Fabio Matsu Hasue

“Uso de biomarcadores para avaliar o efeito citogenotóxico e o estresse oxidativo em *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) ocasionada por nanopartícula de prata”

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

Orientador: Prof. Dr. Phan Van Ngan

São Paulo

- 2017 –

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

“Uso de biomarcadores para avaliar o efeito citogenotóxico e o estresse oxidativo em *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) ocasionada por nanopartícula de prata”

Fabio Matsu Hasue

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

Julgada em: ____/____/____

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

SUMÁRIO

I	Introdução	1
II	Hipótese	7
III	Objetivos	7
IV	Materiais e métodos	8
IV.1	Coleta e manutenção de animais.....	8
IV.2	Caracterização da nanopartícula de prata	10
IV.2.1	Microscopia eletrônica de varredura.	10
IV.2.2	Espalhamento dinâmico de luz e Potencial Zeta	11
IV.2.3	Difração de raios-X.....	11
IV.3	Execução das exposições.....	12
IV.4	Coleta de material biológico.....	13
IV.5	Ensaio cometa	15
IV.6	Análise do dano ao DNA.....	16
IV.7	Teste do micronúcleo e anormalidades eritrocitárias nucleares	17
IV.8	Análise da atividade enzimática da catalase.....	19
IV.9	Análise estatística	20
V	Resultados	21
V.1	Caracterização da nanopartícula de prata	21
V.1.1	Microscopia eletrônica de transmissão - MEV AgNP _{PVP}	21
V.1.2	Espalhamento dinâmico de luz.....	22
V.1.3	Difração de raio-X.....	24
V.2	Análise MEV-EDS em fígado	25
V.3	Ensaio cometa	27

V.3.1	Efeitos da dosagem – Experimento 1	27
V.3.1.1	36 horas	27
V.3.1.2	72 horas	29
V.3.1.3	108 horas	30
V.3.2	Efeitos do tempo de exposição – Experimento 1	31
V.3.2.1	Ctrl _{Água}	31
V.3.2.2	Ctrl _{Salina}	32
V.3.2.3	0.75 µg _{AgNP/g} peixe	33
V.3.2.4	1.5 µg _{AgNP/g} peixe	34
V.3.2.5	3 µg _{AgNP/g} peixe	35
V.3.3	Efeitos da dosagem – Experimento 2	36
V.3.3.1	12 horas	36
V.3.3.2	24 horas	38
V.3.3.3	36 horas	39
V.3.4	Efeitos do tempo de exposição – Experimento 2	40
V.3.4.1	Ctrl _{Água}	40
V.3.4.2	Ctrl _{Salina}	41
V.3.4.3	0.75 µg _{AgNP/g} peixe	42
V.3.4.4	1.5 µg _{AgNP/g} peixe	43
V.3.4.5	3 µg _{AgNP/g} peixe	44
V.4	Anormalidades nucleares eritrocitárias	45

V.4.1	Efeitos da dosagem – Experimento 1	45
V.4.1.1	36 horas	45
V.4.1.2	72 horas	47
V.4.1.3	108 horas	49
V.4.2	Efeitos do tempo de exposição – Experimento 1	51
V.4.2.1	Ctrl _{Água}	51
V.4.2.2	Ctrl _{Salina}	53
V.4.2.3	Dose 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$	55
V.4.2.4	Dose 1.5 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$	57
V.4.2.5	Dose 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$	59
V.4.3	Efeitos da dosagem – E2.....	61
V.4.3.1	12 horas	61
V.4.3.2	24 horas	63
V.4.3.3	36 horas	65
V.4.4	Efeito do tempo de exposição – Experimento 2.....	67
V.4.4.1	Ctrl _{Água}	67
V.4.4.2	Ctrl _{Salina}	69
V.4.4.3	0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$	71
V.4.4.4	1.5 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$	73
V.4.4.5	3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$	75
V.5	Atividade enzimática da catalase	77

V.5.1	Efeito da dosagem – Experimento 1	77
V.5.1.1	36 h	77
V.5.1.2	72 horas	79
V.5.1.3	108 horas	81
V.5.2	Efeito do tempo de exposição – Experimento 1	82
V.5.2.1	Ctrl _{Água}	82
V.5.2.2	Ctrl _{Salina}	83
V.5.2.3	0.75 µg _{AgNP/g} peixe	84
V.5.2.4	1.5 µg _{AgNP/g} peixe	85
V.5.2.5	3 µg _{AgNP/g} peixe	86
V.5.3	Efeito da dosagem – Experimento 2	87
V.5.3.1	12 horas	87
V.5.3.2	24 horas	88
V.5.3.3	36 horas	89
V.5.4	Efeito do tempo de exposição – Experimento 2	90
V.5.4.1	Ctrl _{Água}	90
V.5.4.2	Ctrl _{Salina}	91
V.5.4.3	0.75 µg _{AgNP/g} peixe	92
V.5.4.4	1.5 µg _{AgNP/g} peixe	93
V.5.4.5	3 µg _{AgNP/g} peixe	94
VI	Discussão	95

VII	Conclusão.....	100
VIII	Bibliografia.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático do sistema de manutenção de peixes utilizado. .	9
Figura 2 - Catálogo do micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias. A – normal; B – micronúcleo; C – reniforme; D – segmentado; E – lobado; F – Bolha.	18
Figura 3 - Fotomicrografia da nanopartícula da prata (AgNP) em aumento de 3000X (A), 10.000X (B) e 100.000X (C).	21
Figura 4 - Distribuição do tamanho hidrodinâmico do diâmetro da nanopartícula de prata (AgNP) em suspensão utilizando água destilada (A) e solução salina (B)...	23
Figura 5 - Difração de raios-X da amostra de AgNP utilizada no estudo.	24
Figura 6- Eletromicrografia de fígado de <i>T. carolinus</i> que não receberam injeção intraperitoneal (Ctrl _{Água}) com AgNP e permaneceram em água limpa por 36 h. (A – fígado Ctrl _{Água} aumento de 800X; B – fígado Ctrl _{Água} aumento de 3000X; C – fígado Ctrl _{Água} aumento de 6000X; D - fígado Ctrl _{Água} aumento de 10000X; setas longas – hepatócitos; setas curtas – sinusóides hepáticos).	25
Figura 7 - Eletromicrografia e análise semiquantitativa de fígado de <i>T. carolinus</i> que recebeu a dose de 3 µg _{AgNP} /g _{peixe} e permaneceu em água limpa por 36 h (E/F - fígado 3 µg _{AgNP} /g _{peixe} aumento de 3000X; G - fígado 3 µg _{AgNP} /g _{peixe} aumento de 6000X; H - região da análise semi-quantitativa; I - percentil da composição de átomos, C – carbono, O – oxigênio, P – fósforo; S – enxofre, K – potássio, Cl – cloro).	26
Figura 8 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de <i>Trachinotus carolinus</i> (n=5) mantidos em água limpa por 36 horas após receberem	

injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) nas doses de 0.75, 1.5, 3 µgAgNP/g_{peixe} e de 10 µL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras distintas indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 28

Figura 9 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 72 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) nas doses de 0.75, 1.5, 3 µgAgNP/g_{peixe} e de 10 µL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos, $p < 0,05$). 29

Figura 10 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) nas doses de 0.75, 1.5, 3 µgAgNP/g_{peixe} e de 10 µL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos, $p < 0,05$). 30

Figura 11 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5), nos quais não foi administrada injeção de suspensão de AgNP e foram mantidos em água limpa (Ctrl_{Água}) por 36, 72 e 108 horas (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$). 31

Figura 12 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de solução isosmótica para teleósteos marinhos (10 µL_{Salina}/g_{peixe} - Ctrl_{Salina}) (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$). 32

Figura 13 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) na

dose de 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).	33
Figura 14 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de <i>Trachinotus carolinus</i> (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) na dose de 1.5 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).	34
Figura 15 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de <i>Trachinotus carolinus</i> (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) na dose de 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).	35
Figura 16 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de <i>Trachinotus carolinus</i> (n=5) mantidos em água limpa por 12 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl _{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl _{Água}) (letras distintas indicam diferença significativa, $p < 0,05$).	37
Figura 17 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de <i>Trachinotus carolinus</i> (n=5) mantidos em água limpa por 24 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl _{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl _{Água}) (letras distintas indicam diferença significativa, $p < 0,05$).	38
Figura 18 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de <i>Trachinotus carolinus</i> (n=5) mantidos em água limpa por 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl _{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl _{Água}) (letras distintas indicam diferença significativa, $p < 0,05$).	39

Figura 19 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de <i>Trachinotus carolinus</i> (n=5), nos quais não foi administrada injeção de suspensão de AgNP e foram mantidos em água limpa (Ctrl _{Água}) por 12, 24 e 36 horas (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).....	40
Figura 20 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de <i>Trachinotus carolinus</i> (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de solução isosmótica para teleósteos marinhos (10 μL Salina/g _{peixe} - Ctrl _{Salina}) (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).	41
Figura 21 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de <i>Trachinotus carolinus</i> (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L ⁻¹) na dose de 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).	42
Figura 22 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de <i>Trachinotus carolinus</i> (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L ⁻¹) na dose de 1.5 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).	43
Figura 23 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de <i>Trachinotus carolinus</i> (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 h após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L ⁻¹) na dose de 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).	44
Figura 24 - Média da frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de <i>Trachinotus carolinus</i> (n = 5) mantidos em água limpa por 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl _{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl _{Água}) (ANE = MN + R + L + S + B,	

MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 46

Figura 25 - Média da frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 72 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ e de 10 μL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 48

Figura 26 - Média da frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ e de 10 μL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 50

Figura 27 - Média de frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa (Ctrl_{Água}), sem receber injeções, por 36, 72 e 108 horas (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 52

Figura 28 - Média de frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receber injeção de suspensão isosmótica para teleósteos marinhos (10 $\mu\text{L}_{\text{Salina}}/\text{gpeixe}$ - Ctrl_{Salina}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 54

Figura 29 - Média de frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) na dose de 0.75 µg_{AgNP}/g_{peixe} (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05). 56

Figura 30 - Média de frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) na dose de 1.5 µg_{AgNP}/g_{peixe} (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05). 58

Figura 31 - Média de frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) na dose de 3 µg_{AgNP}/g_{peixe} (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05). 60

Figura 32 - Média da frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 12 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 µg_{AgNP}/g_{peixe} e de 10 µL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05). 62

Figura 33. - Média da frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 24 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 µg_{AgNP}/g_{peixe} e de 10 µL de

solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 64

Figura 34 - Média da frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 66

Figura 35 - Média de frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa (Ctrl_{Água}), sem receber injeções, por 12, 24 e 36 horas (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 68

Figura 36 Média de frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receber injeção de suspensão isosmótica para teleósteos marinhos (10 $\mu\text{L}_{\text{Salina/g}_{\text{peixe}}}$ - Ctrl_{Salina}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 70

Figura 37 - Média de frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) na dose de 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 72

Figura 38 - Média de frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) na dose de 1.5 µg_{AgNP}/g_{peixe} (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05). 74

Figura 39. - Média de frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) na dose de 3 µg_{AgNP}/g_{peixe} (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05). 76

Figura 40 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 µg_{AgNP}/g_{peixe} e de 10 µL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05). 78

Figura 41 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 72 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 µg_{AgNP}/g_{peixe} e de 10 µL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05). 80

Figura 42 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 µg_{AgNP}/g_{peixe} e de 10 µL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05). 81

- Figura 43 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5), nos quais não foi administrada injeção de suspensão de AgNP e foram mantidos em água limpa (Ctrl_{Água}) por 36, 72 e 108 horas (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$)..... 82
- Figura 44 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de solução isosmótica para teleósteos marinhos (10 μL Salina/g_{peixe} - Ctrl_{Salina}) (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$). 83
- Figura 45 - Média e desvio padrão da atividade a catalase em fígado (U/mg) de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) na dose de 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$) 84
- Figura 46 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) na dose de 1.5 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$). 85
- Figura 47 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) na dose de 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$). 86
- Figura 48 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 12 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 87

Figura 49 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 24 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 88

Figura 50 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$). 89

Figura 51 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5), nos quais não foi administrada injeção de suspensão de AgNP e foram mantidos em água limpa (Ctrl_{Água}) por 12, 24 e 36 horas (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$). 90

Figura 52 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de solução isosmótica para teleósteos marinhos (10 $\mu\text{L}_{\text{Salina}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ - Ctrl_{Salina}) (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$). 91

Figura 53 - Média e desvio padrão da atividade a catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 h após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) na dose de 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$). 92

Figura 54 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) na

dose de 1.5 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$). 93

Figura 55 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) na dose de 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$). 94

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Valores da média da massa (M) em gramas (g) e do comprimento total (CT) em milímetros (mm) dos peixes utilizados no Experimento 1 (n = 5 por tratamento; tratamentos: controle água – Ctrl_{Água}; controle solução salina – Ctrl_{Salina}; [1], [2] e [3] – dosagem de nanopartícula de prata injetada 0.75, 1.5 e 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$, respectivamente; t – período após administração da injeção, t₁ = 36 h, t₂ = 72 h, t₃ = 108 h; * - $\pm$ erro padrão). 14

Tabela 2. Valores da média da massa (M) em gramas (g) e do comprimento total (CT) em milímetros (mm) dos peixes utilizados no Experimento 2 (n = 5 por tratamento; tratamentos: controle água – Ctrl_{Água}; controle solução salina – Ctrl_{Salina}; [1], [2] e [3] – dosagem de nanopartícula de prata injetada 0.75, 1.5 e 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$, respectivamente; t – período após administração da injeção, t₁ = 12 h, t₂ = 24 h, t₃ = 36 h; * - $\pm$ erro padrão). 14

Tabela 3 - Valores da média do tamanho da nanopartícula de prata (AgNP) quando se utiliza água destilada ou solução salina no preparo da suspensão. 22

Tabela 4 - Valores da média do potencial Zeta de prata (AgNP) quando se utiliza água destilada ou solução salina no preparo da suspensão. 22

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer

primeiramente, ao meu orientador, o Prof. Dr. Phan Van Ngan pela orientação, pelos ensinamentos, oportunidades, conversas, convivência, ajuda e amizade.

ao Instituto Oceanográfico pelo auxílio e facilidades desde o meu ingresso no instituto até os dias de hoje.

ao CNPq, pela bolsa de estudo concedida.

aos membros atuais e passados do laboratório de Ecofisiologia de Animais Marinhos pela participação de cada um na minha formação pessoal e acadêmica, pela convivência, confiança, conversas e momentos descontraídos, pelos trabalhos de campo e no laboratório, desde a época de estágio até hoje..... obrigado Prof. Phan, Prof. Vicente, Zezé, Athur, Marina, Juliana, Daniela, Deborah Priscila , Alex, Carol e Carol..... e gostaria de agradecer, novamente, à Zezé pela grande ajuda e esforço no trabalho de campo.

à minha família por ser a minha família.

aos professores, funcionários e alunos do IO pela convivência, ajuda e amizade ... são tantos que fica difícil citar. Mas principalmente aos funcionários Luis, André, Davi, Davi, Ayrton, Valter, Wagner, Ana Paula, Silvana, Letícia, Daniel, Cláudio, Roberto, André, Evaldo, Marlene pela grande ajuda e/ou participação durante o doutorado.

aos funcionários da Base de Ubatuba que me auxiliaram durante o trabalho de campo, pelas conversas, risadas e apoio....., Manuel, Ayrton Marcos, Fernando,

Dona Cida, Beth, Vânia, Oziel, Daico, Orlando, Lincoln, José Roberto, Messiana, Zé Luis, Selso, Luis Felipe e ao técnico Ricardo do LAM IOUSP.

aos amigos

Luciano, Luis, André, Tulia, Diego, aos Arthur, Eric, Cau, Caia, Sandrinha, Maurício, Bica, as Paulas, Brow, Cássia, Thomas, Maysa, Zé Carlos, Josie, Patrick, Frango, João, Helliane, Hélio, Jasão, Fanny, André, Sérgio, Isaias

..... pela convivência no IO e fora dele, amizade e descontração.

à Luciana Xavier pelo carinho, compreensão, companheirismo, pelas conversas, paciência, amizade e por ser e estar presente na minha vida e que permaneça assim por um bom tempo.

aos amigos Chicão, Iberê, às Lu, Murizzia, Roberto, Jean, Rafael, Carol e Tita, à querida XXXVII e agregados pela amizade duradoura, ensinamentos, aprendizagens e pelas lembranças.

RESUMO

A ação antimicrobiana da nanopartícula de prata (AgNP) favorece seu uso em diversos produtos. Sua toxicidade está relacionada com o tamanho da nanopartícula, seu estado de agregação e a capacidade em gerar espécies reativas de oxigênio (EsRO). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos citogenotóxicos, como também o estresse oxidativo em eritrócitos de *Trachinotus carolinus* expostos à AgNP. Os peixes receberam, via injeção intraperitoneal, três diferentes doses de suspensão de AgNP, 3, 1.5 e 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$. Após 12, 24, 36, 72 e 108 horas o sangue foi coletado para realizar o ensaio cometa e o teste do micronúcleo (MN) outras anormalidades nucleares (ANE), como também o fígado para a atividade enzimática da catalase. A AgNP demonstrou ser citogenotóxica, como também se capaz de promover o estresse oxidativo em *Trachinotus carolinus*. Os resultados mostram que os danos ao DNA e a ocorrência de MN e ANE apresentaram relação dose-resposta dependente. A redução no dano ao DNA mostrou estar relacionada com o aumento da atividade da catalase.

Palavras chave: Anormalidades nucleares; Micronúcleo; Catalase; Ensaio Cometa; Estresse oxidativo; Nanopartícula de prata; Peixe marinho.

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNP) are applied as antimicrobial agents to many manufactured products. Nanoparticles size, aggregation and its induction of reactive oxygen species (ROS) are associated with AgNP toxicity. This study was undertaken to examine the citogenotoxicity as well as oxidative stress of AgNP in *Trachinotus carolinus* erythrocytes. The fish received three different doses of 3, 1.5 e 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{fish}}$ by intraperitoneal injection. Bloods samples were collected and at 12, 24, 36, 72 and 108 hours post-injection to perform the comet assay and the micronucleus test. Extract of liver were used to measure catalase activity. This study showed that AgNP is citogenotoxic to this species and is able to induce oxidative stress. The results showed that the DNA damage, micronucleus and nuclear abnormalities was dose dependent. The reduction of DNA damage exhibit a close relationship with catalase activity.

Key words: Catalase; Comet Assay; Marine fish; Micronucleus; Nuclear abnormalities; Oxidative stress; Silver nanoparticle.

I INTRODUÇÃO

As partículas que possuem uma ou mais dimensão com medida menor que 100 nanômetros (NM) se enquadram na categoria de tamanho das nanopartículas (HANDY et al., 2008a; LOPES et al., 2012; MOORE, 2006). Podem ser de origem natural como a fuligem (NOWACK; BUCHELI, 2007) ou artificial como as nanopartículas de dióxido de titânio, de carbono como o fulereno e de prata (FABREGA et al., 2011; GOTTSCHALK et al., 2009). Nanopartículas artificiais (NP_a) tem origem a partir da nanotecnologia, uma engenharia que abrange o desenvolvimento e utilização destas substâncias.

O minúsculo tamanho dessas partículas lhes confere características benéficas para o uso humano e tem sua aplicação nos produtos de uso diário, nas ciências, na tecnologia e na medicina. Cerca de 1000 produtos contendo nanopartículas estão disponíveis para o mercado consumidor. Um levantamento, realizado em 2010, mostrou que mais de um quarto deles fazem uso da nanopartícula de prata (AgNP) (FABREGA et al., 2011; SINGH et al., 2009). Ela está presente em produtos como tecidos, embalagem de alimentos, eletrodomésticos, eletrônicos, pigmentos, brinquedos, produtos de saúde, beleza e equipamentos médicos. O amplo uso de prata se deve em parte à sua ação bactericida, como também, ao baixo custo de produção da AgNP. (AHAMED et al., 2010; CHOI et al., 2010; FABREGA et al., 2011).

O Governo brasileiro destaca a importância do desenvolvimento da nanotecnologia na economia e ciência do país ao criar em 2005 o Programa Nacional do Desenvolvimento da Nanociência e Nanotecnologia (MCTI, 2012). Juntamente com a evolução da nanotecnologia há cada vez mais o aumento da produção e da variedade de nanopartículas (AZQUETA; SHAPOSHNIKOV; COLLINS, 2009; HANDY; OWEN; VALSAMI-JONES, 2008; MOORE, 2006; SINGH et al., 2009).

A produção de nanopartículas, e consequente expansão na aplicabilidade e utilização, torna inevitável a entrada destas substâncias, de seus produtos e subprodutos no ambiente. Dentre as possíveis vias de entrada no ambiente, as mais

citadas são: durante a produção, através do uso pelos consumidores e após seu descarte (NAVARRO et al., 2008; NOWACK; BUCHELI, 2007; SIMONET; VALCÁRCEL, 2009; TIEDE et al., 2008). No caso das AgNP, estas podem entrar no ambiente durante o processo de síntese das nanopartículas, na fabricação e incorporação da nanopartícula em produtos comerciais, no uso, em processos de reciclagem e no descarte de produtos que contém AgNP (FABREGA et al., 2011).

No ambiente aquático, estas substâncias podem se acumular por rotas derivadas de fontes industriais e/ou não industriais, como por exemplo, produtos de saúde e beleza, que podem entrar tanto por meios diretos, (efluentes domésticos) como indiretos (lixiviação dos aterros ou solo contaminado e fontes atmosféricas de combustão de resíduos) (MOORE, 2006; OWEN; DEPLEDGE, 2005).

O comportamento das nanopartículas nos ecossistemas aquáticos pode ser influenciado pelas características físico-químicas dos diferentes habitats aquáticos podendo gerar implicações quanto ao destino, interações com o ambiente e exposição de nanopartículas aos organismos. A tendência de muitas nanopartículas em interagir com a matéria orgânica e com coloides naturais presentes nos sistemas aquáticos e formar agregados/aglomerados pode influenciar na sua biodisponibilidade para a biota (FARRÉ et al., 2009; HANDY et al., 2008a). É bem provável que organismos marinhos que vivem na interface do sedimento sejam expostos aos agregados de nanopartículas. Mesmo que em um estado menos disponíveis no ambiente estes agregados podem contaminar a biota via transferência trófica (HANDY et al., 2008b; NOWACK; BUCHELI, 2007).

Dessa forma, o comportamento, e conseqüentemente, a exposição às nanopartículas pode ser diferente nos diversos habitats onde organismos aquáticos são encontrados. Por esses motivos, quantificar a concentração e o tipo de nanomateriais se torna uma tarefa difícil. Entretanto, estudos utilizando modelos preveem a concentração de AgNP no ambiente aquático e terrestre variando de $\mu\text{g.L}^{-1}$ a $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente. Previamente ao advento da AgNP, a prata já havia sido detectada em ambientes aquáticos ($< 0,01 - 100 \text{ ng.L}^{-1}$). Concentrações de AgNP abaixo do mínimo previsto podem afetar organismos procariontes,

invertebrados e peixes, o que indica que a AgNP pode representar um risco ambiental (BILBERG et al., 2010; FABREGA et al., 2011; TIEDE et al., 2008).

Nos organismos aquáticos a contaminação por nanopartículas pode ocorrer através da ingestão direta e absorção pelos tecidos de revestimento como o branquial e epitelial. 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., 2010). Dessa forma, as nanopartículas podem indiretamente ser acumuladas através da ingestão de plantas que as absorveram ou animais que as acumularam, considerando a possibilidade de biomagnificação na cadeia alimentar (EPA, 2007), podendo afetar tanto os animais como os seres humanos. A possibilidade de entrada de nanopartículas nos organismos, e com isso seu armazenamento dentro das células, pode provocar efeitos tóxicos em nível celular ou em nível de organismo (AVAKIAN et al., 2002; OBERDÖRSTER et al., 2005).

A despeito dos benefícios das nanopartículas para a humanidade e de serem consideradas biologicamente inertes, há uma preocupação crescente em relação ao tamanho nanométrico influenciar na toxicidade das nanopartículas. O tamanho nanométrico lhes confere certa facilidade em penetrar nas células, maior reatividade devido à grande área superficial e a habilidade em gerar espécies reativas de oxigênio (EsRO) (NEL et al., 2006; REEVES et al., 2008). A AgNP é usada em diferentes segmentos de produtos que trazem benefícios para a sociedade, mas o amplo uso da prata metálica se deve principalmente pela sua forte ação bactericida/fungicida (AHAMED et al., 2010). O seu potencial de ação está relacionado com dois fatores: formação de EsRO, como por exemplo, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e desregulação do equilíbrio homeostático de íons (Na^+ , H^+ , Ca^{++} , Cl^-) via íons Ag^+ (BOTTERO et al., 2011; BRADFORD et al., 2009).

As lesões fundamentais associadas as EsRO, por exemplo, o ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), incluem alteração no balanço das reações de redução-oxidação (redox) da célula, oxidação de membrana lipídica, ácidos nucleicos como o DNA e proteínas (DI GIULIO et al., 1995; WDZICZAK et al., 1982). Organismos aeróbicos possuem diferentes mecanismos de defesa

antioxidante, os quais podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Dentre as defesas enzimáticas, que atuam diretamente na redução das EsRO, podemos citar a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$, e a catalase (CAT) que decompõe o H_2O_2 . A atuação da SOD em eliminar o ânion superóxido leva a formação de peróxido de hidrogênio, o qual é degradado em oxigênio e água pela CAT. (DI GIULIO et al., 1995; LUSHCHAK, 2011; PAMPLONA; COSTANTINI, 2011). Embora esta defesa enzimática seja uma consequência do metabolismo aeróbico, a presença de EsRO em concentrações acima da fisiologicamente normal pode trazer consequências deletérias celulares devido ao processo de oxidação de proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA (RIBEIRO et al., 2005).

O DNA danificado e não reparado pode acarretar defeitos na transcrição e na replicação dessa molécula, resultando em uma série de transtornos, incluindo a morte celular, câncer e mudanças hereditárias via mutagênese, com sérias implicações ecológicas e evolutivas (KORNHAUSER; WAMER; LAMBERT, 1991). Além disso, quebras no cromossomo podem resultar na formação de micronúcleo (MN). A formação de MN é consequência de fragmentos ou cromossomos acêntricos que não estão ligados às fibras do fuso durante a fase da anáfase da mitose (AL-SABTI; METCALFE, 1995; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). Um aumento na frequência dos micronúcleos é considerado como resultado de danos cromossômicos e genômicos causados por substâncias clastogênicas (MERSCH; BEAUVAIS; NAGEL, 1996). A manutenção da integridade do genoma e a capacidade de reparação do DNA, decorrentes de danos ocorridos devido a fatores internos e externos, são um dos requisitos necessários para qualquer organismo sobreviver e manter a estabilidade das espécies.

A resposta biológica a agressões ambientais pode ser evidenciada em qualquer nível de organização, desde compartimentos subcelulares ou reações bioquímicas intracelulares, a célula, sistemas fisiológicos, organismos, populações, comunidades e até ecossistemas. Estas respostas biológicas ao estresse, provocadas pelos poluentes, podem ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos aos organismos e são comumente denominadas biomarcadores (DI GIULIO et al., 1995; PEAKALL, 1994). Os poluentes atuam modificando as propriedades

estruturais ou funcionais de moléculas essenciais às atividades celulares. Portanto, a utilização de biomarcadores em baixos níveis de organização molecular pode servir como ferramentas sensíveis de avaliação prévia de efeitos biológicos e na avaliação da qualidade ambiental (CAJARAVILLE et al., 2000).

Biomarcadores citogenotóxicos como o Ensaio Cometa (EC) e o MN e ANE são amplamente utilizados para detectar danos no DNA em organismos vivos devido à sensibilidade e facilidade de aplicação (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011; FASULO et al., 2010; LEE; STEINERT, 2003; SINGH et al., 2009; VALAVANIDIS et al., 2006). Outros biomarcadores, como o bioquímico, também são bastante usados para avaliar variação no equilíbrio do estado basal das EsRO (AMADO et al., 2006; CANESI et al., 2010; GOMES et al., 2013b; MOORE, 2006; SAQUIB et al., 2012). Tanto os biomarcadores citogenotóxicos quanto os enzimáticos estão sendo aplicados para avaliar o estresse oxidativo ocasionado por nanopartículas (LANDSIEDEL et al., 2009; LAPRESTA-FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ; BLASCO, 2012; NAIR; PARK; CHOI, 2013).

Estudos envolvendo a AgNP como possível promotora de estresse oxidativo, devido a ação das EsRO, foram realizados em alguns organismos: bactéria (BRADFORD et al., 2009; ZHOU et al., 2012); protozoário (SHI et al., 2013); plantas, algas e fungos (GARDEA-TORRESDEY et al., 2003; GUBBINS; BATTY; LEAD, 2011; NAVARRO et al., 2008); microcrustáceo de água doce (ASGHARI et al., 2012); molusco (AL-SID-CHEIKH; PELLETIER; ROULEAU, 2011; GOMES et al., 2013a); poliqueta (CONG et al., 2011).

A maioria dos trabalhos encontrados que envolveram peixes para avaliar a toxicidade da AgNP fizeram uso de espécies de água doce: medaka japônês (KIM et al., 2013; KWOK et al., 2012; WU et al., 2010; WU; ZHOU, 2012); tilápia (CHOI et al., 2010; GOVINDASAMY; RAHUMAN, 2012); peixe zebra (CHIO et al., 2012; GRIFFITT et al., 2013); perca (BILBERG et al., 2010); truta (FARKAS et al., 2010, 2011). Apenas um fez uso de espécie marinha de peixe - salmão do Atlântico (FARMEN et al., 2012).

Além dos resultados sobre efeitos de NP em organismos aquáticos apresentarem falta de concordância, o conhecimento obtido em relação à toxicidade

se baseia em hipóteses ao invés de dados experimentais (MATRANGA; CORSI, 2012). Os efeitos dos contaminantes em peixes podem manifestar-se em vários níveis de organização biológica, incluindo disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos e tecidos, além de modificações comportamentais que levam ao prejuízo do crescimento e da reprodução (ADAMS et al., 1990). Uma vez que os peixes são um recurso alimentício de alto valor proteico, eles desempenham importante papel no fluxo de energia dos ecossistemas costeiros (DU PREEZ et al., 1990) e podem ser considerados como bons indicadores da qualidade do ambiente.

O peixe escolhido para o presente trabalho, *Tachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766), é comumente conhecido no Brasil como pampo. Esta espécie ocorre no Oceano Atlântico desde o sul da América do Norte até o norte da Argentina (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980), apresenta boa tolerância para diferentes condições ambientais (JORY; IVERSEN; LEWIS, 1985), é fácil de se capturar e de fácil manutenção em cativeiro (SANTOS et al., 2006). Além disso, vem sendo utilizado em diversos trabalhos que visam avaliar o efeito de poluentes citogenotóxicos em peixes marinhos (HASUE et al., 2013; PHAN et al., 2007; ROCHA et al., 2012, 2015; VIGNARDI et al., 2015).

O Brasil passa por um momento de expansão na pesquisa e desenvolvimento envolvendo nanopartículas (NP), haja vista o Estudo Prospectivo “VISÃO DE FUTURO DA NANOTECNOLOGIA NO BRASIL: 2008 - 2025” (ABDI, 2010), o qual também ressalta que é de extrema importância o desenvolvimento de técnicas de monitoramento e diagnóstico de nanomateriais para uma avaliação nanotoxicológica. A região costeira é considerada como o último depósito de muitas nanopartículas que estão sendo produzidas em larga escala (CANESI et al., 2010). Independentemente da sua potencial toxicidade, o aumento na produção de produtos contendo AgNP levará a um maior despejo de prata no ambiente, como também a um potencial impacto negativo nos ecossistemas. Por este motivo, é necessário que se realizem estudos sobre o risco das AgNP para o ambiente (LEVARD et al., 2012).

II HIPÓTESE

O poluente (AgNP) indutor de citogenotoxicidade/estresse oxidativo promoverá respostas que diagnosticarão, através do uso de biomarcadores, o seu efeito em *T. carolinus*.

- H_0 – AgNP não promove citogenotoxicidade/estresse oxidativo em *T. Carolinus*;
- H_1 – AgNP promove citogenotoxicidade/estresse oxidativo em *T. Carolinus*.

III OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos citogenotóxicos e o estresse oxidativo em peixe marinho costeiro exposto à nanopartícula de prata (AgNP). Para tanto, serão utilizados os biomarcadores citados a seguir:

- Genotóxico: avaliar o potencial genotóxico da AgNP através da quantificação da quebra de fitas do DNA eritrocitário (Ensaio Cometa).
- Citogenotóxicos: avaliar o potencial mutagênico da AgNP através do estudo da formação de anormalidades nucleares eritrocitárias e micronúcleos (MN e ANE).
- Bioquímico: avaliar o potencial da AgNP em gerar EsRO através da avaliação da atividade de enzima antioxidante catalase (CAT).

Para complementar o trabalho foram realizadas a caracterização da nanopartícula de prata a partir da difração de raio-X, microscopia eletrônica de varredura e dispersão dinâmico de luz.

IV MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho apresenta dois experimentos que diferem no tempo total de duração. O Experimento 1 prolongou-se por até 108 horas e o Experimento 2 teve duração de até 36 horas. A execução do Experimento 2 teve como objetivo avaliar se a relação dose-tempo em períodos tempo menores ocorre de forma semelhante ao resultado obtido no Experimento 1.

Os itens referentes à parte experimental foram aplicados em ambos os experimentos, com exceção do período máximo de duração dos mesmos.

IV.1 COLETA E MANUTENÇÃO DE ANIMAIS

Os juvenis de peixes da espécie *T. carolinus* foram capturados em praias arenosas do Lázaro, Enseada e Fortaleza no município de Ubatuba, São Paulo. A coleta foi realizada por meio de arrasto com o auxílio de uma rede tipo picaré com malha 15 mm nas bordas e 10 mm no centro, medida nó a nó. Os arrastos foram feitos na zona de espraiamento, paralelamente à linha de costa e em profundidade inferior a um metro.

A triagem dos animais de interesse foi feita ao fim de cada arrasto, os quais foram prontamente colocados em uma caixa d'água de 250 L com suprimento de ar fornecido por aeradores portáteis e transportados ao laboratório da Base de Pesquisa "Clarimundo de Jesus". Ao longo da triagem os demais animais capturados eram rapidamente devolvidos para seu *habitat*.

Os peixes levados ao laboratório permaneceram na caixa d'água de transporte até a temperatura da água se equilibrar com a temperatura da água dos tanques de manutenção de 500 L previamente preenchidos. Atingido o equilíbrio da temperatura os peixes foram transferidos para os tanques de manutenção e neles permaneceram por cinco dias para aclimatização antes do início dos experimentos.

Para realizar o experimento foi utilizado um sistema de manutenção de fluxo contínuo (Figura 1). O sistema é composto por um reservatório principal de 1000 L

cuja água era bombeada para o segundo reservatório de 80 L, o qual distribuía água para seis caixas de quarenta litros. O fluxo de água para as caixas de menor volume foi ajustado para 1.7 litros por hora, ou seja, a cada 24 horas ocorria a troca completa da água.

A água utilizada para a manutenção e para os experimentos passou por filtragem com o uso de elemento filtrante de malha de 1 micrômetro. O fornecimento de ar para o sistema foi feito por meio de aeradores para aquários. A temperatura foi mantida controlada, $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ e a média dos valores para demais parâmetros monitorados foram: oxigênio dissolvido - $5,82\text{ mg.L}^{-1}$; amônia - $0,01\text{ mg.L}^{-1}$; pH 8,0; salinidade 34.

Durante a manutenção e a execução do experimento o fotoperíodo utilizado foi o do ciclo de luz natural, com média 12 h claro/12 h escuro. O alimento foi fornecido à vontade uma vez ao dia utilizando ração comercial para peixes marinhos.

Figura 1 - Desenho esquemático do sistema de manutenção de peixes utilizado.

IV.2 CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE PRATA

A nanopartícula de prata em pó (AgNP_{PVP} - Sigma-Aldrich® - 7440-22-4) adquirida possui as seguintes características físicas: tamanho - <100 nm; pureza - 99,5 %; área superficial - 5,0 m²/g; densidade - 10,49 g/cc; encapsulado com polivinilpirrolidona (PVP) (dados fornecidos pelo fabricante).

IV.2.1 Microscopia eletrônica de varredura.

A aquisição do tamanho médio da nanopartícula de prata (AgNP) foi realizada com o uso de um aparelho de microscopia eletrônica de varredura (Jeol - JSM 7401F) com espectroscopia por dispersão de energia de raios-x (MEV-EDS). A análise ocorreu na Central Analítica do Instituto de Química da USP. Para o preparo da amostra o material foi espalhado em uma fita de carbono e o excesso foi retirado com suaves borrifos de ar comprimido. As imagens foram capturadas em aumentos de 3.000, 10.000 e 100.000 vezes e em cada foto foi feito o mapeamento composicional semiquantitativo.

Essa análise também foi realizada para a identificação e quantificação de AgNP em fígado de *T. carolinus*. O material biológico utilizado foi mantido em nitrogênio líquido até o início do seu preparo para análise. Na primeira etapa de preparação os tecidos foram retirados do nitrogênio líquido e cortados em pedaços de 0,5 x 0,5 cm, colocados em uma placa de petri e mantidos no freezer por 72 horas. Ao término deste período as amostras foram colocadas em liofilizador e lá permaneceram por seis horas. Este processo foi repetido mais duas vezes antes de realizar as análises de detecção e de concentração da AgNP no fígado. A análise foi realizada com a colaboração da Dra. Maria Cristina Zampieri do Instituto de Pesquisa Energéticas e nucleares da USP.

IV.2.2 Espalhamento dinâmico de luz e Potencial Zeta

Espalhamento dinâmico de luz (DDL) é uma técnica utilizada para medir o tamanho e a distribuição de tamanho das moléculas e partículas, normalmente submicrométricas. O uso desta técnica é indicado para a caracterização de partículas, emulsões ou moléculas, que foram dispersos ou dissolvidos em um líquido. A partir do movimento Browniano das nanopartículas em suspensão é possível calcular a distribuição de tamanhos usando a equação de Stokes-Einstein. A obtenção do potencial Zeta é realizada com a execução de uma microeletroforese para avaliar a estabilidade cinética da suspensão de AgNP, ou seja, auxilia na compreensão do poder de dispersão e agregação do material estudado (STOPILHA, 2014).

A análise do tamanho e do potencial Zeta da AgNP em suspensão foi feita utilizando um aparelho de espalhamento dinâmica de luz (DLS) (Zetasizer Nano Zs - Malvern). A medição realizada pelo aparelho abrange três leituras em ciclo de 70 segundos. Foram realizadas medições com a AgNP suspensa em água e em solução fisiológica isotônica para teleósteo marinho (solução salina) na concentração de 300 mg.L⁻¹. A composição da solução salina e o método de preparo das suspensões serão descritas no item IV. 3. Uma alíquota de cada uma das suspensões foi colocada na cubeta do aparelho para a leitura e a amostra foi diluída até a obtenção de um resultado com boa qualidade. Estas análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

IV.2.3 Difração de raios-X

A técnica de difração de raios-X é usada para caracterizar alguns compostos, minerais e metais que apresentam estruturas cristalinas, ou seja, estruturas que possuem átomos organizados de tal forma que apresentam uma periodicidade ao longo do espaço que, por sua vez, formam planos sobrepostos compondo assim estruturas conhecidas como cristalitos.

A análise foi feita com a emissão de feixe de raios-X com potência de 40 KV e 30 mA, ângulo de incidência de θ e de leitura de 2θ (30° a 90°), 15 rpm, com passo de $0,05^\circ$ e contagem de 4s por passo (Difratômetro de raios-X: Rigaku, Ultima IV, tipo θ - θ). Esta análise contou com a parceria do Prof. Dr. Giancarlo E. S. Brito do Instituto de Física da USP.

IV.3 EXECUÇÃO DAS EXPOSIÇÕES

Os peixes foram expostos a diferentes doses de nanopartícula de prata via injeção intraperitoneal. Foram utilizados cinco tratamentos (3 grupos expostos e 2 grupos controle) por três períodos de tempo, totalizando quinze condições experimentais com cinco peixes em cada. A escolha da concentração foi baseada em diferentes trabalhos (FABREGA et al., 2011; POWERS et al., 2011a, 2011b), mas principalmente no trabalho no qual o autor utilizou fígado de peixes adultos (*Danio rerio*) para avaliar o estresse oxidativo e apoptose ocasionados pela exposição à nanopartícula de prata (30, 60 e 120 mg.L^{-1}) (CHOI et al., 2010).

A suspensão de AgNP foi preparada a partir da sua dispersão em uma solução fisiológica isotônica para teleósteos marinhos (Valores em g/L: NaCl - 7,8; KCl - 0,18; CaCl_2 - 0,166; MgCl_2 - 0,095; NaHCO_3 - 0,084; NaH_2PO_4) descritas por Hoar e Hickman (1967). A dispersão foi realizada com o auxílio de um ultrasonicador (9 W; 300 KHz) por uma hora em um recipiente com água e gelo para evitar o aquecimento da suspensão. Os peixes que compuseram os grupos expostos receberam injeção intraperitoneal de suspensão de AgNP com concentração nominal de 300, 150 ou 75 mg.L^{-1} nas doses de 3, 1.5 e $0.75 \mu\text{g}$ de AgNP por grama de peixe (3, 1.5 e $0.75 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$). No grupo controle solução salina (Ctrl_{Salina}), os peixes receberam injeção de solução salina com dosagem de $10 \mu\text{L}$ de solução por grama de peixe. O grupo controle água (Ctrl_{Água}), passou por todos os procedimentos dos demais tratamentos, porém sem a administração da injeção.

Antes da administração das injeções a massa de cada peixe foi obtida para determinar a dose a ser injetada. Ao término de cada injeção administrada os peixes foram colocados em caixas plásticas com 40 L com água limpa e mantidos nelas por períodos de 36, 72 e 108 horas (Experimento 1) e por períodos de 12, 24 e 36 horas (Experimento 2).

IV.4 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizados cinco peixes por tratamento para coleta de material biológico. O sangue foi coletado por punção cardíaca através do ducto de Cuvier utilizando agulhas e seringas hipodérmicas de 0,5 mL. Para realização do EC o sangue foi misturado a 1 mL de tampão fosfato salino (PBS g/L: NaCl - 8; KCl - 0,2; KH_2PO_4 - 0,24; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; pH 7,4) e mantido em recipiente com gelo até o momento da sua execução. Em seguida, foi retirada mais uma alíquota de sangue para confecção das lâminas de esfregaço para a análise de ANE. Ao final desta coleta os indivíduos foram espinhalados na região do crânio com consequente ruptura do sistema nervoso central, foram obtidas as medidas de massa (M) e comprimento total (CT) de ambos experimentos (Tabela 1 e 2). Em seguida, foi iniciada a coleta de tecidos e seu acondicionamento em nitrogênio líquido para realização de análises futuras.

Tabela 1 - Valores da média da massa (M) em gramas (g) e do comprimento total (CT) em milímetros (mm) dos peixes utilizados no Experimento 1 (n = 5 por tratamento; tratamentos: controle água – Ctrl_{Água}; controle solução salina – Ctrl_{Salina}; [1], [2] e [3] – dosagem de nanopartícula de prata injetada 0.75, 1.5 e 3 µgAgNP/g_{peixe}, respectivamente; t – período após administração da injeção, t₁ = 36 h, t₂ = 72 h, t₃ = 108 h; * - ± erro padrão).

	Ctrl _{Água}		Ctrl _{Salina}		[1]		[2]		[3]	
	M (g)	CT (mm)	M (g)	CT (mm)	M (g)	CT (mm)	M (g)	CT (mm)	M (g)	CT (mm)
t ₁	5.64 (±0.45)*	71.93 (±1.63)*	4.33 (±1.03)*	66.71 (±4.66)*	5.58 (±0.55)*	73.57 (±2.35)*	5.18 (±0.65)*	71.57 (±2.92)*	5.77 (±1.14)*	75.43 (±4.61)*
t ₂	6.53 (±0.55)*	76.36 (±2.34)*	7.31 (±1.20)*	79 (±4.95)*	5.37 (±0.32)*	73 (±1.48)*	6.41 (±0.66)*	77.14 (±1.82)*	5.55 (±1.11)*	71.57 (±4.61)*
t ₃	6.07 (±0.52)*	73.57 (±2.05)*	6.70 (±0.67)*	79.57 (±3.01)*	5.06 (±0.38)*	69.57 (±1.95)*	5.05 (±0.36)*	71.86 (±2.13)*	4.57 (±0.44)*	70.29 (±2.49)*

Tabela 2. Valores da média da massa (M) em gramas (g) e do comprimento total (CT) em milímetros (mm) dos peixes utilizados no Experimento 2 (n = 5 por tratamento; tratamentos: controle água – Ctrl_{Água}; controle solução salina – Ctrl_{Salina}; [1], [2] e [3] – dosagem de nanopartícula de prata injetada 0.75, 1.5 e 3 µgAgNP/g_{peixe}, respectivamente; t – período após administração da injeção, t₁ = 12 h, t₂ = 24 h, t₃ = 36 h; * - ± erro padrão).

	Ctrl _{Água}		Ctrl _{Salina}		[1]		[2]		[3]	
	M (g)	CT (mm)	M (g)	CT (mm)	M (g)	CT (mm)	M (g)	CT (mm)	M (g)	CT (mm)
t ₁	5.86 (±0.76)*	72 (±3.44)*	6.24 (±0.96)*	73.20 (±4.34)*	5.14 (±0.31)*	71.10 (±1.36)*	7.64 (±1.03)*	80.20 (±4.18)*	7.91 (±1.67)*	79.60 (±5.80)*
t ₂	5.86 (±0.76)*	72.00 (±3.44)*	6.41 (±1.02)*	75.60 (±3.59)*	6.71 (±0.58)*	76.20 (±1.83)*	7.4 (±0.9)*	78.0 (±2.6)*	7.79 (±1.21)*	79.40 (±3.75)*
t ₃	6.21 (±0.78)*	73.60 (±3.50)*	6.47 (±0.39)*	75.20 (±1.98)*	6.89 (±1.20)*	76.20 (±4.48)*	8.42 (±1.24)*	80 (±4.27)*	9.08 (±0.75)*	87.00 (±2.86)*

IV.5 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa (SINGH et al., 1988) foi realizado com base nos protocolos de Gontijo e Tice (2003) e Tice et al. (2000), as modificações são descritas a seguir. Dez microlitros do sangue foram diluídos em tampão fosfato salino (PBS g/L: NaCl - 8; KCl - 0,2; KH_2PO_4 - 0,24; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; pH 7,4) e em seguida 20 microlitros desta suspensão foram misturados com 120 μL de gel de agarose de baixo ponto de fusão (1%) (*SIGMA-ALDRICH*[®] - 9012-36-6) dissolvido em PBS. Esta nova suspensão foi colocada sobre uma lâmina previamente preparada com uma camada de gel de agarose de ponto de fusão normal (1,5 %) (*SIGMA-ALDRICH*[®] - 9012-36-6) e distribuída sobre sua superfície com o auxílio de uma lamínula. Após este processo, as lâminas foram mantidas sob refrigeração (4 °C) por vinte minutos para polimerização do gel.

Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas permaneceram imersas em solução de lise (Lise estoque - 89 mL; Triton X-100 - 1%; DMSO - 10%; quantidades para volume total de 100 mL) por duas horas, sob refrigeração a 4 °C (Lise estoque: NaCl - 146,1g; EDTA Titriplex III - 32,7g; Tris(hidroximetil)aminometano - 1,21g; NaOH - 8g; Laurilsarcosinato de sódio 10g; pH 10; quantidades para volume total de 890 mL).

Na etapa subsequente, que consiste no relaxamento do DNA, as lâminas foram acondicionadas na cuba para eletroforese e mantidas imersas em solução tampão de eletroforese (NaOH - 300 mM; EDTA Titriplex III - 1 mM; pH >13) por 10 minutos na temperatura de 4 °C. A eletroforese foi realizada por 20 minutos com os ajustes dos valores de voltagem e amperagem igual a 20 V e 230 mA, respectivamente.

Após o término da eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba eletroforética e lavadas com água destilada gelada para retirar o excesso de solução tampão de eletroforese. Feita a lavagem, as lâminas passaram pelo processo de neutralização, o qual foi realizado mantendo as lâminas imersas em solução tampão de neutralização (Tris(hidroximetil)aminometano - 0,4 M; pH 7,5) por 15 minutos,

este processo foi repetido mais duas vezes. Para fixação dos cometas as lâminas foram mantidas imersas em etanol P.A. por dez minutos.

Para a coloração do material genético, foi utilizado o protocolo descrito por Cerda et al. (1997) com modificações descritas a seguir. As lâminas foram banhadas em solução de fixação (Ácido tricloroacético 15%; Sulfato de zinco heptahidratado 5%; glicerol 5%) durante 10 minutos, lavadas por três vezes com água destilada gelada e colocadas para secar em temperatura ambiente pelo tempo mínimo de 10 horas. As lâminas foram hidratadas por imersão em cubeta com água destilada por 2 minutos a 37°C. A solução de trabalho de coloração foi obtida misturando-se 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%), ambas pré-aquecidas por 20 minutos em banho-maria a 37°C. Após a mistura, as lâminas foram imediatamente cobertas pela solução de coloração e mantidas abrigadas da luz em banho-maria a 37°C por cerca de 1.5 minutos. Ao término deste período, as lâminas foram observadas em microscópio óptico para checagem da coloração e, uma vez atingida, o processo de interrupção da coloração era iniciado. Este processo era repetido até a obtenção da coloração desejada. Para a interrupção da coloração, as lâminas foram colocadas em cubetas verticais com solução de ácido acético 1% por 5 minutos, lavadas por três vezes durante 1 minuto com água destilada e deixadas para secar em temperatura ambiente por um período mínimo de 24 horas.

IV.6 ANÁLISE DO DANO AO DNA

As imagens dos cometas foram obtidas utilizando um microscópio óptico Zeiss Primo Star (©Carl Zeis) com câmera digital acoplada, Axio cam ERc 5S (©Carl Zeis). Cem cometas foram fotografados em diferentes regiões das lâminas utilizando a objetiva com aumento de 40X.

Para quantificar o dano ao DNA foi utilizado o programa TriTek CometScore™ Freeware v1.5 (TriTek Corporation). Dentre os 17 parâmetros presentes neste programa, o momento caudal foi o parâmetro escolhido para a avaliação de dano ao DNA.

IV.7 TESTE DO MICRONÚCLEO E ANORMALIDADES ERITROCITÁRIAS NUCLEARES

Para a análise das ANE foram feitas lâminas de esfregaço com o auxílio de uma lamínula lapidada. Logo após o procedimento, as lâminas foram secas rapidamente com o auxílio de um pequeno ventilador. A fixação dos eritrócitos foi realizada com metanol P.A. por 10 minutos e as lâminas foram mantidas a temperatura ambiente para secagem do material fixado. Para a coloração, as lâminas foram acondicionadas em suporte e mantidas cobertas com corante Giensa (10%) por 40 minutos. Ao fim deste período, as lâminas foram mergulhadas rapidamente por três vezes em água destilada para retirar o excesso de corante e colocadas para secar em temperatura ambiente.

A análise das lâminas foi realizada com auxílio de microscópio óptico Zeiss Primo Star (©Carl Zeiss) e objetiva de 100X. A documentação das imagens foi feita com câmera digital, Axio cam ERc 5S (©Carl Zeiss), acoplada ao microscópio. Foram examinados 1000 eritrócitos em cada lâmina e calculadas as frequências de ocorrência (‰) de micronúcleos e de cada anormalidade nuclear encontrada nos diferentes grupos.

Os micronúcleos podem ser identificados como corpúsculos contendo DNA e de aparência e coloração semelhante ao material nuclear. Estes corpúsculos são encontrados no citoplasma e não apresentam ligação com o núcleo, uma vez que sua formação ocorre devido à quebra cromossômica e disfunção das fibras do fuso. As outras anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) utilizadas foram: Reniforme (R), por apresentar a forma semelhante a um rim; Lobado (L), no qual o núcleo é dividido em lobos; Segmentado (S), que apresenta o núcleo separado por uma

constricção, em partes não necessariamente do mesmo tamanho e Bolha (B), que apresenta uma evaginação relativamente pequena do envelope nuclear (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990; PHAN et al., 2007; VIGNARDI et al., 2015).

Figura 2 - Catálogo do micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias. A – normal; B – micronúcleo; C – reniforme; D – segmentado; E – lobado; F – Bolha.

As fórmulas a seguir foram utilizadas para calcular as frequências de MN e ANE – R; L; S; B.

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

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

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

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

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

Os valores de MN, R, L, S, B foram dados em número de ocorrência em mil eritrócitos analisados. E a frequência total de anormalidades (ANE) foi obtida utilizando a seguinte fórmula:

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

IV.8 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE

A análise da atividade da catalase foi realizada em fígados de *T. carolinus* seguindo o protocolo de Beutler (1975) com as modificações descritas a seguir.

Inicialmente o tecido foi pesado e em seguida adicionou-se o tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,0) na proporção de 10 vezes a massa obtida. As amostras foram homogeneizadas em duas etapas, primeiro com o uso de macerador mecânico e posteriormente com um ultrasonicador (XL 2000 - Misonix Inc.; 300 KHz) ajustado na potência de 3W. A maceração foi feita uma única vez durante 30 segundos e a sonicação foi realizada em três repetições de 10 segundos, em ambas etapas o material permaneceu sobre refrigeração. Os homogeneizados foram centrifugados a 17.800 g por 20 minutos a 4 °C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante (extrato bruto) foi retirado e uma alíquota do extrato bruto foi diluída em 49 partes de tampão de homogeneização.

Para realizar as leituras da variação de absorbância 20 µL do extrato bruto diluído foi adicionado a 980 µL de sistema de reação (H₂O₂ - 8,7 mM; Tris-EDTA: Tris HCl - 1M, EDTA - 5mM; pH 8,0). As leituras de variação de absorbância ao longo do tempo foram feitas durante dois minutos em intervalos de 10 segundos em espectrofotômetro UV-Visível utilizando o comprimento de onda de 240 nm. O Reagente Bradford (*SIGMA-ALDRICH*® - B6916) foi utilizado para quantificar a proteína total nos extratos de fígado. A curva padrão de concentração de proteína foi realizada anteriormente a cada leitura das amostras utilizando albumina de soro bovino (*SIGMA-ALDRICH*® - 9048-46-8). A etapa das leituras de variação de absorbância contou com a colaboração da Profa. Dra. Silvia Cristina Ribeiro de Souza do IBUSP.

Fórmula para cálculo da Atividade Catalase (U/mg)

$$\frac{U}{mg} = \frac{\left(\frac{\Delta Abs}{min}\right) * Volume\ cubeta * Diluição\ EB}{\epsilon_{H_2O_2} * Volume\ da\ amostra * Quantidade\ Proteína\ EB}$$

Onde:

ΔAbs – Variação da absorbância;

EB – Extrato bruto;

$\epsilon_{H_2O_2}$ – Coeficiente de extinção do peróxido de hidrogênio.

IV.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados em forma de gráficos com o valor da média e desvio padrão e analisados utilizando o programa Statistica 7 (StatSoft Inc.). Testes estatísticos foram realizados de acordo com os resultados obtidos com as análises de conformidade de normalidade e homogeneidade de variância, utilizando os testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente (ZAR, 1996):

- Para dados sem conformidade: teste ANOVA não paramétrico Kruskal Wallis, com teste de comparação múltipla de Newman-Keuls *a posteriori*.
- Para dados com conformidade: teste estatístico Oneway ANOVA, com teste de comparação múltipla de Tukey *a posteriori*.

V RESULTADOS

V.1 CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE PRATA

V.1.1 *Microscopia eletrônica de transmissão - MEV AgNP_{PVP}*

A eletromicrografia obtida com o uso do microscópio eletrônico de transmissão mostrou que a AgNp revestida com polivinilpirrolidona (PVP) apresenta tendência a permanecer aglomerada (Figura 3). O formato desta nanopartícula é variável: ovalada, arredondada e alongada (Figura 3 C). Apresentou tamanhos variando de 36 a 98 nm.

Figura 3 - Fotomicrografia da nanopartícula da prata (AgNP) em aumento de 3000X (A), 10.000X (B) e 100.000X (C).

V.1.2 *Espalhamento dinâmico de luz*

A técnica do espalhamento de luz mostrou que há diferença de tamanho hidrodinâmico da nanopartícula de prata quando a sua suspensão é feita utilizando água destilada ou solução salina. O tamanho da nanopartícula apresenta pouca variação quando se usa água destilada para preparar a suspensão e grande variação no tamanho quando se usa a solução salina (Tabela 3).

A suspensão de AgNP em solução salina apresenta menor valor em módulo de potencial Zeta quando comparado com o valor da suspensão preparada com água destilada (Tabela 4). Os menores valores obtidos indicam uma menor estabilidade cinética o que promove uma maior agregação entre elas.

O resultado obtido com a AgNP suspensa em água apresentou variação mínima nas leituras indicando maior estabilidade e consequente menor estado de aglomeração (Figura 4 A). Quando a AgNP é suspensa na solução salina utilizada neste trabalho ela apresenta menor estabilidade, maior estado de aglomeração e maior variação na distribuição de tamanho (Figura 4 B).

Tabela 3 - Valores da média do tamanho da nanopartícula de prata (AgNP) quando se utiliza água destilada ou solução salina no preparo da suspensão.

	AgNP - Água Destilada	AgNP - Solução Salina
Leitura 1	184,5 nm	309,8 nm
Leitura 2	189,7 nm	449,1 nm
Leitura 3	187,1 nm	501,3 nm

Tabela 4 - Valores da média do potencial Zeta de prata (AgNP) quando se utiliza água destilada ou solução salina no preparo da suspensão.

	AgNP - Água Destilada	AgNP - Solução Salina
Leitura 1	- 28,1 mV	- 14,1 mV
Leitura 2	- 27,8 mV	- 13,4 mV
Leitura 3	- 25,7 mV	- 10,2 mV

Figura 4 - Distribuição do tamanho hidrodinâmico do diâmetro da nanopartícula de prata (AgNP) em suspensão utilizando água destilada (A) e solução salina (B).

V.1.3 Difração de raio-X

O resultado da caracterização é baseado na medida do ângulo de difração do raio emergente, com este valor é possível descobrir a distância entre os átomos, como também o tamanho do cristalito e a fase cristalina. O tamanho do cristalito está relacionado com a largura a meia altura do pico de difração, quanto maior a largura do pico menor o tamanho do cristalito (KLUG; ALEXANDER, 1962)

A largura a meia altura dos picos de difração da amostra de AgNP é maior que os picos do material de referência e da prata microparticulada, indicando tamanho inferior aos demais. Embora o ângulo de difração do material nanoparticulado seja diferente dos demais, o que pode ser constatado devido ao deslocamento dos picos, o número destes picos gerado é idêntico. Este fato indica que o material utilizado é prata metálica e o estabilizante polivinilpirrolidona (PVP) para manter a prata em tamanho manométrico colaborou para obtenção deste resultado (Figura 5).

Figura 5 - Difração de raios-X da amostra de AgNP utilizada no estudo.

V.2 ANÁLISE MEV-EDS EM FÍGADO

A análise com MEV-EDS em fígado de *T. carolinus* não mostrou indícios de acúmulo de prata nos tecidos dos grupos expostos. As imagens do tecido hepático dos peixes dos tratamentos Ctrl_{Água} e 3 µg_{AgNP}/g_{peixe} não apresentaram regiões com acúmulo visível de corpos estranhos (Figuras 6 e 7). Em ambos tratamentos é possível visualizar apenas tecido formado por hepatócitos e canais entre os cordões de hepatócitos, por onde o sangue passa até atingir a veia hepática terminal (sinusóides) (Figuras 6-B e 7-A) (GENTEN; TERWINGHE; DANGUY, 2009). A análise semiquantitativa da composição de átomos das amostras dos grupos expostos também não detectou a presença de prata a de prata (Figura 7-I).

Figura 6- Eletromicrografia de fígado de *T. carolinus* que não receberam injeção intraperitoneal (Ctrl_{Água}) com AgNP e permaneceram em água limpa por 36 h. (A – fígado Ctrl_{Água} aumento de 800X; B – fígado Ctrl_{Água} aumento de 3000X; C – fígado Ctrl_{Água} aumento de 6000X; D - fígado Ctrl_{Água} aumento de 10000X; setas longas – hepatócitos; setas curtas – sinusóides hepáticos).

Figura 7 - Eletromicrografia e análise semi-quantitativa de fígado de *T. carolinus* que recebeu a dose de $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e permaneceu em água limpa por 36 h (E/F - fígado $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ aumento de 3000X; G - fígado $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ aumento de 6000X; H - região da análise semi-quantitativa; I - percentil da composição de átomos, C – carbono, O – oxigênio, P – fósforo; S – enxofre, K – potássio, Cl – cloro).

V.3 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa visou avaliar o potencial genotóxico da AgNP. As análises dos resultados foram feitas comparando os efeitos entre as diferentes dosagens e os efeitos entre os diferentes tempos de exposição em ambos experimentos (Experimento 1 e Experimento 2). Os valores apresentados são referentes à média e o desvio padrão do momento caudal (MC - % DNA na cauda x comprimento da cauda; unidade adimensional).

V.3.1 Efeitos da dosagem – Experimento 1

V.3.1.1 36 horas

No período pós-injeção de 36 horas o maior valor de média do MC ocorreu no grupo que recebeu a maior dose de suspensão de AgNP, sendo significativamente diferente dos demais tratamentos ($p < 0,01$). O valor de média (2.81) do MC foi aproximadamente 8.2, quatro, seis e 3.3 vezes maior que o Ctrl_{Água}, Ctrl_{Salina}, 0.75 e 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, respectivamente (Figura 8).

Figura 8 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) nas doses de 0.75, 1.5, 3 µg_{AgNP}/g_{peixe} e de 10 µL de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras distintas indicam diferença significativa, p < 0,05).

V.3.1.2 72 horas

Nas 72 horas pós-injeção não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). O valor de média do MC de ambos os grupos de peixes que receberam as duas maiores dosagens de suspensão de AgNP ($1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}} - 1.14$; $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}} - 1.06$) foi de 2.8, 2.1 e 1.4 vezes maior que os tratamentos CtrlÁgua, CtrlSalina e $0.75 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$, respectivamente (Figura 9).

Figura 9 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n=5$) mantidos em água limpa por 72 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) nas doses de 0.75, 1.5, $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e de $10 \mu\text{L}$ de solução isotônica para teleosteos marinhos por grama de peixe (CtrlSalina). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (CtrlÁgua) (letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos, $p < 0,05$).

V.3.1.3 108 horas

Ao final das 108 horas pós-injeção os tratamentos Ctrl_{Água}, Ctrl_{Salina} e 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ não apresentaram diferença significativa entre si, ocorrendo o mesmo ocorreu entre os tratamentos 0.75 e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$. Entretanto, estes dois tratamentos foram significativamente diferentes dos demais ($p < 0,02$). O tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ (0.79) exibiu valor de média do MC aproximadamente 2.9 vezes maior que a média dos dois tratamentos controles e 4.1 vezes maior que a média do tratamento com dosagem intermediária. No tratamento 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ (1.08) o valor de média do MC foi 4 e 5.5 vezes maior em relação aos dois tratamentos controles e 4.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, respectivamente (Figura 10).

Figura 10 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos, $p < 0,05$).

V.3.2 Efeitos do tempo de exposição – Experimento 1

V.3.2.1 Ctrl_{Água}

Os resultados mostraram que o tratamento Ctrl_{Água} não apresentou diferença significativa entre os valores de média do MC nos períodos de 36, 72 e 108 horas ($p > 0,05$). O maior valor de média do MC ocorreu no período de 72 horas (0.41) e este valor foi 1.2 vezes maior que no período de 36 horas e 1.5 vezes maior que no período de 108 horas (Figura 11).

Figura 11 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5), nos quais não foi administrada injeção de suspensão de AgNP e foram mantidos em água limpa (Ctrl_{Água}) por 36, 72 e 108 horas (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.3.2.2 Ctrl_{Salina}

No tratamento Ctrl_{Salina} todos os três períodos pós-injeção mostraram-se significativamente diferentes ($p < 0,04$). A média do MC no período de 36 horas (0.7) foi aproximadamente 1.3 e 1.3 vezes maior que nos períodos de 72 e 108 horas, respectivamente (Figura 12).

Figura 12 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de solução isosmótica para teleósteos marinhos (10 μ L_{Salina}/g_{peixe} - Ctrl_{Salina}) (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.3.2.3 $0.75 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

Os grupos de peixes que receberam a dose de $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ indicou um aumento no valor de média do MC, sendo os valores dos períodos pós-injeção de 72 e 108 horas significativamente diferente do período de 36 horas ($p < 0,04$). A média do MC nos períodos de 72 (0.80) e 108 horas (0.79) foi 1.7 vezes maior que no período pós-injeção de 36 horas (Figura 13).

Figura 13 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) na dose de $0.75 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.3.2.4 $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

O valor de média do MC nos períodos de 36 e 72 horas após os indivíduos receberem a dose de $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ foi significativamente diferente do valor no período de 108 horas ($p < 0.01$). O maior valor de média do MC ocorreu no período de 72 horas e este foi 1.3 e 5.8 vezes maior nos períodos de 36 e 108 horas, respectivamente (Figura 14).

Figura 14 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n=5$) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) na dose de $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.3.2.5 $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

No tratamento realizado com a maior dose, $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$, o valor de média do MC no período de 36 horas (2.81) pós-injeção apresentou diferença significativa em relação aos demais períodos ($p < 0,01$). O valor exibido no período de 36 horas foi de 2.6 vezes mais elevado que em ambos os períodos de 72 e 108 horas (Figura 15).

Figura 15 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) na dose de $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.3.3 Efeitos da dosagem – Experimento 2

V.3.3.1 12 horas

No período de 12 horas pós-injeção os valores da média do MC foram significativamente diferentes entre os tratamentos 0.75 (0.26) e 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ (0.59) ($p < 0,04$). Os grupos que receberam as maiores dosagens de suspensão de AgNP apresentaram maiores valores de média do MC (3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ – 0.52). O valor de média da dose intermediária foi 1.5 vezes maior que os valores nos tratamentos controle e 2.3 vezes maior que no tratamento com a menor dosagem. Já no tratamento com a maior dose o valor de média foi 1.3 vezes maior que os valores obtidos nos Ctrl_{Água} e Ctrl_{Salina}, e duas vezes maior que o tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ (Figura 16).

Figura 16 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) nas doses de 0.75, 1.5, 3 µgAgNP/g_{peixe} e de 10 µL de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras distintas indicam diferença significativa, p < 0,05).

V.3.3.2 24 horas

Não houve diferença significativa entre os tratamentos no período de 24 horas pós-injeção ($p > 0,05$). O valor da média do MC do tratamento $0.75 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ foi 1.5 vezes maior que em ambos tratamentos controle e 1.6 vezes maior que em ambas as demais dosagens de suspensão de AgNP (Figura 17).

Figura 17 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n=5$) mantidos em água limpa por 24 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe ($\text{Ctrl}_{\text{salina}}$). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção ($\text{Ctrl}_{\text{água}}$) (letras distintas indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.3.3.3 36 horas

Após o período pós-injeção de 36 horas os tratamentos Ctrl_{Água} e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ diferença significativa em relação aos tratamentos Ctrl_{Salina} e 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ ($p < 0,03$). Os maiores valores de média do MC foram alcançados nos tratamentos Ctrl_{Água} (0.24) e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ (0.24), sendo estes valores 3.1 vezes que nos tratamentos Ctrl_{Salina}, 2.1 vezes maior que no 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e 1.5 vezes maior que no tratamento 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$. O grupo que recebeu a dosagem intermediária de suspensão AgNP não apresentou diferença significativa com os demais grupos (Figura 18).

Figura 18 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isotônica para teleosteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras distintas indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.3.4 Efeitos do tempo de exposição – Experimento 2

V.3.4.1 Ctrl_{Água}

O tratamento controle água não apresentou diferença significativa entre os períodos pós-injeção de 12, 24 e 36 horas ($p > 0,05$). O valor de média do MC no período de 12 horas (0.41) foi aproximadamente 1.1 vezes maior que no período de 36 horas e 1.7 vezes maior que no período de 36 horas (Figura 19).

Figura 19 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5), nos quais não foi administrada injeção de suspensão de AgNP e foram mantidos em água limpa (Ctrl_{Água}) por 12, 24 e 36 horas (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.3.4.2 Ctrl_{Salina}

No tratamento Ctrl_{Salina} o valor da média do MC no período de 36 horas (0,08) pós-injeção foi significativamente diferente dos demais ($p < 0,01$). Este valor foi 5.1 vezes menor que o obtido no período pós-injeção de 12 horas e 1.1 vezes menor que o valor no período de 24 horas (Figura 20).

Figura 20 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de solução isosmótica para teleósteos marinhos (10 $\mu\text{L}_{\text{Salina}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ - Ctrl_{Salina}) (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.3.4.3 $0.75 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

Os peixes dos períodos de 12 e 36 horas pós-injeção de suspensão de AgNP apresentaram valores de média do MC significativamente diferente do valor no período de 24 horas (0.53) ($p < 0,05$). O valor neste período foi duas e 4.6 vezes maior que os obtidos após o período de 12 e 36 horas, respectivamente (Figura 21).

Figura 21 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) na dose de $0.75 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.3.4.4 $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

Na dosagem de $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ o valor de média do MC no período de 12 horas (0.59) pós-injeção foi significativamente diferente dos demais ($p < 0,03$). Os períodos de 24 e 36 horas pós-injeção exibiram valor de média 1.8 e 3.7 vezes menor que o valor do período de 12 horas (Figura 22).

Figura 22 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) na dose de $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.3.4.5 $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

O valor de média do MC no período de 36 horas foi significativamente diferente dos valores nos períodos de 12 (0.52) e 24 horas (0.33) pós-injeção ($p < 0,03$). O valor de média do MC no menor período pós-injeção foi 1.6 vezes maior que no período de 24 horas e 2.2 vezes maior que no período de 36 h (Figura 24).

Figura 23 - Média e desvio padrão do Momento Caudal de cometa de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 h após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) na dose de $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.4 ANORMALIDADES NUCLEARES ERITROCITÁRIAS

O estudo das anormalidades nucleares eritrocitárias ($ANE = MN + R + L + S + B$; sendo MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, Bolha = B) pretendeu avaliar o potencial clastogênico e teratogênico da AgNP. As análises dos resultados foram feitas comparando os efeitos entre as diferentes dosagens e entre os diferentes tempos de exposição. Os dados apresentados indicam a média e o desvio padrão do número de ocorrência de micronúcleo e anormalidades por mil células (Frequência de Ocorrência) de ambos os experimentos (Experimento 1 e Experimento 2).

V.4.1 *Efeitos da dosagem – Experimento 1*

V.4.1.1 *36 horas*

As médias das frequências de ocorrência de MN, R, L, S, B e ANE no período pós-injeção de 36 horas não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Neste período pós-injeção o MN ocorreu somente nos tratamentos CtrlÁgua e $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ com valor de média de frequência igual a $2 \times 10^{-4} \text{ ‰}$.

Nas anormalidades R, L, S e na soma das anormalidades mais MN o tratamento $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ apresentou maior média de frequência de ocorrência. Os núcleos R ($2.24 \times 10^{-2} \text{ ‰}$) exibiram valor de média de frequência de ocorrência 2.7 vezes maior que no tratamento CtrlÁgua, 1.7 vezes maior que nos tratamentos CtrlSalina, 1.6 vezes maior que nos tratamentos 0.75 e $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$.

No caso dos núcleos L ($3.6 \times 10^{-3} \text{ ‰}$) a média da frequência de ocorrência foi 18 vezes maior que no tratamento CtrlÁgua, nove vezes maior que no CtrlSalina, duas vezes maior e 1.8 vezes maior que nos tratamentos 0.75 e $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$, respectivamente.

A média de frequência de ocorrência dos núcleos S ($5.2 \times 10^{-3} \text{ ‰}$) foi 8.7 vezes maior que no Ctrl_{Água}, 2.6 vezes maior que no Ctrl_{Salina}, 26 vezes maior que no tratamento $0.75 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e 2.4 vezes maior que no tratamento $1.5 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

Para os núcleos B os tratamentos 1.5 e $3 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ ($1.38 \times 10^{-2} \text{ ‰}$ e $1,32 \times 10^{-2} \text{ ‰}$) apresentaram valores de média de frequência de ocorrência 2.8 vezes maior que no Ctrl_{Água}, 1.5 vezes maior que no Ctrl_{Salina} e 1.2 vezes maior que no tratamento $0.75 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

Nas anormalidades totais e MN o valor da média de frequência de ocorrência no tratamento $3 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ ($4.44 \times 10^{-2} \text{ ‰}$) foi 3.1 vezes maior que no tratamento Ctrl_{Água}, 1.8, 1.6 e 1.4 vezes maior que nos tratamentos Ctrl_{Salina}, 0.75 e $1.5 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, respectivamente (Figura 24).

Figura 24 - Média da frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75 , 1.5 , $3 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e de $10 \mu\text{L}$ de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.1.2 72 horas

No período de 72 horas pós-injeção as médias das frequências de ocorrência das anormalidades MN, L e B não foram significativamente diferentes entre os tratamentos testados ($p > 0,05$).

O MN ocorreu somente no tratamento $3 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, com média de frequência de ocorrência igual a $4 \times 10^{-4} \text{ ‰}$. Nas anormalidades R S e ANE o tratamento $1.5 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ apontou ser significativamente diferente dos demais ($p < 0,03$). Além disso, este tratamento apresentou o maior valor de média de frequência de ocorrência nas anormalidades R, L, S e na soma das anormalidades (ANE).

O valor da média de frequência de ocorrência da anormalidade R ($1.28 \times 10^{-2} \text{ ‰}$) foi em torno de duas vezes maior do que nos tratamentos Ctrl_{Água} e $0.75 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, 2.2 vezes maior que no Ctrl_{Salina} e 1.4 vezes maior que no tratamento $3 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

Para a anormalidade L, o valor de média de frequência de ocorrência ($4.4 \times 10^{-3} \text{ ‰}$) foi aproximadamente 4 vezes maior que no tratamento Ctrl_{Água}, 1.5 vezes maior que o valor no tratamento Ctrl_{Salina}, duas vezes maior do que o valor no tratamento $0.75 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e 1.4 vezes maior do que no tratamento $3 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

No caso da anormalidade S a média da frequência de ocorrência ($5.8 \times 10^{-3} \text{ ‰}$) apresentou valor 3.6 vezes maior que nos tratamentos Ctrl_{Salina}, 9.7 vezes maior que no tratamento $0.75 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e 4.1 vezes maior que no tratamento $3 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$. Não houve registro de ocorrência desta anormalidade no tratamento Ctrl_{Água}.

No caso da anormalidade B os maiores valores de média ocorreram em dois tratamentos: $1.5 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ – $1.36 \times 10^{-2} \text{ ‰}$; $3 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ – $1.5 \times 10^{-2} \text{ ‰}$. Estes valores foram 1.7 vezes maiores que no tratamento Ctrl_{Água}, duas vezes maior que nos tratamentos Ctrl_{Salina} e 2.3 vezes maiores que no tratamento $0.75 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

A soma de todas as anormalidades mais MN exibiu valor de média de frequência de ocorrência ($4.88 \times 10^{-2} \text{ ‰}$) 2.2 vezes maior que no controle água, 2.1 vezes maior que no controle salina e 2.3 vezes maior que no tratamento 0.75

$\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$. Em relação ao tratamento $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ o valor de média de frequência das ANE foi 1.3 vezes maior (Figura 25).

Figura 25 - Média da frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 72 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.1.3 108 horas

As frequências de MN, R, L, S, B e ANE neste período não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Em relação a frequência de ocorrência do MN verificou-se os maiores valores de média nos tratamentos 1.5 e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ ($6 \times 10^{-4} \text{‰}$), sendo estes valores três vezes maior que nos tratamentos Ctrl_{Água}, Ctrl_{Salina} e 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

No caso da anormalidade R os três grupos de peixes tratados com suspensão de AgNP exibiram valores de média de frequência de ocorrência praticamente iguais (0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ – $1.54 \times 10^{-2} \text{‰}$; 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ – $1.50 \times 10^{-2} \text{‰}$; 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ – $1.48 \times 10^{-2} \text{‰}$). Estes valores foram em torno de 1.5 e 2.2 vezes maior que nos tratamentos Ctrl_{Água} e Ctrl_{Salina}, respectivamente.

O valor de média de frequência de ocorrência da anormalidade L no tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ ($3.2 \times 10^{-3} \text{‰}$) foi oito vezes maior que no Ctrl_{Água} e 3.2 vezes maior que nos tratamentos Ctrl_{Salina}, 1.5 e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

Na anormalidade S o valor de média de frequência de ocorrência no tratamento 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ ($2.2 \times 10^{-3} \text{‰}$) foi em torno de 1.2 vezes maior que no Ctrl_{Água}, 2.2 vezes maior que no Ctrl_{Salina} e 1.4 vezes maior que nos tratamentos 0.75 e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

Os núcleos com a anormalidade bolha apresentaram maior valor de média de frequência de ocorrência no tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ ($1.54 \times 10^{-2} \text{‰}$), este valor foi 2.3 vezes maior que no Ctrl_{Água}, 3.1 vezes maior que no Ctrl_{Salina}; aproximadamente 1.3 e 1.8 vezes nos tratamentos 1.5 e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, respectivamente.

O maior valor de média de frequência de ocorrência da soma de todas as anormalidades mais o MN ($3.58 \times 10^{-2} \text{‰}$) ocorreu no tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, este valor foi em torno de 1.8 vezes maior que no Ctrl_{Água}, 2.5 vezes no Ctrl_{Salina}, 1.2 vezes no tratamento 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e 1.3 vezes no tratamento 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$. (Figura 26).

Figura 26 - Média da frequência de ocorrência (%) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g AgNP/g peixe}$ e de 10 μL de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.2 Efeitos do tempo de exposição – Experimento 1

V.4.2.1 Ctrl_{Água}

A análise dos valores de média de frequência para cada anormalidade bem como para a soma total não indicou diferença significativa entre os períodos pós-injeção neste tratamento ($p > 0,05$).

A ocorrência de MN se deu apenas nos períodos de 36 e 108 horas com igual valor de média de frequência de $2 \times 10^{-4} \text{ ‰}$.

O maior valor da média da frequência de ocorrência da anormalidade R no período de 72 horas ($1.28 \times 10^{-2} \text{ ‰}$) foi em torno de 1.5 e 1.2 vezes maior que nos períodos de 36 e 108h, respectivamente.

A anormalidade L também exibiu maior valor de média de frequência de ocorrência no período de 72 horas ($8 \times 10^{-4} \text{ ‰}$) com valor quatro e duas vezes maior que no período de 36 e 108 horas, respectivamente.

No caso da anormalidade S o valor de média de frequência de ocorrência do período de 108 h ($1.8 \times 10^{-3} \text{ ‰}$) foi três vezes maior que o do período de 36 horas, não houve ocorrência desta anormalidade no período de 72 horas.

A anormalidade B apresentou maior valor de média de frequência no período de 72 horas ($9 \times 10^{-3} \text{ ‰}$), sendo este valor 1.8 e 1.4 vezes maior que nos períodos de 36 e 108 horas, respectivamente.

O valor da média das frequências para a soma de todas as anormalidades também foi maior no período de 72 horas ($2.26 \times 10^{-2} \text{ ‰}$), exibindo valor em torno de 1.6 e 1.2 vezes maior que os períodos de 36 e 108 horas, respectivamente (Figura 27).

Figura 27 - Média de frequência de ocorrência (%) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa (Ctrl_{Água}), sem receber injeções, por 36, 72 e 108 horas (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.2.2 Ctrl_{Salina}

Neste tratamento os valores de média de frequência de cada anormalidade como também os valores da soma total não foram significativamente diferentes entre os períodos pós-injeção ($p > 0,05$).

Não houve ocorrência para MN nos períodos de 36 e 72 horas, no maior período a média de frequência de ocorrência foi igual a $2 \times 10^{-4} \%$.

A anormalidade R exibiu no período de 36 horas o maior valor de média de frequência de ocorrência ($1.34 \times 10^{-2} \%$), este valor foi em torno de 1.2 vezes maior que no período de 72 horas e 1.9 vezes maior que no período de 108 horas.

No caso da anormalidade L o maior valor de média de frequência de ocorrência se deu no período de 72 horas ($2.2 \times 10^{-3} \%$) e foi aproximadamente 5.5 vezes maior que no período de 36 horas e 2.2 vezes que no período de 108 h.

Para a anormalidade S o período de 36 horas apresentou maior valor de média de frequência de ocorrência ($2 \times 10^{-3} \%$) em torno de 1.3 vezes maior que no período de 72 horas e duas vezes maior que no período de 108 horas.

A anormalidade B exibiu maior valor de média de frequência de ocorrência no período de 36 horas ($9 \times 10^{-3} \%$), sendo este valor em torno de 1.2 vezes maior que no período de 72 horas e 1.8 vezes maior que no período de 108 horas.

No caso da soma das anormalidades verificou-se o maior valor de média de frequência de ocorrência nos períodos de 36 ($2.48 \times 10^{-2} \%$) e 72 horas ($2.30 \times 10^{-2} \%$) com valores semelhantes, estes valores foram em torno de 1.7 vezes maior que no período de 108 horas (Figura 28).

Figura 28 - Média de frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receber injeção de suspensão isosmótica para teleósteos marinhos ($10 \mu\text{L}_{\text{Salina}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ - Ctrl_{Salina}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.2.3 Dose 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

Neste tratamento as anormalidades avaliadas, como também a soma de todas elas acrescentando a ocorrência de MN, não apresentaram diferença significativas entre os períodos pós-injeção ($p > 0,05$). O MN e as anormalidades, bem como a soma de ambos, apresentaram maior valor de média de frequência de ocorrência período de 108 horas.

Não houve ocorrência de MN nos períodos de 36 e 72 horas, já o valor da média de frequência de ocorrência do MN no período de 108 horas foi igual a $2 \times 10^{-4} \text{‰}$.

Somente a anormalidade R exibiu maior valor de média de frequência de ocorrência no período de 108 horas ($1.54 \times 10^{-2} \text{‰}$) e o valor neste período foi em torno de 1.1 e 1.2 vezes maior que nos períodos de 36 e 72 horas, respectivamente.

No caso da anormalidade L o valor de média de frequência no período de 108 horas ($3.2 \times 10^{-3} \text{‰}$) foi 1.8 vezes maior que no período de 36 horas e duas vezes maior que no período de 72 horas.

Para a anormalidade S a média de frequência de ocorrência ($1.6 \times 10^{-3} \text{‰}$) exibiu valor em torno de oito e 2.7 vezes maior que nos períodos de 36 e 72 horas, respectivamente.

A anormalidade B apresentou valor de média de frequência de ocorrência ($1.54 \times 10^{-2} \text{‰}$) aproximadamente 1.4 vezes maior que no período de 36 horas e em torno de 2.3 vezes maior que no período de 72 horas.

Na soma de todas as anormalidades mais o MN, o valor da média de frequência de ocorrência ($3.58 \times 10^{-2} \text{‰}$) ficou em torno de 1.3 e 1.7 vezes maior que nos períodos de 36 e 72 horas, respectivamente (Figura 29).

Figura 29 - Média de frequência de ocorrência (%) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) na dose de $0.75 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.2.4 Dose $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

Neste tratamento somente as anormalidades L e S apresentaram diferença significativa entre os períodos pós-injeção ($p < 0,05$).

Os valores da média de frequência de ocorrência das anormalidades L ($4.4 \times 10^{-3} \text{‰}$) e S ($5.8 \times 10^{-3} \text{‰}$) foram maiores no período de 72 horas. Este valor na anormalidade L foi 2.2 e 4.4 vezes maior que nos períodos de 36 e 108 horas, respectivamente. A anormalidade S exibiu valor de média de frequência de ocorrência 2.6 vezes maior que nos demais períodos.

O MN não ocorreu no grupo de peixes do período pós-injeção de 72 horas, apresentou maior valor de média de frequência de ocorrência no período de 108 horas ($6 \times 10^{-4} \text{‰}$) com valor três vezes maior que no período de 36 horas.

No caso da anormalidade R o maior valor de média de frequência de ocorrência ($2.5 \times 10^{-2} \text{‰}$) ocorreu no período pós-injeção de 72 horas, sendo em torno de 1.8 e 1.7 vezes maior que nos períodos de 36 e 108 horas, respectivamente.

A anormalidade B apresentou valores próximos de média de frequência nos períodos de 36 ($1.38 \times 10^{-2} \text{‰}$) e 72 horas ($1.36 \times 10^{-2} \text{‰}$) que representou uma ocorrência aproximadamente 1.2 vezes maior que no período de 108 horas.

Na soma das anormalidades, incluindo o MN, o maior valor de média de frequência ocorreu no período de 72 horas ($4.88 \times 10^{-2} \text{‰}$) e foi aproximadamente 1.5 vezes maior que no período de 36 horas e 1.6 vezes maior que no período de 108 horas (Figura 30).

Figura 30 - Média de frequência de ocorrência (%) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) na dose de $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.2.5 Dose $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

Neste tratamento nenhuma das anormalidades nem a soma delas apresentou diferença significativa entre os períodos pós-injeção ($p > 0,05$).

O MN apresentou maior valor de média de frequência de ocorrência no período pós-injeção de 108 horas ($6 \times 10^{-4} \text{‰}$) e foi 1.5 vezes maior que no período de 72 horas. Não houve ocorrência desta anormalidade no período de 36 horas.

Nas anormalidades R, L e S o maior valor de média de frequência de ocorrência deu-se no período de 36 horas. Na anormalidade R este valor ($2.24 \times 10^{-2} \text{‰}$) foi em torno de 1.2 vezes maior que no período de 36 horas e de 1.5 vezes maior que no período de 108 horas. Já na anormalidade L o valor ($3.6 \times 10^{-3} \text{‰}$) foi em torno de 1.1 e de 3.6 vezes maior que nos períodos de 72 e 108 horas, respectivamente. Para a anormalidade S o valor ($5.2 \times 10^{-3} \text{‰}$) foi em torno de 3.7 vezes maior que no período de 72 horas e 3.3 vezes maior que no período de 108 horas.

Na anormalidade B o período de 72 horas apresentou o maior valor de média de frequência ($1.5 \times 10^{-2} \text{‰}$), sendo em torno de 1.1 e 1.7 vezes maior que nos períodos de 36 e 108 horas, respectivamente.

A soma das anormalidades, juntamente com o MN, exibiu maior valor de média de frequência de ocorrência ($4.4 \times 10^{-2} \text{‰}$), no período pós-injeção de 36 horas. Este valor foi em torno de 1.2 vez maior que no período de 72 horas e 1.7 vezes maior que no período de 108 horas (Figura 31).

Figura 31 - Média de frequência de ocorrência (%) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) na dose de $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ ($\text{ANE} = \text{MN} + \text{R} + \text{L} + \text{S} + \text{B}$, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.3 Efeitos da dosagem – E2

V.4.3.1 12 horas

No período de 12 horas pós-injeção as médias das frequências de ocorrência de MN, L, S e B não apresentaram diferença significativa entre os diferentes tratamentos ($p > 0,05$).

O MN ocorreu somente no Ctrl_{Salina} com valor de média de frequência de ocorrência igual a $2 \times 10^{-4} \%$. A média da frequência de ocorrência da anormalidade R foi significativamente diferente entre as médias dos grupos controle e dos grupos em que foi administrada a injeção de suspensão de AgNP ($p < 0,05$). O valor de média de frequência de ocorrência de núcleos reniformes de ambos os grupos controle (Ctrl_{Água} – $8.8 \times 10^{-3} \%$; Ctrl_{Salina} – $9.4 \times 10^{-3} \%$) foi aproximadamente duas, seis e oito vezes maior que nos tratamentos 0.75, 1.5 e 3 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$.

A anormalidade L apresentou maior valor de média de frequência de ocorrência no Ctrl_{Salina} ($2.2 \times 10^{-3} \%$). Este valor foi duas vezes maior que a média presente no Ctrl_{Água}, 1.4 e 4 vezes maior que no tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ e 1.5 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$, respectivamente. Não houve ocorrência desta anormalidade no grupo que recebeu a maior dosagem de suspensão de AgNP.

Os núcleos classificados como S apresentaram maior frequência de ocorrência no tratamento Ctrl_{Salina} ($8 \times 10^{-3} \%$). O valor de média de frequência neste tratamento foi 2.9 vezes maior que nos tratamentos Ctrl_{Água} e 3 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$, 2.2 e quatro vezes maior que nos tratamentos 0.75 e 1.5 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$, respectivamente.

A anormalidade nuclear B exibiu maior valor de média de frequência no Ctrl_{Salina} ($8 \times 10^{-4} \%$), sendo este valor quatro vezes maior que nos tratamentos Ctrl_{Água} e 0.75 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$; e 1.3 vezes maior que nos tratamentos 1.5 e 3 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$.

A média de frequência de ocorrência de todas as anormalidades e MN foi maior e igual nos dois grupos controle ($2.06 \times 10^{-2} \%$), sendo o valor de média duas vezes maior que o encontrado no tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ e quatro vezes maior que nos demais tratamentos com administração de suspensão de AgNP (Figura 32).

Figura 32 - Média da frequência de ocorrência (%) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 12 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.3.2 24 horas

No período pós-injeção de 24 horas apenas a anormalidade nuclear S apresentou diferença significativa. Tal diferença ocorreu entre os valores de média de frequência dos tratamentos CtrlÁgua e $1.5 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ ($p < 0,05$).

A ocorrência de MN foi detectada nos tratamentos CtrlSalina ($6 \times 10^{-4} \text{‰}$) e $1.5 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ ($2 \times 10^{-4} \text{‰}$) e não houve diferença significativa entre os valores de média de frequência de ocorrência. O valor de média do grupo controle salina foi três vezes maior que o do grupo em que foi administrada a injeção com a dose intermediária de suspensão de AgNP.

A média de frequência de ocorrência de núcleos identificados como R foi bastante similar entre três tratamentos: CtrlÁgua – $4.75 \times 10^{-3} \text{‰}$; CtrlSalina – $4.8 \times 10^{-3} \text{‰}$; $0.75 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ – $5.2 \times 10^{-3} \text{‰}$. Os valores de média de frequência destes tratamentos foram aproximadamente três vezes maiores que no tratamento $1.5 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e duas vezes maior que no tratamento $3 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

O maior valor de média de frequência de ocorrência da anormalidade L ($2.13 \times 10^{-3} \text{‰}$) e S ($5.5 \times 10^{-3} \text{‰}$) ocorreu no CtrlÁgua e em ambos os casos, este valor foi 1.5 vezes maior que no tratamento CtrlSalina. Para a anormalidade L, o valor foi 1.5 vezes maior que no tratamento $0.75 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, duas vezes maior que no tratamento $1.5 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e 3.6 vezes maior que no tratamento $3 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$. Já na anormalidade S o valor foi 2.3 vezes maior que no tratamento $0.75 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, cinco vezes maior que no tratamento $1.5 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e duas vezes maior que no tratamento $3 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

A anormalidade B apresentou maior valor de média de frequência de ocorrência no tratamento CtrlSalina ($1.2 \times 10^{-3} \text{‰}$) e este valor foi 1.5 vezes maior que no CtrlÁgua, três vezes maior que no tratamento $0.75 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, 1.2 vezes maior que no tratamento $1.5 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e seis vezes maior que no tratamento $3 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

A soma de todas anormalidades mais o MN exibiu maior valor de média de frequência no tratamento CtrlÁgua ($1.32 \times 10^{-2} \text{‰}$) Este valor foi 1.1 vezes maior que no tratamento CtrlSalina, 1.4 vezes maiores que no tratamento $0.75 \mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$,

2.4 e 1.9 vezes maior que nos tratamento 1.5 e 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$, respectivamente (Figura 33).

Figura 33. - Média da frequência de ocorrência (%) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 24 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg/L}$) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isosmótica para teleósteos marinhos por grama de peixe ($\text{Ctrl}_{\text{Salina}}$). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção ($\text{Ctrl}_{\text{Água}}$) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.3.3 36 horas

A frequência de ocorrência no período de 36 horas exibiu diferença significativa apenas nos eritrócitos classificados como segmentado entre o tratamento Ctrl_{Água} e ambos tratamentos 0.75 e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ ($p < 0,05$).

Neste período houve maior incidência de MN com maior valor de frequência de ocorrência no Ctrl_{Salina} ($6 \times 10^{-4} \%$) e ele foi três vezes maior que no tratamento 0.75 e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$. Não houve visualização de MN nos tratamentos Ctrl_{Água} e 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

O valor da média de frequência de ocorrência da anormalidade R foi maior no Ctrl_{Água} ($5.6 \times 10^{-3} \%$). Este valor foi: 1.2 vezes maior que o Ctrl_{Salina}, 1.1 vezes maior que no tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, duas vezes maior que no tratamento 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e 5 vezes maior que no tratamento 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

Na anormalidade L o tratamento 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ apresentou o maior valor de média de frequência de ocorrência ($1.8 \times 10^{-3} \%$) e foi 2.3 vezes maior que no Ctrl_{Água}, 1.8 vezes maior que Ctrl_{Salina}, 1.5 vezes maior no tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e três vezes maior no tratamento 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

A maior média de frequência de ocorrência da anormalidade S foi no Ctrl_{Água} ($6 \times 10^{-3} \%$). O valor de média do grupo controle foi aproximadamente duas vezes maior que no Ctrl_{Salina}; 7.5, 2.5 e 10 vezes maior do que nos tratamentos 0.75, 1.5 e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, respectivamente.

No grupo em que foi administrado a maior dose de AgNP não se verificou a anormalidade B. Entre os demais tratamentos, o Ctrl_{Salina} apresentou maior valor de média de frequência de ocorrência ($1 \times 10^{-3} \%$), sendo cinco vezes maior que no Ctrl_{Água}, 1.3 vezes maior que no tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e 1.7 vezes maior que no tratamento 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

A soma de todas as normalidades mais o MN indicou que o Ctrl_{Água} exibiu maior valor de média de frequência de ocorrência ($1.26 \times 10^{-2} \%$) e foi 1.2 vezes maior que no Ctrl_{Salina}, 1.6 vezes maior que no tratamento que recebeu a menor dose de AgNP, 1.7 vezes maior no tratamento com dose intermediária e 5 vezes mais no tratamento com a maior dose (Figura 34).

36 h

Figura 34 - Média da frequência de ocorrência (%) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 µg AgNP/g peixe e de 10 µL de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.4 Efeito do tempo de exposição – Experimento 2

V.4.4.1 Ctrl_{Água}

No tratamento Ctrl_{Água}, as anormalidades avaliadas e a soma das anormalidades incluindo o MN não acusaram diferença significativa entre os três períodos pós-injeção ($p > 0,05$). Neste tratamento não se verificou a ocorrência de MN.

A anormalidade R apresentou maior valor de média de frequência de ocorrência ($8.8 \times 10^{-3} \text{ ‰}$) no período pós-injeção de 12 horas e este valor foi 1.9 vezes maior que no período de 24 horas e 1.6 vezes maior que no período de 36 horas.

Os eritrócitos com núcleo classificado como L exibiram maior valor de média de frequência de ocorrência no período pós-injeção de 24 horas ($2.13 \times 10^{-3} \text{ ‰}$) e foi em torno de 1.8 e 2.7 vezes maior que nos períodos de 12 e 36 horas, respectivamente.

A anormalidade S apresentou valores iguais de média de frequência nos períodos pós-injeção de 24 e 36 horas ($6 \times 10^{-3} \text{ ‰}$) e foram 2.1 vezes maior que no período de 12 horas.

O maior valor de média de frequência de ocorrência da anormalidade B foi no período de 24 horas ($8 \times 10^{-4} \text{ ‰}$), este valor foi 4 vezes maior que nos períodos de 12 e 36 horas.

Na soma de todas as anormalidades e MN não teve diferença entre os valores de média de frequência de ocorrência. Os valores de média foram: 12 e 24 horas – $1.3 \times 10^{-2} \text{ ‰}$; 36 horas – $1.26 \times 10^{-2} \text{ ‰}$ (Figura 35).

Figura 35 - Média de frequência de ocorrência (‰) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa (Ctrl_{Água}), sem receber injeções, por 12, 24 e 36 horas (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.4.2 Ctrl_{Salina}

Em todos as anormalidades, como também no MN, o tratamento Ctrl_{Salina} não exibiu diferença significativa do valor de média entre os períodos pós-injeção ($p > 0,05$).

O MN ocorreu em todos os períodos pós-injeção. Os períodos de 24 e 36 horas apresentaram o maior valor de frequência de ocorrência ($6 \times 10^{-4}\%$). Os valores nestes períodos são, respectivamente, iguais e três vezes maior que no período de 12 horas.

Na anormalidade R o valor de média de frequência de ocorrência no período de 12 horas ($9.4 \times 10^{-3} \%$) foi duas vezes maior que nos períodos de 24 e 36 horas.

O maior valor de média de frequência de ocorrência das anormalidades L e S se deu no período de 12 horas. No caso da anormalidade L ($2.2 \times 10^{-3} \%$) este valor foi 1.6 vezes maior que no período de 24 horas e 2.2 vezes maior que no período de 36 horas. Já na anormalidade S ($8 \times 10^{-3} \%$) o valor foi 2.2 e 2.5 vezes maior que nos períodos de 24 e 36 horas, respectivamente.

A anormalidade B apresentou maior valor de média de frequência de ocorrência ($1.2 \times 10^{-3} \%$) no período de 24 horas. O valor foi 1.5 vezes maior que no período de 12 horas e 1.2 vezes maior que no período de 36 horas.

A soma de todas as anormalidades exibiu o valor mais elevado de frequência de ocorrência ($2.04 \times 10^{-3} \%$) foi detectado no período de 12 horas, sendo duas vezes maior que nos demais períodos (Figura 36).

Figura 36 Média de frequência de ocorrência (%) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receber injeção de suspensão isosmótica para teleósteos marinhos ($10 \mu\text{L}_{\text{Salina}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ - Ctrl_{Salina}) (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$)

V.4.4.3 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

No tratamento 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ os valores de média de frequência de ocorrência em todas as anormalidades e no MN não apresentaram diferença significativa entre os períodos pós-injeção ($p > 0.05$).

Apenas o período pós-injeção de 24 horas indicou presença de MN com valor de frequência de ocorrência igual a $2 \times 10^{-4} \text{ ‰}$.

O valor de média de frequência de ocorrência das anormalidades R e S foi maior no período de 12 horas. Na anormalidade R, o valor de média ($4.6 \times 10^{-3} \text{ ‰}$) foi 2.6 e 1.6 vezes maior que no período de 24 e 36 horas. No caso dos núcleos classificados como S o valor ($4.6 \times 10^{-3} \text{ ‰}$) foi 3 vezes maior que no período de 24 horas e 1.5 vezes maior que no período de 36 horas.

Na anormalidade L, o maior valor de média de frequência ($1.8 \times 10^{-3} \text{ ‰}$) ocorreu no período de 36 horas e foi 1.1 vezes maior que no período de 12 horas e 1.5 vezes maior que no período de 24 horas.

O maior valor de média de frequência da anormalidade B ($1 \times 10^{-3} \text{ ‰}$) aconteceu no período de 24 horas e este valor foi cinco e 1.7 vezes maior que nos períodos de 12 e 36 horas, respectivamente.

A somatória das anormalidades juntamente com o MN apresentou o maior valor de média de frequência no período de 36 horas ($1 \times 10^{-2} \text{ ‰}$) e este valor foi 1.9 vezes maior que o valor no período de 12 horas e 1.3 vezes maior que no período de 24 horas (Figura 37).

Figura 37 - Média de frequência de ocorrência (%) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) na dose de $0.75 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ ($\text{ANE} = \text{MN} + \text{R} + \text{L} + \text{S} + \text{B}$, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.4.4 1.5 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$

Neste tratamento os valores de média de frequência de ocorrência em todas as anormalidades e no MN, bem como a soma de todos esses, não apresentaram diferença significativa entre os períodos pós-injeção ($p > 0.05$).

A ocorrência de MN no tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ se deu apenas no período de 24 horas após a administração da suspensão de AgNP ($2 \times 10^{-4} \text{‰}$).

A anormalidade R, L e S apresentaram maior valor de frequência de ocorrência no período de 36 horas. Na anormalidade R o valor ($2.8 \times 10^{-3} \text{‰}$) foi 1.8 e 1.6 maior que nos tratamentos 12 e 24 horas, respectivamente. Já nos eritrócitos com núcleo classificado com L o valor no período de 36 horas ($1.8 \times 10^{-3} \text{‰}$) foi três vezes maior que no período de 12 horas e 1.5 vezes maior que no período de 24 horas. Por fim, a anormalidade S, no período pós-injeção mais extenso, exibiu valor de frequência de ocorrência ($2.4 \times 10^{-3} \text{‰}$) 1.2 vezes maior que no período de 12 horas e duas vezes maior que no período de 36 horas.

O valor de média de frequência de ocorrência da anormalidade B ($1 \times 10^{-3} \text{‰}$) foi maior no período de 24 horas. Este valor foi 1.7 vezes maior do que em ambos os períodos de 12 e 36 horas.

Na soma das anormalidades, incluindo o MN, o maior valor de frequência de ocorrência ($7.6 \times 10^{-3} \text{‰}$) foi visualizado no período de 36 horas que foi 1.6 e 1.4 vezes maior que nos períodos de 12 e 24 horas, respectivamente (Figura 38).

Figura 38 - Média de frequência de ocorrência (%) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) na dose de 1.5 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.4.4.5 $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

No tratamento de $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ o maior valor de média de frequência de ocorrência não apresentou diferença significativa entre os três períodos pós-injeção.

A ocorrência de MN se deu apenas no período de 36 horas ($2 \times 10^{-4} \text{‰}$). No período de 12 horas não foi encontrado núcleos de eritrócitos com aspecto lobado (L). A anormalidade B não foi encontrada nos eritrócitos de peixes mantidos em água limpa por 36 horas após administração de AgNP.

O maior valor de média de frequência da anormalidade R ($3.2 \times 10^{-3} \text{‰}$) foi encontrado no período de 24 horas e foi 2.7 vezes maior em ambos os períodos de 12 e 36 horas.

Na anormalidade L o valor da média de frequência foi igual nos períodos de 24 e 36 horas ($6 \times 10^{-4} \text{‰}$).

Os núcleos classificados como S exibiram o mesmo valor de média de frequência de ocorrência ($2.8 \times 10^{-3} \text{‰}$) nos períodos de 12 e 24 horas. Estes valores foram 4.7 vezes maiores que no período pós-injeção mais extenso.

Na anormalidade B o valor de frequência de ocorrência ($6 \times 10^{-4} \text{‰}$) foi maior no período de 12 e foi três vezes maior que no período 24 horas.

A soma do MN mais todas outras anormalidades apresentou maior valor de média de frequência ($6.8 \times 10^{-3} \text{‰}$) no período de 24 horas. O valor neste período foi 1.5 e 2.6 vezes maior que nos períodos de 12 e 24 horas, respectivamente (Figura 39).

Figura 39. - Média de frequência de ocorrência (%) e desvio padrão de anormalidades nucleares de eritrócitos de *Trachinotus carolinus* (n = 5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L⁻¹) na dose de 3 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ (ANE = MN + R + L + S + B, MN = micronúcleo, R = reniforme, L = lobado, S = segmentado, B = bolha; letras diferentes indicam diferença significativa, p < 0,05).

V.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE

A investigação da atividade da catalase avaliar o potencial da AgNP em gerar EsRO. As análises dos resultados foram feitas comparando os efeitos entre as diferentes dosagens e os efeitos entre os diferentes tempos de exposição em ambos experimentos (Experimento 1 – E1 e Experimento 2 – E2). Os valores apresentados são referentes à média e o desvio padrão da atividade da catalase (U/mg).

V.5.1 *Efeito da dosagem – Experimento 1*

V.5.1.1 36 h

No período pós-injeção de 36 horas o valor da média da atividade da catalase foi significativamente diferente entre os tratamentos Ctrl_{Água} e os tratamentos em que se administraram as duas maiores doses (1.5 e 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$; $p < 0,05$). A atividade da catalase exibiu maior valor de média (191.22 U/mg) no tratamento 3 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ e este foi 1.6 e 1.3 vezes maior que no Ctrl_{Água} e no Ctrl_{Salina}, respectivamente. Em relação aos demais tratamentos (0.75 e 1.5 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$), o valor de média de atividade foi 1.1 vezes maior (Figura 40).

Figura 40 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ e de 10 μL de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.5.1.2 72 horas

As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores de média de atividade da catalase do período pós-injeção de 72 horas aconteceram entre os seguintes tratamentos: Ctrl_{Água} e 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$; Ctrl_{Salina} e as duas menores dose de suspensão de AgNP (0.75 e 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$); 0.75 e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$; 1.5 e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$.

Os maiores valores de média de atividade da catalase ocorreram nos tratamentos 0.75 (172.13 U/mg) e 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ (175.50 U/mg) com diferença de 0,02% entre eles. Estes valores foram 1.4 vezes maiores que no tratamento Ctrl_{Água}, duas vezes maior que no Ctrl_{Salina} e 1.6 vezes maior que no tratamento 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ (Figura 41).

Figura 41 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 72 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ e de 10 μL de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.5.1.3 108 horas

Não houve diferença significativa entre os tratamentos no período pós-injeção de 108 horas ($p > 0,05$).

O maior valor de média de atividade da catalase (236.67 U/mg) se deu no tratamento $3 \mu\text{gAgNP/gpeixe}$ e o valor foi 1.3 vezes maior que no Ctrl_{Água}; 1.5 vezes maior que no tratamento Ctrl_{Salina}; 1.6 vezes maior que no tratamento $0.75 \mu\text{gAgNP/gpeixe}$ e 1.4 vezes maior que no tratamento $1.5 \mu\text{gAgNP/gpeixe}$ (Figura 42).

Figura 42 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ e de 10 μL de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.5.2 Efeito do tempo de exposição – Experimento 1

V.5.2.1 Ctrl_{Água}

No tratamento Ctrl_{Água} o período pós-injeção de 108 horas foi significativamente diferente dos demais ($p < 0,05$). A média de atividade da catalase neste período (177.08 U/mg) foi 1.4 vezes maior do que ambos os períodos de 36 e 72 horas (Figura 43).

Figura 43 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5), nos quais não foi administrada injeção de suspensão de AgNP e foram mantidos em água limpa (Ctrl_{Água}) por 36, 72 e 108 horas (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.5.2.2 Ctrl_{Salina}

O tratamento Ctrl_{Salina} apresentou diferença significativa entre o período pós-injeção de 72 e os demais períodos ($p < 0,05$). Os períodos de 36 (145.6 U/mg) e 108 horas (152.7 U/mg) apresentaram os maiores valores de média de atividade da catalase, como também uma diferença de 4.7% entre eles. Esta pouca diferença faz com ambos os valores sejam 1.7 vezes maiores que no período de 72 horas (Figura 44).

Figura 44 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de solução isosmótica para teleósteos marinhos (10 μ L_{Salina}/g_{peixe} - Ctrl_{Salina}) (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.5.2.3 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

No tratamento 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ não houve diferença significativa entre os períodos pós-injeção de 36, 72 e 108 horas ($P > 0,05$). Os valores de média de atividade da catalase foram praticamente iguais nos períodos de 36 horas (172.22 U/mg) e 72 horas (172.13 U/mg). Estes valores foram aproximadamente 1.1 vezes maiores que no período de 108 horas (Figura 45).

Figura 45 - Média e desvio padrão da atividade a catalase em fígado (U/mg) de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) na dose de 0.75 $\mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$)

V.5.2.4 $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

No tratamento $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ não se verificou diferença significativa entre os períodos pós-injeção de 36, 72 e 108 horas ($p > 0,05$). O período de 72 horas apresentou maior valor de média de atividade da catalase (175.49 U/mg). Este valor foi semelhante aos obtidos nos demais períodos, as diferenças entre as médias foram de 2.1% e 3.1% em relação ao período de 36 (171.81 U/mg) e 108 horas (170.14 U/mg), respectivamente (Figura 46).

Figura 46 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata ($\text{AgNP} - 300 \text{ mg.L}^{-1}$) na dose de $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.5.2.5 $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

No tratamento $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$, os valores de média de atividade da catalase foram significativamente diferentes entre os períodos pós-injeção de 72 horas e os demais períodos ($p < 0,05$). O maior valor de média ocorreu no período de 108 horas (236.67 U/mg) e este valor foi 1.2 vezes maior que no período de 36 horas e 2.2 vezes maior que no período de 72 horas (Figura 47).

Figura 47 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 36, 72 e 108 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) na dose de $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.5.3 Efeito da dosagem – Experimento 2

V.5.3.1 12 horas

Não houve diferença significativa entre os tratamentos no período de 12 horas ($p > 0,05$).

O tratamento Ctrl_{Salina} apresentou maior valor de média de atividade da catalase (133.5 U/mg). Este valor foi 1.4 vezes maior que no Ctrl_{Água}, 1.6 vezes maior que no tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ e 1.5 vezes maior que nos tratamentos 1.5 e 3 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ (Figura 48).

Figura 48 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 12 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{gAgNP/gpeixe}$ e de 10 μL de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.5.3.2 24 horas

Não houve diferença significativa entre os tratamentos no período de 24 horas ($p > 0,05$).

No período pós-injeção de 24 horas os tratamentos Ctrl_{Água} (119.19 U/mg) e Ctrl_{Salina} (122.51 U/mg) exibiram os maiores valores de média de atividade da catalase com diferença de 2.7% entre eles. Os valores de média foram 1.2 vezes maiores que no tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$, duas vezes maior que no tratamento 1.5 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e 1.2 vezes maior que no tratamento 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ (Figura 49).

Figura 49 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 24 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isomótica para teleósteos marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.5.3.3 36 horas

As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos no período de 36 horas foram identificadas apenas entre o tratamento Ctrl_{Salina} e as duas maiores doses de suspensão de AgNP (1.5 e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$).

Os maiores valores de média de atividade da catalase ocorreram nos tratamentos 1.5 (190.8 U/mg) e 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ (186.53 U/mg) e apresentaram valores praticamente iguais. A diferença entre eles foi de apenas 2.2%. Em relação aos demais tratamentos, os valores de média nestes dois casos foram: 1.4 vezes maior que no Ctrl_{Água}, aproximadamente duas vezes maior que no Ctrl_{Salina} e 1.3 vezes maior que no tratamento 0.75 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ (Figura 50).

Figura 50 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* ($n = 5$) mantidos em água limpa por 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg/L) nas doses de 0.75, 1.5, 3 $\mu\text{gAgNP/g}_{\text{peixe}}$ e de 10 μL de solução isotônica para teleostes marinhos por grama de peixe (Ctrl_{Salina}). Grupo mantido em água limpa sem receber injeção (Ctrl_{Água}) (letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$).

V.5.4 Efeito do tempo de exposição – Experimento 2

V.5.4.1 Ctrl_{Água}

Não houve diferença significativa entre os períodos pós-injeção no tratamento Ctrl_{Água} ($p > 0,05$). O período de 36 horas apresentou o maior valor de média de atividade de catalase (139.01 U/mg) e seu valor foi 1.4 vezes maior que no período de 12 horas e 1.2 vezes maior que no período de 24 horas (Figura 51).

Figura 51 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5), nos quais não foi administrada injeção de suspensão de AgNP e foram mantidos em água limpa (Ctrl_{Água}) por 12, 24 e 36 horas (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.5.4.2 Ctrl_{Salina}

Os períodos pós-injeção de 12, 24 e 36 horas do tratamento Ctrl_{Salina} não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). O maior valor de média de atividade ocorreu no período de 12 horas (133.5 U/mg) e foi 1.1 e 1.4 vezes maior que nos períodos de 24 e 36 horas, respectivamente (Figura 52).

Figura 52 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de solução isomótica para teleósteos marinhos (10 μ L_{Salina}/g_{peixe} - Ctrl_{Salina}) (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.5.4.3 $0.75 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

No tratamento $0.75 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ a média da atividade da catalase no período de 36 horas (147.93 U/mg) mostrou ser significativamente diferente do valor nos demais períodos ($p < 0,05$). Este período exibiu a maior média e foi 1.8 vezes mais elevada que no período de 12 horas e 1.5 vezes maior que no período de 36 horas (Figura 53).

Figura 53 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 h após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) na dose de $0.75 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.5.4.4 $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

O período de 36 horas exibiu valor de média de atividade de catalase (190.8 U/mg) significativamente diferente do valor de média nos demais períodos do tratamento $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ ($p < 0,05$). Este valor foi o mais elevado, sendo 2.2 vezes maior que no período de 12 horas e 3.1 vezes maior que no período de 24 horas (Figura 54).

Figura 54 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) na dose de $1.5 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

V.5.4.5 $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$

No tratamento $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ período de 36 horas apresentou maior valor de média de atividade da catalase (186.53 U/mg) e este foi significativamente diferente do valor de média nos demais períodos ($p < 0,05$). O valor de média neste período foi em torno de duas vezes maior que nos períodos de 11 e 24 horas (figura 55).

Figura 55 - Média e desvio padrão da atividade da catalase (U/mg) em fígado de *Trachinotus carolinus* (n=5) mantidos em água limpa por 12, 24 e 36 horas após receberem injeção de suspensão de nanopartícula de prata (AgNP - 300 mg.L^{-1}) na dose de $3 \mu\text{g}_{\text{AgNP}}/\text{g}_{\text{peixe}}$ (letras distintas indicam diferença significativa entre os períodos, $p < 0,05$).

VI DISCUSSÃO

Diferentes fatores como a característica química do meio, matéria orgânica, forças iônicas, cargas ao redor da nanopartícula podem interferir no seu estado de agregação e consequentemente na sua toxicidade (BOTTERO et al., 2011; MATRANGA; CORSI, 2012). O uso do revestimento de partículas com substâncias poliméricas de cadeia longa, como o polivinilpirrolidona - PVP, tem como objetivo promover a estabilização estérica. Esta estabilização ocorre com a adsorção do polímero na superfície da partícula fazendo com que fiquem isoladas. No caso da AgNP utilizada neste trabalho, o revestimento com PVP mantém as partículas de prata com tamanho menor que 100 nm (HOTZA, 1997; LEVARD et al., 2012; NYMARK et al., 2013). Os resultados da microscopia eletrônica de varredura indicaram uma variação de tamanho, porém o valor permaneceu abaixo dos 100 nm. Embora Levard et al. (2012) em seu trabalho de revisão sobre o comportamento da AgNP no ambiente cite o PVP como um dos melhores estabilizantes, eles fazem uma ressalva sobre a necessidade de estudos que avaliem o efeito deste revestimento no processo de agregação das AgNP.

Neste trabalho, o uso da solução salina favoreceu a aglomeração da AgNP. A mesma nanopartícula quando dispersa em água destilada apresenta menor tamanho hidrodinâmico e maior valor em módulo do potencial Zeta (Tabela 3). Quanto menor o valor em módulo do potencial Zeta, maior a tendência de haver formação de agregados (SCHAFFAZICK et al., 2003). O fato de uma suspensão rica em sais (PBS) influenciar na formação de agregados de AgNP também foi observado por Ghosh et al. (2012). A presença de íons na superfície de partículas promove uma força de repulsão entre as mesmas, porém a junção de íons que neutralizem a carga da partícula diminuirá a força de repulsão (HOTZA, 1997; LEVARD et al., 2012). O uso da solução salina forneceu grande quantidade e variedade de íons que podem ter neutralizado a carga da superfície da AgNP e com isso este material apresentou maior estado de agregação do que quando disperso em água destilada.

O tamanho da AgNP em suspensão excedeu o valor que categoriza um material como nanométrico (< 100 nm), permitindo que ela seja enquadrada na categoria de tamanho denominada coloidal (1 a 1000 nm) (NOWACK; BUCHELI, 2007), o que poderia dar abertura para questionamento sobre o fato dela ainda poder ser considerada como nanopartícula. Entretanto, Handy et al. (2008a) sugerem que um agregado que ultrapasse a dimensão nanométrica pode ser considerado uma nanopartícula, pois a partícula que o originou possui tamanho menor que 100 nm.

Mesmo apresentando tamanho hidrodinâmico maior que 100 nm, a AgNP provavelmente entrou na célula por pinocitose. Uma vez dentro da célula diversos xenobióticos, inclusive a AgNP, podem induzir a formação de EsRO. Estando no interior da célula ou interagindo com a membrana celular a nanopartícula promove o aumento das EsRO. Por fim, AgNP quando em suspensões/soluções libera íons prata que também são responsáveis pelo aumento da produção das EsRO (LAPRESTA-FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ; BLASCO, 2012; SINGH et al., 2009).

A não detecção da AgNP em fígado de *T. carolinus* utilizando MEV-EDS pode estar relacionada com o fato de não ter ocorrido acúmulo no fígado, com relação ao número de amostras não ter sido suficiente ou com o fato de se tratar de um tecido. O uso desta técnica é capaz de detectar o acúmulo de nanopartícula em matriz biológica, porém a detecção deste material foi feita em bactérias nitrificantes (CHOI et al., 2009), células embrionárias de camundongo (AHAMED et al., 2008) e embriões de peixe (medaka) (WU; ZHOU, 2012).

A toxicidade da AgNP está relacionada com liberação de prata iônica em solução a partir da oxidação da prata, associação da nanopartícula com a membrana celular e formação de EsRO (BOTTERO et al., 2011; NYMARK et al., 2013). Além disso, o tamanho da partícula, o estado de agregação, a capacidade de penetrar na célula e o revestimento da nanopartícula podem interferir no grau de toxicidade. Estudo *in vitro* com macrófagos expostos à AgNP indica que partículas de tamanho menor apresentam maior toxicidade dependendo do tipo de célula (PARK et al., 2011). Em um trabalho com larvas de mosquito a AgNP causou maior expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo do que os íons de prata

(NAIR; PARK; CHOI, 2013). O resultado de um experimento *in vitro* com células do epitélio bronquial humano mostrou que a AgNP revestida com polivinilpirrolidona (PVP) não penetrou nas células nem provocou danos ao DNA (NYMARK et al., 2013). Entretanto, a AgNP revestida com PVP mostrou ser capaz de inibir o crescimento de bactérias (LEVARD et al., 2012).

Apesar das variações que a AgNP apresenta em relação a sua toxicidade, os resultados deste trabalho demonstram que a AgNP revestida com PVP, mesmo em estado agregado, promove a citogenotoxicidade em *T. carolinus*. A capacidade da AgNP em promover a citogentoxicidade em *T. carolinus* pode ser evidenciada pelo fato de que o aumento do MC foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de AgNP, como também os danos ao DNA nos grupos expostos foram maiores que nos grupos controle (Figuras 8, 9, 16 e 18). Esta relação dose-dependente também foi encontrada em outros trabalhos que utilizaram cultura de células do epitélio bronquial (KIM et al., 2011) e peixe de água doce (CHOI et al., 2010).

Ahamed et al. (2010) realizou experimentos com de larvas de drosófilas que recebiam alimento contendo AgNP nas concentrações de 50 e 100 µg/mL por períodos de 24 e 48 horas. Os resultados obtidos com seu trabalho indicaram que a expressão da proteína ligada ao dano e reparo do DNA apresentou relação dose e tempo dependente. Este nosso trabalho também indicou certa relação com a concentração e o período pós-injeção. A menor concentração de AgNP acusou aumento do dano ao DNA a medida que o tempo de exposição aumentou (Figura 13), porém com uso da maior concentração este efeito foi inverso em *T. carolinus* (Figuras 15, 22 e 23). Dependendo da concentração da AgNP e do período de exposição o efeito sobre o dano ao DNA pode não ser evidente.

A causa destes danos ao DNA está relacionada com o estresse oxidativo ocasionado pela produção de EsRO, como por exemplo os radicais ânions superóxidos (O_2^-) e hidroxil (OH^-). Os ânions superóxidos não atuam diretamente na quebra do DNA, eles são mediadores para formação do hidroxil que apresenta grande potencial oxidativo capaz de danificar as moléculas de DNA. Os íons de metais de transição são capazes de converter produtos do metabolismo aeróbico

(H_2O_2 e $O_2^{\cdot -}$) em radicais hidroxil via reação de Fenton, os quais realmente danificam o DNA (SINGH et al., 2009; VALAVANIDIS et al., 2006), conforme reação demonstrada abaixo.

Onde: M = metal de transição (prata).

Estudos que utilizaram o teste do micronúcleo para avaliar o efeito da AgNP em culturas de células humanas (KIM et al., 2011; LI et al., 2012; NYMARK et al., 2013) encontraram uma relação dose-resposta dependente. Experimentos *in vitro* (VEVERS; JHA, 2008) e *in vivo* (VIGNARDI et al., 2015) envolvendo peixes expostos à nanopartícula (TiO_2) também mostraram que nanopartículas são capazes de gerar micronúcleos. A exposição de *T. carolinus* à AgNP gerou resultados que exibem uma relação direta entre o aumento do momento caudal e o aumento da frequência de ocorrência da soma das anormalidades mais o micronúcleo (Figuras 12,28; 13,29; 14,30; 15,31). Tal relação não foi observada nos Experimento 2. O dano ao DNA pode favorecer a liberação de fragmentos de cromossomos durante a fase da anáfase da meiose, estes fragmentos permanecendo no interior da célula podem formar os micronúcleos (AL-SABTI; METCALFE, 1995; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). O fato do dano ao DNA estar relacionado com a formação de ANE e MN colabora para a existência desta relação direta entre estes biomarcadores. Além disso, as frequências de ocorrência das ANE+MN indicam que também existe uma relação dose-resposta.

A catalase mostra ser uma enzima eficiente na redução das EsRO. Em um estudo com cultura de células humanas expostas à AgNP e tratados com CAT foi detectada redução no dano ao DNA e na ocorrência de MN (KIM et al., 2011). Entretanto, pode haver tanto o aumento da atividade da CAT quanto sua inibição

mesmo que haja aumento da produção de EsRO. Peixes zebra expostos à solução de AgNP apresentaram redução na atividade da CAT mesmo apresentando danos ao DNA (CHOI et al., 2010). A atividade da catalase em *T. carolinus* mostrou uma relação inversa ao dano no DNA. Nos casos em que ocorreu redução no dano ao DNA ao longo do período de exposição a catalase apresentou aumento de atividade (Figuras 11,43; 15,47; 17,49; 19,51; 21,53) e nos casos em que o dano ao DNA aumentou a catalase exibiu menor atividade (Figuras 9,41; 13,45). Conforme descrito por Kim et al. (2011) a CAT apresenta atuação eficiente na redução do dano ao DNA devido a sua capacidade em reduzir as EsRO. Neste trabalho, a redução valor de MC esteve relacionado com o aumento da atividade da CAT, indicando sua ação antioxidante sobre EsRO e consequente redução nos danos ao DNA.

VII CONCLUSÃO

- A AgNP revestida com PVP promove o estresse oxidativo em juvenis de peixe marinho da espécie *Trachinotus carolinus*, aumentando a atividade da enzima antioxidante catalase.
- AgNP revestida com PVP é citogenotóxico para *T. carolinus*, provocando o aumento de danos ao DNA, induz a formação de micronúcleos e outras anormalidades nucleares eritrocitárias.
- O aumento da atividade da catalase apresentou uma relação nítida com a redução do dano do DNA.
- Há indicação de que tanto o aumento de dano do DNA quanto a formação de micronúcleos e o aumento de outras anormalidades nucleares eritrocitária é dose-resposta dependente.
- Há indicação de uma relação direta entre o aumento de dano de DNA (Momento caudal) e o aumento da frequência de ocorrência da soma das anormalidades mais o micronúcleo nos eritrócitos de *T. carolinus* expostos à AgNP.
- A solução salina favorece a aglomeração da AgNP aumentando o tamanho hidrodinâmico da mesma. No estado agregado esta nanopartícula é citogenotóxica para a espécie estudada.
- Os biomarcadores utilizados, catalase, micronúcleos e outras anormalidades nucleares eritrocitária são eficientes em avaliar a genotoxicidade de AgNP na espécie estudada.
- É recomendável a consideração de genotoxicidade da AgNP nos estudos ambientais marinhos.

VIII BIBLIOGRAFIA

- ABDI. **Estudo prospectivo nanotecnologia**: Série Cadernos da Indústria ABDI. Brasília: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2010.
- ADAMS, S. M. et al. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. . (Eds.). . **Biomarkers of environmental contamination**. Boca Raton, FL: [s.n.]. p. 333–353.
- AHAMED, M. et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 233, n. 3, p. 404–10, 15 dez. 2008.
- AHAMED, M. et al. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 242, n. 3, p. 263–269, 1 mar. 2010.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, p. 121–135, 1995.
- AL-SID-CHEIKH, M.; PELLETIER, E.; ROULEAU, C. Synthesis and characterization of [(110m)Ag]-nanoparticles with application to whole-body autoradiography of aquatic organisms. **Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine**, v. 69, n. 10, p. 1415–21, out. 2011.
- AMADO, L. L. et al. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 199–206, 2006.
- ASGHARI, S. et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. **Journal of nanobiotechnology**, v. 10, p. 14, jan. 2012.
- AVAKIAN, M. D. et al. The origin, fate, and health effects of combustion by-products: A research framework. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 11, p. 1155–1162, 2002.
- AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. R. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutation research**, v. 674, n. 1–2, p. 101–8, 31 mar. 2009.

- BEUTLER, E. Catalase. In: STRATTON, G. & (Ed.). . **Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods**. New York: [s.n.]. p. 89–90.
- BILBERG, K. et al. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 96, n. 2, p. 159–65, 31 jan. 2010.
- BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205–13, jan. 2011.
- BOTTERO, J.-Y. et al. Manufactured metal and metal-oxide nanoparticles: Properties and perturbing mechanism of their biological activity in ecosystems. **Comptes Rendus Geoscience**, v. 343, n. 2–3, p. 168–176, fev. 2011.
- BRADFORD, A. et al. Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 12, p. 4530–6, 15 jul. 2009.
- CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to asses the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295–311, 2000.
- CANESI, L. et al. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 168–177, 2010.
- CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 44, n. 11, p. 2123–2136, 1990.
- CERDA, H. et al. The DNA “comet assay” as a rapid screening technique to control irradiated food. **Mutation Research**, p. 167–181, 1997.
- CHIO, C.-P. et al. Assessing the potential risks to zebrafish posed by environmentally relevant copper and silver nanoparticles. **The Science of the total environment**, v. 420, p. 111–8, 15 mar. 2012.
- CHOI, J. E. et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 100, n. 2, p. 151–9, 15 out. 2010.

- CHOI, O. et al. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. **Water research**, v. 43, n. 7, p. 1879–86, abr. 2009.
- CONG, Y. et al. Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron- and ionic-Ag in the polychaete, *Nereis diversicolor*. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 105, n. 3–4, p. 403–11, out. 2011.
- DAUGHTON, C. G. Non-regulated water contaminants: Emerging research. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 24, n. 7–8, p. 711–732, 2004.
- DI GIULIO, R. T. et al. Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation and Toxicology. In: RAND, G. M. (Ed.). . **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Second ed. Washington: Taylor & Francis, 1995. p. 523–561.
- DU PREEZ, H. H. et al. Bioenergetics of fishes in a high-energy surf-zone. **Marine Biology**, v. 12, n. 106, p. 1–12, 1990.
- EPA. **U.S. Environmental Protection - Agency Nanotechnology White Paper**, 2007.
- FABREGA, J. et al. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment international**, v. 37, n. 2, p. 517–31, fev. 2011.
- FARKAS, J. et al. Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 96, n. 1, p. 44–52, 21 jan. 2010.
- FARKAS, J. et al. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 101, n. 1, p. 117–25, 17 jan. 2011.
- FARMEN, E. et al. Acute and sub-lethal effects in juvenile Atlantic salmon exposed to low ug/L concentrations of Ag nanoparticles. **Aquatic Toxicology**, v. 108, p. 78–84, 2012.
- FARRÉ, M. et al. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 1, p. 81–95, 2009.
- FASULO, S. et al. A multibiomarker approach in *Coris julis* living in a natural environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 7, p. 1565–73, out. 2010.

- GARDEA-TORRESDEY, J. L. et al. Alfalfa Sprouts: A Natural Source for the Synthesis of Silver Nanoparticles. **Langmuir**, v. 19, n. 4, p. 1357–1361, fev. 2003.
- GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of fish histology**. 1ª ed. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, 2009.
- GHOSH, M. et al. In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. **Mutation research**, v. 749, n. 1–2, p. 60–9, 12 dez. 2012.
- GOMES, T. et al. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Marine environmental research**, v. 84, p. 51–9, mar. 2013a.
- GOMES, T. et al. Differential protein expression in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nano and ionic Ag. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 136–137, p. 79–90, 15 jul. 2013b.
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES MARQUES, E. K. (Eds.). . **Mutagênese ambiental**. Canoas: Editora Ulbra, 2003. p. 247–279.
- GOTTSCHALK, F. et al. Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials for Different Regions. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 24, p. 9216–9222, 2009.
- GOVINDASAMY, R.; RAHUMAN, A. A. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 6, p. 1091–1098, jun. 2012.
- GRIFFITT, R. J. et al. Chronic nanoparticulate silver exposure results in tissue accumulation and transcriptomic changes in zebrafish. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 130–131, p. 192–200, 15 abr. 2013.
- GUBBINS, E. J.; BATTY, L. C.; LEAD, J. R. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 159, n. 6, p. 1551–9, jun. 2011.
- HANDY, R. D. et al. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 4, p. 287–314, 2008a.

- HANDY, R. D. et al. Manufactured nanoparticles: Their uptake and effects on fish - A mechanistic analysis. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 396–409, 2008b.
- HANDY, R. D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 315–325, 2008.
- HASUE, F. M. et al. Assessment of genotoxicity and depuration of anthracene in the juvenile coastal fish *Trachinotus carolinus* using the comet assay. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 61, n. 4, p. 215–222, 2013.
- HOAR, W. S.; HICKMAN JR., C. P. **A laboratory companion for general and comparative physiology**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc., 1967.
- HOTZA, D. Artigo revisão: colagem de folhas cerâmicas. **Cerâmica**, v. 43, n. 283–284, p. 159–166, 1997.
- JORY, D.; IVERSEN, E.; LEWIS, R. Culture of the fishes of the genus *Trachinotus* (Carangidae) in the Western Atlantic. **Journal of the World Mariculture Society**, v. 16, p. 87–94, 1985.
- KIM, H. R. et al. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. **Mutation research**, v. 726, n. 2, p. 129–35, 24 dez. 2011.
- KIM, J. Y. et al. Developmental toxicity of Japanese medaka embryos by silver nanoparticles and released ions in the presence of humic acid. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 92, p. 57–63, jun. 2013.
- KLUG, H. P.; ALEXANDER, L. E. **X-ray Diffraction Procedures. For Polycrystalline and Amorphous Materials**. 2 nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1962.
- KORNHAUSER, A.; WAMER, W. G.; LAMBERT, L. A. Light-induced dermal toxicity: Effects on the cellular and the molecular level. In: MARZULLI, F. N.; MAIBACH, H. I. (Eds.). **Dermatotoxicology**. Fourth ed. New York: Hemisphere, 1991. p. 527–569.
- KWOK, K. W. H. et al. Uptake of silver nanoparticles and toxicity to early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*): effect of coating materials. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 120–121, p. 59–66, 15 set. 2012.

- LANDSIEDEL, R. et al. Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations-Many questions, some answers. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 2–3, p. 241–258, 2009.
- LAPRESTA-FERNÁNDEZ, A.; FERNÁNDEZ, A.; BLASCO, J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 32, n. 797, p. 40–59, fev. 2012.
- LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 544, p. 43–64, 2003.
- LEVARD, C. et al. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 13, p. 6900–14, 3 jul. 2012.
- LI, Y. et al. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. **Mutation research**, v. 745, n. 1–2, p. 4–10, 14 jun. 2012.
- LOPES, I. et al. Toxicity and genotoxicity of organic and inorganic nanoparticles to the bacteria *Vibrio fischeri* and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 3, p. 637–648, 2012.
- LUSHCHAK, V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 153, n. 2, p. 175–190, 2011.
- MATRANGA, V.; CORSI, I. Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches. **Marine environmental research**, v. 76, p. 32–40, maio 2012.
- MCTI. **Ministério da Ciência , Tecnologia e Innovação: Programa Nacional de Nanotecnologia.** Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/27137.html>>. Acesso em: 1 jan. 2012.
- MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV. Teleostei (3).** São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1980.

- MERSCH, J.; BEAUVAIS, M. N.; NAGEL, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. **Mutation Research - Genetic Toxicology**, v. 371, n. 1–2, p. 47–55, 1996.
- MOORE, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**, v. 32, n. 8, p. 967–976, 2006.
- NAIR, P. M. G.; PARK, S. Y.; CHOI, J. Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in *Chironomus riparius*. **Chemosphere**, v. 92, n. 5, p. 592–9, jul. 2013.
- NAVARRO, E. et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 372–386, 2008.
- NEL, A. et al. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. February 2006, p. 622–627, 2006.
- NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 1, p. 5–22, 2007.
- NYMARK, P. et al. Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. **Toxicology**, v. 313, n. 1, p. 38–48, 2013.
- OBERDÖRSTER, G. et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. **Particle and Fibre toxicology**, v. 2, p. 8, 2005.
- OWEN, R.; DEPLEDGE, M. Nanotechnology and the environment: Risks and rewards. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 6, p. 609–612, 2005.
- PAMPLONA, R.; COSTANTINI, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 4, p. R843–R863, 2011.
- PARK, M. V. D. Z. et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9810–7, dez. 2011.

- PEAKALL, D. B. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 3, n. 3, p. 157–60, 1994.
- PHAN, V. N. et al. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station “Comandante Ferraz,” King George Island. **Polar Biology**, v. 30, n. 2, p. 209–217, 2007.
- POWERS, C. M. et al. Silver exposure in developing zebrafish produces persistent synaptic and behavioral changes. **Neurotoxicology and teratology**, v. 33, n. 2, p. 329–32, 2011a.
- POWERS, C. M. et al. Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition. **Neurotoxicology and teratology**, v. 33, n. 6, p. 708–14, 2011b.
- REEVES, J. F. et al. Hydroxyl radicals (.OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. **Mutation research**, v. 640, n. 1–2, p. 113–22, 2 abr. 2008.
- RIBEIRO, S. M. R. et al. A formacao e os efeitos das especies reativas de oxigenio no meio biologico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005.
- ROCHA, A. J. D. S. et al. Assessment of trophic transfer of benzo(a)pyrene genotoxicity from the post-larval pink shrimp *F. brasiliensis* to the juvenile Florida pompano *T. carolinus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 969–976, 2012.
- ROCHA, A. J. S. et al. GENOTOXICITY OF SHALLOW WATERS NEAR THE BRAZILIAN ANTARCTIC STATIO ‘COMANDANTE FERRAZ” (EACF), ALDMIRALTY BAY, KING GEORGE ISLAND, ANTARCTICA. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 63, n. 1, p. 63–70, 2015.
- SANTOS, T. C. A. et al. Effects of naphthalene on metabolic rate and ammonia excretion of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 335, n. 1, p. 82–90, jul. 2006.
- SAQUIB, Q. et al. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 26, n. 2, p. 351–61, mar. 2012.

- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quimica Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.
- SHI, J. et al. Light induced toxicity reduction of silver nanoparticles to *Tetrahymena Pyriformis*: effect of particle size. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 132–133, p. 53–60, 15 maio 2013.
- SIMONET, B. M.; VALCÁRCEL, M. Monitoring nanoparticles in the environment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 1, p. 17–21, 2009.
- SINGH, N. et al. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 23–24, p. 3891–3914, 2009.
- SINGH, N. P. et al. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184–191, 1988.
- STOPILHA, R. T. **Obtenção e caracterização de complexos polieletrólitos de quitosana e poli(metacrilato de sódio)**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014.
- TICE, R. R. et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–21, 2000.
- TIEDE, K. et al. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 25, n. 7, p. 795–821, 2008.
- VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 64, n. 2, p. 178–89, jun. 2006.
- VEVERS, W. F.; JHA, A. N. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 17, n. 5, p. 410–20, jul. 2008.
- VIGNARDI, C. P. et al. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 218–229, 2015.

- WDZICZAK, J. et al. COMPARATIVE STUDIES ON SUPEROXIDE DISMUTASE , CATALASE A ND PEROXIDASE LEVELS IN ERYTHROCYTES A N D LIVERS OF DIFFERENT FRESHWATER AND MARINE FISH SPECIES. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 73 B, n. 2, p. 361–365, 1982.
- WU, Y. et al. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 100, n. 2, p. 160–7, 15 out. 2010.
- WU, Y.; ZHOU, Q. Dose- and time-related changes in aerobic metabolism, chorionic disruption, and oxidative stress in embryonic medaka (*Oryzias latipes*): underlying mechanisms for silver nanoparticle developmental toxicity. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 124–125, p. 238–46, 15 nov. 2012.
- ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 3rd. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1996.
- ZHOU, Y. et al. Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and *Bacillus Calmette-Guérin*. **Journal of nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 19, jan. 2012.