dioxide enhanced inflammatory responses in the septic brain of mouse. *Neuroscience*, v. 165, p. 445-454.
- SHUKLA, R. K.; SHARMA, V.; PANDEY, A. K.; SINGH, S.; SULTANA, S.; DHAWAN, A. 2011. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol. In Vitro*, v. 25(1), p. 231-41.

- SOUZA, L. G.; SILVA, E. J.; MARTINS, A. L. L.; MOTA, M. F.; BRAGA, R. C.; LIMA, E. M.; VALADARES, M. C.; TAVEIRA, S. F.; MARRETO, R. N. 2011. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 79, p. 189–196.
- STEGEMAN, J. J.; LECH, J. J. 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ. Health Perspect.*, v. 90, p. 101–109.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 35, p. 206–221.
- TIEDE, K.; BOXALL, A. B. A.; TEAR, S. P.; LEWIS, J.; DAVID, H.; HASSELLÖV, M. 2008. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Addit. Contam.*, v. 25 (7), p. 795–821.
- TROUILLER, B.; RELIENE, R.; WESTBROOK, A.; SOLAIMANI, P.; SCHIESTL, R. H. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.*, v. 69(22), p. 8784–8789.
- VAZ, C.; MELEGARI, S. P.; COSTA, C. H. D.; POPOVIC, R.; KLEINE, T.; BÖHM, R. F. S.; OLIVEIRA, T. M. N. D.; MATIAS, W. G. 2011. The effects of copper oxide nanoparticles on *Mysidopsis juniae*. *Toxicol. Lett.* v. 205, p. S290.
- VEVERS, W. F.; JHA, A. N. 2008. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro. *Ecotoxicology*, v. 17, p. 410–20.
- VIGNARDI, C. P.; PASSOS, M. J. A. C. R.; HASUE, F. M.; SARTORIO, P. V.; CARDOSO, C. M.; OLIVEIRA, A. M. B.; PERAZOLLI, B. E.; SANTOS, T. C. A.; MACHADO, A. S. D.; GOMES, V.; PHAN, V. N. 2011. Avaliação da genotoxicidade da nanopartícula TiO₂ em juvenis de pampo, *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766), através de métodos citogenotóxicos. In: Resumos Expandidos do 14^o Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar - COLACMAR. Camboriú : Associação Latino-Americana de Investigadores em Ciências do Mar - ALICMAR; AOCEANO, trabalho N^o 0182. CDROOM.

- XIONG, D.; FANG, T.; YU, L.; SIMA, X.; ZHU, W. 2011. Effects of nano-scale TiO_2 , ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci. Total Environ.*, v. 409(8), p. 1444-52.
- WANG, J.; ZHU, X.; ZHANG, X.; ZHAO, Z.; LIU, H.; GEORGE, R.; WILSON-RAWLS, J.; CHANG, Y.; CHEN, Y. 2011. Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) reproduction upon chronic exposure to TiO_2 nanoparticles. *Chemosphere*, v. 83, p. 461-467.
- WANG, J. J.; SANDERSON, B. J. S.; WANG, H. 2007. Cyto and genotoxicity of ultrafine TiO_2 particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res.*, v. 628, p. 99–106.
- WEIRICH, C. R.; RICHE, M. 2006. Acute tolerance of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus* L., to ammonia and nitrite at various salinities. *Aquac. Res.*, v. 37, p. 855-861.
- WOJEWÓDZKA, M.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. 2002. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. *Mutat. Res.*, v. 518, p. 9-20.
- ZAR, J. H. 1996. Biostatistical analysis, 3rd edition. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall. 662 p.
- ZHANG, X.; SUN, H.; ZHANG, Z.; NIU, Q.; CHEN, Y.; CRITTENDEN, J. C. 2007. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere*, v. 67, p. 160–166.
- ZHU, X.; WANG, J.; ZHANG, X.; CHANG, Y.; CHEN, Y. 2010. Trophic transfer of TiO_2 nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere*, v. 79, p. 928–933.
- ZHU, X.; ZHU, L.; DUAN, Z.; QI, R.; LI, Y.; LANG, Y. 2008. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *J. Environ. Sci. Health A*, v. 43, p. 278–284.