

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - UFSCar/UNESP

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO
EM DIFERENTES pH DO MEIO AQUÁTICO EM BRÂNQUIAS DE
CURIMBATÁ (*Prochilodus lineatus*, TELEOSTEI, PROCHILODONTIDAE):
ASPECTOS BIOQUÍMICOS, FISIOLÓGICOS E MORFOFUNCIONAIS**

Naiara Elisabete da Silva de Souza

São Carlos - SP
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - UFSCar/UNESP

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO
EM DIFERENTES pH DO MEIO AQUÁTICO EM BRÂNQUIAS DE
CURIMBATÁ (*Prochilodus lineatus*, TELEOSTEI, PROCHILODONTIDAE):
ASPECTOS BIOQUÍMICOS, FISIOLÓGICOS E MORFOFUNCIONAIS

Naiara Elisabete da Silva de Souza

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

São Carlos - SP
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S729 Souza, Naiara Elisabete da Silva de
Efeitos da exposição à nanopartícula de dióxido de titânio em diferentes pH do meio aquático em brânquias de curimatã (Prochilodus lineatus, Teleostei, Prochilodontidae) : aspectos bioquímicos, fisiológicos e morfofuncionais / Naiara Elisabete da Silva de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
80 p.

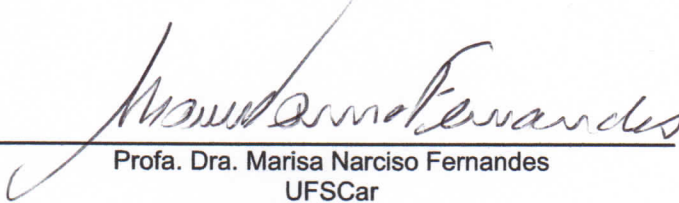
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Nanopartícula de dióxido de titânio . 2. Diferentes pH. 3. Brânquias . 4. Prochilodus lineatus. I. Título.




Folha de Aprovação

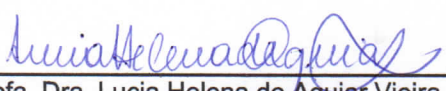
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Naiara Elisabete da Silva de Souza, realizada em 08/10/2015:



Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
UFSCar



Profa. Dra. Evelise Nunes Fragoso de Moura
UFSCar



Profa. Dra. Lucia Helena de Aguiar Vieira
UNICEP

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só nem nos deixa só; leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. (...) Essa é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso.”

Antoine de Saint-Exupéry

Dedico

*Aos meus amados pais, Fátima e Orlando,
pelo amor incondicional e dedicação sem
precedentes.*

*Ao meu amado avô Waldomiro, pelo
exemplo de vida que foi e sempre será para
todos nós, sua família.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, por acreditar em mim e no meu trabalho e por tantas oportunidades incríveis que me proporcionaram um grande crescimento profissional e pessoal, além do apoio que me concedeu, principalmente nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Aos meus amados pais, Orlando e Fátima, pelo amor incondicional, incentivo, por todo esforço e dedicação em proporcionar a mim e a minha irmã a melhor herança que um filho pode ter... uma educação de qualidade. Obrigada por serem pais tão especiais e amorosos. Como tenho sorte em tê-los! Amo vocês!

À minha irmã Nádia, o mais lindo presente que a vida me deu, pelo carinho e todo amor dedicado ao longo desses 19 anos de sua existência. Amo você!

À minha família querida e, principalmente, aos amados vô Waldomiro, vó Helena, vó Elsa e vô Orlando, por serem luzes na minha vida, por todo amor e carinho e por acreditarem em mim e entenderem minhas ausências nesses anos. Mesmo longe meu pensamento sempre esteve com vocês!

Ao meu amado André Luís, por todo auxílio, encorajamento, força e por acreditar em mim, principalmente nos momentos em que a minha autoconfiança faltou. Seu amor, companheirismo e auxílio foram fundamentais para a realização desse trabalho. Obrigada amor!

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) da Universidade Federal de São Carlos pelo curso de mestrado. Ao Alexandre, secretário do PIPGCF, por sua disponibilidade e auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA) pelo apoio financeiro.

À Estação de Hidrologia e Psicultura da Usina Hidrelétrica de Furnas – MG, pela obtenção dos peixes.

À Profa. Dra. Marcela Bianchessi da Cunha Santino, Profa. Dra. Odete Rocha, Dra. Marise Margareth Sakuragui pelas sugestões dadas durante o exame de qualificação.

À Dra. Marise Margareth Sakuragui e Dr. Marcelo Gustavo Paulino por todo auxílio, ensinamentos, amizade e cuidado desde o primeiro dia em que entrei no laboratório, obrigada de todo o meu coração.

A Laís e Greyce que me acompanharam todo o tempo, sempre com um sorriso no rosto e com muita dedicação e amizade, desde os cuidados com os peixes, durante os experimentos e análises. Muito obrigada meninas!

Aos amigos do laboratório, Ta (Talita), Pri (Priscila Siqueira), Jake (Jakeline), Vini (Vinícius), Marcelito (Marcelo), Ma (Marise), Aike (Natália), Iara, Mari (Marina), Dri (Drielle), Mari (Mariana), Laís, Greyce, Pam (Pamela), Pri Pedrão, Kelli, Vivi (Vivian),

Li (Eliane), pelo carinho, companheirismo, auxílio e boas risadas.... não posso esquecer dos lanchinhos! Muito obrigada!

Aos queridos amigos, Pri, Vini, Talitinha e Jake pelas risadas, momentos de descontração, desabafos, gordices e amizade que foram essenciais nesses dois anos. Obrigada queridos!

Aos queridos amigos para a vida, que encontrei na universidade, Jaque, Jorge e Naty, que se mostraram uma família para mim nesses anos todos, os grandes responsáveis por momentos maravilhosos e muito divertidos dessa época da minha vida. Obrigada chuchus!

À minha psicóloga Viviane, por todo encorajamento e auxílio, fundamentais para que eu chegasse até aqui. Obrigada de coração!

Aos queridos mestres que me inspiraram durante toda a minha jornada educacional e me ajudaram a moldar o que sou hoje: Professora Erica, Professora Luciana, Professora Cida Possati, Professor Caetano, Professor Ernaldo, Professor Dr. Manuel Martins Filho, Professor Dr. Marco Del Lama, Professora Dra. Andrea Lúcia de Souza, Professora Dra. Ana Lúcia Perdigão, Professor Dr. Nivaldo Nordi e tantos outros com quem tive a honra de aprender, obrigada!

À Biologia, uma das melhores coisas que me aconteceram! Porque “ser biólogo é mais que uma profissão, é fazer de sua paixão, sua vida”.

À Deus pela oportunidade de estar aqui, vivenciando e aprendendo tantas coisas, ao lado de pessoas muito especiais, com as quais sempre posso contar.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Nanomateriais: histórico e aplicação | 1 |
| 1.2. Nanopartícula de dióxido de titânio (NP-TiO ₂) | 3 |
| 1.3. Contaminação dos ecossistemas aquáticos e alteração do pH do meio | 5 |
| 1.4. Peixes no ambiente aquático..... | 6 |
| 1.5. Brânquias | 7 |
| 1.6. Biomarcadores em peixes | 11 |
| 1.7. Biomarcadores fisiológicos | 11 |
| 1.8. Biomarcadores bioquímicos | 12 |
| 1.8.1. Biomarcadores bioquímicos relacionados à osmorregulação..... | 12 |
| 1.8.2. Biomarcadores bioquímicos associados ao sistema de defesa antioxidante . | 15 |
| 1.9. Biomarcadores morfológicos | 19 |
| 1.10. Espécie <i>Prochilodus lineatus</i> | 21 |
| 2. OBJETIVOS..... | 23 |
| 2.1. Objetivo Geral | 23 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 23 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 24 |
| 3.1. Análises físico-químicas das NP-TiO ₂ | 24 |
| 3.1.1. Caracterização e dinâmica das NP-TiO ₂ em meio aquático | 24 |
| 3.1.2. Recuperação das NP-TiO ₂ após suspensão em meio aquoso | 24 |
| 3.1.3. Determinação da concentração de titânio em água | 26 |
| 3.1.4. Análise da forma das NP-TiO ₂ em microscopia eletrônica de varredura (MEV) após suspensão em água..... | 27 |
| 3.2. Animais..... | 27 |
| 3.3. Teste de sensibilidade com cloreto de potássio (KCl)..... | 28 |
| 3.4. Teste de toxicidade aguda: determinação da CL50;48h em pH 5,0, 7,0, e 8,0..... | 28 |
| 3.5. Efeito da NP-TiO ₂ em brânquias | 29 |
| 3.5.1. Toxicidade aguda. Delineamento Experimental..... | 29 |
| 3.5.2. Análises das variáveis hematológicas | 30 |
| 3.5.3. Análises das variáveis plasmáticas: íons e osmolalidade | 31 |
| 3.5.4. Análises Bioquímicas..... | 31 |
| 3.5.5. Determinação de proteínas totais..... | 32 |
| 3.5.6. Atividade da Superóxido dismutase (SOD)..... | 32 |
| 3.5.7. Atividade da Catalase (CAT) | 33 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.5.8. | Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx) | 33 |
| 3.5.9. | Atividade da Glutaciona-S-transferase (GST) | 33 |
| 3.5.10. | Antioxidantes não enzimáticos | 34 |
| 3.5.11. | Espécies reativas de oxigênio (EROs) | 34 |
| 3.5.12. | Peroxidação lipídica (LPO) | 35 |
| 3.5.13. | Atividade das enzimas Na ⁺ -K ⁺ -ATPase (NKA) e H ⁺ -ATPase | 35 |
| 3.5.14. | Atividade da anidrase carbônica (AC) | 36 |
| 3.5.15. | Análise histopatológica das brânquias | 36 |
| 3.5.16. | Determinação da densidade e área fracional das células-cloreto (CC) em brânquias | 37 |
| 3.6. | Análise estatística | 39 |
| 4. | RESULTADOS | 40 |
| 4.1. | Análises físico-químicas das NP-TiO ₂ | 40 |
| 4.1.1. | Caracterização e dinâmica das NP-TiO ₂ em suspensão | 40 |
| 4.1.2. | Recuperação das NP-TiO ₂ após suspensão em meio aquoso | 42 |
| 4.1.3. | Concentração de Ti solúvel e TiO ₂ nas amostras de água coletadas durante o experimento nos tempos 0 h e 48 h | 43 |
| 4.1.4. | Morfologia das NP-TiO ₂ | 43 |
| 4.2. | Toxicidade aguda das NP-TiO ₂ (CL-50;48h) | 44 |
| 4.2.1. | Análises hematológicas | 44 |
| 4.2.2. | Atividade das enzimas relacionadas à regulação iônica | 45 |
| 4.2.3. | Densidade e área fracional das células cloreto | 47 |
| 4.2.4. | Respostas antioxidantes e peroxidação lipídica | 49 |
| 4.2.5. | Análise histopatológica | 51 |
| 5. | DISCUSSÃO | 55 |
| 5.1. | Características físico-químicas das NP-TiO ₂ | 55 |
| 5.2. | Toxicidade das NP-TiO ₂ para <i>P. lineatus</i> em diferentes pH da água | 57 |
| 5.2.1. | Respostas hematológicas | 58 |
| 5.2.2. | Respostas ionosmóticas | 59 |
| 5.2.3. | Respostas antioxidantes | 61 |
| 5.2.4. | Respostas morfológicas | 63 |
| 6. | CONCLUSÕES | 65 |
| 7. | REFERÊNCIAS | 67 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela I.** Tratamentos experimentais aos quais espécimes de *Prochilodus lineatus* foram expostos durante 48 h, sendo divididos entre grupos controles (livres de NP-TiO₂) e grupos expostos (submetidos a concentrações crescentes de NP-TiO₂) nos pH 5,0, 7,0 e 8,0. 29
- Tabela II.** Tampão e relação peso de tecido/volume de tampão utilizado para preparação dos homogeneizados das análises bioquímicas realizadas..... 32
- Tabela III.** Classificação das histopatologias branquiais mais comuns em brânquias. Adaptado de Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994). 38
- Tabela IV.** Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das NP-TiO₂ em suspensão aquosa (1mg.L⁻¹) em pH 5,0; 7,0; e 8,0. 40
- Tabela V.** Porcentagem de recuperação de NP-TiO₂ após suspensão em meio aquoso, porcentagem em suspensão e precipitada verificada no teste 1 (controle) e testes 2 a 5 (suspensão 48 horas)..... 42
- Tabela VI.** Concentração de Ti solúvel e TiO₂ nas amostras de água dos aquários experimentais com concentração inicial de 1mg L⁻¹ nos diferentes pH (5,0; 7,0; e 8,0) referentes aos tempos 0h e 48h a partir da digestão em persulfato de amônio e quantificação do Ti⁺⁴ livre em ICP-MS..... 43
- Tabela VII.** Concentração de íons (Na⁺, K⁺ e Cl⁻) e osmolalidade do plasma sanguíneo de *Prochilodus lineatus* expostos a NP-TiO₂ em diferentes pH (5,0, 7,0 e 8,0), durante 48h. 44
- Tabela VIII.** Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a NP-TiO₂ em diferentes pH. 52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Comparação das nanopartículas com partículas em microescala. Disponível em: <http://www.aoc.kit.edu/english/1909.php>. **1**
- Figura 2.** Áreas que têm utilizado materiais em nano-escala. Extraído de Segala, 2009. **2**
- Figura 3.** Formas de contaminação dos ecossistemas dulcícolas por NP-TiO₂. Adaptado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAqCUAH/aguas-subterraneas>. **4**
- Figura 4.** Esquema representativo das formas mais comuns de NP-TiO₂. a. Rutilo; b. Anatase (Extraído de Brandão, 2008). **5**
- Figura 5.** Estrutura da brânquia de um teleósteo. A. Brânquia mostrando os quatro pares de arcos branquiais (Fonte: <http://dicionarioportugues.org/pt/branquia>; acesso em 30 de maio de 2015); Barra de escala = 10 mm. B. Detalhe de um arco branquial. Foto: Marcelo G. Paulino e Naiara E. S. Souza; Barra de escala = 10 mm. C. Detalhe dos filamentos e lamelas branquiais. Foto: Marcelo G. Paulino e Naiara E. S. Souza; Barra de escala = 1 mm. D. Filamento e lamelas branquiais, Microscopia eletrônica de varredura. Foto: Luciana Fernandes; Barra de escala = 500 µm. F. Filamento; L. Lamela. **9**
- Figura 6.** Estrutura das brânquias de teleósteos. a) Localização das brânquias na cavidade orofaríngea do peixe. b) Esquema ilustrativo da estrutura dos arcos branquiais c) Esquema que ilustra o fluxo de água através das lamelas em contracorrente em relação ao fluxo sanguíneo. (Extraído de Paulino, 2011, adaptado e traduzido de Hirose et al., 2003). **10**
- Figura 7.** Corte longitudinal do filamento branquial de um espécime de *Prochilodus lineatus*; a - Célula pavimentosa; b - Célula cloreto; c - Célula pilar. F. Filamento; L. Lamela. Glutaraldeído, Azul de Toluidina. Barra de escala = 20 µm. Foto: Marcelo G. Paulino **10**
- Figura 8.** Ilustração do funcionamento da enzima NKA. 1. A ligação de 3 íons Na⁺ citoplasmático à proteína NKA estimula a fosforilação desta pelo ATP. 2. A fosforilação da NKA causa uma mudança na sua conformação. 3. A mudança de conformação da NKA libera os íons Na⁺ para fora da célula e 2 íons K⁺ extracelular se ligam à NKA. 4. As ligações dos íons K⁺ provocam a liberação do grupo fosfato. 5. A perda do fosfato restaura a conformação inicial da NKA. 6. Íons K⁺ são liberados e os sítios de ligação dos íons Na⁺ ficam expostos novamente; o ciclo se repete. (Extraído de Cummings, B. Disponível em: <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/memb/c8x15NaK-pump.jpg>). **13**
- Figura 9.** Representação esquemática do transporte de íons proposta por Evans (2008) nos diferentes tipos de células cloreto (CRM α e CRM β) presentes no epitélio branquial de peixes de água doce. Extraído de Evans (2008); modificado por Cavicchioli-Azevedo

(2013). NHE - trocador Na^+/H^+ ; VHA (H-ATPase); EnaC - canal de íons Na^+ ; AC – anidrase carbônica; NBC - co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$; NKA – Na^+/K^+ -ATPase; Kir – Canal de íons K^+ ; NCC - co-transportador Na^+Cl^- ; AE - trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$;..... **14**

Figura 10. Esquema ilustrativo do desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes (AOX) e as espécies reativas de oxigênio (ERO), levando ao quadro de estresse oxidativo. Extraído de Scandalios (2005), adaptado por Monteiro (2006). **16**

Figura 11. Esquema representativo do sistema antioxidante das células de mamíferos, enzimático e não enzimático. Extraído de Fang et al., 2002. **19**

Figura 12. Esquema das lesões branquiais mais comumente encontradas. (A) lamela normal, (B-F) lamelas alteradas. Abreviações: lb = lâmina basal; CC = célula-cloreto; CM = célula mucosa; CPi = célula pilar; CPv = célula pavimentosa; svl = seio venoso lamelar; csm = canal sanguíneo marginal (Machado, 1999, modificada de Mallat, 1985). **20**

Figura 13. A. Espécime de *Prochilodus lineatus*. Foto: Marcelo G. Paulino. B. Mapa do Brasil; em evidência as regiões sul, sudeste e centro oeste em que a espécie *P. lineatus* é encontrada; Modificado de IBGE, 2015 (<http://mapas.ibge.gov.br/fisicos/brasil>). **22**

Figura 14. Eletromicrografia de NP-TiO₂ em suspensão em água Milli-Q. A. aglomerados de NP-TiO₂. B. Detalhe do tamanho individual das NP-TiO₂. Barra de escala = 200 nm (A) e 100 nm (B). **40**

Figura 15. Porcentagem (%) de distribuição dos aglomerados (nm) de NP-TiO₂ em suspensão aquosa em pH 5,0; 7,0 e 8,0. Linha vermelha indica distribuição de Gauss. **41**

Figura 16. Imagens das NP-TiO₂ em solução. A. NP-TiO₂ precipitadas; B. NP-TiO₂ dispersa em meio aquoso. **43**

Figura 17. Variáveis hematológicas de *Prochilodus lineatus* expostos a NP-TiO₂ em água com pH 5,0, 7,0 e 8,0, durante 48h. A. Hematócrito (Hct); B. Concentração de hemoglobina ([Hb]); C. Número de eritrócitos (RBC); e índices hematimétricos: D. Volume Corpuscular Médio (VCM); E. Hemoglobina corpuscular média (HCM); F. Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Média ± EPM. * indica diferença significativa entre o grupo expostos a NP-TiO₂ em relação aos seus controles; # - indica diferença dos grupos C-pH5 ou C-pH8 em relação ao grupo C-pH7 (p < 0,05). **46**

Figura 18. Atividade da enzima anidrase carbônica (A), Na^+/K^+ -ATPase (B) e H⁺-ATPase (C) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a NP-TiO₂ nos pH 5,0, 7,0 e 8,0. Média ± EPM. * indica diferença significativa entre os grupos expostos a NP-TiO₂ em relação aos seus controles; # - indica diferença dos grupos C-pH5 ou C-pH8 em relação ao grupo C-pH7 (p < 0,05). **47**

Figura 19. Eletromicrografias de varredura (SEM) do epitélio do filamento branquial de *Prochilodus lineatus*. A. Filamento branquial mostrando a localização das lamelas (L) e local onde a captura das imagens foi feita para as análises (setas). Barra de escala = 500 μm ; B. Células-cloreto – pH 5,0; C. Células-cloreto – pH 7,0; D. Células-cloreto - pH 8,0. Em B, C e D Setas simples indicam CC tipo I; setas duplas indicam CC tipo II; Barra de escala = 20 μm 48

Figura 20. Área fracional (AFCC - %) e densidade de células-cloreto (CC) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* dos grupos controles e expostos a NP-TiO₂ em pH 5,0, 7,0 e 8,0 durante 48h. A. AFCC de CC tipo I; B. AFCC de CC tipo II; C. Densidade de CC tipo I (CC.mm⁻²); D. Densidade de CC tipo II (CC.mm⁻²). Média \pm EPM. * indica diferença significativa entre grupos (p<0,05). 49

Figura 21. A. Espécies reativas de oxigênio (ERO); B. Peroxidação lipídica (LPO); C. Atividade da superóxido dismutase (SOD); D. Atividade da catalase (CAT); E. Atividade da glutatona peroxidase (GPx); F. Atividade da glutatona S-transferase (GST); G. Concentração da glutatona reduzida (GSH); H. Atividade da glutamato-cisteína ligase (GCL) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* dos grupos controle e exposto à NP-TiO₂ nos pH 5,0, 7,0 e 8,0, durante 48h. Média \pm EPM. * indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação aos seus controles; # - indica diferença dos grupos C-pH5 ou C-pH8 em relação ao grupo C-pH7 (p < 0,05). 50

Figura 22. Histopatologias em brânquiais de *Prochilodus lineatus* expostos a NP-TiO₂ em diferentes pH. A. Estrutura normal da brânquia; B. Hipertrofia do Epitélio da lamela (setas) C. Fusão completa de algumas lamelas (seta); D. Fusão completa de todas as lamelas; E. Dilatação dos vasos sanguíneos (seta); F. Aneurismas Apicais (setas); G. Hipertrofia e Hiperplasia de cél. cloreto (seta); H. Hipertrofia do Epitélio da lamela (setas); L. Lamela; F. Filamento. Glutaraldeído. Azul de Toluidina. Escala = 20 μm . .. 53

Figura 23. Índice de alterações histopatológicas (IAH); B. Volume médio de alterações (VMA); em brânquias de *Prochilodus lineatus* dos grupos controle e exposto à NP-TiO₂ nos pH 5,0, 7,0 e 8,0, durante 48h. Média \pm EPM. * indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação aos seus controles; # - indica diferença dos grupos C-pH5 ou C-pH8 em relação ao grupo C-pH7 (p < 0,05). 54

Figura 24. Ilustração da dupla camada eletrostática que se forma ao redor da partícula em suspensão. 55

Figura 25. Variação do potencial zeta em diferentes pH. Em vermelho está a região de instabilidade (entre pH 4,0 e pH 7,5). Disponível em <http://www.quiminet.com/>..... 56

Figura 26. Diagrama das brânquias de peixe de água doce mostrando os mecanismos de absorção de eletrólitos e entrada a de NP-TiO₂ nas células do epitélio branquial a partir de transporte vesicular. Extraído de Shaw & Handy (2011). 63

ABREVIATURAS

AC = Anidrase carbônica

ADP = Adenosina trifosfato

AFCC = Área fracional das células cloreto

AOX = antioxidantes

ATP = Adenosina trifosfato

Ca²⁺ = Íon cálcio

CAT = catalase

CC = Célula cloreto

CDNB = 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno

CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média

Cl⁻ = Íon cloreto

CM = Célula mucosa

CO₂ = Dióxido de carbono

CPv = Célula pavimentosa

Dh = diâmetro hidrodinâmico

Dhmax = Diâmetro hidrodinâmico máximo

Dhmin = Diâmetro hidrodinâmico mínimo

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO = Espécies reativas de oxigênio

Fe²⁺ = Íon ferro

FeSO₄ = Sulfato ferroso

GCL = Glutamato cisteína ligase

GPx = Glutathione peroxidase

GR = Glutathione reductase

GSH = Glutathione reduzida

GSSG = Glutathione oxidada

GST = Glutathione S-transferase

GTA = Glutaraldeído

H₂DCFDA = 2,7-diacetato de diclorofluoresceína

H₂O = Água

H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio

H-ATPase = hidrogênio ATPase
Hb = Hemoglobina
HCM = Hemoglobina corpuscular média
Hct = Hematócrito
 HO_2^\bullet = Hidroperóxido
IAH = Índice de alteração histopatológica
KCl = Cloreto de potássio
LPO = Peroxidação lipídica
MET = Microscopia eletrônica de transmissão
MEV = Microscopia eletrônica de varredura
 Mg^{2+} = Íon Magnésio
 MgCl_2 = Cloreto de magnésio
 Na^+ = Íon sódio
NaCl = Cloreto de sódio
NADH = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo -P
NDA = 2,3-naftalenedicarboxialdeído
NKA = Na^+/K^+ - ATPase
NP-TiO₂ = Nanopartícula de dióxido de titânio
O₂ = Oxigênio
 O_2^\bullet = Radical superóxido
Pi = Fosfato inorgânico
RBC = Red Blood Cells
SOD = superóxido dismutase
TC = reação / taxa catalisada
TCA = Ácido tricloroacético
Ti = Titânio livre
TiO₂ = Dióxido de titânio
TNC = reação / taxa não catalisada
U = unidades
VCM = Volume corpuscular médio
VMA = Valor médio de alterações

RESUMO

As nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂) têm alcançado os ecossistemas aquáticos através de diferentes fontes, como esgotos e lixiviação das culturas agrícolas. Fatores abióticos como pH, força iônica, dureza da água podem alterar a agregação química das NPs e a biodisponibilidade de metais nas águas. Considerando as variações de pH que podem ocorrer no ambiente, naturalmente ou não, e a crescente utilização de NP-TiO₂ nos mais diferentes segmentos industriais, o presente estudo teve por objetivo determinar a CL-50;48h das NP-TiO₂ em diferentes pH (ácido, neutro e básico) em juvenis de *Prochilodus lineatus* (curimbatá) e avaliar os efeitos da exposição subletal a NP-TiO₂ nesses pH, utilizando biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e morfológicos. Após a realização do teste de sensibilidade com KCl, os animais foram submetidos a testes com diferentes concentrações de NP-TiO₂ nos pH 5,0, 7,0 e 8,0 durante 48h para determinar a CL-50;48h. Posteriormente, os animais foram expostos à concentração de 1 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ durante 48h nos diferentes pH. Após a exposição, amostras de sangue e de brânquias foram coletadas. Análises de caracterização das NP-TiO₂ sugerem que em diferentes pH a capacidade de agregação das NP se modificam e que em pH 5,0, o diâmetro hidrodinâmico das NP é maior em relação aos outros pH, o que pode ter dificultado a entrada das NP nos organismos e causado danos menores. As NP-TiO₂ foram consideradas não-tóxicas nos diferentes pH. A exposição a NP-TiO₂ e a pH 5,0 causou desequilíbrio iônico nos animais expostos, possivelmente em função das alterações na concentração de Cl⁻. A exposição a pH 5,0 e 8,0 e a NP-TiO₂ em pH 7,0 inibiu a enzima anidrase carbônica. Nos animais expostos a NP em pH 5,0 não foram identificadas CC em cripta, possivelmente devido ao bloqueio das superfícies dessas CC pelos grandes agregados de NP. As alterações nas concentrações de espécies reativas de oxigênio e da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutamato cisteína ligase podem indicar um desequilíbrio no sistema antioxidante. A exposição as NP causou danos maiores em pH 7,0, onde os agregados apresentam diâmetro hidrodinâmico menor, corroborando com a hipótese de que quanto menor o tamanho dos aglomerado, maior a facilidade das NP entrarem no organismo dos animais expostos.

Palavras-chave: nanopartícula de dióxido de titânio; diferentes pH; brânquias; *Prochilodus lineatus*.

ABSTRACT

The titanium dioxide nanoparticles (NP-TiO₂) has achieved into aquatic ecosystems through different sources, such as sewer and leaching. Abiotic factors such as pH, ionic strength, water hardness may change the chemical aggregation of NPs as well as the bioavailability of metals in waters result of speciation and /or complexation with other compounds. Considering the pH variations can occur in the environment naturally or as a result of ecological accidents and the increasing use of NP-TiO₂ in many different industries, this study aimed to determine the CL-50; 48 hours of NP-TiO₂ in different pH (acidic, neutral and basic) in juvenile *Prochilodus lineatus* (curimbatá) and evaluating the effects of exposure to sublethal NP-TiO₂ these pH using biochemical, physiological and morphological biomarkers. After sensitivity test with KCl, the animals were tested with different concentrations of NP-TiO₂ at pH 5.0, 7.0 and 8.0 for 48 hours to determine the CL-50; 48h. Subsequently, the animals were exposed to 1 mg L⁻¹ NP-TiO₂ for 48 hours at different pH. After the exposure period, blood samples were obtained *via* caudal puncture for ion plasma analysis and hematologic variables, and samples of gills were collected and fixed. The analytical characterization of NP-TiO₂ suggest the aggregation ability are modified of the NP at different pH and at pH 5.0, the hydrodynamic diameter of the NP is much larger then the others pH, which may have create difficults for the entry of NP in organisms and caused less damage. The NP-TiO₂ were considered non-toxic in pH 5,0, 7,0 and 8,0. Exposure to NP-TiO₂ pH 5.0 and ionic imbalance caused in the exposed animals, possibly due to changes in the concentration of Cl⁻ ions. Exposure to pH 5.0 and 8.0 and NP-TiO₂ at pH 7.0 inhibited AC enzyme. In animals exposed to NP at pH 5.0 were not identified chloride cells with crypt surface, possibly due the blocking of these surfaces by the large NP aggregates. Changes in concentrations of ROS and SOD, CAT and GCL activity may indicate an imbalance in antioxidant system due to different pH and NP-TiO₂ exposure. NP exposure caused major damage at pH 7.0, where have lower hydrodynamic diameter , supporting the hypothesis that the smaller the size of the cluster,it's easier the NP enter the body of the exposed animals.

Keywords: Titanium dioxide nanoparticles; different pH; gills; *Prochilodus lineatus*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanomateriais: histórico e aplicação

Em dezembro de 1959, Nobel Laureate Richard Feynman proferiu uma palestra no Instituto de Tecnologia da Califórnia durante um encontro da *American Physical Society*, na qual mencionou o processo pelo qual seria possível manipular átomos e moléculas individualmente, tornando-se o primeiro pesquisador a reconhecer o potencial dos materiais em nanoescala para o setor industrial. Em 1974, o processo de manipular átomos e moléculas em nano-escala, passou a ser chamado oficialmente de “nanotecnologia” (Feynman, 1960; Taniguchi, 1974; Srivastava et al., 2015). A palavra nanotecnologia deriva do grego “nanos” que significa diminuir. De acordo com o documento PAS71 (BSI, 2005), *nanopartícula* (NP) é uma partícula em que pelo menos uma das dimensões está entre 1 e 100 nm. Para a ecotoxicologia, são considerados nanomateriais (NMs), partículas que podem incluir algumas partículas maiores que 100 nm (Figura 1) ou agregados de NPs cujo tamanho pode variar em poucas centenas de nanômetros (Handy & Shaw, 2007; Handy et al., 2008a; Handy et al., 2008b).

A produção de NMs começou a se destacar no início dos anos 1980 com a invenção do microscópio de força atômica que permitiu a observação de átomos e moléculas, assim como sua manipulação física. Em 1985, novas estruturas de carbono compostas de 60 átomos foram descobertas e denominadas fulerenos, em homenagem ao arquiteto Buckminster Fuller. Em 1991, a manipulação dos átomos de carbono tornou possível a criação do primeiro nanotubo seis vezes mais leve e 100 vezes mais forte que o aço (Bystrzejewska-Piotrowska et al, 2009; Brar et al., 2010).

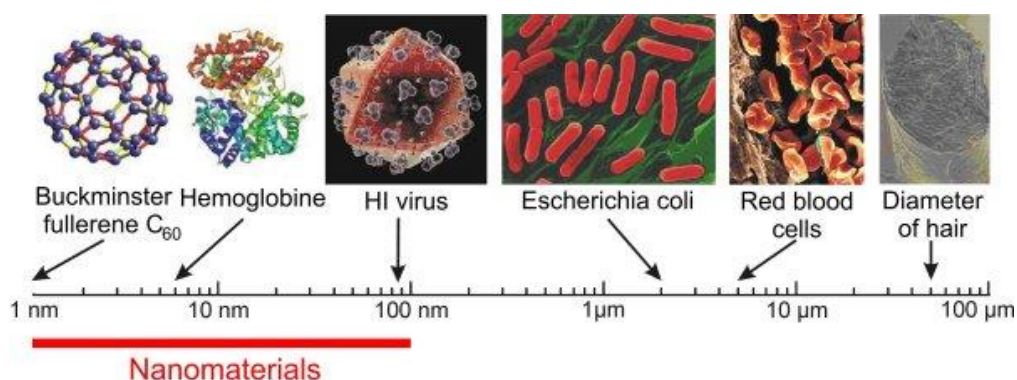


Figura 1. Comparação das nanopartículas com partículas em microescala. Disponível em: <http://www.aoc.kit.edu/english/1909.php>.

Apesar dos NMs terem ganhado destaque no cenário acadêmico principalmente nas últimas décadas, NMs existem no ambiente desde o começo da história da Terra, com a liberação de NPs em explosões vulcânicas e incêndios florestais naturais. A presença dos NMs no ambiente se intensificou devido a ação do homem que passou a produzir NPs em centrais elétricas, combustão de materiais e produção industrial de NMs (Mamalis, 2007; Oberdörster et al., 2007; Srivastava et al., 2015).

Os materiais em nanoescala, devido ao seu tamanho diminuto, apresentam uma extensa área superficial, possuindo assim, um elevado número de sítios reativos que podem interagir com diversas espécies químicas, tornando-os materiais altamente reativos (Zeng et al., 1998; Mamalis, 2007; Oberdörster et al., 2007; Sharma et al., 2009; Rosseto, 2012; Srivastava et al., 2015).

Atualmente, tem-se observado um intenso crescimento na produção de materiais em nanoescala para os mais variados setores da ciência e tecnologia (Figura 2), como nas indústrias farmacêuticas, na construção de células combustíveis, produção de chips de computadores, baterias, polímeros, entre outros (Abdelrahim et al., 2002; Santhoshkumar et al., 2014). Segundo pesquisas, a produção anual estimada de materiais em nanoescala saltou de 1.000 toneladas em 2004 para 5000 toneladas nos últimos anos, com a perspectiva de que a marca de 100.000 toneladas seja atingida na próxima década (Paschoalino, et al. 2010; Rosseto, 2012).

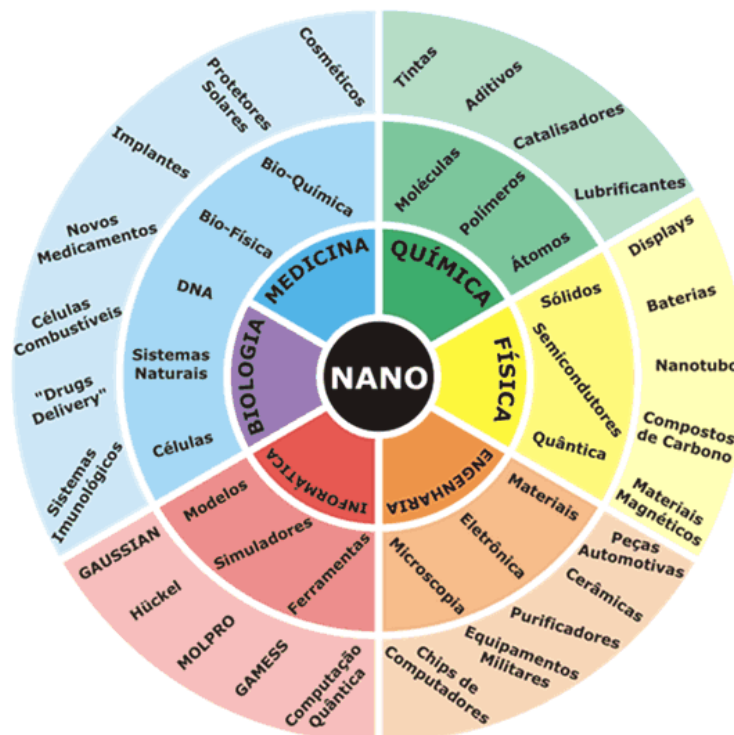


Figura 2. Áreas que têm utilizado materiais em nano-escala. Extraído de Segala, 2009.

Contudo, as mesmas propriedades que tornam as NPs tão atrativas podem ser responsáveis por efeitos nocivos aos organismos, conforme indícios reportados em estudos toxicológicos com micro-organismos, algas, peixes, ratos e células humanas. Em relação à sua toxicidade e alta reatividade, alguns estudos sugerem que as NPs podem apresentar uma permeabilidade maior através da pele, mucosas e membranas celulares aumentando o seu efeito tóxico. Além disso, é preciso considerar as formas que as NPs se apresentam no ambiente ou nos organismos, uma vez que podem estar em forma livre ou formando aglomerados (Quina, 2004; Seaton, 2005; Paschoalino et al. 2010).

Em geral, as NPs podem ser categorizadas em materiais a base de carbono (como os fulerenos e nanotubos de carbono) e NPs inorgânicas, incluindo as NP de óxidos metálicos (óxido de zinco, óxidos de ferro, dióxido de titânio, entre outros), NP metálicas (ouro, prata e ferro) e as chamadas “*quantum dots*” (sulfeto de cádmio e seleneto de cádmio) (Ju-Nam & Lead, 2008).

1.2. Nanopartícula de dióxido de titânio (NP-TiO₂)

Entre as NPs de óxidos metálicos, destaca-se o dióxido de titânio (TiO₂) que inicialmente ganhou rápida expressão como substituto dos pigmentos à base de chumbo. Devido às suas propriedades de opacidade e branqueamento, as aplicações das NP-TiO₂ abrangem diversas áreas como, a indústria alimentar, cosmética, de papel, farmacêutica, fabricação de tintas, plásticos, indústrias têxtil, laticínios e doces (Levine et al., 2003; Zhang et al., 2007; Medina-Reyes et al., 2015). As NP-TiO₂ são aplicadas em alimentos para retirar umidade e oxigênio e suspensões de NP-TiO₂ têm sido amplamente utilizadas como um eficiente catalisador para a decomposição de contaminantes orgânicos presentes na água (Centi et al., 2002; Pirkanniemi & Sillanpää, 2002; Zhang et al., 2007). Além disso, à capacidade de absorver de forma eficaz a radiação ultravioleta do sol e convertê-la em calor, torna a NP-TiO₂ ideal para a fabricação de protetores solares (Salata, 2004; Pereira, 2010; Weir et al., 2012; Halappanavar et al., 2014; Feckler et al., 2015).

Embora alguns materiais em micro-escala não apresentem toxicidade, como TiO₂, em nano-escala podem tornar-se tóxicos (Howard e Maynard, 1999). Nesse sentido, estudos sugerem que o efeito do tamanho é consideravelmente mais importante em relação à toxicidade das NPs do que a composição real do material (Donaldson et al., 2000; Öberdorster, 2000; Gumbleton, 2001). Apesar da crescente utilização das NP-

TiO₂ pouco se sabe sobre a transferência e destino desses materiais nanométricos no meio aquático. Dessa forma, o impacto das NP-TiO₂ sobre os organismos aquáticos é de especial interesse na ecotoxicologia (Lovern & Klaper, 2006; Zhang et al.; 2007).

As NP-TiO₂ tem sido consideradas compostos com baixa toxicidade, entretanto estudos em peixes têm evidenciado alterações bioquímicas e fisiológicas e histopatologias em diversos tecidos (Bermudez et al., 2004; Federici et al., 2007; Ramsden et al., 2013; Carmo, 2014).

As NP-TiO₂ tem alcançado os ecossistemas aquáticos (Figura 3) através de diferentes fontes, tais como esgotos urbanos e industriais não tratados adequadamente; pela lixiviação das culturas agrícolas; por meio da liberação de partículas provenientes de processos industriais para a atmosfera, que são carregados pela chuva até os ambientes aquáticos.

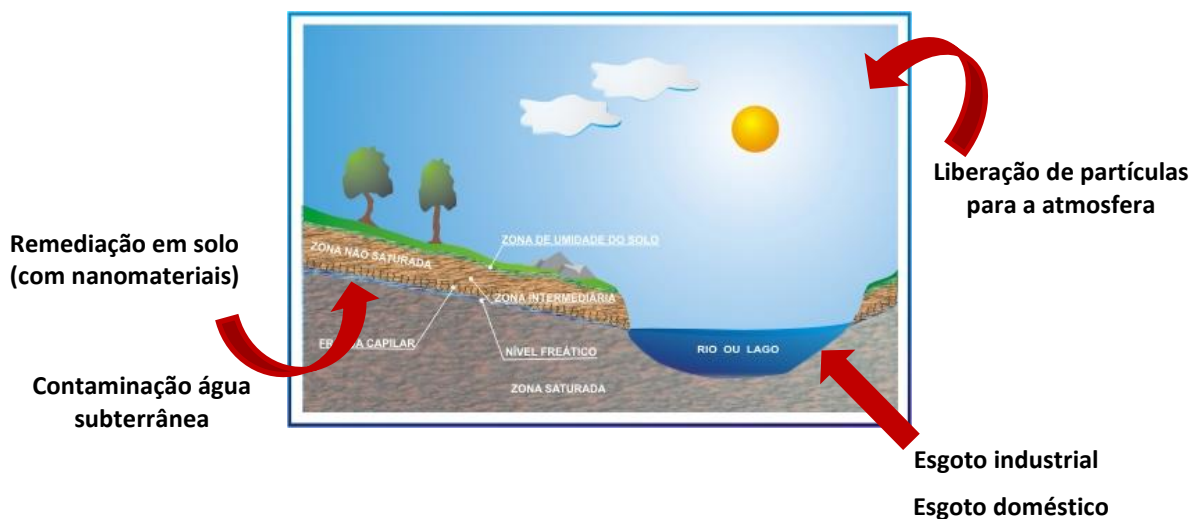


Figura 3. Formas de contaminação dos ecossistemas dulcícolas por NP-TiO₂. Adaptado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAqUAH/aguas-subterraneas>.

As NP-TiO₂ possuem diferentes estruturas cristalinas, sendo *rutilo* e *anatase* (Figura 4) as formas mais comuns. A capacidade reativa das NPs está intimamente relacionada com sua forma cristalina (Handy et al., 2008a). Os cristais de NP-TiO₂ são formados por íons de Ti⁴⁺ no centro de um octaedro constituído por seis íons O²⁻; cada átomo de oxigênio possui três átomos de titânio vizinhos, pertencendo a três octaedros diferentes. A estrutura cristalina das formas rutilo e anatase se diferenciam uma da outra devido a uma distorção nos octaedros formados pelos átomos de oxigênio. A célula unitária da anatase apresenta quatro moléculas de TiO₂ enquanto que a célula unitária de rutilo possui apenas duas moléculas de TiO₂ (Brandão, 2008).

Oberdörster et al. (1992), em seu estudo com células epiteliais humanas de brônquios expostas a diferentes estruturas cristalinas de NP-TiO₂, observou que a forma anatase apresentou maior toxicidade em relação a forma rutilo, causando produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), peroxidação lipídica (LPO), danos no DNA e formação de micronúcleo.

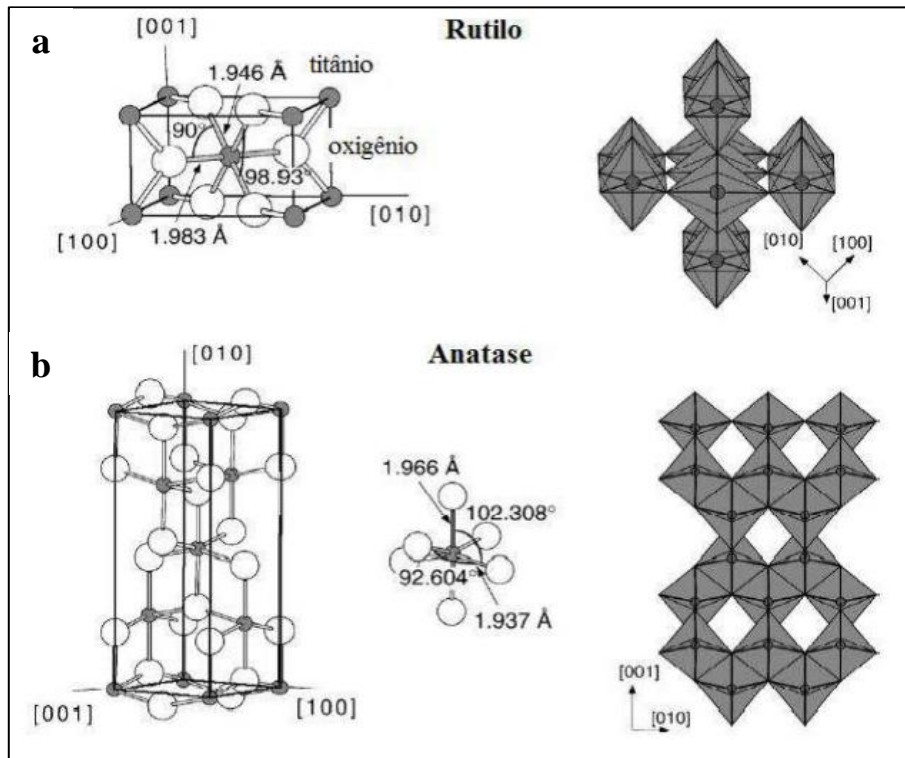


Figura 4. Esquema representativo das formas mais comuns de NP-TiO₂. a. Rutilo; b. Anatase (Extraído de Brandão, 2008).

Fatores abióticos como pH, força iônica, dureza da água e a presença de matéria orgânica podem alterar a agregação química às NPs (Handy et al., 2008a). Dessa forma, é importante compreender o comportamento das NPs nas diferentes condições que o ambiente aquático pode apresentar assim como sua entrada e efeitos para organismos aquáticos.

1.3. Contaminação dos ecossistemas aquáticos e alteração do pH do meio

Nas últimas décadas, com a intensificação do desenvolvimento de novas tecnologias e desenvolvimento acelerado dos setores agrícola e industrial, os corpos d'água têm recebido grandes descargas de poluentes (Zagatto & Bertoletti, 2006).

Efluentes provenientes da agricultura, indústrias e esgoto doméstico normalmente contém uma grande variedade de xenobióticos que chegam aos corpos d'água sem tratamento adequado. Esses compostos podem modificar a qualidade da

água e causar alterações bioquímicas nas células, alterações estruturais e fisiológicas, doenças e até mudanças na estrutura das populações de peixes e outros animais que vivem nesse ambiente (Zagatto & Bertoletti, 2006).

O conhecimento sobre o destino das substâncias químicas nos ambientes aquáticos permite a previsão dos possíveis efeitos ecotoxicológicos. Vários fatores ambientais incluindo pH e concentração de ácido húmico podem alterar a biodisponibilidade de metais e compostos orgânicos nas águas em consequência da especiação e/ou complexação com outros compostos. A disponibilidade dos poluentes para os organismos aquáticos é a chave determinante para a bioconcentração e toxicidade dessas substâncias (Fent & Looser, 1995).

O pH, assim como outras variáveis físico-químicas, podem variar devido a fatores naturais e antrópicos como alteração no teor de matéria orgânica e ocorrência de precipitação ácida (Maier, 1987; Esteves, 1998; Carvalho & Fernandes, 2006; Silva, 2008). Águas doce e pobre em íons, como a maioria das águas continentais do Brasil apresentam uma baixa capacidade de tamponamento e variam naturalmente de neutro a ácido podendo se alterar ao longo do rio dependendo dos efluentes que recebe. Assim, a biota aquática que inclui os peixes pode ser submetida a mudanças no pH do meio em que vivem (Esteves, 1998; Carvalho & Fernandes, 2006).

Mudanças no pH dos ecossistemas aquáticos naturais influenciam a fisiologia de diversas espécies, uma vez que o pH da água tem importante papel na homeostase dos animais aquáticos. O aumento ou diminuição do pH pode causar distúrbios no balanço ácido-base, regulação iônica e excreção de amônia (Grosell & Wood, 2002). Peixes expostos a águas alcalinas acumulam amônia no plasma e apresentam alterações histopatológicas nas brânquias e fígado (Smith & Piper, 1975; Thurston et al., 1984; Miron et al., 2008). Carvalho & Fernandes (2006) observaram mudanças nos parâmetros hematológicos em *Prochilodus lineatus* associados a mudanças de pH, indicando distúrbios ionoregulatórios e respiratórios.

1.4. Peixes no ambiente aquático

No ambiente aquático os peixes representam o maior grupo de vertebrados. Os peixes podem ser encontrados desde regiões 5000 m acima do nível do mar até zonas abissais marinhas, cuja profundidade pode chegar a 11000 m (Goksoyr & Förlin, 1992; Andrade & Yasui, 2003). Esses animais são encontrados em ambientes muito variáveis principalmente em relação à salinidade, temperatura, pH, dureza da água. Dessa forma,

o meio influencia diretamente o organismo dos peixes, o que implica em uma ampla capacidade fisiológica adaptativa desses animais (Roberts, 2012).

1.5. Brânquias

As brânquias dos peixes, assim como qualquer órgão responsável por trocas gasosas, são organizadas de forma a maximizar a área superficial disponível para difusão de O_2 e CO_2 e minimizar a distância de difusão entre o meio externo e o sangue, facilitando as trocas gasosas através do tecido. A combinação da pequena distância de difusão da barreira água-sangue, que varia entre 1 a 10 μm (Cerqueira & Fernandes, 2002) e a extensa área superficial das brânquias é fundamental para a troca de gases (Ay et al., 1999; Mazon et al., 2002); contudo, a extensa área superficial, facilita o contato das brânquias com substâncias tóxicas e agentes patógenos presentes na água tornando as brânquias o primeiro órgão-alvo dos xenobióticos (Sollid & Nilsson, 2006).

O epitélio branquial possui papéis fundamentais na regulação ácido-base, iônica e osmótica e na excreção de nitrogênio nos peixes. Assim como todos os vertebrados, os peixes possuem três mecanismos compensatórios para regular o estado ácido-base do meio extracelular do seu corpo: o primeiro mecanismo, que entra em ação instantaneamente, consiste no tamponamento a partir da liberação de íons, como bicarbonato e H^+ ; o segundo mecanismo tem início em poucos minutos e consiste nos ajustes respiratórios para o funcionamento do sistema tampão $CO_2-HCO_3^-$; a mobilização do terceiro mecanismo pode ocorrer entre alguns minutos a horas, e consiste no transporte de moléculas relevantes como, íons H^+ , Na^+ , Cl^- , NH_4^+ entre o meio intracelular e o meio extracelular para a manutenção do equilíbrio ácido-base entre o animal e ambiente (Evans et al., 2005). Embora a osmorregulação nos peixes seja mediada por um conjunto de estruturas, incluindo o epitélio gastrointestinal e renal, as brânquias são os principais locais onde ocorre troca de íons para manutenção do balanço iônico (Evans et al., 1999; Evans et al., 2005).

As brânquias apresentam uma estrutura complexa cuja organização geral baseia-se em um sistema de subdivisões sucessivas (Figura 5). As brânquias são constituídas por quatro pares de arcos branquiais dispostos lateralmente localizados na cavidade orofaríngea, e coberta pelo opérculo que a separa do meio externo (Figura 6a). Cada arco branquial possui filamentos ou lamelas primárias, que são subdivididos em lamelas ou lamelas secundárias, local onde ocorrem as trocas gasosas (Figura 6b). O fluxo de

água passa em contracorrente ao fluxo sanguíneo nas lamelas (Figura 6c), o que torna mais eficiente as trocas gasosas e iônicas (Evans et al., 1999).

O epitélio branquial é constituído por diversos tipos celulares (Figura 7), em particular, por células pavimentosas, células cloreto, células neuroepiteliais, células mucosas, células pilares e células indiferenciadas (Laurent, 1984). Aproximadamente 90% da superfície do epitélio lamelar é constituída por células pavimentosas (CPv). Essas células possuem inúmeras mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmáticos rugoso bem desenvolvidos indicando atividade metabólica (Laurent & Dunel, 1980; Evans et al., 1999).

As células mucosas (CM) estão localizadas, principalmente, na borda dos filamentos dispostas entre as células pavimentosas de forma que a distribuição de muco produzido por essas células seja mais eficiente sendo carregado sobre as demais células pelo movimento da água, mas também podem ser encontradas na região interlamelar (Laurent, 1984). As mucosubstâncias produzidas por essas células dificultam a entrada de substâncias tóxicas, protegem o tecido branquial de partículas abrasivas (Sibbing & Uribe, 1985), atraem íons formando um microambiente favorável para trocas de íons entre o organismo e o meio. Dependendo das características físico-químicas da água e da presença de xenobióticos, pode ocorrer uma diminuição ou aumento no número de CM ou da produção de muco (Shephard, 1989; Powell et al., 1994; Handy & Eddy, 2004; Handy et al., 2008b; Moron et al., 2009; Paulino et al., 2012a, 2014).

As células cloreto (CC) são encontradas em todo o corpo do animal sendo fundamentais na regulação ionosmótica do organismo (Alam & Frankel, 2006). No entanto, as brânquias apresentam um elevado número de CC, visto que este órgão é responsável pela manutenção do gradiente iônico entre o meio externo e o fluido extracelular dos peixes (Paulino et al., 2012b). As CC apresentam um sistema tubular constituído por uma extensa invaginação da membrana basolateral, que forma uma espécie de labirinto em contato com o citoplasma celular e apresentam uma grande quantidade de enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (NKA) (Philpott, 1980; Evans et al., 2005). A atividade da NKA mantém o equilíbrio iônico entre os meios extra e intracelular por transporte ativo dos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) através da membrana.

As lamelas são constituídas em seu interior por células pilares (CPI) cuja disposição poligonal forma um complexo sistema de espaços por onde o sangue circula de forma ocorrer as trocas de gases através da superfície branquial e nutrir as células que compõem o epitélio lamelar (Laurent, 1984; Evans et al., 1999).

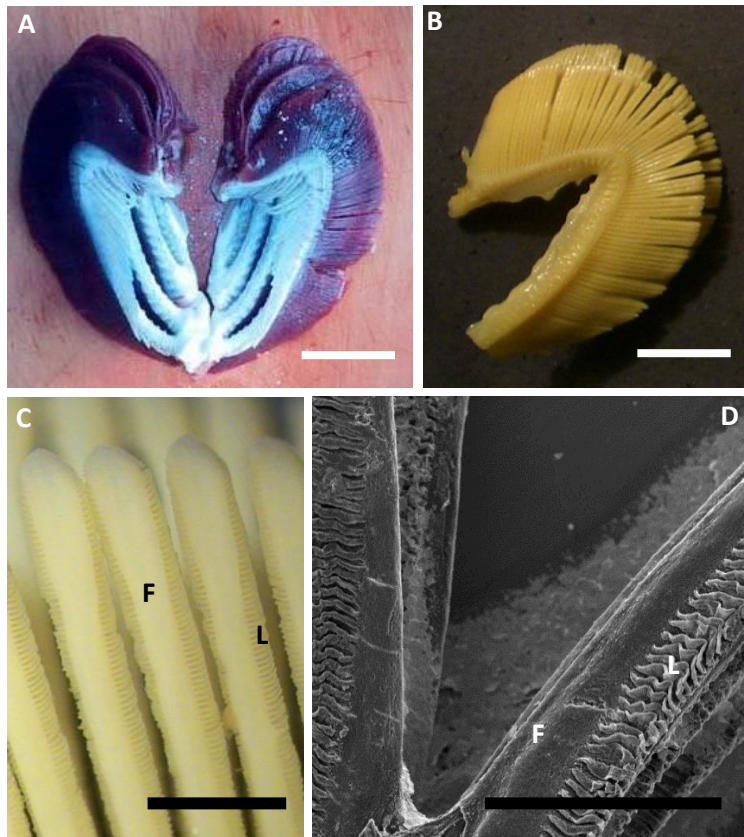


Figura 5. Estrutura da brânquia de um teleósteo. A. Brânquia mostrando os quatro pares de arcos branquiais (Fonte: <http://dicionarioportugues.org/pt/branquia>; acesso em 30 de maio de 2015); Barra de escala = 10 mm. B. Detalhe de um arco branquial. Foto: Marcelo G. Paulino e Naiara E. S. Souza; Barra de escala = 10 mm. C. Detalhe dos filamentos e lamelas branquiais. Foto: Marcelo G. Paulino e Naiara E. S. Souza; Barra de escala = 1 mm. D. Filamento e lamelas branquiais, Microscopia eletrônica de varredura. Foto: Luciana Fernandes; Barra de escala = 500 μ m. F. Filamento; L. Lamela.

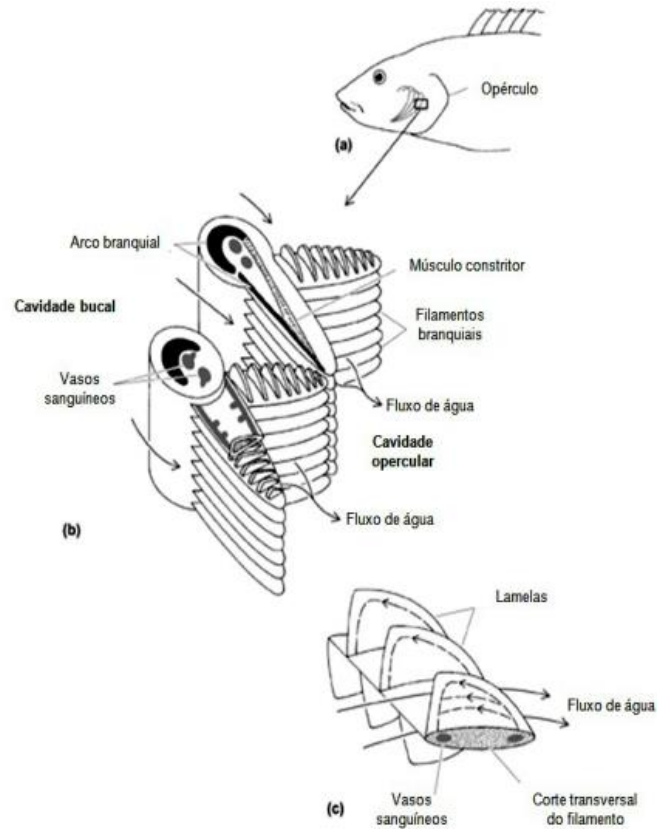


Figura 6. Estrutura das brânquias de teleostes. a) Localização das brânquias na cavidade orofaríngea do peixe. b) Esquema ilustrativo da estrutura dos arcos branquiais c) Esquema que ilustra o fluxo de água através das lamelas em contracorrente em relação ao fluxo sanguíneo. (Extraído de Paulino, 2011, adaptado e traduzido de Hirose et al., 2003).

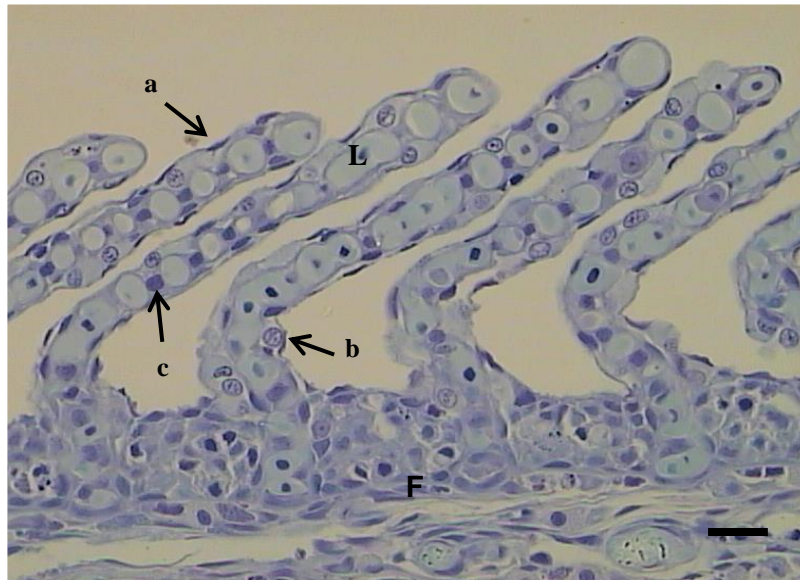


Figura 7. Corte longitudinal do filamento branquial de um espécime de *Prochilodus lineatus*; a - Célula pavimentosa; b - Célula cloreto; c - Célula pilar. F. Filamento; L. Lamela. Glutaraldeído, Azul de Toluidina. Barra de escala = 20 µm. Foto: Marcelo G. Paulino

1.6. Biomarcadores em peixes

Biomarcadores têm sido definidos como uma variação molecular, bioquímica, celular, fisiológica ou comportamental que pode ser mensurada em células, tecidos ou fluídos do corpo fornecendo evidências de exposição e/ou efeitos de um ou mais poluentes (Depledge & Fossi., 1994; van der Oost et al., 2003; Rola et al., 2012). Assim, biomarcadores podem ser usados como uma ferramenta para avaliar os níveis de contaminação nas águas e a intensidade da resposta pode estar relacionada com o nível ou concentração química ambiental (Hahn, 2002; Rola et al., 2012). Essas respostas podem ser avaliadas a partir da determinação dos níveis moleculares e bioquímicos, como alteração dos ácidos nucleicos, estrutura e atividade enzimática e proteínas; ou outros níveis de organização biológica, como danos morfológicos, reprodução, redução da taxa de crescimento e deterioração individual da saúde (Rola et al., 2012).

Biomarcadores podem ser definidos como sinais de alerta precoce de efeitos em níveis de resposta mais tardios, sendo assim, excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema aquático (Bayne et al., 1985; Walker et al., 1996; van der Oost et al., 2003).

1.7. Biomarcadores fisiológicos

A exposição a agentes químicos e físicos podem resultar em alterações fisiológicas no sangue dos peixes (Nussey et al., 1995; Alberto *et al.*, 2005). Mudanças hematológicas dependem da ação dos xenobióticos nos sistemas biológicos, a concentração dos contaminantes na água, tempo de exposição e sensibilidade da espécie. Os eritrócitos são essenciais para o transporte de gases (O_2 e CO_2) da superfície respiratória para os tecidos e vice versa, suprindo as necessidades metabólicas e mantendo o pH ótimo do organismos (Sadauskas-Henrique et al., 2011). O plasma sanguíneo é responsável por transportar nutrientes, íons e resíduos metabólicos para excreção.

Nesse sentido, a avaliação das células sanguíneas permite diagnosticar doenças e monitorar o estado fisiológico do peixe, uma vez que é bem conhecido que a função do sangue é manter a estabilidade dos tecidos e o ambiente interno do corpo constante (Mazon et al., 2002).

1.8. Biomarcadores bioquímicos

A avaliação das respostas bioquímicas refletem o potencial dos contaminantes em modificar os processos fisiológicos nos organismos expostos (van der Oost, 2003). Os biomarcadores bioquímicos são indicadores de curto prazo dos efeitos a exposição a substâncias tóxicas (van der Oost, 2003).

Biomarcadores bioquímicos são definidos como mudanças na atividade de enzimas e na produção de proteínas presentes nas células ou fluidos resultantes da exposição a agentes xenobióticos.

1.8.1. Biomarcadores bioquímicos relacionados à osmorregulação

A regulação iônica e osmótica é essencial para a vida. Nos peixes, as brânquias são os principais órgãos de troca iônica. As CC estão diretamente envolvidas na captação de íons Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} e H^+ nos peixes de água doce para a manutenção da homeostase iônica (Mazon et al., 2002; Paulino et al., 2012b). Essas células possuem grande quantidade de enzimas sódio – potássio ATPase (NKA), hidrogênio ATPase (H^+ -ATPase) e anidrase carbônica (AC), que estão intimamente relacionadas com as trocas iônicas do organismo com o meio.

A NKA é uma enzima transmembrana responsável pela manutenção do volume celular e pressão osmótica, uma vez que é responsável pelo transporte ativo dos íons Na^+ e K^+ e, conseqüentemente, pela manutenção do gradiente eletroquímico entre os meios intra e extracelular (Ostrowski et al., 2011; Priya et al., 2015). A enzima NKA apresenta duas conformações (Figura 8), sendo uma fosforilada e a outra desfosforilada (Figura 9). Na conformação fosforilada, a NKA apresenta alta afinidade pelos íons Na^+ intracelular, enquanto na conformação desfosforilada apresenta alta afinidade pelos íons K^+ extracelular. A cada ciclo entre a forma fosforilada e desfosforilada da NKA uma molécula de ATP é lisada em $\text{ADP} + \text{P}_i$ e um íon Mg^{2+} é utilizados como co-fator, resultando no transporte de três íons Na^+ para o meio extracelular e de dois íons K^+ para o meio intracelular (Horisberger, 2004; Massui, 2005).

Estudos mostram que a quantidade de CC e a atividade da enzima NKA nas brânquias podem alterar como consequência da variação de pH, de temperatura ou a presença de xenobióticos (Shikano e Fujio, 1998; Paulino et al., 2012b).

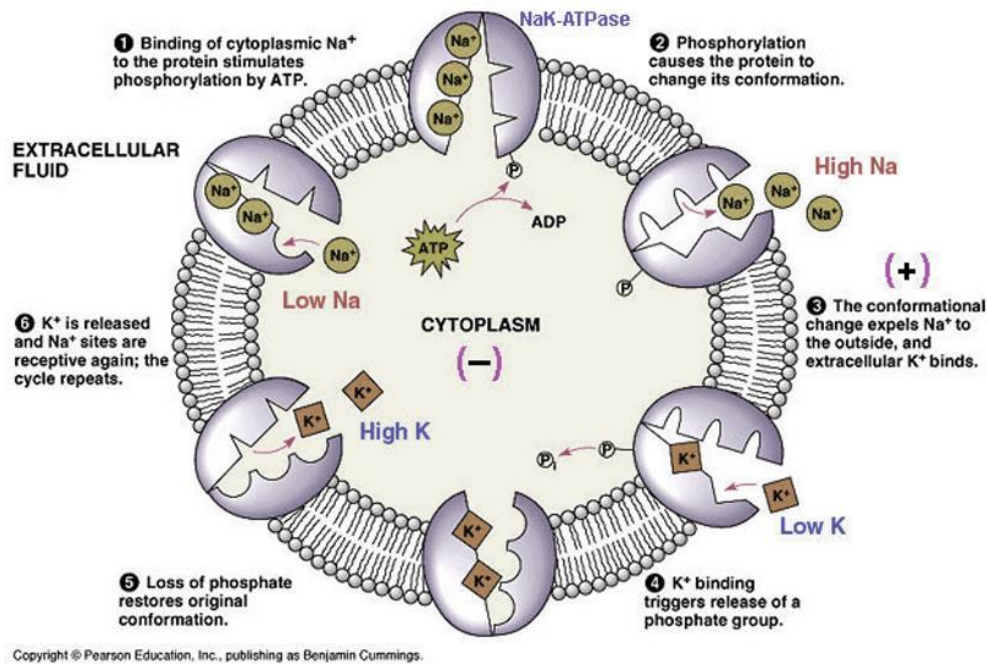


Figura 8. Ilustração do funcionamento da enzima NKA. 1. A ligação de 3 íons Na^+ citoplasmático à proteína NKA estimula a fosforilação desta pelo ATP. 2. A fosforilação da NKA causa uma mudança na sua conformação. 3. A mudança de conformação da NKA libera os íons Na^+ para fora da célula e 2 íons K^+ extracelular se ligam à NKA. 4. As ligações dos íons K^+ provocam a liberação do grupo fosfato. 5. A perda do fosfato restaura a conformação inicial da NKA. 6. Íons K^+ são liberados e os sítios de ligação dos íons Na^+ ficam expostos novamente; o ciclo se repete. (Extraído de Cummings, B. Disponível em: <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/memb/c8x15NaK-pump.jpg>).

A regulação ácido-base nos vertebrados, incluindo nos peixes, é intimamente ligada à excreção de CO_2 através das reações de hidratação/desidratação e seus equivalentes ácido-base H^+ e HCO_3^- . Nos peixes, no entanto, a regulação ácido-base está associada a regulação iônica, porque a compensação ácido-base depende primariamente da transferência direta de H^+ e HCO_3^- através das brânquias em troca dos íons Na^+ e Cl^- , respectivamente. Uma das principais enzimas responsáveis pela manutenção desses processos são as anidrase carbônicas (AC) (Gilmour & Perry, 2009). As AC são metaloenzimas que catalisam a reação de hidratação do CO_2 , resultando na formação dos íons H^+ e HCO_3^- , fundamentais para processos fisiológicos, como o controle do pH, transporte iônico, secreção de eletrólitos, entre outros (Ekinci et al., 2011).

A enzima H^+ -ATPase consiste em uma bomba de prótons que, a partir da hidrólise do ATP é capaz de transportar íons H^+ do meio intracelular para o meio extracelular (Forgac, 2007; Li et al., 2015). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a atividade da bomba de prótons está indiretamente relacionada a um trocador de Na^+/H^+

(NH_4^+) responsável pela absorção de íons Na^+ em troca da excreção de H^+ nos peixes de água doce (Lin et al., 1994).

Os mecanismos de absorção iônica nos peixes não estão totalmente esclarecidos. Um dos modelos mais aceitos (Figura 9) para explicar as trocas iônicas nos peixes de água doce, proposta por Evans (2008), e sugere que teleósteos de água doce possuem dois tipos de células cloreto (CC) que possuem mecanismos de transportes diferentes. Em um dos tipos de CC (CRM α - Figura 9 A) a atividade da NKA e do co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) presentes na membrana basolateral possibilitam a saída de Na^+ e HCO_3^- para o meio intersticial, o que favorece a formação de um gradiente eletroquímico que impulsiona o transporte de Na^+ da água para o interior da CC, via trocador Na^+/H^+ (NH_4^+) (NHE); concomitantemente, a H-ATPase (VHA) excreta H^+ para o meio externo possibilitando a entrada de Na^+ através dos canais de Na^+ (EnaC) (Evans, 2008).

No outro tipo de CC (CRM β - Figura 9 B), canais de Cl^- e as enzimas H-ATPase (VHA) e NKA presentes na membrana basolateral promovem a saída dos íons Na^+ , H^+ e Cl^- para o meio intersticial, estabelecendo assim um gradiente eletrolítico que favorece a absorção de Cl^- e Na^+ do meio externo para o meio intracelular a partir do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE) e do co-transportador Na^+Cl^- (NCC). A enzima AC, localizada no citoplasma, é responsável pelo fornecimento de H^+ e HCO_3^- para ambos os tipos de CC (Evans, 2008; Inokuchi et al., 2009; Paulino et al., 2012b).

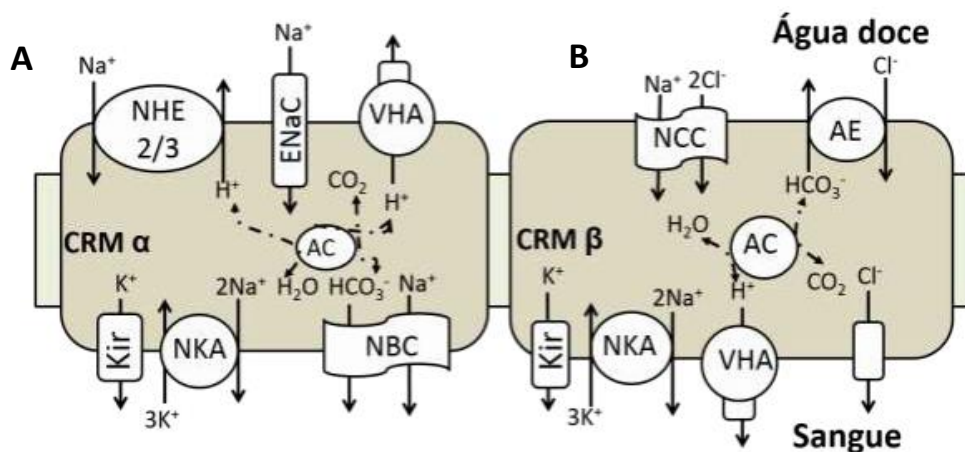


Figura 9. Representação esquemática do transporte de íons proposta por Evans (2008) nos diferentes tipos de células cloreto (CRM α e CRM β) presentes no epitélio branquial de peixes de água doce. Extraído de Evans (2008); modificado por Cavicchioli-Azevedo (2013). NHE - trocador Na^+/H^+ ; VHA (H-ATPase); EnaC - canal de íons Na^+ ; AC - anidrase carbônica; NBC - co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$; NKA - Na^+/K^+ -ATPase; Kir - Canal de íons K^+ ; NCC - co-transportador Na^+Cl^- ; AE - trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$;

1.8.2. Biomarcadores bioquímicos associados ao sistema de defesa antioxidante

Muitos poluentes causam um desequilíbrio oxidativo nos organismos aquáticos e a determinação da atividade das enzimas e reações de biotransformação ou produção dos componentes do sistema de defesas antioxidantes têm sido sugeridos como biomarcadores para contaminantes (Rola et al., 2012; Qu et al., 2014).

Organismos aeróbicos produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) como resultado do metabolismo oxidativo. EROs como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}), radical hidroperoxil (HO_2^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são provenientes da redução parcial do O_2 , sendo altamente reativas por possuírem um ou mais elétrons não pareados em seus orbitais (Oga, 2003; Di Giulio & Meyer, 2008).

Para minimizar os efeitos negativos causados pelas EROs os peixes, assim como outros vertebrados, possuem um sistema de defesa antioxidante formado por componentes enzimáticos e não-enzimáticos. As enzimas-chaves responsáveis pelo sistema de defesa antioxidante são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , o qual é eliminado pela CAT na forma de H_2O e O_2 . A GPx também participa da decomposição do peróxido de hidrogênio (Qu et al., 2014). A glutatona *-s*-transferase (GST) está associada a biotransformação de xenobióticos, atuando a partir da conjugação desses substratos hidrofóbicos e eletrofílicos com GSH, formando conjugados solúveis em água, reduzindo sua toxicidade e facilitando sua excreção (van der Oost., 2003). Os antioxidantes não enzimáticos referem-se, principalmente, aos antioxidantes de baixo peso molecular incluindo a glutatona (GSH), tocoferol, ácido ascórbico e carotenóides (Wilhelm-Filho, 1996; Schlenk et al., 1999). Quando há um desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante, ou seja, quando a produção dos antioxidantes diminui e/ou a produção de EROs aumenta pode ocorrer o estresse oxidativo (Figura 10) (Di Giulio & Meyer, 2008).

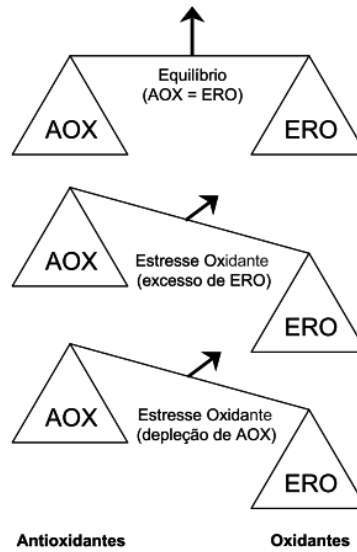
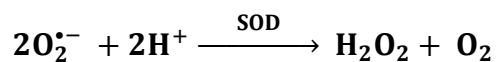


Figura 10. Esquema ilustrativo do desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes (AOX) e as espécies reativas de oxigênio (ERO), levando ao quadro de estresse oxidativo. Extraído de Scandalios (2005), adaptado por Monteiro (2006).

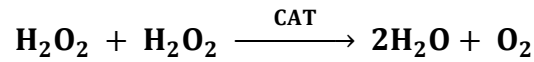
Superóxido dismutase

As superóxido dismutase (SOD) constituem um grupo de metaloenzimas que catalisa a conversão do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). As SOD (equação 1), em conjunto com a CAT e a GPx, possuem um papel essencial no sistema de defesa antioxidante (Halliwell & Gutteridge, 1989; van der Oost et al., 2003). Existem diferentes isoformas de SOD, dependendo do metal que atua como co-fator em seu sítio catalítico (Cu,Zn-SOD; Mn-SOD). A desintoxicação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela enzima superóxido dismutase (SOD) está representada a seguir:



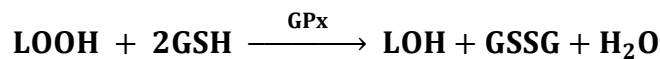
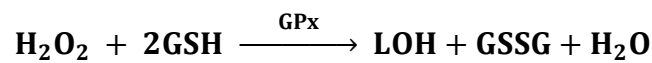
Catalase

A catalase (CAT) é uma heme proteína que facilita a redução H_2O_2 em H_2O e O_2 (Stegeman et al., 1992; Wilhelm-Filho, 1996; van der Oost et al., 2003). A CAT (equação 2), por possuir um alto K_m por H_2O_2 possui uma atividade catalítica muito rápida, sendo acionada quando os níveis de peróxido de hidrogênio estão elevados por possuir uma baixa afinidade pelo substrato (van der Oost et al., 2003; Scandalios, 2005). A CAT está localizada principalmente nos peróxissomos (Handy et al., 2008b). A desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima catalase (CAT) está representada a seguir:



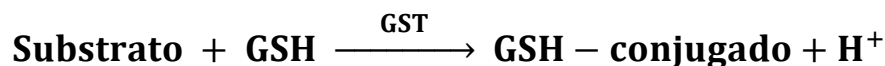
Glutationa peroxidase (GPx)

As glutationas peroxidase (GPx) são enzimas capazes de reduzir uma variedade de peróxidos em alcoóis não-tóxicos (no caso dos hidroperóxidos de ácidos graxos – equação 4) e água (a partir de H_2O_2 – equação 3), a partir da oxidação da glutationa reduzida (GSH) em sua forma oxidada (GSSG) (Nordberg e Arner, 2001; van der Oost et al., 2003). A atividade de reação da GPx (equação 3 e 4) é mais lenta por ser dependente dos níveis de GSH disponíveis (Nakamura et al., 1974). A GPx atua em baixas concentrações de H_2O_2 , por possuir uma afinidade maior pelo substrato, quando comparado a CAT (Handy et al., 2008). A oxidação da GSH a GSSG, pela ação da GPx, utilizando peróxido de hidrogênio H_2O_2 como substrato e a oxidação da GSH a GSSG, pela ação da GPx, utilizando hidroperóxido de lipídio (LOOH) como substrato, resultando água e um álcool sem toxicidade (LOH), estão apresentadas a seguir:



Glutationa-S-transferase

As glutationa-S-transferases (GST) são um grupo de enzimas multifuncionais que catalisam a conjugação da GSH com uma variedade de metabólitos eletrofílicos e hidrofóbicos formando conjugados solúveis em água (equação 5), tornando-o menos tóxicos e facilitando sua excreção, no caso dos xenobióticos (Wilce & Parker, 1994; Storey, 1996; van der Oost et al., 2003; Monteiro et al., 2003), além de promover a conjugação da GSH a produtos celulares que causam danos como, radicais hidroxil, peróxidos de lipídios de membrana, produtos da degradação oxidativa do DNA (Dudler et al., 1991; Barling et al., 1993). A conjugação da GSH com o substrato eletrofílico tóxico (xenobiótico) pela ação glutationa S-transferase (GST) está apresentada a seguir:



Glutationa reduzida

A glutathione (GSH) é um tripeptídeo que possui um grupo sulfidril (-SH) do aminoácido cisteína que confere a esta molécula capacidade redutora (Meister & Anderson, 1983). Por ser essencial na atuação das enzimas antioxidantes GPx e GST, a GSH é o principal antioxidante não-enzimático, sendo indispensável na proteção da célula. Os níveis de GSH são renovados pela conversão da GSSG (forma oxidada) em GSH (forma reduzida) através da enzima glutathione redutase (GR) (Maher, 2005; Azevedo, 2011; Martins, 2012).

Glutamato-cisteína ligase

A glutamato-cisteína ligase (GCL) é um heterodímero constituído por duas subunidades catalíticas e a enzima limitante para a síntese de GSH. A síntese da GSH acontece no interior da célula pela ação de duas enzimas: inicialmente ocorre a formação de uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutamato e cisteína através da ação da enzima γ -glutamylcisteína sintetase, também conhecida como glutamato-cisteína ligase (GCL). O dipeptídeo formado é, em sequência, conjugado à glicina através da catálise realizada pela enzima glutathione sintetase (Huber & Almeida, 2008).

A Figura 11 representa o sistema de defesas antioxidantes de forma integrada, destacando a ação dos agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

Peroxidação Lipídica

Muitos poluentes ambientais são capazes de induzir estresse oxidativo nos peixes a partir da formação de ERO (Pandey et al., 2003), que, se não forem neutralizados pelo sistema antioxidante celular, podem reagir com macromoléculas biológicas suscetíveis e produzir peroxidação lipídica (LPO), danos ao DNA e oxidação de proteínas, resultando em estresse oxidativo (Livingstone et al., 1993, Nordberg & Arner, 2001; Shi et al., 2005).

Uma das principais causas de lesão celular é a formação de peroxidação de lipídeos (LPO), que consiste na oxidação dos lipídeos da bicamada lipídica das membranas celulares por ERO. A LPO é uma reação em cadeia resultante da ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) que se propaga levando a formação de lipoperóxidos como alcóxil e peróxil, podendo causar transtornos de permeabilidade, alteração do fluxo iônico, perda de seletividade para entrada e saída de moléculas, íons e substâncias tóxicas e morte celular (Benzie, 1996; Halliwell & Gutteridge, 2000).

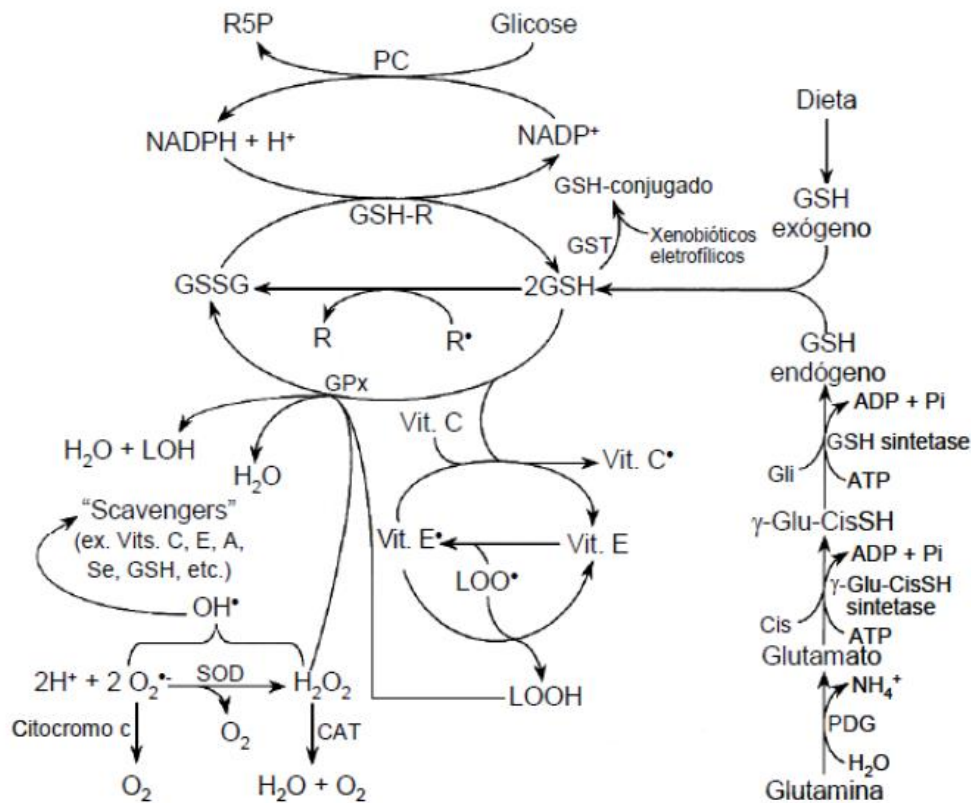


Figura 11. Esquema representativo do sistema antioxidante das células de mamíferos, enzimático e não enzimático. Extraído de Fang et al., 2002.

1.9. Biomarcadores morfológicos

Na presença de poluentes, as brânquias podem exibir modificações causadas pelo efeito direto do agente tóxico sobre o tecido branquial ou por respostas de defesa que evitam a entrada de poluentes ou respostas compensatórias que tendem a compensar danos causados por outros fatores (Mallat, 1985).

A relevância das lesões nos tecidos branquiais depende do tipo da patologia, isto é, como afeta a função do órgão e a habilidade do peixe para sobreviver (Bernet et al., 1999). A Figura 12 mostra as histopatologias mais comumente encontradas nas brânquias de teleósteos.

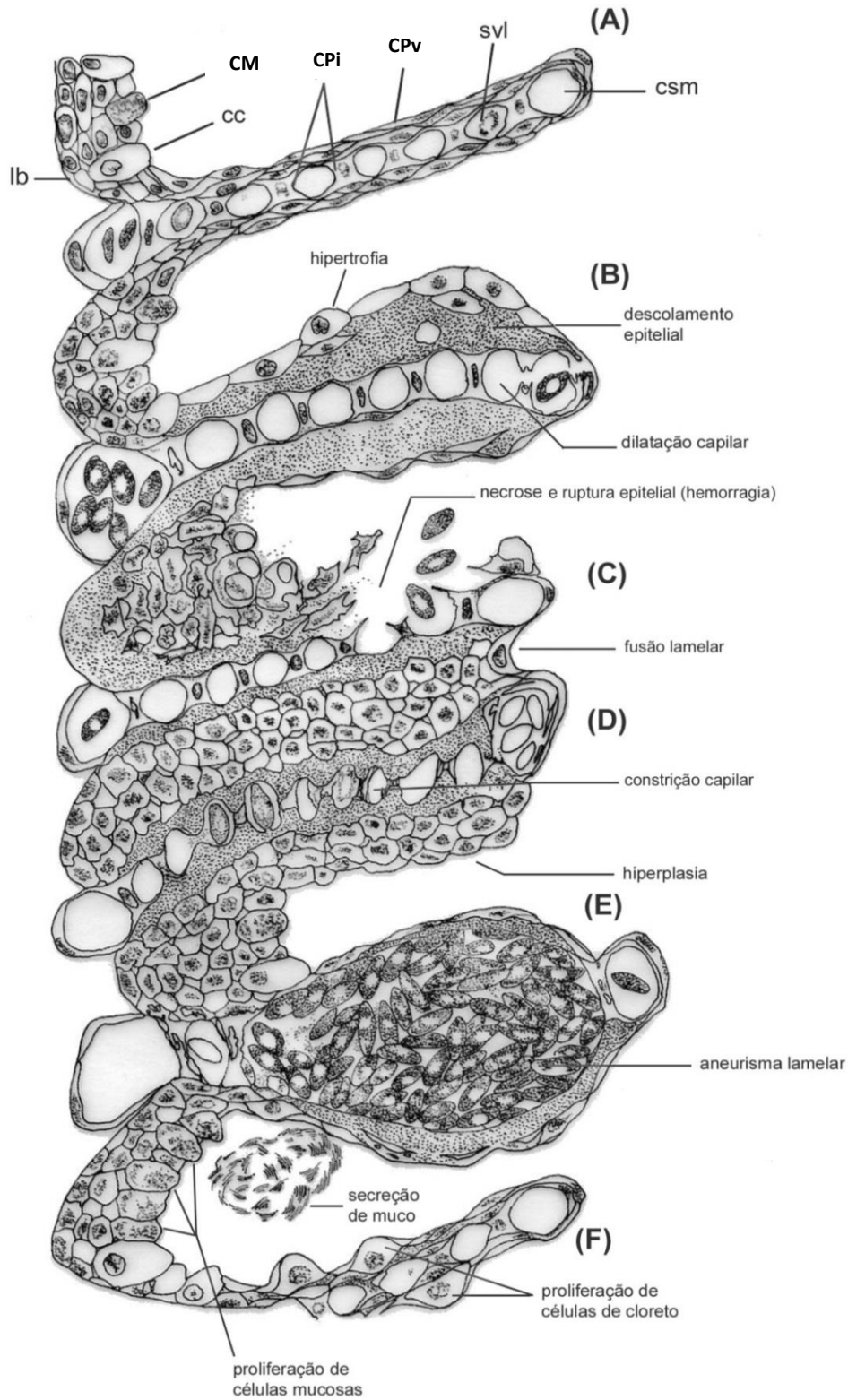


Figura 12. Esquema das lesões branquiais mais comumente encontradas. (A) lamela normal, (B-F) lamelas alteradas. Abreviações: lb = lâmina basal; CC = célula-cloreto; CM = célula mucosa; CPi = célula pilar; CPv = célula pavimentosa; svl = seio venoso lamelar; csm = canal sanguíneo marginal (Machado, 1999, modificada de Mallat, 1985).

1.10. Espécie *Prochilodus lineatus*

O peixe neotropical de água doce curimbatá (Figura 13a), *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) (*Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881), apresenta uma ampla distribuição nas regiões sul e sudeste e parte da região centro-oeste do Brasil (Figura 13b), constitui uma das espécies mais importantes da ictiofauna das bacias dos Rios Paraná, Paraguai e Paraíba (Bonetto et al., 1970; Corrêa e Castro, 1990; Cazenave, et al 2009). Além do seu valor ecológico, *P. lineatus* também tem importância econômica para a pesca de subsistência e comercial (Jensch-Junior et al., 2005; Cazenave, et al 2009) e para programas de aquicultura no Brasil, por apresentar sucesso reprodutivo em pisciculturas (Oliveira et al., 1997). *Prochilodus lineatus* tem alta tolerância a águas com pH entre 4,5 a 8,0 (Carvalho & Fernandes, 2006).

Por ser uma espécie ativa, possuir hábito detritívoro entrando em contato com xenobióticos presentes em suspensão na água ou depositadas no sedimento (da Silva et al., 2004) e ser sensível a contaminantes no meio aquático, *P. lineatus* tem sido considerada uma espécie adequada para testes de toxicidade e monitoramento ambiental (Fenerich-Verani et al., 1984; Gomes & Agostinho, 1997; Barrionuevo & Fernandes, 1995; Martinez & Souza, 2002; Cerqueira & Fernandes, 2002; Camargo & Martinez, 2006; Simonato et al., 2008; Paulino et. al., 2012 a, b; Silva & Martinez, 2014; Schenone et. al., 2014).

Segundo a classificação de Valenciennes (1836), a espécie ocupa a seguinte classificação sistemática:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Divisão: Teleostei

Superordem: Acanthopterygii

Ordem: Characiformes

Subordem: Characoidei

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus lineatus*

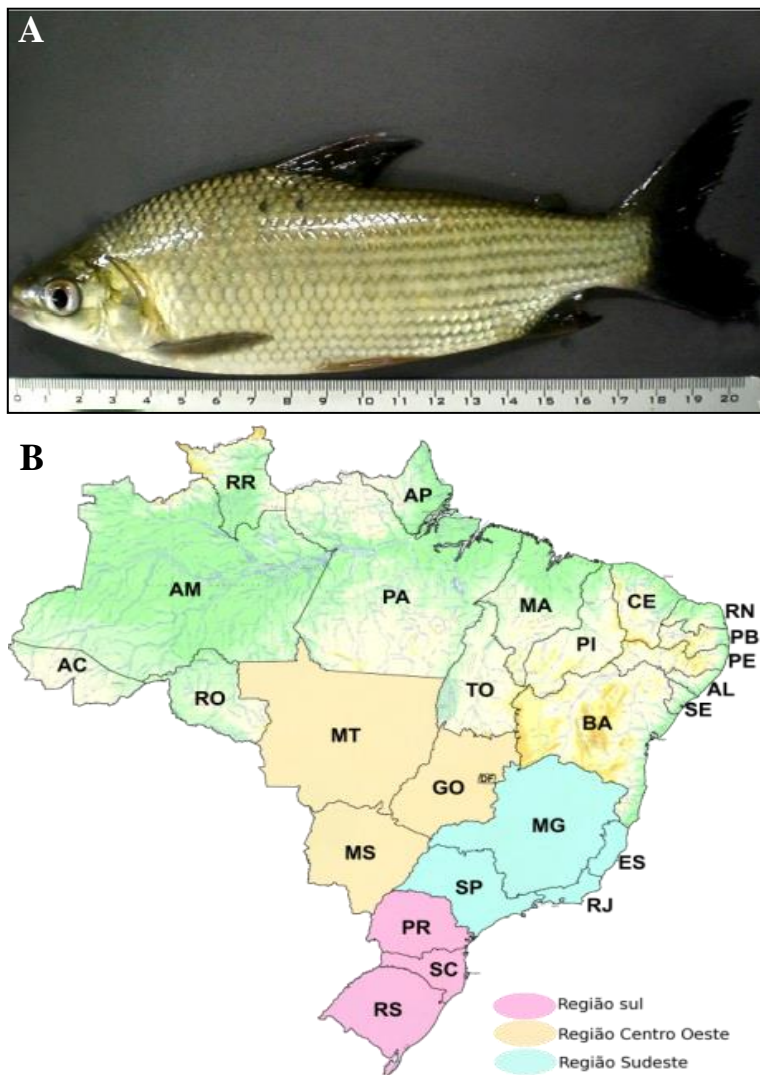


Figura 13. A. Espécime de *Prochilodus lineatus*. Foto: Marcelo G. Paulino. B. Mapa do Brasil; em evidência as regiões sul, sudeste e centro oeste em que a espécie *P. lineatus* é encontrada; Modificado de IBGE, 2015 (<http://mapas.ibge.gov.br/fisicos/brasil>).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Considerando as variações de pH que podem ocorrer no ambiente, naturalmente ou em consequência de acidentes ecológicos e que a crescente utilização de NP-TiO₂ nos mais diferentes segmentos industriais indica que possivelmente haverá aumento das concentrações dessas NPs nos ambientes aquáticos, o presente estudo teve por objetivo determinar a toxicidade aguda da NP-TiO₂ em diferentes pH (ácido, neutro e básico) em juvenis de *Prochilodus lineatus* (curimatá) e avaliar os efeitos da exposição subletal a NP-TiO₂ nesses pH, utilizando biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e morfológicos.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a toxicidade aguda em 48h (concentração letal 50 % - CL_{50,48h}) das NP-TiO₂ em meio aquático com pH 5,0, 7,0 e 8,0.
- Avaliar a ocorrência de alterações hematológicas em *P. lineatus* expostos à concentração subletal de NP-TiO₂ em meio aquático com pH 5,0, 7,0 e 8,0 durante 48h;
- Avaliar os efeitos das NP-TiO₂ sobre a osmorregulação e equilíbrio iônico de *P. lineatus* expostos à NP-TiO₂ em meio aquático com pH 5,0, 7,0 e 8,0 durante 48h;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as respostas do sistema de defesa antioxidante nas brânquias de *P. lineatus* expostos à NP-TiO₂ em meio aquático com pH 5,0, 7,0 e 8,0 durante 48h;
- Avaliar a ocorrência de alterações histopatológicas nas brânquias de *P. lineatus* expostos à NP-TiO₂ em meio aquático com pH 5,0, 7,0 e 8,0 durante 48h;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análises físico-químicas das NP-TiO₂

3.1.1. Caracterização e dinâmica das NP-TiO₂ em meio aquático

As NP-TiO₂ (diâmetro $\leq 21\text{nm}$ e 99,5 % de pureza, sendo 80 % anatase e 20 % rutilo, superfície específica de $50 \pm 15 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) foram adquiridas da EVONIK DEGUSSA BRASIL Ltda. As características físicas das NP-TiO₂ foram aferidas em suspensão aquosa com pH 5,0, 7,0, 8,0. As NP foram dispersas por 30 minutos utilizando um sonicador (frequência de 40 KHz, Q335D, QUIMIS) sem a adição de dispersantes ou estabilizadores. Os pH 5,0 e 8,0 foram obtidos com a adição de H₂SO₄ e NaOH PA na água.

O tamanho das NP foi confirmado utilizando microscópio eletrônico de transmissão (MET) Philips CM-120, FEI Co no Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos/Campus São Carlos (DEMA/UFSCar). Trinta imagens de MET foram analisadas em todos os pH.

O diâmetro hidrodinâmico, distribuição das nanopartículas e agregados em água com pH 5,0, 7,0 e 8,0 e a carga de superfície (potencial Zeta) foram determinadas utilizando espectrofotômetro por espalhamento de luz e potencial Zeta (MICROTAC ZETRATAC SYSTEM) em colaboração com o Ms. Fabrício A. Santos e Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, no Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia, Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo/Campus São Carlos.

3.1.2. Recuperação das NP-TiO₂ após suspensão em meio aquoso

Considerando que testes preliminares mostraram que as NP-TiO₂ tendem a precipitar e acumular no fundo do sistema de testes de toxicidade, foi necessário verificar qual a porcentagem da concentração de NP-TiO₂ colocadas inicialmente fica efetivamente suspensa em meio aquoso, uma vez que, apenas NP-TiO₂ suspensas em meio aquoso poderiam ser absorvidas pelas brânquias dos peixes expostos.

Para isso foram conduzidos experimentos para avaliação da sedimentação de NP-TiO₂ no sistema de testes de toxicidade aguda e NP-TiO₂ em suspensão. Estes experimentos foram conduzidos na ausência de animais e realizados em escala reduzida (1/10) dos sistemas.

Seis experimentos (Teste 1 a 5) foram realizados para avaliar a recuperação das NP (decantada e em suspensão) no meio aquático. Suspensões correspondentes a 1, 5, 10 e 50 mg L⁻¹ NP-TiO₂ foram preparadas em água MILI-Q® e posteriormente, a parte decantada e em suspensão foram separadas e as massas de NP-TiO₂ em suspensão e no precipitado foram mensuradas. Em todos os testes, cada concentração foi testada e analisada em triplicata.

- **Teste 1 (Controle):** As suspensões de 1, 5, 10 e 50 mg L⁻¹ NP-TiO₂ foram preparadas, dispersas por 30 minutos utilizando um sonicador e deixadas 30min em repouso. Após 48h, a água contendo NP em suspensão foi separada do precipitado e imediatamente centrifugada e seca para mensuração da massa de NPs. O precipitado foi seco a 60 °C e efetuado a mensuração da massa de NPs;
- **Teste 2 (suspensão 48 horas – com sonicação):** As suspensões de 1, 5, 10 e 50 mg L⁻¹ NP-TiO₂ foram preparadas e dispersas por 30 minutos utilizando um sonicador e deixadas em repouso. Após 24 h, as suspensões foram sonicadas durante 30 minutos e novamente deixadas em repouso. Depois de 24 h a água contendo NP em suspensão foi separada do precipitado e imediatamente centrifugada e seca para mensuração da massa de NPs. O precipitado foi seco a 60 °C e efetuado a mensuração da massa de NPs;
- **Teste 3 (suspensão 48 horas – pH 7,0):** As suspensões de 1, 5, 10 e 50 mg L⁻¹ NP-TiO₂ foram preparadas e dispersas por 30 minutos utilizando um sonicador. Em sequência, foram mantidas sob leve agitação da água simulando o movimento dos animais, por 48h. Após 48 h, a água contendo NP em suspensão foi separada do precipitado e imediatamente centrifugada e seca para mensuração da massa de NPs. O precipitado foi seco a 60 °C e efetuado a mensuração da massa de NPs;
- **Teste 4 (suspensão 48 horas - pH 4,5-5,0)** As suspensões de 1, 5, 10 e 50 mg L⁻¹ NP-TiO₂ foram preparadas em água com pH 4,5-5,0 e dispersas por 30 minutos utilizando um sonicador. Em sequência, após 24h foram submetidas a um leve movimento da água e, após 24 h a água contendo NP em suspensão foi separada do precipitado e imediatamente centrifugada e seca para mensuração da massa de NPs. O precipitado foi seco a 60 °C e efetuado a mensuração da massa de NPs;
- **Teste 5 (suspensão 48 horas - pH 8,0-8,5)** As suspensões de 1, 5, 10 e 50 mg L⁻¹ NP-TiO₂ foram preparadas em água com pH8,0-8,5 e dispersas por 30 minutos utilizando um sonicador, Em sequência, após 24h foram submetidas a um leve movimento da água e, após 24 h a água contendo NP em suspensão foi separada do precipitado e

imediatamente centrifugada e seca para mensuração da massa de NPs. O precipitado foi seco a 60 °C e efetuado a mensuração da massa de NPs;

A água com as NP em suspensão foram centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi removido e o “pellet” e o sobrenadante foram secos separadamente a 60 °C e as respectivas massas foram pesadas e somadas.

A morfologia dos agregados de NP-TiO₂ após os testes de recuperação (1 a 5) foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura Philips- Inspect S50, FEI Co (DEMa/UFSCar) para avaliar se havia mudanças nas formas das partículas sob as diferentes condições a que foram submetidas.

3.1.3. Determinação da concentração de titânio em água

A determinação da concentração de titânio na água nos diferentes pH foi realizada com colaboração da Dra. Eveline Soares Costa, Dra. Lucimar Lopes Fialho, Dra. Renata Stábile Amais e Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nobrega no laboratório do Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA), Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

3.1.3.1. Digestão das NP- TiO₂ com persulfato de amônio

A quantidade de titânio livre presente nas soluções aquosas foi determinada após digestão das NP-TiO₂ com persulfato de amônio (Khosravi et. al., 2012). Quatro soluções de NP-TiO₂ com concentração de 1; 5; 10 e 50 mg NP-TiO₂ L⁻¹ foram preparadas com água que abastece os tanques de peixes do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da Universidade Federal de São Carlos, SP. As soluções foram sonicadas por 30 min e alíquotas de 30 mL foram coletadas no tempo 0 e 24 h. As alíquotas foram acidificadas à 2 % com ácido nítrico. Posteriormente, 5 mL de cada solução acidificada foram inseridas em cadinhos e 1 g de persulfato de amônio foi acrescentada a solução, a mistura foi aquecida em bico de Bunsen até a sublimação total do persulfato de amônio.

Após o resfriamento do cadinho, 10 mL de solução aquosa acidificada a 2 % (com ácido nítrico) foi despejada para ressuspender o produto depositado no fundo do cadinho e, em seguida, a solução foi transferida para um béquer, onde foi acrescentado mais 40 mL da solução aquosa acidificada. O béquer foi aquecido em placa de aquecimento e a solução permaneceu em ebulição por 10 min. A solução foi transferida

para um balão volumétrico, o volume completado para 50 mL e posteriormente analisado em ICP-MS Agilent Technologies 8800.

Os parâmetros de funcionamento do ICP-MS foram: Potência de RF: 1550 W; Profundidade de amostragem: 8 mm; Fluxo de gás: 1,08 L/min; *Spray* de temperatura da câmara: 2 °C; Taxa de fluxo do gás: 0,3 L/min; Gás: O₂; Massa observada no Q1 e Q2: 46,62; 47,63; 48,64; 50,66. Limite de detecção: 0,19 µg L⁻¹; Limite de quantificação: 0,6327 µg L⁻¹.

3.1.4. Análise da forma das NP-TiO₂ em microscopia eletrônica de varredura (MEV) após suspensão em água

As análises por MEV das NP-TiO₂ foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural DEMa/UFSCar, utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura FEI Magellan 400 L. As amostras foram previamente secas sobre suportes metálicos de alumínio e posteriormente, recobertas com uma fina camada de ouro. Sua morfologia foi examinada a 5 kV com ampliações entre 200.000 vezes.

3.2. Animais

Espécimes juvenis de *P. lineatus* [Massa corpórea (MC) = 36,5 g ± 3,18 g; comprimento total (Ct) = 13,6 ± 1,23 cm] foram obtidos da Estação de Aquicultura da Usina Hidroelétrica de Furnas, São José da Barra, MG, Brasil.

Os peixes foram aclimatados durante 30 dias em tanques internos com capacidade de 1000 L em água corrente desclorada (densidade de espécimes = 0,003 Kg L⁻¹), aeração constante a 25 ± 1 °C, e fotoperíodo natural (~12 h: 12 h) no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC), da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Durante esse período, os animais foram alimentados com ração comercial para peixes (40% de proteína) *ad libitum*. As características físicas e químicas da água foram monitoradas e mantidas sob controle: oxigênio dissolvido (7,0-7,5 mg L⁻¹), condutividade (124-130 µS cm⁻¹), alcalinidade (35-43 mg L⁻¹ CaCO₃) e dureza total (39-50 mg L⁻¹ CaCO₃). Durante o período de aclimação, o pH da água foi mantido neutro (6,8-7,3).

A realização dos experimentos foi aprovada pelo Comitê de Ética Animal (Protocolo nº CEA/UFSCar 038/2013) e Comitê de Ética Ambiental (Protocolo nº CEA/UFSCar: 001/2013).

3.3. Teste de sensibilidade com cloreto de potássio (KCl)

Após aclimação em laboratório foram conduzidos testes de sensibilidade para avaliação da higidez dos animais e assegurar que a mortalidade possa ser atribuída apenas à substância testada posteriormente e não por problemas nos organismos. O teste de sensibilidade foi conduzido em sistema estático sem substituição da água durante o período experimental (48 h) utilizando cloreto de potássio (KCl) como substância de referência (ABNT, 2011), densidade de espécimes = $0,002 \text{ Kg L}^{-1}$. As características da água utilizada nos ensaios foram mantidas de acordo com as recomendações da ABNT (2006) e nas mesmas condições do período de aclimação. Os organismos foram expostos a quatro concentrações (700, 800, 900, 1000 mg L^{-1} de KCl) e um controle (sem acréscimo de KCl), com três repetições (ABNT, 2006) durante 48 horas. Durante o experimento os animais não foram alimentados e a verificação da mortalidade foi realizada diariamente.

As características físicas e químicas da água foram monitoradas e mantidas sob controle: oxigênio dissolvido ($7,0\text{-}7,6 \text{ mg L}^{-1}$), condutividade ($125\text{-}131 \mu\text{S cm}^{-1}$), alcalinidade ($36\text{-}42 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) e dureza total ($38\text{-}50 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$).

3.4. Teste de toxicidade aguda: determinação da CL50; 48h em pH 5,0, 7,0, e 8,0

A determinação da toxicidade aguda (CL50; 48h) foi efetuada de acordo com as recomendações da ABNT (2011), densidade de espécimes = $0,002 \text{ Kg L}^{-1}$. Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados em aquários de vidro, em pH ácido (5,0), pH neutro (7,0) e pH básico (8,0); o pH da água dos aquários foram previamente ajustados com NaOH 1M e Ácido Sulfúrico 1N. Posteriormente, os peixes ($n=1$ peixes/ aquário) foram distribuídos aleatoriamente em seis tratamentos: controle pH 5,0 (C-pH5), controle pH 7,0 (C-pH7) e controle pH 8,0 (C-pH8) nos quais não houve adição de NP-TiO₂, e expostos a NP-TiO₂ em água com pH 5,0 (TiO₂-pH5) pH 7,0 (TiO₂-pH7) e pH 8,0 (TiO₂-pH8), em triplicata. Os espécimes de *P. lineatus* foram submetidos a testes com concentrações crescentes de NP-TiO₂ nos pH 5,0, 7,0 e 8,0 até a concentração de 100 mg L^{-1} .

As características físicas e químicas da água foram monitoradas e mantidas sob controle: oxigênio dissolvido ($7,0\text{-}7,6 \text{ mg L}^{-1}$), condutividade ($125\text{-}131 \mu\text{S cm}^{-1}$), alcalinidade ($36\text{-}42 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) e dureza total ($38\text{-}50 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$).

Após aclimação (24 h) aos pHs 5,0, 7,0 e 8,0 nos aquários-testes foi adicionada as NP-TiO₂, observado o comportamento dos peixes e verificada a mortalidade.

3.5. Efeito da NP-TiO₂ em brânquias

3.5.1. Toxicidade aguda. Delineamento Experimental

Os ensaios foram realizados em aquários de vidro de 180 L e fotoperíodo natural (\approx 12:12 claro/escuro). Os peixes (n = 8 peixes por tratamento) foram distribuídos aleatoriamente em seis tratamentos: controle pH 5,0 (C-pH5), controle pH 7,0 (C-pH7) e controle pH 8,0 (C-pH8) nos quais não houve adição de NP-TiO₂, e expostos a 1mg L⁻¹ NP-TiO₂ em água com pH 5,0 (TiO₂-pH5) pH 7,0 (TiO₂-pH7) e pH 8,0 (TiO₂-pH8) (Tabela I), em duplicata. Primeiramente o pH da água dos aquários foram ajustados e, em seguida, os espécimes foram colocados para aclimação sob as novas condições durante 24 h. Após esse período, foi adicionada NP-TiO₂, observado o comportamento dos peixes e verificada a mortalidade.

Após esse período, foram adicionadas NP-TiO₂ a concentração de 1mg L⁻¹ e os espécimes ficaram expostos as NP durante 48 h. O pH de cada aquário foi verificado aproximadamente a cada 3h para sua manutenção adequada. As características físicas e químicas da água em cada pH foram iguais as informadas no item acima.

Tabela I. Tratamentos experimentais aos quais espécimes de *Prochilodus lineatus* foram expostos durante 48 h, sendo divididos entre grupos controles (livres de NP-TiO₂) e grupos expostos (submetidos a concentrações crescentes de NP-TiO₂) nos pH 5,0, 7,0 e 8,0.

| Tratamentos – teste de toxicidade aguda | | |
|---|--|--|
| pH 5,0 | pH 7,0 | pH 8,0 |
| Grupo controle-CpH5 | Grupo controle-CpH7 | Grupo controle - CpH8 |
| Grupo exposto NP TiO ₂ -pH5 | Grupo exposto NP TiO ₂ -pH7 | Grupo exposto NP TiO ₂ -pH8 |

Ao final dos ensaios, os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1g L⁻¹), e amostra de sangue foi coletada, via punção da veia caudal, com seringas heparinizadas para análise hematológica e o sangue remanescente foi centrifugado e o plasma retirado para análise de osmolalidade e íons e armazenado em alíquotas a -20°C. Posteriormente, cada animal foi morto, via secção medular, e a massa corpórea, comprimento total (Ct) e comprimento padrão (Cp) foram anotados. As brânquias foram removidas e amostras foram coletadas; parte das amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão

fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,3 ou solução de Bouin para análise morfológica e parte foram congeladas e armazenadas a -80°C para análises bioquímicas.

3.5.2. Análises das variáveis hematológicas

As amostras de sangue total foram utilizadas para a determinação do hematócrito (Hct), número total de eritrócitos (Red Blood Cells - RBC), concentração de hemoglobina (Hb), a partir dos quais foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

O Hct (%) foi determinado pela técnica do microhematócrito, como descrito por Goldenfa et al. (1971). As amostras de sangue foram colocadas em um tubo capilar heparinizado (diâmetro de 75 nm), uma das extremidades foi vedada, em seguida submetidos a centrifugação à 12000 rpm durante 3 minutos em uma centrífuga FANEN mod. 207/N (FANEN, Brasil). Após a centrifugação, a porcentagem de células/plasma foi determinada com auxílio de um cartão de leitura de hematócrito.

O RBC ($10^6 \mu\text{L}^{-1}$) foi determinado em câmara de Neubauer, sob microscópio de luz Olympus BX 51 (aumento de 400x) após diluição em 1:200 da amostra de sangue em solução formol-citrato.

A concentração de Hb (g dL^{-1}) foi determinada pelo método da cianometemoglobina através da adição de ferrocianeto de potássio para a conversão de $\text{Hb}^{\cdot-}\text{-CN}^-$ (Collier, 1944). As amostras de sangue foram diluídas em solução de Drabkin (10 μL de amostra de sangue em 2 mL de solução de Drabkin) e agitados manualmente em seguida. As soluções diluídas permaneceram em repouso por 20 minutos para que ocorresse a hemólise dos eritrócitos e liberação da hemoglobina para o meio e, posteriormente, foi colocada em cubeta de acrílico e feita a leitura em espectrofotômetro SPECTRONIC GENESYS 5 em 540 nm.

Os dados de Hct, concentração de Hb e RBC foram utilizados para o cálculo dos índices hematimétricos nas equações abaixo:

Cálculo do VCM:

$$VCM (\mu\text{m}^3) = \frac{Hct (\%) \times 10}{RBC (M. \text{mL}^{-1})}$$

em que M = milhões e foi expressa em fL.

Cálculo do HCM:

$$HCM (pg. cel^{-1}) = \frac{Hb (g. dL^{-1}) \times 10}{RBC (M. mL^{-1})}$$

em que M = milhões e foi expressa em pg cel⁻¹

Cálculo do CHCM, expressa em g dL⁻¹:

$$CHCM (g. dL^{-1}) = \frac{HCM (pg. cel^{-1})}{VCM (\mu m^3)}$$

3.5.3. Análises das variáveis plasmáticas: íons e osmolalidade

A osmolaridade (mOsmol Kg⁻¹) foi determinada utilizando um semi-microsmômetro (μOSMETTE PRECISION SYSTEM, USA) que possui como base o ponto de congelamento da amostra. Os níveis de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) foram determinados usando fotômetro de chama (DIGMED DM-61, Brasil), na proporção 1:100 de plasma e água destilada. A concentração de cloreto (Cl⁻) foi determinada utilizando kit comercial para determinação de cloreto (LABTEST KIT 115, Brasil) em leitora de microplaca (Dynex Technologies Ltd., MRXTC, UK). Os íons plasmáticos foram expressos em mEq L⁻¹.

3.5.4. Análises Bioquímicas

3.5.4.1. Preparação dos homogeneizados

Para a realização das análises bioquímicas das enzimas e antioxidantes não enzimáticos, as amostras de brânquias foram pesadas e homogeneizadas em tampão. A Tabela II descreve o tipo de tampão utilizado e a relação peso de tecido/volume de tampão para cada análise bioquímica realizada. Os homogeneizados foram então centrifugados durante 5 minutos a 11 242 g a 4°C em centrífuga refrigerada (VS-150000 CFNII) e o sobrenadante dos homogeneizados foi armazenado para a realização das análises (Tabela II).

Tabela II. Tampão e relação peso de tecido/volume de tampão utilizado para preparação dos homogeneizados das análises bioquímicas realizadas.

| Análise | Tampão | Peso/volume |
|---|-----------------------------------|-------------|
| SOD, CAT, GPx, GST, LPO | Fosfato de potássio 0,2M (pH 7,8) | 1:3 |
| GSH-GCL | Tris-HCl 0,1M (pH 7,75) | 1:10 |
| EROs | Tris-HCl 0,1M (pH 7,75) | 1:10 |
| Anidrase Carbônica | Fosfato de potássio 0,1M (pH 7,4) | 1:10 |
| Na ⁺ -K ⁺ -ATPase | Tampão SEID 0,5% | 1:10 |
| H ⁺ -ATPase | Tampão SEID 0,5% | 1:10 |

3.5.5. Determinação de proteínas totais

A determinação da concentração de proteína total nos homogeneizados de tecido (mg pt mL⁻¹) foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) adaptada segundo Kruger (1994) para leitora de microplaca MRX-HD (Dynex Technologies, INC) a $\lambda = 595$ nm, utilizando albumina bovina como padrão.

3.5.6. Atividade da Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pela inibição da taxa de redução do *citocromo c* pelo radical superóxido, de acordo com a metodologia de McCord & Fridovich (1969), adaptada para microplaca. A formação do radical superóxido ocorre pelo sistema xantina/xantina oxidase presente no meio de reação. Inicialmente, foi preparado, no escuro, o meio de reação para SOD a partir do tampão de reação + solução de trabalho de xantina (5 μ M) + solução de KCN (200 μ M) + solução de *citocromo c* (100 μ M) + solução de EDTA (1 mM). Após a preparação, o meio de reação foi aquecido a 25°C durante 15 minutos. Antes de iniciar a análise foi necessário verificar se a absorbância de 10 μ L de xantina oxidase correspondia ao valor de referência de 0,03. Caso o valor da leitura estivesse abaixo, seria necessário pipetar uma quantidade maior de xantina oxidase para atingir o valor de referência.

Para a preparação da microplaca, foi pipetado 5 μ L de tampão de reação (branco) ou de amostra, 10 μ L solução de xantina oxidase e, por fim, 285 μ L meio de reação em cada poço. A leitura foi feita em $\lambda = 550$ nm durante 1 minuto com intervalos de 20 segundos. A atividade da enzima foi expressa em U SOD min⁻¹ mg Pt⁻¹.

3.5.7. Atividade da Catalase (CAT)

Para a determinação da atividade da CAT, inicialmente foi preparado o meio de reação a partir da mistura entre uma solução de peróxido de hidrogênio 100 mM e tampão de reação para CAT (Tris-base 1M; EDTA 5 mM), que foi aquecido à 30°C durante 15 minutos, em banho-maria. Para a leitura da absorbância foi pipetado 5 µL tampão de homogeneização (para leitura do branco) ou 5 µL amostra em triplicata na microplaca. Em seguida foi acrescentado 250 µL meio de reação em todos os poços. Para a determinação da atividade da CAT foi observado o decaimento da concentração de H₂O₂ ao longo de um minuto, em $\lambda = 240\text{nm}$, como descrito por Beutler (1975), adaptado para microplaca. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ metabolizado $\text{min}^{-1} \text{mg Pt}^{-1}$.

3.5.8. Atividade da Glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da GPx selênio-dependente foi mensurada de forma indireta pelo consumo de NADPH. A GPx, ao utilizar GSH para degradar o peróxido orgânico t-butil, gera glutathione oxidada (GSSG) que, por sua vez, é reduzida pela enzima glutathione redutase (GR), que utiliza NADPH presente no meio de reação. Inicialmente foi preparada, no dia da análise, as soluções de trabalho de azida sódica (2,6 mM), t-butil (7 mM), NADPH (2 mM), GR (10 U) e GSH (0,1 M). Após preparação das soluções, foi pipetado em todos os poços da microplaca tampão de reação (tris 1M, EDTA 5 mM, pH 7,7), água destilada, solução de GSH, solução de GR, NADPH, azida sódica e, por fim, água destilada (branco) ou amostra, em triplicata. Após agitar a microplaca com auxílio da leitora, houve um período de incubação de 2 minutos e, em seguida, foi adicionado em todos os poços o T-butil (7 mM). A leitura foi feita a $\lambda = 340\text{nm}$ durante 1 minuto, como descrito por Hopkins & Tudhope (1973), adaptado para microplaca. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{M NADPH min}^{-1} \text{mg Pt}^{-1}$.

3.5.9. Atividade da Glutathione-S-transferase (GST)

A conjugação de GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) catalisada pela GST produz um composto que pode ser detectado a 340 nm. A velocidade de reação da GST é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado tioeter.

No dia da análise foram preparadas as soluções de CDNB (0,05 M diluído em etanol 100%) e a solução de GSH (25 mM diluída em tampão de reação). O tampão de

reação (fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0) foi aquecido a 25°C durante 15 minutos e utilizado, em sequência, para preparação da solução tampão de reação + CDNB. Para a leitura do branco foi pipetado 15 µL tampão de homogeneização ou 15 µL homogeneizado para leitura de cada amostra. Posteriormente foram pipetados 235 µL solução tampão de reação + CDNB em todos os poços e por fim, acrescentado a solução de GSH. A atividade de GST foi determinada a $\lambda = 340\text{nm}$ durante 4 minutos com leitura a cada 30 segundos, de acordo com a metodologia proposta por Habig et al. (1974), adaptada para microplaca. A atividade da GST foi expressa em $\text{nM CDNB min}^{-1} \text{mg Pt}^{-1}$.

3.5.10. Antioxidantes não enzimáticos

Os níveis de glutatona reduzida (GSH) ($\mu\text{g GSH mg proteína}^{-1}$) e glutamato cisteína ligase (GCL) foram mensurados nas amostras de brânquias de acordo com White et al. (2003), a partir da incubação com o reagente NDA (2,3-naftalenedicarboxialdeído) em uma microplaca de leitura para fluorímetro branca durante 30 minutos para a formação dos complexos fluorescentes NDA-GCL e NDA-GSH. A leitura foi realizada a $\lambda = 472 \text{ nm}$ de excitação e 528 nm de emissão. A atividade da GCL foi expressa em $\text{nM de GCL min}^{-1} \text{mg Pt}^{-1}$ e a atividade da GSH foi expressa em $\text{nM de GSH min}^{-1} \text{mg Pt}^{-1}$.

3.5.11. Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para detecção das espécies reativas de oxigênio (EROs), é utilizado o 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (H_2DCFDA) que na presença de EROs gera o fluorocromo 2,7-diclorofluoresceína fluorescente. Após a coleta, com o tecido branquial ainda fresco, este foi homogeneizado em uma diluição de 10x em tampão de homogeneização (Tris-HCl 100 mM, EDTA 2 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mM; pH 7,75). Em seguida, foi realizada a leitura de proteína das amostras com auxílio do kit de proteína Doles. A partir dos valores de proteína encontrados foi feita uma fixação dos valores de proteínas para 3 mg mL^{-1} .

Em todos os poços da microplaca foi pipetado 127,5 µL de tampão de reação, 10 µL do extrato do tecido com a proteína fixada a 3 mg mL^{-1} . A placa de leitura foi dividida ao meio, onde as amostras foram pipetadas em triplicata do lado A (onde foi pipetado água destilada sem peróxido de hidrogênio) e em triplicata também do lado B

(onde foi adicionado a solução com peróxido de hidrogênio) da placa. Ao final, foi pipetado a solução de H₂DCFDA.

3.5.12. Peroxidação lipídica (LPO)

A LPO foi determinada pela oxidação de Fe⁺² (ferro reduzido) a Fe⁺³ (ferro oxidado), na presença do reagente Ferrous Oxidation- Xylenol Orange- FOX (laranja de xilenol), resultando em Fe⁺³-xilenol. Inicialmente o homogeneizado das amostras foi tratado com ácido tricloroacético (TCA) 12%. Em seguida, as amostras com TCA foram centrifugadas a 5618 g durante 10 minutos à 4°C.

Para a preparação da microplaca para leitura foi pipetado 30 µL de metanol 90% (branco) ou 30 µL as amostra em triplicata. Em seguida, pipetou-se 270 µL mistura reativa (laranja de xilenol; butil hidroxitolueno; ácido sulfúrico, sulfato ferroso amoniacal diluídos em 100 mL de metanol 90%). A microplaca foi encubada durante 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. A leitura das amostras foi feita em 560 nm, de acordo com Jiang et al. (1991), adaptado para microplaca. Os níveis de LPO foram expressos em µM de hidroperóxidos mg Pt⁻¹.

3.5.13. Atividade das enzimas Na⁺-K⁺-ATPase (NKA) e H⁺-ATPase

A atividade das enzimas NKA e H⁺-ATPase foram determinadas simultaneamente seguindo o método de Gibbs e Somero (1989) adaptado para leitora de microplaca (Dynex Technologies Ltd., MRXTC, UK). A atividade enzimática foi avaliada na presença de ouabaína (inibidor da NKA), na presença de NEM (inibidor da H⁺-ATPase) e na ausência dos inibidores enzimáticos. Inicialmente foram preparadas as soluções de mistura [Imidazol (30 mM), NaCl (45 mM), KCl (15 mM), MgCl₂.6H₂O (3 mM), KCN (0,4 mM)] e de reação [ATP (1 mM), NADH (0,2 mM), de fosfoquinase (3 U mL⁻¹), lactato desidrogenase (2 U mL⁻¹), frutose-1,6-difosfato (0,1 mM), fosfoenolpiruvato (2 mM)]. Em sequência foram pesados os inibidores Ouabaína (2 mM) e NEM (2 mM) e dissolvidos em solução de reação. Em cada microplaca foram feitas 8 amostras, uma em cada linha da microplaca que contém 12 poços. Inicialmente foram pipetados 5 µL de amostra em cada um dos 12 poços. Em seguida, as amostras foram divididas em quadruplicata, em que 4 réplicas foi pipetada solução de reação, 4 réplicas para solução de NEM e 4 réplicas para solução de ouabaína. A leitura foi realizada a 340 nm durante 15 minutos em intervalos de 30 segundos. A atividade da

NKA foi expressa em $\mu\text{mol Pi mg Pt}^{-1} \text{ h}^{-1}$, enquanto que a atividade da H^+ -ATPase foi expressa em $\mu\text{mol H mg Pt}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

3.5.14. Atividade da anidrase carbônica (AC)

A atividade da AC nas amostras de brônquias foram determinadas pelo método descrito por Vitale et al. (1999), que se baseia na catálise de uma solução de CO_2 pela enzima AC. No dia anterior a análise foi preparada a solução de reação [Manitol (225 mM), Sacarose (75 mM), Tris base (10 mM) e fosfato de sódio monobásico (10 mM)] e, em sequência, o pH foi ajustado para 7,4 e estocada em geladeira. No dia do ensaio, a solução de reação e a água deionizada foram colocadas no gelo (para manter a temperatura até $2,5^\circ\text{C}$). Em seguida, foi borbulhado CO_2 supra puro na água deionizada por 15 minutos (tempo necessário para saturação da água com CO_2). Para dar início às análises, em um béquer de 50 mL foi colocado gelo até a metade e, sobre o gelo foi colocado um béquer de 10 mL contendo uma mini-barras magnética em seu interior. Todo o aparato foi colocado sobre o agitador magnético. As leituras foram realizadas com auxílio do pHmetro (inoLAB pH, Level1 da WTW®).

Para a leitura do branco foram colocados dentro do béquer pequeno 7,5 mL de solução de reação e no momento em que o valor do pH estabilizou foi anotado a leitura para o tempo zero e, em seguida, 1 mL de água saturada com CO_2 foi adicionado. Para a leitura das amostras foram pipetados 7,5 mL de solução de reação no béquer pequeno e foram adicionados 50 μL da amostra. A partir da estabilização do pHmetro, foi anotado o valor de pH referente ao tempo zero e em seguida adicionado 1 mL da água saturada. A redução do pH foi monitorada por 20 segundos, com intervalos de 4s, para cada amostra. Uma reta de regressão linear do pH em relação ao tempo foi determinada para cada amostra, para que fosse determinada a taxa da reação catalizada (TC) pela enzima presente no homogeneizado tecidual. A taxa de reação não catalizada (TNC) foi medida através da leitura do decaimento do pH em água destilada saturada com CO_2 adicionada à solução de reação. O cálculo da atividade da AC foi feito através da fórmula $\text{AC} = [\text{TC}/(\text{TNC} - 1)]/\text{mg}$ de proteína total. A atividade da AC foi expressa em U mgPt^{-1} .

3.5.15. Análise histopatológica das brônquias

As amostras de brônquias fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) foram desidratadas em série crescente de etanol até etanol 95 %, embebidas e incluídas em historesina (LEICA, Alemanha). Após a inclusão das amostras, secções

(3 µm de espessura) foram confeccionadas em micrótomo (MICRON HM 360, MICROM International GmbH) com navalha de vidro. As secções foram coradas com azul de Toluidina e as imagens dos cortes histológicos foram obtidas em microscópio óptico de luz (Olympus BX 51, Denmark) com câmara de video acoplada a um computador.

As alterações histopatológicas no órgão de cada peixe (Tabela III) foram avaliadas de forma semi-quantitativa utilizando o Índice de Alterações Histológicas (IAH), como proposto por Cerqueira e Fernandes (2002), que avalia a severidade de cada alteração histológica (lesão). As lesões foram classificadas em estágios progressivos, de acordo com Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994), quanto ao comprometimento da função tecidual e esses dados foram utilizados para calcular o IAH através da seguinte equação:

$$IAH = 10^0 \sum_{i=1}^a a_i + 10^1 \sum_{i=1}^b b_i + 10^2 \sum_{i=1}^c c_i$$

em que a = alterações de estágio I, b = alterações de estágio II e c = alterações de estágio III. A somatória das lesões classificadas como pertencentes ao estágio I, II e III é multiplicada por 10^0 , 10^1 e 10^2 , respectivamente.

A partir dos IAH obtidos, a severidade dos danos do tecido branquial é classificada como: 0 e 10 indicam estrutura normal do órgão; de 11 a 20 indicam danos leves a moderados no órgão; entre 21 e 50 indicam danos moderados a severos e os valores acima de 100 danos irreparáveis no tecido.

3.5.16. Determinação da densidade e área fracional das células-cloreto (CC) em brânquias

As amostras de brânquias fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato pH 7,4, foram desidratadas em etanol e posteriormente em 1,1,1,3,3,3-hexadimetildisilazano (HMDS) e secas a temperatura ambiente. Após secagem as amostras foram coladas com cola de prata (Evonik Degussa) sobre suportes de alumínio próprios para o uso em microscopia eletrônica de varredura. Posteriormente, as amostras foram cobertas com ouro 99 % (Evonik Degussa) em um Sputtering FCD 004

Tabela III. Classificação das histopatologias branquiais mais comuns em brânquias. Adaptado de Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994).

| | Alteração | Estágio |
|---------------------------------|---|----------------|
| Epitélio branquial | Hipertrofia do Epitélio da lamela | I |
| | Hiperplasia do Epitélio do filamento | I |
| | Hiperplasia do Epitélio da lamela | I |
| | Decréscimo do espaço interlamelar | I |
| | Descolamento do epitélio da lamela | I |
| | Descolamento do epitélio do filamento | I |
| | Fusão incompleta das lamelas | I |
| | Fusão completa de algumas lamelas | I |
| | Fusão completa de todas as lamelas | II |
| | Ruptura e descamação do epitélio do filamento | II |
| | Ruptura do epitélio da lamela | II |
| Células mucosa e cloreto | Hipertrofia e Hiperplasia de cél. Mucosas | I |
| | Células mucosas vazias ou ausentes | I |
| | Hipertrofia e Hiperplasia de cél. Cloreto | I |
| Vasos sanguíneos | Dilatação dos vasos sanguíneos | I |
| | Aneurisma apical | I |
| | Hemorragia com ruptura do epitélio | II |
| | Aneurismas | II |
| Estágio terminal | Fibrose | III |
| | Necrose focal | III |
| | Necrose total | III |

BAUSER a vácuo. Imagens digitais contendo CC foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (PHILIPS FEI Quanta 250) em aumento de 4000 x e posteriormente analisadas com auxílio do software Image Pró-plus 6.0 seguindo metodologia descrita por Bindon et al. (1994) e Moron et al. (2003). A área fracional de CC (AFCC) e a densidade de CC e a foram calculadas utilizando as fórmulas seguintes:

$$AFCC = \sum \frac{\text{área de todas as CC}}{\text{área da imagem}}$$

$$\text{Densidade de CC} = \frac{AFCC}{\text{Média das áreas das CC}}$$

3.6. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro-padrão da média. Para verificar se os dados apresentaram uma distribuição normal foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram submetidos à análise de variância one-way (ANOVA) ou seu correspondente não paramétrico. Foram comparados, a partir da aplicação do pós-teste de Dunnett, os grupos controle pH 5,0 (C-pH5) e controle pH 8,0 (C-pH8) com o grupo referência controle pH 7,0 (C-pH7) com o objetivo de identificar possíveis alterações decorrentes da exposição a diferentes pH. Para avaliar a ação das NP-TiO₂ sobre o organismo de *P. lineatus* nos diferentes pH, os grupos expostos a 1 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ (TiO₂-pH5; TiO₂-pH7 e TiO₂-pH8) foram submetidos ao teste-T de duas caudas com seus respectivos grupos controle (C-pH5; C-pH7 e C-pH8) para cada pH. O nível de significância aceito nos testes foi de 5 % ($p < 0,05$) e as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad InStat versão 3.0.

4. RESULTADOS

4.1. Análises físico-químicas das NP-TiO₂

4.1.1. Caracterização e dinâmica das NP-TiO₂ em suspensão

O tamanho das NP-TiO₂ analisado a partir das eletromicrografias de transmissão (Figura 14) em todos os pH foi $23,69 \text{ nm} \pm 0,37 \text{ nm}$, confirmando o tamanho das NP-TiO₂ indicado pelo fabricante (21 nm).

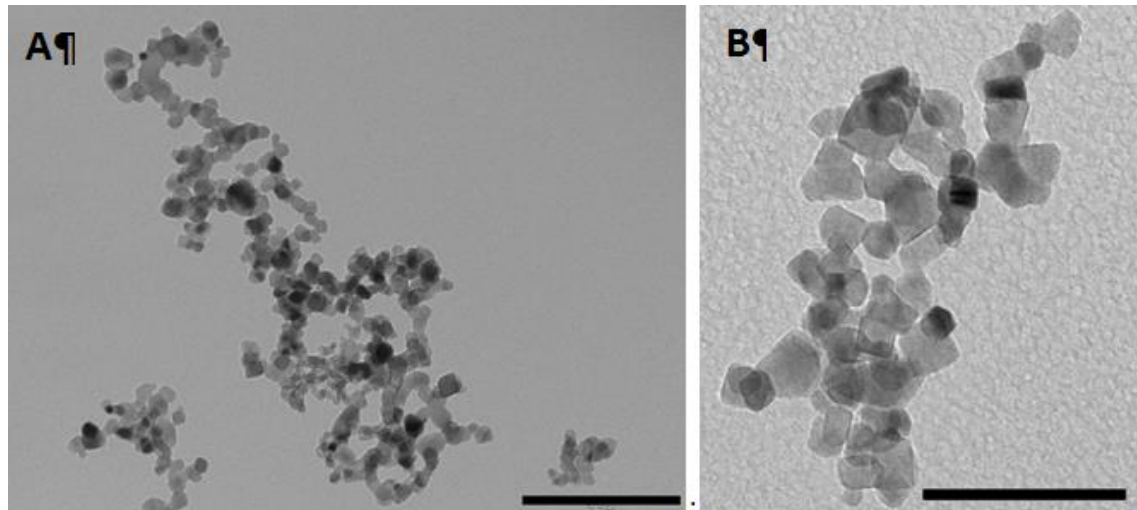


Figura 14. Eletromicrografia de NP-TiO₂ em suspensão em água Milli-Q. A. aglomerados de NP-TiO₂. B. Detalhe do tamanho individual das NP-TiO₂. Barra de escala = 200 nm (A) e 100 nm (B).

O valor médio do diâmetro hidrodinâmico (Dh) em nm da NP-TiO₂, o diâmetro hidrodinâmico mínimo (Dhmin) e máximo (Dhmax) e o potencial zeta (mV) em pH 5,0, 7,0 e 8,0 estão apresentados na Tabela IV. A Figura 15 mostra a distribuição e o tamanho dos aglomerados de NP-TiO₂ em suspensão aquosa em pH 5,0, 7,0 e 8,0.

Tabela IV. Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das NP-TiO₂ em suspensão aquosa ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) em pH 5,0; 7,0; e 8,0.

| Parâmetros | pH 5,0 | pH 7,0 | pH 8,0 |
|--|------------------|------------------|------------------|
| Diâmetro hidrodinâmico (Dh) - Média \pm EPM (nm) | $435,9 \pm 69,1$ | $254,7 \pm 42,6$ | $295,2 \pm 45,4$ |
| Diâmetro mínimo Dhmin (nm) | 141,8 | 68,1 | 105,7 |
| Diâmetro máximo Dhmax (nm) | 955,4 | 615,1 | 615,1 |
| Potencial Zeta médio - Média \pm EPM (mV) | $-9,82 \pm 0,6$ | $-16,50 \pm 0,4$ | $-16,50 \pm 0,6$ |
| Valor mínimo de Potencial Zeta (mV) | -8,74 | -14,6 | -15,3 |
| Valor máximo de Potencial Zeta (mV) | -10,9 | -16,0 | -17,5 |

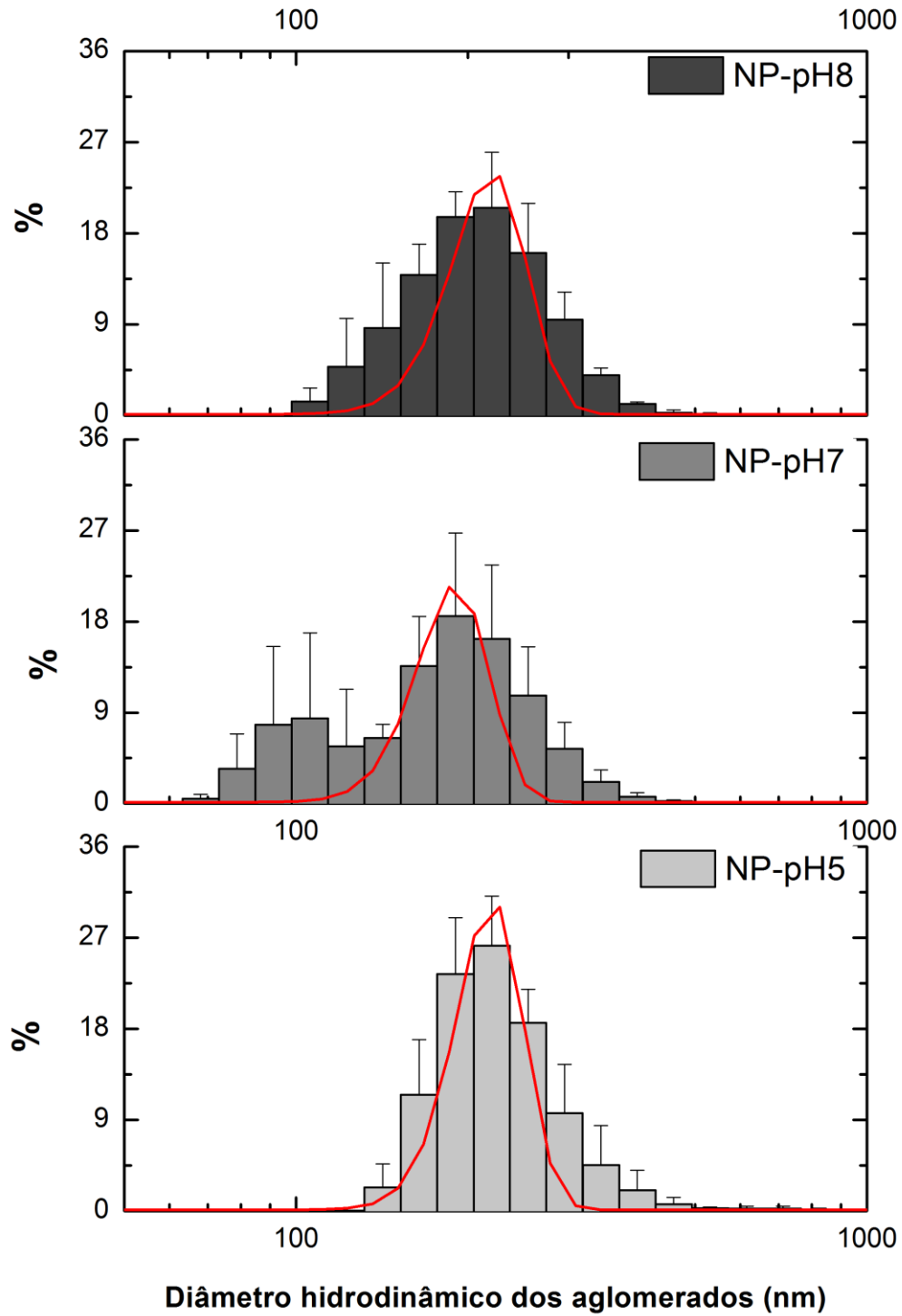


Figura 15. Porcentagem (%) de distribuição dos aglomerados (nm) de NP-TiO₂ em suspensão aquosa em pH 5,0; 7,0 e 8,0. Linha vermelha indica distribuição de Gauss.

4.1.2. Recuperação das NP-TiO₂ após suspensão em meio aquoso

A porcentagem de recuperação de NP-TiO₂ no sobrenadante e no precipitado das amostras de água dos testes de 1 a 5 estão descritos na Tabela V. Independentemente do procedimento utilizado nos testes, 87 a 99 ± 3,3 % da massa das NP-TiO₂ foram recuperadas, dessa massa total 75 ± 4 % precipita e 22 ± 1 % se encontra suspensa imediatamente após sonicação. Ao longo de 24 h, sem agitação, há uma diminuição das NP-TiO₂ em suspensão, porém se mantém estável em torno de 16%. A presença da agitação, mesmo que suave, mantém uma maior porcentagem de NP-TiO₂ em suspensão (25 ± 4 %).

A porcentagem de NP-TiO₂ em suspensão em meio aquoso em pH 4,5-5,0 e em pH 8,0-8,5 é menor do que em pH 7,0. Estes resultados permitiram calcular as concentrações reais em suspensão no meio aquático.

Tabela V. Porcentagem de recuperação de NP-TiO₂ após suspensão em meio aquoso, porcentagem em suspensão e precipitada verificada no teste 1 (controle) e testes 2 a 5 (suspensão 48 horas).

| TiO ₂ (mg L ⁻¹) | Teste 1 (%) | Teste 2 com sonicação (%) | Teste 3 pH 7,0 (%) | Teste 4 pH 4,5 – 5,0 (%) | Teste 5 pH 8,0 – 8,5 (%) |
|---|----------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>Sobrenadante</i> | | | | | |
| 1 | 20,5 | 16,2 | 14,4 | 12,9 | 11,8 |
| 5 | 22,9 | 18,6 | 27,6 | 11,4 | 10,9 |
| 10 | 21,1 | 22,9 | 29,1 | 11,1 | 14,2 |
| 50 | 21,9 | 14,1 | 21,5 | 12,0 | 10,1 |
| <i>Precipitado</i> | | | | | |
| 1 | 69,5 | 74,7 | 72,9 | 85,6 | 86,9 |
| 5 | 75,5 | 80,0 | 71,4 | 87,7 | 88,4 |
| 10 | 77,9 | 76,1 | 70,1 | 87,7 | 85,6 |
| 50 | 77,0 | 84,9 | 77,9 | 87,7 | 89,2 |
| <i>Total</i> | | | | | |
| 1 | 90,0 | 90,9 | 87,4 | 98,5 | 98,7 |
| 5 | 98,4 | 98,6 | 99,0 | 99,2 | 99,3 |
| 10 | 99,0 | 98,9 | 99,2 | 98,7 | 97,7 |
| 50 | 98,9 | 99,0 | 99,2 | 99,7 | 99,3 |

4.1.3. Concentração de Ti solúvel e TiO₂ nas amostras de água coletadas durante o experimento nos tempos 0 h e 48 h

Os íons Ti⁺⁴ *m/z* 48 e 65 foram monitorados e foi possível quantificar o teor de Ti⁺⁴ livre nas soluções. A partir da obtenção da concentração de Ti livre, foi possível calcular a concentração de TiO₂ disponíveis nas amostras de água coletadas dos aquários nos tempos 0 h e 48 h que correspondem, respectivamente, ao início e final dos experimentos em cada pH. As concentrações de Ti livre e TiO₂ quantificados nas amostras estão apresentadas na Tabela VI.

Em pH 5,0 a concentração de Ti e TiO₂ para as amostras não variou entre 0 h (52,2 %) e 48 h (53,6 %). Em pH 7,0 a concentração de Ti e TiO₂ das amostras diminuiu 10,3 % entre 0 h (44,9 %) e 48 h (34,7 %). Em pH 8,0 a concentração de Ti e TiO₂ diminuiu 33,5 % entre 0 h (69,9 %) e 48 h (36,4 %).

Tabela VI. Concentração de Ti solúvel e TiO₂ nas amostras de água dos aquários experimentais com concentração inicial de 1mg L⁻¹ nos diferentes pH (5,0; 7,0; e 8,0) referentes aos tempos 0h e 48h a partir da digestão em persulfato de amônio e quantificação do Ti⁺⁴ livre em ICP-MS.

| Amostra [1mg L ⁻¹] | Tempo | Concentração Ti ⁺⁴ [mg L ⁻¹] | Diluição 10 X | TiO ₂] mg.L ⁻¹ | % TiO ₂ em suspensão |
|-----------------------------------|-------|--|------------------|--|------------------------------------|
| pH 5,0 | 0h | 0,032 | 0,32 | 0,522 | 52,2 |
| pH 5,0 | 48h | 0,032 | 0,32 | 0,536 | 53,6 |
| pH 7,0 | 0h | 0,027 | 0,27 | 0,449 | 44,9 |
| pH 7,0 | 48h | 0,021 | 0,21 | 0,347 | 34,7 |
| pH 8,0 | 0h | 0,042 | 0,423 | 0,699 | 69,9 |
| pH 8,0 | 48h | 0,022 | 0,220 | 0,364 | 36,4 |

4.1.4. Morfologia das NP-TiO₂

Não houve modificação na forma das NP-TiO₂ em suspensão e precipitada (Figura 17).

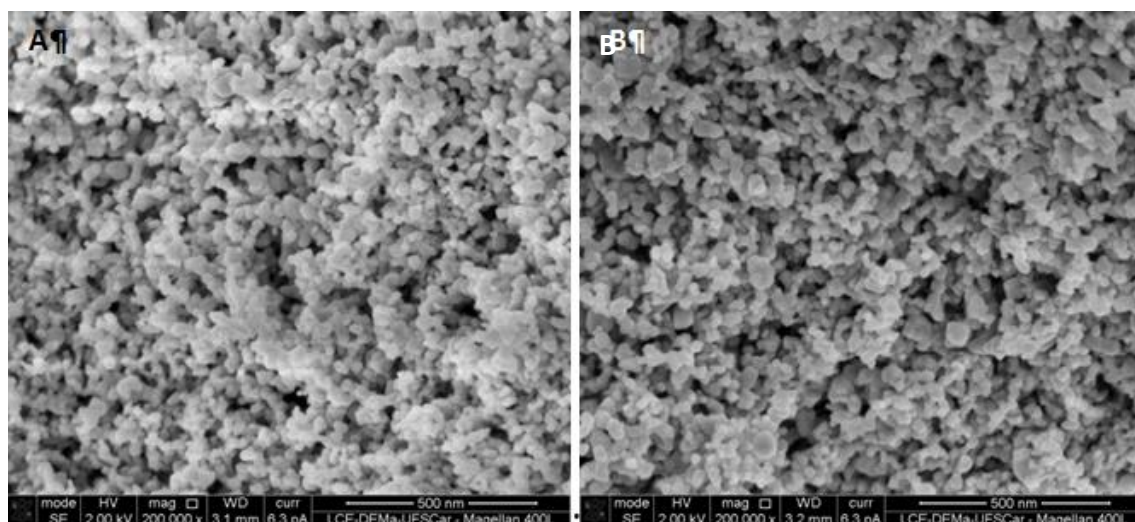


Figura 16. Imagens das NP-TiO₂ em solução. A. NP-TiO₂ precipitadas; B. NP-TiO₂ dispersa em meio aquoso.

4.2. Toxicidade aguda das NP-TiO₂ (CL-50;48h)

Não ocorreu mortalidade de *P. lineatus* expostos a NP-TiO₂ durante 48 h em pH 5,0, 7,0 e 8,0 em nenhuma das concentrações testadas. Os testes foram encerrados, uma vez que, 100 mg L⁻¹ é considerada concentração limite nos testes de toxicidade aguda (OECD, 2009), indicando que o organismo teste empregado no estudo não pertence ao grupo mais sensível para o estudo de toxicidade aguda. Assim, CL50;48h das NP-TiO₂ para *P. lineatus* foi superior a 100 mg L⁻¹ (concentração nominal).

4.2.1. Análises hematológicas

A osmolalidade e íons plasmáticos estão apresentados na Tabela VII. A osmolalidade e a concentração de íons Cl⁻ do grupo C-pH5 diminuiu e a concentração de íons K⁺ aumentou ($p < 0,05$) em relação ao C-pH7. Não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) para a concentração dos íons Na⁺ entre os grupos controle pH5, pH8 e pH7.

Após exposição a NP- TiO₂, a osmolalidade diminuiu ($p < 0,05$) no grupo TiO₂-pH7 em relação ao seu controle C-pH7. A concentração de íons K⁺ diminuiu ($p < 0,05$) para os grupos TiO₂-pH5 e TiO₂-pH7 em relação aos respectivos controles controle C-pH5 e C-pH7. A concentração de íons Cl⁻ aumentou ($p < 0,05$) para o grupo TiO₂-pH5 e diminuiu ($p < 0,05$) para o grupos TiO₂-pH8 em relação aos respectivos controles C-pH5 e C-pH8. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) para a concentração de íons Na⁺ entre os grupos os expostos TiO₂-pH5, TiO₂-pH7 e TiO₂-pH8 em relação aos seus respectivos controles.

Tabela VII. Concentração de íons (Na⁺, K⁺ e Cl⁻) e osmolalidade do plasma sanguíneo de *Prochilodus lineatus* expostos a NP-TiO₂ em diferentes pH (5,0, 7,0 e 8,0), durante 48h.

| Parâmetros | pH 5,0 | | pH 7,0 | | pH 8,0 | |
|--|-----------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|---------------------|
| | Controle | NP-TiO ₂ | Controle | NP-TiO ₂ | Controle | NP-TiO ₂ |
| Na ⁺ (mEq L ⁻¹) | 133,4 ± 11,5 | 124,5±9,3 | 153,2±14,3 | 149,6±12,9 | 171,5±13 | 163,4±11,8 |
| K ⁺ (mEq L ⁻¹) | 5,9±0,2 [#] | 5,4±0,6* | 4,4±0,5 | 4,8±0,4* | 4,5±0,3 | 4,7±0,4 |
| Cl ⁻ (mEq L ⁻¹) | 97,9±3,2 [#] | 110±2,6* | 129,7±9,2 | 113,1±3,6 | 122,7±3,7 | 105,1±4,8* |
| Osmolalidade (μOsmol Kg ⁻¹) | 217±15,1 [#] | 236±10,6 | 298,3±19,8 | 249,4±17,6* | 287,6±12,5 | 288,1±17,2 |

Os valores são média ± EPM. * indica diferença significativa entre o grupo exposto a NP-TiO₂ em relação aos seus controles; # - indica diferença dos grupos controles C-pH5 ou C-pH8 em relação ao grupo C-pH7 ($p < 0,05$).

A Figura 19 mostra os valores médios de Hct, Hb, RBC e dos índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) de *P. lineatus* dos grupos controles e expostos a 1 mg L^{-1} de NP-TiO₂ em água com pH 5,0, 7,0 e 8,0 durante 48 h. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) no Hct e HCM entre os grupos C-pH5, C-pH7 e C-pH8. A concentração de hemoglobina (Hb) e CHCM diminuiu e o VCM aumentou ($p < 0,05$) no grupo C-pH8 em relação ao C-pH7; o RBC diminuiu significativamente ($p < 0,05$) para os grupos C-pH5 e C-pH8 em relação ao grupo C-pH7.

A exposição as NP- TiO₂ nos diferentes pH não alterou o Hct, RBC e VCM dos animais relação aos seus respectivos controles. A concentração de Hb, HCM, CHCM diminuiu ($p < 0,05$) no grupo TiO₂-pH5 em relação ao seu controle C-pH5 e aumentou ($p < 0,05$) nos grupos TiO₂-pH7 e TiO₂-pH8 em relação aos controles C-pH7 e C-pH8.

4.2.2. Atividade das enzimas relacionadas à regulação iônica

A Figura 20 mostra os valores médios das atividades das enzimas relacionadas à regulação iônica anidrase carbônica (AC), Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) e H-ATPase de *P. lineatus* dos grupos controles e expostos a 1 mg L^{-1} de NP-TiO₂ com pH 5,0, 7,0 e 8,0 durante 48h.

A atividade da enzima AC diminuiu significativamente ($p < 0,05$) nos grupos C-pH5 e C-pH8 em relação ao controle C-pH7 e após exposição as NP-TiO₂, a atividade da enzima diminuiu significativamente ($p < 0,05$) apenas no grupo TiO₂-pH7 em relação ao seu controle C-pH7 (Figura 20A).

O pH da água (C-pH5, C-pH8 e C-pH 7) não alterou a atividade da NKA e a exposição as NP-TiO₂ aumentou a atividade da enzima nos animais mantidos em pH 8,0 (Figura 20B). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na atividade da H-ATPase entre os grupos C-pH5 e C-pH8 e C-pH7 e a exposição as NP-TiO₂ não alterou a atividade da enzima em nenhum pH (Figura 20C).

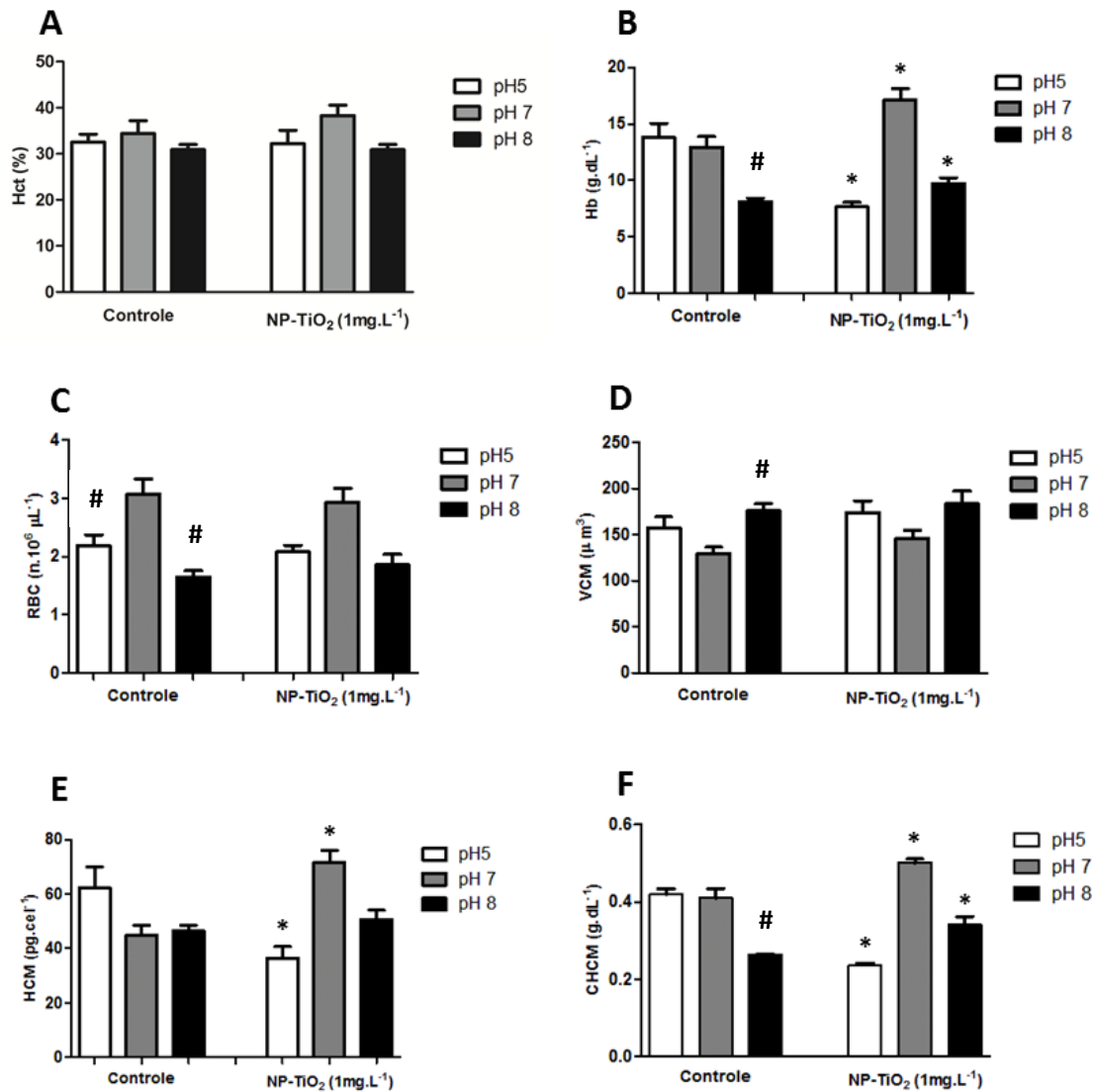


Figura 17. Variáveis hematológicas de *Prochilodus lineatus* expostos a NP-TiO₂ em água com pH 5,0, 7,0 e 8,0, durante 48h. A. Hematócrito (Hct); B. Concentração de hemoglobina ([Hb]); C. Número de eritrócitos (RBC); e índices hematimétricos: D. Volume Corpuscular Médio (VCM); E. Hemoglobina corpuscular média (HCM); F. Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Média ± EPM. * indica diferença significativa entre o grupo expostos a NP-TiO₂ em relação aos seus controles; # - indica diferença dos grupos C-pH5 ou C-pH8 em relação ao grupo C-pH7 ($p < 0,05$).

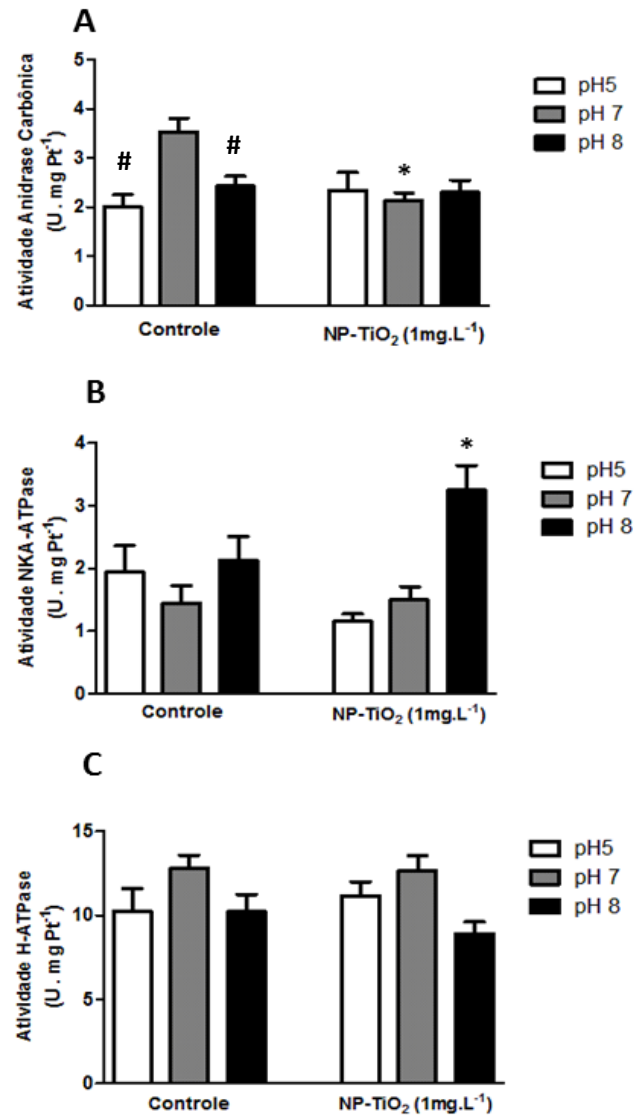


Figura 18. Atividade da enzima anidrase carbônica (A), Na⁺/K⁺-ATPase (B) e H⁺-ATPase (C) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a NP-TiO₂ nos pH 5,0, 7,0 e 8,0. Média ± EPM. * indica diferença significativa entre os grupos expostos a NP-TiO₂ em relação aos seus controles; # - indica diferença dos grupos C-pH5 ou C-pH8 em relação ao grupo C-pH7 (p<0,05).

4.2.3. Densidade e área fracional das células cloreto

A Figura 21A mostra parte de filamentos branquiais da hemibrânquia anterior e posterior unidos pelo septo interbranquial e a localização das lamelas nos filamentos branquiais indicando o local em que as imagens da superfície das CC foram obtidas. Essa região é o local em que as imagens são obtidas sem distorção e é representativa da distribuição dessas células ao longo do epitélio do filamento.

As células pavimentosas ocupam a superfície do epitélio do filamento em contato com a água e entre elas é possível identificar as CC. A superfície das células pavimentosas de *P. lineatus* apresentam microdobras na região apical. As membranas apicais das CC permitem dividi-las em 2 tipos distintos: Tipo 1 - CC cuja membrana

apical possui um aspecto de esponja e tem maior frequência e, Tipo 2 - cuja membrana apical forma uma cripta e não é possível observar detalhadamente as características da membrana e tem frequência muito baixa na superfície do filamento (Figuras 21 e 22). As CC tipo 2 proporcionam a formação de um microambiente que favorece as trocas iônicas. As Figuras 21B, C e D mostram respectivamente, eletromicrografias capturadas em animais expostos a pH 5,0, 7,0 e 8,0.

A área fracional e a densidade das CC tipo 1 não foram alteradas pela exposição a diferentes pH (C-pH5 e C-pH8 e C-pH7) e as NP-TiO₂ (Figuras 22 A e C). Em relação as CC tipo 2, a área fracional e densidade não diferiram nos grupos controles nos diferentes pH, mas após exposição as NP-TiO₂, essas células não foram observadas nos animais em pH 5,0 (TiO₂-pH5) e aumentaram ($p < 0,05$) em pH 7,0 (TiO₂-pH7) (Figuras 22B e D).

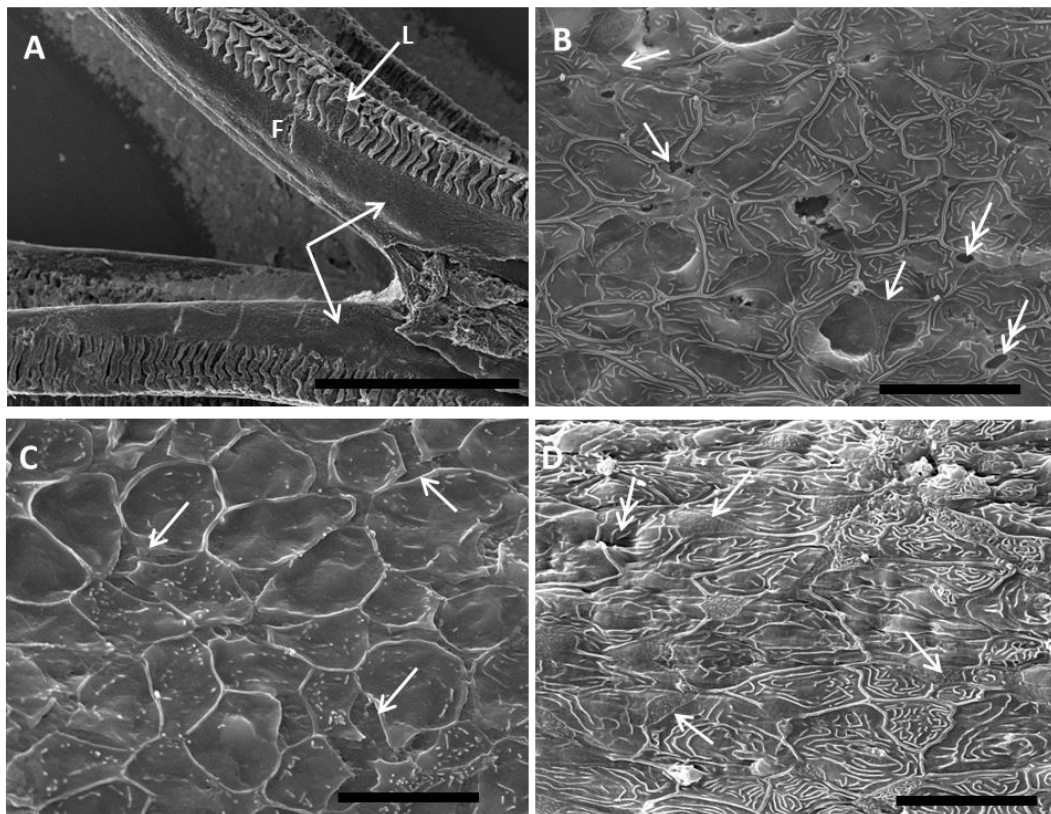


Figura 19. Eletromicrografias de varredura (SEM) do epitélio do filamento branquial de *Prochilodus lineatus*. A. Filamento branquial mostrando a localização das lamelas (L) e local onde a captura das imagens foi feita para as análises (setas). Barra de escala = 500 μm ; B. Células-cloreto - pH 5,0; C. Células-cloreto - pH 7,0; D. Células-cloreto - pH 8,0. Em B, C e D Setas simples indicam CC tipo I; setas duplas indicam CC tipo II; Barra de escala = 20 μm .

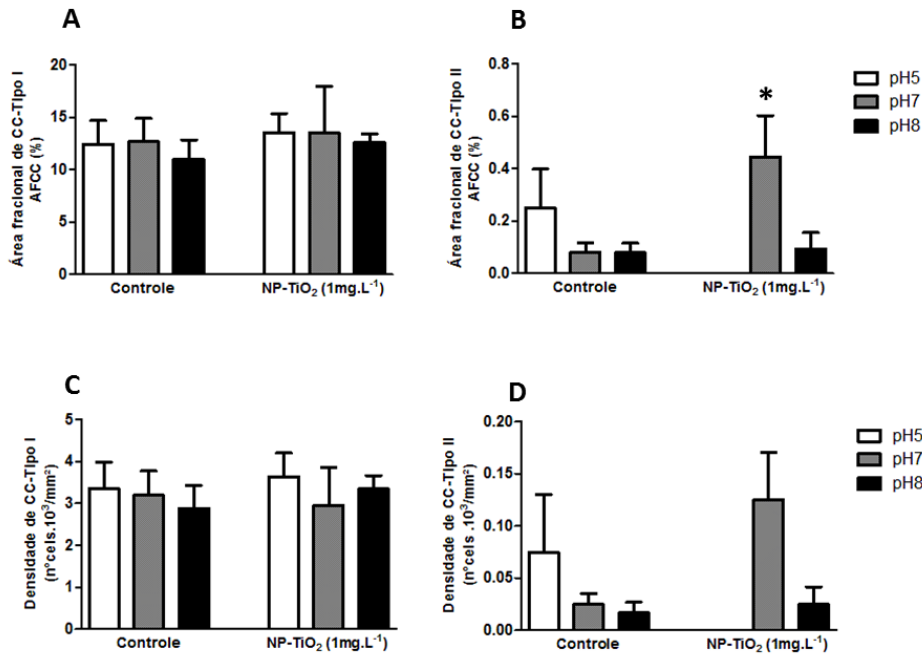


Figura 20. Área fracional (AFCC - %) e densidade de células-cloreto (CC) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* dos grupos controles e expostos a NP-TiO₂ em pH 5,0, 7,0 e 8,0 durante 48h. A. AFCC de CC tipo I; B. AFCC de CC tipo II; C. Densidade de CC tipo I (CC.mm⁻²); D. Densidade de CC tipo II (CC.mm⁻²). Média ± EPM. * indica diferença significativa entre grupos (p<0,05).

4.2.4. Respostas antioxidantes e peroxidação lipídica

O pH da água mostrou efeito significativo na produção de ERO; a concentração de ERO (Figura 23A) diminuiu ($p < 0,05$) nos grupos C-pH5 e C-pH8 em relação ao C-pH7 e, após exposição as NP-TiO₂, diminuiu no grupo TiO₂-pH5 em relação ao seu controle (C-pH5). Entretanto não houve diferença significativa na concentração de peróxidos de lipídios, exceto no grupo C-pH8 que foi menor que em pH 5,0 e 7,0. A atividade da SOD (Figura 23D) não foi alterada nos diferentes pH, grupos C-pH5, C-pH7 e C-pH8, mas a exposição as NP-TiO₂ induziu aumento da atividade da SOD nos grupos TiO₂-pH7 ($p < 0,05$) em relação ao controle C-pH7 e diminuiu no grupo TiO₂-pH8 em relação ao C-pH8. A CAT (Figura 23C) diminuiu nos grupos C-pH5 e C-pH8 em relação ao C-pH7 e nos grupos TiO₂-pH7 e TiO₂-pH8 em relação aos seus respectivos controles e aumentou ($p < 0,05$) no grupo TiO₂-pH5 em relação ao grupo C-pH5. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na atividade da GPx (Figura 23E) e GST (Figura 23F) entre os grupos. A concentração da GSH diminuiu nos animais expostos ao pH5 em relação ao pH7 ($p < 0,05$) mas não após a exposição a NPs. A atividade da GCL não sofreu alteração em função da exposição aos diferentes pH, porém aumentou em função da exposição à NP-TiO₂ no grupo TiO₂-pH7 ($p < 0,05$) em relação ao C-pH7.

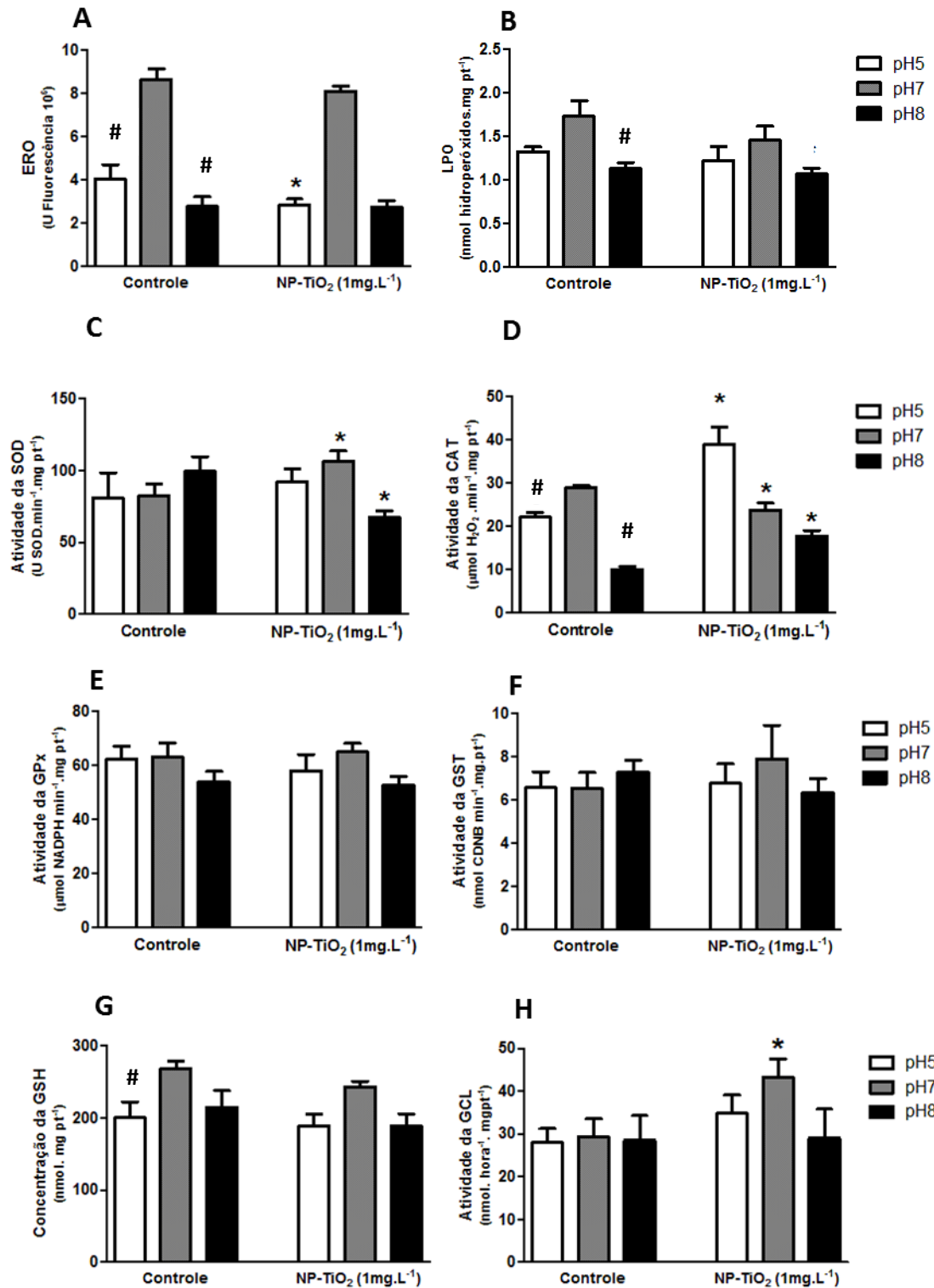


Figura 21. A. Espécies reativas de oxigênio (ERO); B. Peroxidação lipídica (LPO); C. Atividade da superóxido dismutase (SOD); D. Atividade da catalase (CAT); E. Atividade da glutatona peroxidase (GPx); F. Atividade da glutatona S-transferase (GST); G. Concentração da glutatona reduzida (GSH); H. Atividade da glutamato-cisteína ligase (GCL) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* dos grupos controle e exposto à NP-TiO₂ nos pH 5,0, 7,0 e 8,0, durante 48h. Média ± EPM. * indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação aos seus controles; # - indica diferença dos grupos C-pH5 ou C-pH8 em relação ao grupo C-pH7 ($p < 0,05$).

4.2.5. Análise histopatológica

As análises das brânquias evidenciou diferenças morfológicas entre os grupos controle expostos aos pH 5,0, 7,0 e 8,0. A frequência de CC nas lamelas dos animais do grupo C-pH7 foi menor que nos grupos C-pH5 e C-pH8. Nos animais do grupo C-pH5 a frequência de CM localizadas no topo das lamelas, enquanto nos outros grupos controles, poucas CM foram encontradas. Nos grupos C-pH5 e C-pH8 houve um aumento na hipertrofia e hiperplasia das CPv em relação ao C-pH7 e no grupo C-pH5 houve alteração do sistema de células pilares em algumas lamelas, ou seja, houve rompimento das células pilares.

Em relação à exposição à NP-TiO₂, houve um aumento na frequência da dilatação dos vasos sanguíneos e do decréscimo do espaço entre as lamelas nos grupos TiO₂-pH5, TiO₂-pH7 e TiO₂-pH8 em relação aos seus controles. Notou-se um aumento na frequência de hipertrofia e hiperplasia do epitélio da lamela e do filamento, assim como da fusão de algumas lamelas no grupo TiO₂-pH7 em relação ao seu controle. A frequência de CC não variou entre os grupos expostos à NP-TiO₂ em relação aos seus controles. Houve um aumento na frequência de aneurismas apicais e aneurismas no grupo TiO₂-pH8 em relação C-pH8. A quantidade de CM presentes no topo das lamelas nos grupos TiO₂-pH5 foi menor do que as do grupo C-pH5.

A frequência e o tipo de alteração nas brânquias dos espécimes de *P. lineatus* expostos NP-TiO₂ em diferentes pH estão representados na Tabela VIII.

A estrutura normal do epitélio lamelar branquial está representada pela Figura 24A, onde se observa uma fina camada de revestimento formada pelas células pavimentosas.

As principais histopatologias encontradas nas brânquias de *P. lineatus* neste estudo estão representadas na Figura 24 (B-H). As patologias mais frequentes foram as de estágio de severidade I, como, hipertrofia do epitélio lamelar, hiperplasia do epitélio lamelar, proliferação de células cloreto, decréscimo do espaço interlamelar, hiperplasia do epitélio do filamento, dilatação dos vasos sanguíneos, fusão incompleta das lamelas, fusão completa de algumas lamelas. Aneurismas, que são alterações histopatológicas de estágio de severidade II, foram encontrados somente no grupo NP-pH8. Não foram observadas alterações histopatológicas de estágio de severidade III nas brânquias dos peixes.

Tabela VIII. Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a NP-TiO₂ em diferentes pH.

| Alterações | Estágio | C pH5 | TiO ₂ pH5 | C pH7 | TiO ₂ pH7 | C pH8 | TiO ₂ pH8 |
|--|---------|-------|----------------------|-------|----------------------|-------|----------------------|
| Dilatação dos vasos sanguíneos | I | 0* | * | 0* | 0* | 0* | * |
| Hipertrofia do epitélio da lamela | I | ** | ** | * | ** | ** | ** |
| Hipertrofia e hiperplasia de células cloreto | I | ** | ** | * | 0* | ** | ** |
| Hiperplasia do epitélio da lamela | I | * | * | 0* | * | ** | ** |
| Descolamento do epitélio da lamela | I | 0 | 0 | 0* | 0 | 0 | 0* |
| Hiperplasia do epitélio do filamento | I | * | * | * | ** | * | * |
| Decréscimo do espaço interlamelar | I | * | ** | 0* | ** | * | * |
| Hipertrofia e hiperplasia de células mucosas | I | * | 0* | 0* | 0* | 0* | 0* |
| Fusão incompleta das lamelas | I | 0* | 0* | 0* | * | 0* | 0* |
| Fusão completa de algumas lamelas | I | 0* | 0* | 0* | 0* | 0 | 0* |
| Aneurisma apical | I | 0* | 0* | 0* | 0 | 0 | 0* |
| Aneurisma | II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0* |

0 = ausente, 0* = raramente frequente, * = frequente, ** = muito frequente, * = extremamente frequente**

O índice de alterações histopatológicas (IAH – Figura 25 A) indicou o funcionamento normal do órgão em todos os grupos, com exceção ao grupo NP-pH8, cujo IAH indicou danos leves a moderados no órgão. Contudo, alguns animais do grupo NP-pH8 apresentaram lesões moderadas a severas e que podem afetar o funcionamento do órgão. O valor médio de alterações (VMA – Figura 25B) indicou ausência de alteração histopatológica para o grupo C-pH7 e lesões pontualmente localizadas nas brânquias dos animais dos demais grupos. O IAH do grupo NP-pH 8,0 aumentou ($p < 0,05$) em relação ao grupo C-pH8; os demais grupos não apresentaram diferenças significativas. Em relação ao VMA, nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas.

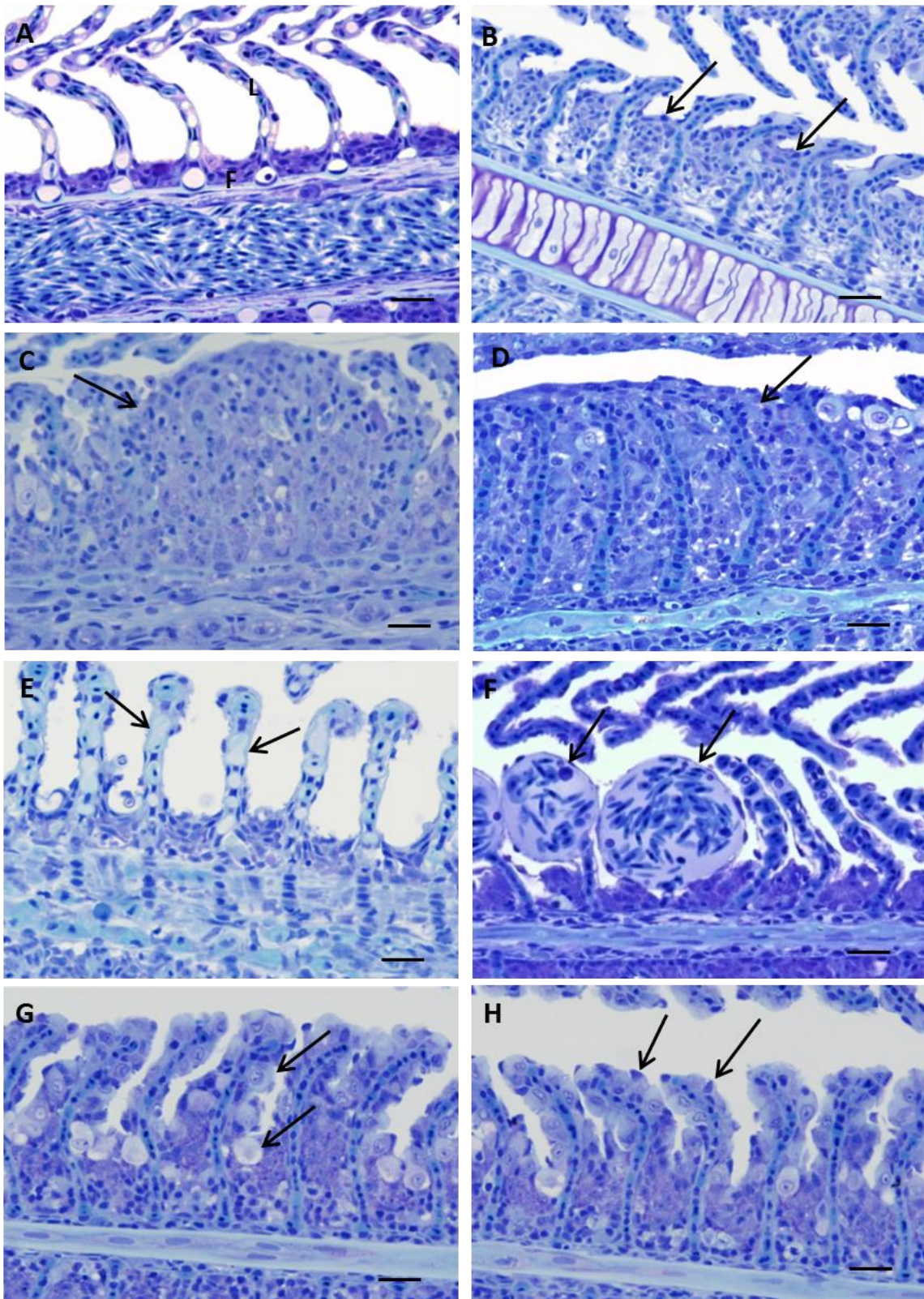


Figura 22. Histopatologias em brânquiais de *Prochilodus lineatus* expostos a NP-TiO₂ em diferentes pH. A. Estrutura normal da brânquia; B. Hipertrofia do Epitélio da lamela (setas) C. Fusão completa de algumas lamelas (seta); D. Fusão completa de todas as lamelas; E. Dilatação dos vasos sanguíneos (seta); F. Aneurismas Apicais (setas); G. Hipertrofia e Hiperplasia de cél. cloreto (seta); H. Hipertrofia do Epitélio da lamela (setas); L. Lamela; F. Filamento. Glutaraldeído. Azul de Toluidina. Escala = 20 µm.

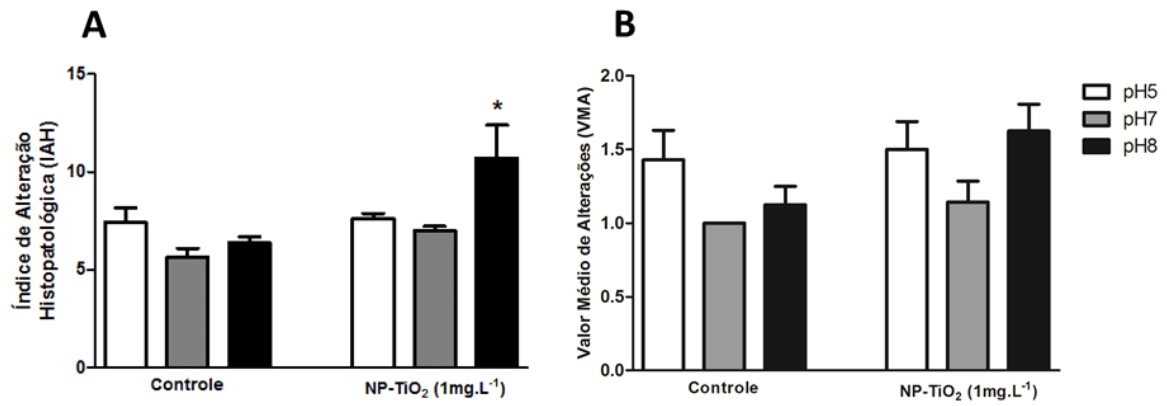


Figura 23. Índice de alterações histopatológicas (IAH); **B.** Volume médio de alterações (VMA); em brânquias de *Prochilodus lineatus* dos grupos controle e exposto à NP-TiO₂ nos pH 5,0, 7,0 e 8,0, durante 48h. Média ± EPM. * indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação aos seus controles; # - indica diferença dos grupos C-pH5 ou C-pH8 em relação ao grupo C-pH7 ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Características físico-químicas das NP-TiO₂

Quando as NP-TiO₂ estão em suspensão, a maioria das partículas possui uma carga de superfície constituída pela dissociação de grupos ionizáveis na superfície da partícula e/ou pela adsorção diferencial de íons da solução na superfície da partícula. A carga na superfície da partícula determina a distribuição de íons ao seu redor, assim como a concentração de íons de carga oposta que se mantém próximos à sua superfície, compondo, dessa forma, uma dupla camada elétrica entre a partícula e o líquido da suspensão. Em partículas neutras existe a atuação da força atrativa de van der Waals, que favorece a agregação e a força de repulsão estérica, que favorece a estabilização. Em partículas carregadas a atração eletrostática favorece a agregação, enquanto que a repulsão eletrostática favorece a estabilização (Doane et al., 2011).

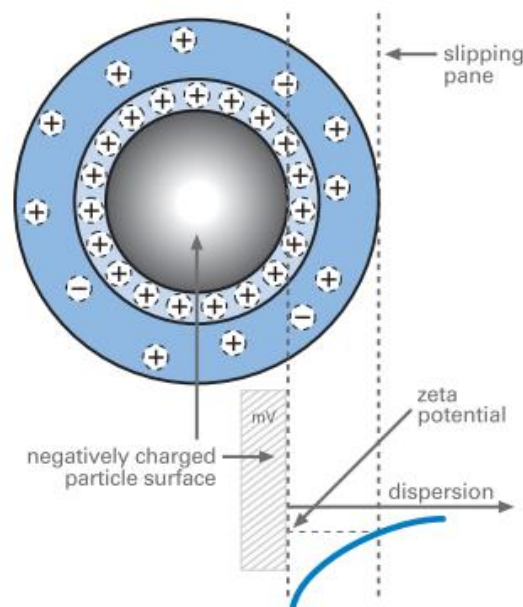


Figura 24. Ilustração da dupla camada eletrostática que se forma ao redor da partícula em suspensão.

O potencial zeta (Pz) é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, ou seja, o potencial da dupla camada elétrica que a partícula apresenta, é dependente da superfície da partícula e do dispersante e, dessa forma, pode ser afetado pelo pH (Figura 26), concentração das partículas no meio ou força iônica do meio (Doane et al., 2011). O potencial zeta prediz a estabilidade da partícula em uma

suspensão, sendo a suspensão considerada estável quando potencial zeta está entre - 30 mV e + 30 mV.

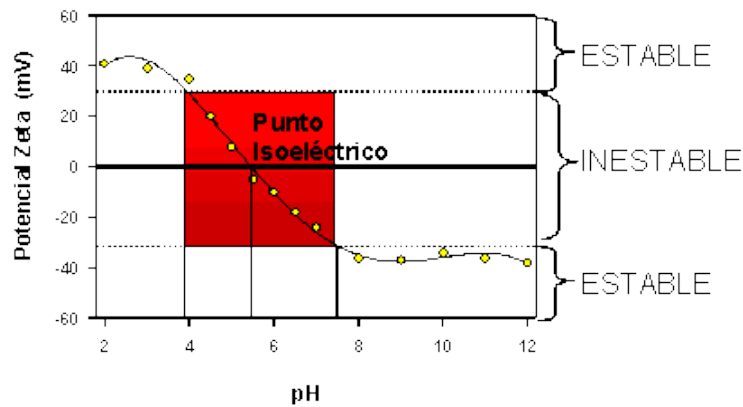


Figura 25. Variação do potencial zeta em diferentes pH. Em vermelho está a região de instabilidade (entre pH 4,0 e pH 7,5). Disponível em <http://www.quiminet.com/>

Os potenciais zeta das amostras de água do experimento com *P. lineatus* nos pH 5,0; 7,0 e 8,0 estão dentro da faixa que corresponde a -30mV a +30mV, onde as NP-TiO₂ não são estáveis e tendem a formar aglomerados no meio em que estão. O potencial zeta da suspensão das NP-TiO₂ em pH 5,0 foi maior que nos pH 7,0 e 8,0, evidenciando a interferência do pH e favorecendo a formação de aglomerados de NP-TiO₂. Observando a Figura 26 seria esperado que as NP-TiO₂ em pH 8,0 seriam estáveis, contudo, os valores de potencial zeta das amostras em pH 8 indicaram instabilidade, que pode ser explicado devido a alta concentração de NP-TiO₂ no meio (1 mg L⁻¹, concentração nominal), que possivelmente diminui a distância entre uma partícula e outra favorecendo a agregação destas.

Considerando que o potencial zeta das NP-TiO₂ e que a média dos diâmetros hidrodinâmicos e os valores máximos e mínimos dos aglomerados de NP-TiO₂ nos pH 5,0 foram maiores em comparação ao pH 7,0 e 8,0, no pH 5,0 os peixes foram expostos a aglomerados de partículas maiores, o que pode ter dificultado a entrada de NP-TiO₂ nos organismos dos peixes causando assim menores alterações nesses animais. Esse fato corrobora com o comportamento das NP-TiO₂ observados nos aquários durante os experimentos, após aproximadamente 1 h de exposição era possível notar NP-TiO₂ decantadas no fundo dos aquários com pH 5,0 tornando a água mais translúcida enquanto que em pH 7,0 e 8,0 a água manteve o aspecto leitoso. Segundo McDonald et al., (1980) o efeito do pH da água sobre metais é complexo, podendo afetar a solubilidade e/ou a especiação de muitos metais.

Os testes de recuperação das NP-TiO₂ após suspensão em meio aquoso mostraram que praticamente 70-80 % das NPs não se mantem em suspensão e precipitam o que sugere que em ambiente natural as NP-TiO₂ poderão se acumular no sedimento, a agitação favorece a manutenção das NP em suspensão uma vez que no teste 3 a precipitação de NP foi de aproximadamente 70 %. Em água com pH 5,0 e 8,0, a precipitação em torno de 85 a 89% sugerem que nesses pH as NPs tendem a facilitar a agregação das NP-TiO₂. De um modo geral, não há um perfil de dispersão em relação à concentração das NP-TiO₂ em água. Independente do pH, a suspensão de NP-TiO₂ em água não altera a morfologia das NP-TiO₂.

As porcentagens de Ti livre obtidos por digestão das amostras de água com NP-TiO₂ por persulfato de amônio, cuja concentração inicial foi 1 mg L⁻¹ nos pH 5,0, 7,0 e 8,0 não foram condizentes com o esperado no tempo 0h para nenhum dos três pH. A concentração de NP-TiO₂ para as amostras de pH 5,0 não variou entre 0 h (52,2 %) e 48 h (53,6 %), em pH 7,0 ocorreu uma diminuição de aproximadamente 10 % entre 0 h (44,9 %) e 48 h (34,7 %) e em pH 8,0 a diminuição na concentração de NP-TiO₂ de 33,5 % entre os tempos 0h (69,9 %) e 48h (36,4 %).

5.2. Toxicidade das NP-TiO₂ para *P. lineatus* em diferentes pH da água

As NP-TiO₂ não foram tóxicas para *P. lineatus* quando em suspensão em água com pH 5,0, 7,0 e 8,0. Em todas essas condições experimentais não houve mortalidade e a CL₅₀;48h das NP-TiO₂ foi superior a 100 mg L⁻¹, sendo então considerada não-tóxica de acordo com a classificação de Zuker (1985) para compostos químicos. Kovřížnych et al. (2013) determinou a CL₅₀; 48h de 31 tipos de NPs em ovos e indivíduos adultos de *Danio rerio* e verificou que a CL₅₀;48h para animais expostos à NP-TiO₂ foi superior à 1600 mg L⁻¹, o que corrobora o presente estudo em *P. lineatus*. A toxicidade aguda 96 h (CL₅₀;96 h) de NP-TiO₂ para *D. rerio* estimada por Xiong et al. (2011) foi de 124,5 mg L⁻¹ confirmando a ausência de toxicidade das NP-TiO₂. Entretanto alguns dados tem sido contraditórios, Diniz et al. (2013) avaliou a toxicidade (CL₅₀;96h) das NP-TiO₂ em *Carassius auratus* e *Danio rerio*, duas espécies de peixes dulcícolas, e verificou que não houve mortalidade para *C. auratus*; porém houve mortalidade de 53 % *D. rerio* expostos à 100 mg L⁻¹.

5.2.1. Respostas hematológicas

A manutenção da osmolalidade, que se refere ao balanço de água entre o meio intracelular e o meio extracelular, e a regulação do volume dos vários compartimentos do organismo, que se refere à concentração de sódio (Na^+) dada pela relação entre absorção e excreção de Na^+ , são fundamentais para manter a homeostase dos compartimentos biológicos e as condições fisiológicas dos animais (Aires, 2008).

Apesar da concentração de Na^+ não ter alterado, a diminuição da osmolalidade no grupo C-pH5 em relação ao grupo C-pH7 pode ser explicada pela diminuição na concentração dos íons Cl^- . O Cl^- é o principal ânion do líquido extracelular e, assim como o Na^+ , o Cl^- auxilia a manter a osmolalidade no plasma. Quando ocorre acidose, os níveis de HCO_3^- são aumentados no sangue para restaurar os valores normais do pH o que pode afetar a concentração de Cl^- plasmático em peixes (Marieb & Hoehn, 2009). Segundo Wood (1989, 2001) a exposição a pH ácido e pH alcalino são potencialmente tóxicos para peixes, sendo o pH ácido capaz de inibir a captação de íons Cl^- através das brânquias e estimular passivamente o efluxo desses íons o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo em que o nível interno de íons Cl^- foram menores no grupo C-pH5, enquanto o pH alcalino não houve diferença em relação ao C-pH7.

A diminuição da concentração dos íons Cl^- para o grupo TiO_2 -pH8 em relação ao controle C-pH8 pode ter causado a diminuição da osmolalidade plasmática, sugerindo que a exposição à NP- TiO_2 dificulta o transporte de Cl^- para o plasma dos animais. Entretanto, o aumento dos íons Cl^- no grupo TiO_2 -pH5 em relação ao seu controle C-pH5, corrobora a hipótese de que em pH 5,0 (ácido) as NP- TiO_2 tendem a se aglomerar mais, dificultando sua entrada no organismo, não interferindo tanto na concentração de Cl^- do plasma.

A diminuição da concentração de Hb no grupo C-pH8 em relação ao controle C-pH7 indica um possível efeito sobre a produção de hemoglobina em animais expostos a pH alcalino. A diminuição da concentração de Hb, HCM e CHCM no grupo TiO_2 -pH5 em relação ao C-pH5 sugere um efeito da exposição às NP- TiO_2 . Contudo, nos pH 7,0 e 8,0 o aumento da concentração de Hb, HCM e CHCM nos grupos expostos à NP- TiO_2 em relação aos seus respectivos controle podem ter sido causados pela associação entre pH e NP- TiO_2 .

Apesar da concentração de hemoglobina ter alterado, não foi observado alteração no RBC (número de eritrócitos) nos grupos expostos a NP- TiO_2 em relação aos seus controles, o que sugere que a exposição às NP- TiO_2 nos diferentes pH podem

ter afetado a produção de hemoglobina mas não afetou o número de eritrócitos. Porém, a diminuição do RBC nos grupos C-pH5 e C-pH8 e aumento do VCM no grupo C-pH8 em relação ao controle C-pH7 podem estar associados à alteração iônica no meio intracelular devido ao aumento da concentração dos íons Na^+ e Cl^- no meio intracelular, que favorece a entrada de água na célula, aumentando o volume dos eritrócitos, levando a hemólise (Tavares-Dias e Moraes, 2004).

5.2.2. Respostas ionosmóticas

Os peixes teleósteos apresentam mecanismos para a manutenção do equilíbrio ionosmótico muito eficientes mesmo quando expostos a alterações no meio como, variação de pH, disponibilidade de íons, presença de xenobióticos, temperatura e alcalinidade. As brânquias são o primeiro órgão de contato com a água do ambiente, exercendo papéis fundamentais na regulação iônica, equilíbrio ácido-base e nas trocas gasosas (Hirose et al., 2003; Evans et al., 2005; Paulino et al., 2012b). As CC, em alto número nas brânquias, são os principais sítios de absorção de íons, como Na^+ , Cl^- e Ca^+ nos peixes dulcícolas (Mazon et al., 2002; Sakuragui et al., 2003; Evans et al., 2005; Shiogiri et al., 2012).

O aumento da atividade da enzima NKA no grupo TiO_2 -pH8 pode estar associado a um aumento na entrada de íons Cl^- do meio para as células pela ação do co-transportador Na^+ - Cl^- e/ou pela ação da H-ATPase que pela excreção de íons H^+ que favorece a entrada de Na^+ nas células e, conseqüentemente, elevaria a concentração dos íons Na^+ intracelular. Com o aumento do Na^+ , para manter o equilíbrio iônico a excreção dos íons Na^+ para fora da célula é feita por intermédio da NKA, aumentando assim a atividade dessa enzima. A diminuição observada das concentrações dos íons plasmáticos Na^+ e Cl^- corroboram esta hipótese.

Apesar da exposição a diferentes pH que, a princípio, causaria dificuldades na manutenção do equilíbrio ácido-base dos organismos expostos, a atividade da enzima H-ATPase não foi alterada. As H-ATPases se localizam na membrana apical das CC, onde promovem a excreção de íons H^+ para o meio externo, criando um gradiente eletroquímico que favorece a entrada de Na^+ do meio para a célula através dos canais de Na^+ (Inokuchi et al., 2009; Cavicchioli-Azevedo, 2013).

A atividade da anidrase carbônica pode ter sido inibida devido a mudança de pH (5,0 e 8,0) assim como quando exposta a NP- TiO_2 no pH 7,0. A diminuição da atividade da enzima AC no C-pH5 em relação ao C-pH7 foi acompanhada pela diminuição na

concentração de íons Cl^- no plasma. Os íons Cl^- entram na célula através do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, sendo que a produção dos íons HCO_3^- é intermediada pela ação da enzima AC que através da hidratação do CO_2 , forma os íons H^+ e HCO_3^- . Na exposição ao pH 5,0, a concentração de H^+ aumentou no meio, que pode ter levado a um aumento da entrada desses íons através de canais iônicos das células do epitélio lamelar, aumentando sua concentração intracelular. Dessa forma a reação $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ foi deslocada para o lado esquerdo, sendo a atividade da AC inibida devido à elevada concentração de H^+ . De forma semelhante, quando os peixes foram expostos ao pH 8,0, a concentração dos íons HCO_3^- aumentou no meio e, através de difusão, sua concentração no meio intracelular aumentou também, o que pode ter inibido a atividade da AC. A inibição da AC no grupo TiO_2 -pH7 em relação ao seu controle sugere que as NP- TiO_2 ou os íons Ti dissociados das NP podem ter se ligado as AC, causando sua inibição. A AC é uma metaloproteína que utiliza o zinco como co-fator em seu sítio ativo (Vitale et al., 1999). Os íons Ti podem competir com o zinco, causando mudanças na conformação da estrutura da proteína, prejudicando seu funcionamento e, podendo mudar as condições fisiológicas do organismo (Shultz et al., 2012). Alguns trabalhos sugerem que a exposição à NP pode também afetar a função da AC em humanos (Lundqvist et al., 2004; Manokaran et al., 2010).

As CC são ricas em mitocôndrias e possuem um complexo sistema tubular originário de sua membrana basolateral, onde se localizam proteínas fundamentais no transporte iônico como a NKA e trocadores (Hirose et al., 2003; Carmona et al., 2004; Liu et al., 2012; Cavicchioli-Azevedo, 2013). Estudos têm mostrado que a densidade de CC em espécies de teleósteos, assim como o tamanho e a forma da sua superfície CC podem alterar quando expostas a diferentes tipos de poluentes (Mazon et al., 2002; Al-Ghanbousi et al., 2012; Paulino et al., 2012).

Apesar da exposição a diferentes pH não ter causado alteração na área fracional e na densidade das CC na base do filamento em contato com o meio externo, a análise histopatológica mostrou um aumento na quantidade de CC presentes no epitélio da lamela, principalmente nos animais expostos a pH5 em relação ao pH7, que pode indicar uma resposta para manter o equilíbrio ácido-base dos indivíduos em pH ácido.

A maior área fracional e densidade das CC tipo II nos animais expostos a NP- TiO_2 em pH 7,0 sugere o aumento de um microambiente que favoreça as trocas iônicas. A ausência de CC tipo II em animais expostos a NP- TiO_2 em pH 5,0 sugere que a existência de um microambiente ácido dificultaria as trocas iônicas.

5.2.3. Respostas antioxidantes

Muitos estudos tem demonstrado que a exposição a NP-TiO₂ leva a produção de ERO (Federici, 2007; Hao et al., 2009; Palaniappan and Pramod, 2010; Xiong et al., 2011; Clemente et al., 2013). A maior parte das ERO é produzida devido às propriedades catalíticas das NP-TiO₂, as quais na presença de luz podem transferir elétrons para substratos, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou compostos orgânicos clorados para gerar o radical hidroxil (Hirano, 2005; Federici, 2007; Clemente et al., 2013). Xiong et al. (2011) observaram que a produção de •OH em soluções de 50 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ em contato com o epitélio branquial causa sérios danos.

Para compensar a produção de ERO decorrente da exposição à xenobióticos, os teleósteos, assim como os mamíferos, possuem um sistema antioxidante bem desenvolvido capaz de transformar as ERO em substâncias não tóxicas para as células, controlando assim os danos celulares (Monteiro et al., 2003; Pandey et al., 2003; Paulino et al., 2012; Carmo, 2015).

A diminuição da produção de ERO nas brânquias de *P. lineatus* sugere que a exposição a pH ácido ou pH básico induz menor atividade metabólica responsável pela produção de ERO nesse órgão. A diminuição de ERO não alterou a atividade das enzimas do sistema antioxidante SOD e GPx e resultou em redução da atividade da CAT em ambos os pHs 5,0 e 8,0. Embora não tenha ocorrido redução da atividade da GPx e da enzima de biotransformação de fase II, GST, que utilizam a GSH como substrato, o nível de GSH diminuiu apenas nos animais expostos ao pH 5,0. Em consequência da redução de ERO em pH 8,0 houve uma redução nos níveis de peroxidação lipídica nesse grupo.

Em relação à exposição a NP-TiO₂, a diferença do diâmetro hidrodinâmicos dos aglomerados de NP-TiO₂ que foram maiores nos pH 5,0, poderia dificultar a entrada das NP no organismo e explicar a menor produção de ERO nesse grupo, quando comparados ao pH 7,0. A SOD é a primeira enzima a agir sobre as ERO sendo responsável pela dismutação do radical superóxido O₂⁻ em O₂ e H₂O₂. A SOD é muito sensível a estresses causados por poluentes e pode ser utilizada como um sinal indicativo de estresse oxidativo, sendo um alerta precoce de poluição ambiental (Hao et al., 2009). O aumento da atividade da SOD no grupo TiO₂-pH7 e redução no grupo TiO₂-pH8 sugere diferentes respostas das brânquias frente a NP-TiO₂ dependente do pH da água. A diminuição da atividade da SOD no grupo TiO₂-pH8 sugere que o sistema

de defesa antioxidante poderia estar sobrecarregado (Vander et al., 2003; Hao et al., 2009).

Concomitantemente, o aumento da CAT nos grupos TiO₂-pH5 e em TiO₂-pH8, a diminuição da CAT no grupo TiO₂-pH7 evidencia a influencia do pH da água nas respostas antioxidantes. O aumento da atividade da CAT nos pH5,0 e 8,0 podem ter ajudado na manutenção dos baixos níveis de ERO. A CAT é uma enzima chave no sistema de defesa antioxidante para converter os radicais livres H₂O₂ em água e oxigênio (Hao et al., 2009) e atua como suporte para o sistema glutathiona dependente, sendo acionada quando há altos níveis de H₂O₂, devido à baixa afinidade que possui pelo substrato. Por não depender da produção de GSH para funcionar, a CAT possui uma atividade rápida. A CAT se localizada principalmente nos peroxissomos (Shaw & Handy, 2012). Hand et al., (2008) sugere que a forma mais provável de transporte das NP-TiO₂ para dentro das células é a partir de vesículas (Figura 27), o que poderia indicar que os peroxissomos podem produzir CAT também para eliminar NP-TiO₂ das células. Hao et al. (2009) observaram diminuição na atividade da CAT nas brânquias de *Cyprinus carpio* expostos a diferentes concentrações de NP-TiO₂ (10, 50, 100 e 200 mg L⁻¹) nos primeiros dias de exposição que, segundo os autores, seria um indicativo de que sob estresse a atividade da CAT é inibida e as ERO gradualmente tendem a se acumular.

Apesar dos níveis de GSH não terem alterado com a exposição a NP-TiO₂, nota-se um aumento da atividade da GCL no grupo TiO₂-pH7, enzima responsável pela produção de GSH, o que sugere que o aumento da GSH pode ser um mecanismo acionado mais tardiamente, ou seja, em exposições mais prolongadas. Federici et al. (2007) verificou um aumento expressivo nos níveis de GSH nas brânquias de *Oncorhynchus mykiss* expostas à 1 mg L⁻¹ durante 14 dias em pH neutro. A diminuição dos níveis de GSH em pH 5,0 pode sugerir que sua produção pode ter sido afetada devido ao pH ácido.

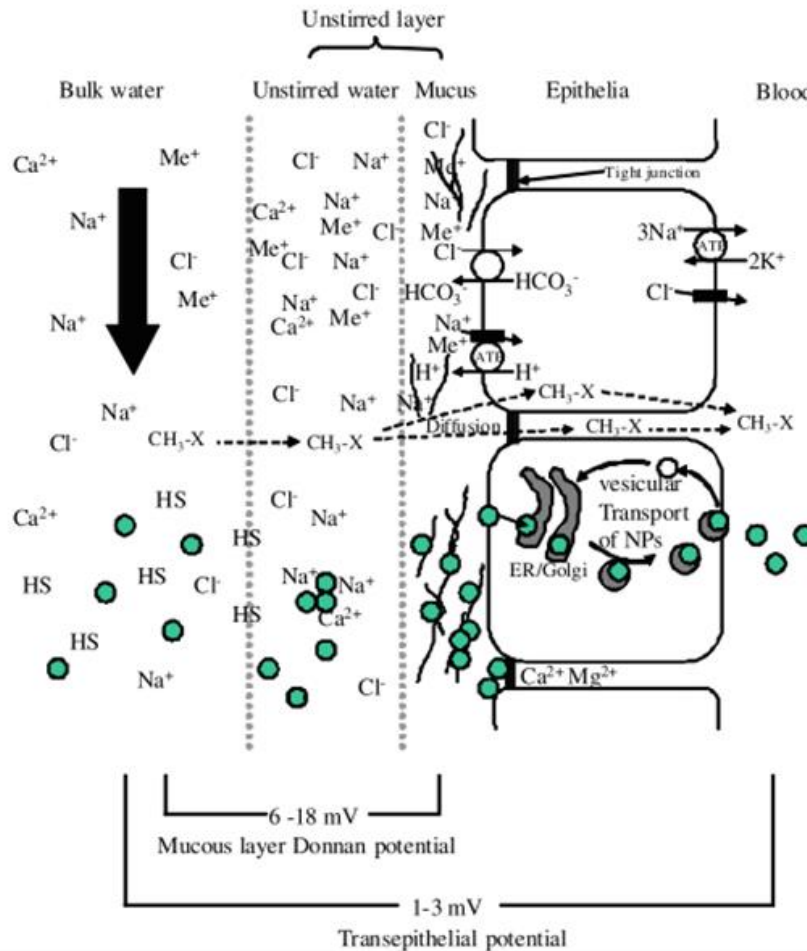


Figura 26. Diagrama das brânquias de peixe de água doce mostrando os mecanismos de absorção de eletrólitos e entrada a de NP-TiO₂ nas células do epitélio branquial a partir de transporte vesicular. Extraído de Shaw & Handy (2011).

5.2.4. Respostas morfológicas

A principal função das brânquias dos peixes é a respiração. A estrutura branquial é adaptada para tornar as trocas gasosas ocorram da forma mais eficiente possível (Guan & Lin, 2004). A estrutura delicada das brânquias pode sofrer danos pela ação de substâncias tóxicas e/ou abrasivas presentes no meio; porém, apesar da relativa fragilidade, normalmente há recuperação dos tecidos que constituem as brânquias quando as condições críticas são revertidas (Harper & Wolf, 2009; Carmo, 2015).

A hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar observadas nos grupos expostos à NP-TiO₂ assim como a fusão das lamelas observadas em maior frequência no grupo TiO₂-pH7 e o descolamento epitelial observado no grupo TiO₂-pH8 consistem em mecanismos de defesa que tendem a aumentar a distância de difusão água-sangue para evitar a absorção de componentes tóxicos, como NP-TiO₂. No entanto, embora essas alterações dificultem a entrada de substâncias tóxicas no organismo, elas podem

dificultar as trocas gasosas, podendo causar danos maiores como, vasodilatação dos vasos sanguíneos, rompimento do sistema de células pilares e formação de como observado no grupo TiO₂-pH8. Aumento na incidência de dilatação dos vasos, hiperplasia do epitélio da lamela e filamento, fusão lamelar também foram observados nas brânquias de truta arco-íris expostas à NP-TiO₂ (Federici et al., 2007) e *Cyprinus carpio* (Hao et al., 2009) expostas a NP-TiO₂ e *Danio rerio* exposição a suspensões de NP de cobre (Griffitt et al., 2007).

A exposição a diferentes pH e a NP-TiO₂ podem dificultar as trocas iônicas nos animais expostos. Muitas vezes, em condições de estresse, ocorrem hipertrofia e hiperplasia de CC, que são responsáveis pela absorção de íons Na⁺, Ca²⁺ e Cl⁻ em peixes de água doce. Porém, a proliferação das CC sugere um maior gasto energético dos animais na tentativa de manter a homeostase iônica e osmótica, podendo causar prejuízos em longo prazo (Paulino et al., 2012a). Em condições normais, as CC são encontradas principalmente no epitélio do filamento branquial, entretanto em águas pobres em íons como a maioria das águas continentais brasileiras, CC podem ser encontradas nas lamelas secundárias como em *P. lineatus* (Paulino et al., 2012b). No presente estudo, nos animais expostos a pH 5,0 e 8,0 houve hipertrofia e hiperplasia das CC quando comparados aos animais expostos a pH 7,0. A exposição a diferentes pH podem afetar a captação de íons nas brânquias, sendo a proliferação das CC uma tentativa de compensar o desequilíbrio iônico e osmótico.

A proliferação de CM é um mecanismo de defesa que dificultam a absorção de agentes tóxicos (Mallat, 1985; Paulino et al., 2012a). A densidade das CM pode variar dependendo das condições do ambiente (Moron et al., 2009). Contudo, o muco produzido e liberado pelas CM na superfície branquial pode dificultar as trocas gasosas.

Apesar dos danos histológicos observados neste estudo, as alterações histopatológicas encontradas são reversíveis caso as condições adversas sejam removidas. Porém, caso a exposição a essas condições permaneçam, os danos podem aumentar, podendo comprometer o funcionamento das brânquias (Sakuragui et al., 2003).

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho, a avaliação das características físico-químicas das NP-TiO₂ permitiu concluir:

1. A tendência a formar agregados, assim como o diâmetro hidrodinâmico dos agregados de NP-TiO₂ variam em pH diferentes; Em pH 5,0 diâmetro hidrodinâmico dos aglomerados foi maior, resultado que é corroborado pelo maior valor de potencial zeta das NP quando comparados aos pH 7,0 e 8,0; Esse fato pode ter dificultado a entrada das NP-TiO₂ no organismo, causando assim, menos danos aos peixes em pH 5,0 em relação aos outros grupos;
2. A concentração de NP-TiO₂ em suspensão na água diminui substancialmente podendo chegar a valores próximos a 16% (na ausência de agitação) da concentração colocada inicialmente após 24h. Isso pode ser explicado pelas elevadas concentrações a que os animais foram expostos, que fazem com que as partículas fiquem muito próximas umas das outras, facilitando sua agregação e consequente decantação.
3. Apesar da exposição a diferentes pH (ácido, básico e neutro) a morfologia das NP-TiO₂ se manteve.
4. A liberação de muco e a excreção de amônia pelos animais, assim como a agitação dos animais expostos podem ter contribuído para que uma maior concentração de NP-TiO₂ ficassem em suspensão na água, quando comparados aos testes preliminares, que foram realizados na ausência de peixe.

A avaliação de brânquias de *P. lineatus* expostos a 1 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ em pH ácido (5,0), neutro (7,0) e básico (8,0) durante 48 horas permitiu as seguintes conclusões:

1. A CL-50;48h das NP-TiO₂ em meio aquático em pH 5,0, 7,0 e 8,0 foi superior a 100 mg L⁻¹, sendo então considerada não-tóxica, de acordo com a classificação de Zuker (1985), para *P. lineatus*.
2. A exposição a NP pode causar alterações nas variáveis hematológicas em 48h de exposição; a exposição a diferentes pH afeta principalmente o número de células sanguíneas dos organismos expostos, que pode acarretar em um prejuízo ao transporte

de O₂ pelos eritrócitos, prejudicando a homeostase do organismo e, aumentando o gasto de energia na tentativa de manter o equilíbrio fisiológico;

3. A exposição à NP-TiO₂ nos pH testados indicaram desequilíbrio osmorregulatório por parte dos animais, uma vez que:

- A exposição à NP-TiO₂ (em pH 7,0) assim como a exposição a pH ácido (5,0) causou desequilíbrio sobre o equilíbrio iônico nos exemplares de peixe, o que provavelmente está relacionado principalmente com as alterações nas concentrações dos íons Cl⁻;
- A exposição a pH ácido e básico inibe a enzima AC; A exposição a NP-TiO₂ também pode inibir a atividade da AC em pH neutro.
- A exposição a NP e nos diferentes pH testados não alterou a área fracional e densidade das CC tipo I; contudo a exposição às NP alteraram a área fracional das CC tipo II, sendo que em pH 5,0 esse tipo de CC não foi identificado. Isso pode estar relacionado ao bloqueio das superfícies das CC tipo II (em cripta) pelos grandes agregados de NP presentes em pH 5,0, que pode ter dificultado bastante as trocas iônicas dessas células;

4. As alterações nas concentrações de ERO e da atividade das enzimas SOD, CAT e GCL podem indicar um desequilíbrio no sistema antioxidante dos animais expostos aos diferentes pH e a NP-TiO₂.

5. A exposição a NP-TiO₂ causou mais danos principalmente em pH 7,0, onde os agregados apresentam diâmetro hidrodinâmico médio menor quando comparado aos outros pH, corroborando com a hipótese de que quanto menor o tamanho dos aglomerados, maior a facilidade das NP entrarem no organismo dos animais expostos.

6. REFERÊNCIAS

- ABDELRAHIM, S. I., ALMAGBOUL, A. Z., OMER, M. E., ELEGAMI, A. Antimicrobial activity of *Psidium guajava*. **L. Fitoterapia**, 73: 713-715, 2002.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 1232.
- AL-GHANBOUSI, R.; BA-OMAR, T.; VICTOR, R. Effect of deltamethrin on the gills of *Aphanius dispar*: A microscopic study. **Tissue and Cell**, 44: 7– 14, 2012.
- ALAM, M.; FRANKEL, T. L. Gill ATPase activities of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell), and golden perch, *Macquaria ambigua* (Richardson): Effects of environmental salt and ammonia. **Aquacult.**, 251: 118-133, 2006.
- ALBERTO, A., CAMARGO, F. M., VERANI, J.R., COSTA, O. F. T. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 61: 247-255, 2005.
- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no brasil. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, 27: 2, 166-172, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 15088, Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. 2006, 19 p.
- AY, Ö.; KALAY, M.; TAMER, L.; CANLI, M. Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na,K-ATPase Activity. **Bull. Environ. Contam. and Toxicol.**, 62:160-168, 1999.
- BARLING, D. et al., A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **Europ. J. Biochem.**, 216: 579-586, 1993.
- BARRIONUEVO, W. R. ; FEMANDES, M. N. Critical thermal maxima and minima for curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, of two different sizes. **Aquac. Res.**, 26: 447-450, 1995.
- BAYNE, B. L.; BROWN, D. A.; BURNS, K.; DIXON, D. R.; IVANOVICI, A.; LIVINGSTONE, D. A.; LOWE, D. M.; MOORE, M. N.; STEBBING, A. R. D.; WIDDINGS, J. **The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals**. New York: Praeger, USA, 1985.
- BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary. **Int. J. Food Sci. Nut.** 47: 233-261, 1996.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Dis.**, 22: 25-34, 1999.

- BERMUDEZ, E.; MANGUM, J. B.; WONG, B. A.; ASGHARIAN, B.; HEXT, P. M.; WARHEIT, D. B.; EVERITT, J. I. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. **Toxicol.Sci.**, 77: 347–357, 2004.
- BEUTLER, E.; DUROM, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, 6: 882-890, 1963.
- BONETTO, C., CORDIVIOLA DE YUAN, E., PIGNALBERI, C. Nuevos datos sobre poblaciones de peces en ambientes leníticos permanentes del Parana Medio. **Physis**, 30: 141–154, 1970.
- BRANDÃO, F. D. Identificação, quantificação e controle de defeitos em monocristais e nanopartículas de TiO₂. 2008. 130f. **Dissertação** (Mestrado em Física) – Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- BRAR, S. K., VERMA, M., TYAGI, R. D., SURAMPALLI, R.Y. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. **Waste Management**, 30: 504–520, 2010.
- BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G.; GOLIMOWSKI, J. URBAN, P. L., Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. **Waste Managem.**, 29: 2587–2595, 2009.
- CAMARGO, M.M.P.; Martinez, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environ. Toxicol. and Pharm.**, 21: 61–69, 2006.
- CARMO, T. L. L. Efeito da exposição à nanopartícula de dióxido de titânio (NP-TiO₂) em curimatá (*Prochilodus lineatus*, Teleostei): aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos. 2015. 105f. **Tese** (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- CARMONA, R.; GARCIA-GALLEGO, M.; SANZ, A.; DOMEZAIN, A.; OSTOS-GARRIDO, V. Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens. **J. of Fish Biol.**, 64: 553–566, 2004.
- CAVICCHIOLI-AZEVEDO, V. Efeitos do cobre sobre o estresse oxidativo na anêmona-do-mar *Actinia bermudensis*. **Monografia** apresentada ao curso de Oceanologia – Universidade Federal do Rio Grande, 2011, 44p.
- CAVICCHIOLI-AZEVEDO, V. Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de *Poecillia vivípara* aclimatados a diferentes salinidades. 2013. 105f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquacult.**, 251: 109-117, 2006.

CAZENAVEA, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M.J.; SCARABOTTI, P.A.; WUNDERLIN, D.A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environ. Pollut.**, 157: 3025–3033, 2009.

CENTI, G., CIAMBELLI, P., PERATHONER, S., RUSSO, P. Environmental catalysis: trends and outlook. **Catal. Today**, 75: 3–15, 2002.

CERQUEIRA, C. C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after Cooper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus Scrofa*. **Ecotoxicol. and Environ. Saf.**, 52: 83–91, 2002.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V.L.; FEITOSA, L.O.; LIMA, R.; JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N.; FRACETO, L.F. Fish exposure to nano-TiO₂ under different experimental conditions: Methodological aspects for nanoEcotoxicol. investigations. **Sci. of the Total Environ.**, 463–464: 647–656, 2013.

COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Can. Med. Assoc. J.**, 50: 550-552, 1944.

CORRÊA E CASTRO, R.M. Revisão taxonômica da família Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes). Thesis, São Paulo, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1990.

CUMINGS, B. Na Pump. Publishing by. Pearson Education, Inc. Department of Biology. University of Miami. Florida. Disponível em: <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/memb/c8x15NaK-pump.jpg>. Acesso em 05/08/2015.

DEPLEDGE, M. H., FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment. **Ecotoxicol.**, 3: 161-172, 1994.

DI GIULIO, R. T. MEYER, J. N. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: **The toxicology of fishes**. Boca Raton: CRC Press, 2008, p. 273-324.

DINIZ, M. S.; MATOS, A. P. A.; LOURENÇO, J.; CASTRO, L.; PERES, I.; MENDONÇA, E.; PICADO, A. Liver Alterations in two freshwater fish species *Carassius auratus* and *Danio rerio* following exposure to different TiO₂ nanoparticle concentrations. **Microsc. Microanal.**, 19: 1131–1140, 2013.

DONALDSON, K., STONE, V., GILMOUR, P.S., BROWN, D.M., MACNEE, W. Ultrafine particles: mechanisms of lung injury. **Philos. Trans. Royal Soc. Lond.**, 358: 2741–2749, 2000.

DUDLER, R. Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J., & Mauch, F. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferase. **Mol. Plant Microbe Inter.**, 4: 14-18, 1991.

EKINCI, D.; BUGRAHAN CEYHUN, S. B., SENTÜRK, M., ERDEM, D.; KÜFREVIÖG, Ö. I., SUPURAN, C.T. Characterization and anions inhibition studies of

an a-carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19: 744–748, 2011.

ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 1998, 602 p.

EVANS D. H., PIERMARINI P. M., POTTS, W. T. W. Ionic transport in the fish gill epithelium. *J. Exp. Zool.*, 283: 641–652, 1999.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.*, 85: 97–177, 2005.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrit.*, 18: 872-879, 2002.

FENERICH-VERANI, N., GODINHO, M. H., NARAHARA, M. Y. The size composition of the eggs of curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). *Aquacult.*, 42: 37-41, 1984.

FEYNMAN, R. There ' s Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science*, 22, 1960.

FECKLER, A.; ROSENFELDT, R. R.; SEITZ, F.; SCHULZ, R.; BUNDSCHUH, M. Photocatalytic properties of titanium dioxide nanoparticles affect habitat selection and food quality for a key species in the leaf litter decomposition process. *Environ. Pollut.*, 196: 276-283, 2015.

FENT, K.; LOOSER, P. W. Bioaccumulation and bioavailability of tributyltin chloride: influence of pH and humic acids. *Wat Res.* 29: 7, 1631-1637, 1995.

FORGAC, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Ver. Molec. Cell Bio.*, 8: 917–929, 2007.

GILMOUR, K. M.; PERRY, S. F. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. *The J. of Exp. Bio.*, 212: 1647-1661, 2009.

GOKSOYR, A.; FÖRLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.*, 22: 287-312, 1992.

GOLDENFA, P. B. BOWYER, F. P. HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in hematology laboratory – Microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.*, 56: 35-39, 1971.

GOMES, L. C.; Agostinho, A. A. Influence of the flooding regime on the nutritional state and juvenile recruitment of the curmba, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, in upper Paraná River, Brazil. *Fisheries Manag. and Ecol.*, 4: 263-274, 1997.

- GRIFFITT R, WEIL R, HYNDMAN K, DENSLOW N, POWERS K, TAYLOR D, BARBER D. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). **Environ. Sci. Technol.**, 41: 8178–8186, 2007.
- GROSELL, M.; WOOD, C. M. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. **The J. of Exp. Bio.** 205: 1179–1188, 2002.
- GUMBLETON, M. Caveolae as potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium. **Adv. Drug Deliver. Rev.** 49: 281–300, 2001.
- HABIG, W. H. PABST, M. J.; JAKOBI, W. B. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, 249: 7130-7139, 1974.
- HALAPPANAVAR, S.; SABER, A. T.; DECAN, N.; JENSEN, K. A.; WU, D.; JACOBSEN, N. R.; GUO, C.; ROGOWSKI, J.; KOPONEN, I. K.; LEVIN, M.; MADSEN, A. M.; ATLURI, R.; SNITKA, V.; BIRKEDAL, R. K.; RICKERBY, D.; WILLIAMS, A.; KAN WALLIN, H.; YAUK, C. L.; VOGEL, U. Transcriptional profiling identifies physicochemical properties of nanomaterials that are determinants of the in vivo pulmonary response. **Environ. and Molec. Mutag.** 00:00-00, 2014.
- HAHN, M.E. Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment. **Sci. Total Environ.** 289: 49–69, 2002.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. UK: Oxford University Press, 1999, 936p.
- HANDY, R. D.; EDDY, F. B. Transport of solutes across biological membranes in eukaryotes: an environmental perspective. In: van Leeuwen, H. P.; Köster, W. **Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces**. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, p. 338-352, 2004.
- HANDY R. D.; SHAW B. J. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. **Health Risk Soc.**, 9: 125–144, 2007.
- HANDY R. D., KAMMER, F.V.D.; LEAD, J. R., HASSELLÖV, M.; OWEN, R.; CRANE, M. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. **Ecotoxicol.**, 17:287–314, 2008a.
- HANDY R. D., VALSAMI-JONES, E., OWEN, R. The Ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. **Ecotoxicol.**, 17: 315-325, 2008b.
- HARPER, C. L.; WOLF, J. Morphologic effects of the stress response in fish. **Mar J.**, 50: 387-396, 2009.
- HIRANO, K., NITTA, H., SAWADA, K. Effect of sonication on the photo-catalytic mineralization of some chlorinated organic compounds. **Ultrason. Sonochem.** 12: 271–276, 2005.

HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. **Comp. Biochem. Physiol.**, 136: 593–620, 2003.

HOPKINS, J.; TUDHOPE, G.R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **J. Haematol.** 25: 563–575, 1973.

HORISBERGER, J.D. Recent insights into the structure and mechanisms of the sodium pump. **Physiol.**, 19, 377–387, 2004.

HOWARD, C.V., MAYNARD, R.L. **Particulate Matter: Properties And Effects Upon Health.** New York : Oxford BIOS Scientific Publishers, 63–84p, 1999.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, 31: 5, 1170-1179, 2008.

INOKUCHI, M.; HIROI, J.; WATANABE, S.; HWANG, P.; KANEKO, T. Morphological and functional classification of ion-absorbing mitochondria-rich cells in the gills of Mozambique tilapia. **The J. of Exp Bio**, 212: 1003-1010, 2009.

JENSCH-JUNIOR, B.E., PRESSINOTTI, N., BORGES, J.C.S., SILVA, J.R.M.C. Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). **Aquacult.**, 251: 509 – 515, 2005.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P.; Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol Orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, 26: 853-856, 1991.

JU-NAM, Y.; LEAD, J. R.; Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. **Science Of The Total Environment**, 400: 396–414, 2008.

KOVRIŽNYCH, J. A.; SOTNÍKOVÁ, R.; ZELJENKOVÁ, D.; ROLLEROVÁ, E.; SZABOVÁ, E.; WIMMEROVÁ, S. Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) tested in adulthood and in early life stages – comparative study. **Interdiscip. Toxicol.**, 6(2): 67–73, 2013.

LAURENT, P., DUNEL, S. Morphology of gill epithelia in fish. **Am. J. Physiol.**, 238: R147–159, 1980.

LAURENT, P. Gill internal morphology. In: HOAR W.S., RANDALL, D. J., editors. **Fish Physiol.** Orlando: Academic Press v. XA. 73–183, 1984.

LEVINE, K.E., FERNANDO, R.A., LANG, M., ESSADER, A., WONG, B.A. Development and validation of a high-throughput method for the determination of titanium dioxide in rodent lung and lung-associated lymph node tissues. **Anal. Lett.** 36 (3): 563–576, 2003.

LI, L.; JIA, Y., LI, P.; YIN, S.; ZHANG, G.; WANG, X.; WANG, Y.; WANG, X.; ZANG, X.; DING, Y. Expression and activity of V-H⁺-ATPase in gill and kidney of

- marbled eel *Anguilla marmorata* in response to salinity challenge. **J. of Fish Biol.**, 87: 28–42, 2015.
- LIN, H.; PFEIFFER, D. C.; VOGL, A. W.; PAN, J.; RANDALL, D. J. Immunolocalization of H⁺-ATPase in the gill epithelia of rainbow trout. **J. Exp. Biol.** 195: 169–183, 1994.
- LIVINGSTONE, D.R., LEMAIRE, P., MATTHEWS, A., PETERS, L., BUCKE, D., LAW, R.J. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. **Mar. Pollut. Bull.** 26: 602 – 606, 1993.
- LOVERN, S. B.; KLAPER, R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. **Environ.Toxicol. and Chem.**, 25 (4): 1132 – 1137, 2006.
- LUNDQVIST, M.; SETHSON, I.; JONSSON, B. H. Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles curvature and the protein stability. **Langm.**, 20 (24): 10639 – 10647, 2004.
- MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. UNOPAR Cient., **Ciênc. Biol. Saúde**, 1: 63-76, 1999.
- MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants : a statistical review. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 42: 630-648, 1985.
- MAHER, P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. **Ag. Res. Rev.**, 4: 288–314, 2005.
- MAIER, M. H. Ecologia da bacia do rio Jacaré Pepira (47°55' – 48°55'W; 22°30' – 21°55'S – Brasil): qualidade da água do rio principal. **Ciênc. e Cult.**, 39(2): 164-185, 1987.
- MAMALIS, A. G. Recent advances in nanotechnology. **J. Mater. Process. Technol.** 181: 52, 2007.
- MANOKARAN, S.; ZHANG, X.; CHEN, W.; SRIVASTAVA, D. K. Differential modulation of the active site environment of human carbonic anhydrase XII by cationic quantum dots and polylysine. **Biochim. Biophys. Acta**, 1804 (6): 1376 – 1384, 2010.
- MARIEB, E. N.; HOEHN, K. **Anatomia e fisiologia**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 1050p.
- MARTINEZ, C.B.R., SOUZA, M.M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comp. Biochem. and Physiol.**, 133: 151–160, 2002.
- MARTINS, L. P. A. Toxicidade e alterações hematológicas, morfofuncionais, bioquímicas e genéticas em curimatás, *Prochilodus lineatus*, (Teleostei, Prochilodontidae) expostos ao fenantreno. 2012. 92f. **Dissertação** (Mestrado em

Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

MASSUI, D.C.; FURRIEL, R.P.M.; SILVA, E.C.C.; MANTELATTO, F.L.M.; MCNAMARA, J.C.; BARRABIN, H.; SCOFANO, H.M.; FONTES, C.F.L.; LEONE, F.A. Gill microsomal (Na⁺K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. **Int. J. of Biochem. and Cell Biol.**, 37: 2521–2535, 2005.

MAZON, A.F.; CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill Cellular Changes Induced by Copper Exposure in the South American Tropical Freshwater Fish *Prochilodus scrofa*. **Environm. Res. Sect. A.**, 88: 52-63, 2002.

McCORD, J.E.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, 244: 6049-6055, 1969.

McDONALD, D. G.; HOBE, H.; WOOD, C. M. The influence of calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to low environmental pH. **J. Exp. Biol.**, 88: 109-131, 1980.

MEDINA-REYES, E. I.; DÉCIGA-ALCARAZ, A.; FREYRE-FONSECA, V.; DELGADO-BUENROSTRO, N. L.; FLORES-FLORES, J. O.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F.; SÁNCHEZ-PÉREZ, Y.; GARCÍA-CUÉLLAR, C. M.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; CHIRINO, Y. I. Titanium dioxide nanoparticles induce an adaptive inflammatory response and invasion and proliferation of lung epithelial cells in chorioallantoic membrane. **Environm. Res.**, 136: 424–434, 2015.

MEISTER, A. ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu. Ver. Biochem.**, 52: 711-760, 1983.

MIRON, D.S.; MORAES, B.; BECKER, A. G.; CRESTANI, M.; SPANEVELLO, R.; LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). **Aquacult.**, 277 (3-4): 192-196, 2008.

MIRON, D. S.; BECKER, A. G.; LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Waterborne ammonia and silver catfish, *Rhamdia quelen*: survival and growth. **Cienc. Rural**, 41, 2, 349-353, 2011.

MONTEIRO, D. A.; ALMEIDA, J. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comp. Biochem. and Physiol.**, Part C 143: 141 – 149, 2006.

MORON, S. E.; OBA, E. T.; ANDRADE, C. A.; FERNANDES, M. N. Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the Erythrinids *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **J. of Exp. Zool.**, 298: 93-104, 2003.

NAKAMURA, W.; HOSODA, S., & HAYASHI, K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. **Biochem. Biophys. Acta**, 358: 251-261, 1974.

- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.**, 31: 1287-1312, 2001.
- NUSSEY, G., VAN VUREN, J. H. J., DU PREEZ, H. H. Effect of copper on the differential white blood cell counts of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Comp. Biochem. Physiol.**, 11(3): 381-388, 1995.
- ÖBERDÖRSTER, G. Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies. **Philos. Trans. Royal Soc. Lond.** 358: 2719–2740, 2000.
- OGA, Z. **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 530 p.
- ÖBERDÖRSTER, G. Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies. **Philosop. Trans. Royal Soc. of London**, 358: 2719–2740, 2000.
- OLIVEIRA, C.; SABOYA, S.M.R.; FORESTI, F.; SENHORINI, J.A.; BERNARDINO, G. Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. **Heredity**, 79: 473-476, 1997.
- OSTROWSKI, A. D.; WATANABE, W. O.; MONTGOMERY, F. P.; REZEK, T. C.; SHAFER, T. H.; MORRIS JR. J. A. Effects of salinity and temperature on the growth, survival, whole body osmolality, and expression of Na⁺/K⁺ATPase mRNA in red porgy (*Pagrus pagrus*) larvae. **Aquacult.**, 314:193–201, 2011.
- PALANIAPPAN, P.R., PRAMOD, K.S. FTIR study of the effect of nTiO₂ on the biochemical constituents of gill tissues of Zebrafish (*Danio rerio*). **Food Chem. Toxicol.** 48, 2337-2343, 2010.
- PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **The Sci. of the Total Environm.**, 309, 105–115, 2003.
- PAULINO, M.G.; SOUZA, N.E.S.; FERNANDES, M.N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicol. and Environm. Saf.**,80: 6–13, 2012a.
- PAULINO, M.G.; SAKURAGUI, M.M.; FERNANDES, M.N. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. **Chemosp.** 86: 1–7, 2012b.
- PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Quim. Nova**, 33 (2): 421-430, 2010.
- PEREIRA, J. C. Estudo do comportamento de nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes suspensões. 2010. 89f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de materiais) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

- PHILPOTT, C. W. Tubular system membranes of teleost chloride cells: osmotic response and transport sites. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 238: R171–R184, 1980.
- PIRKANNIEMI, K., SILLANPÄÄ, M. Heterogeneous water phase catalysis as an environmental application: a review. **Chemosp.**, 48: 1047–1060, 2002.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MUKLLER, R.; LLOYD, R. Eds. **Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish**. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1994, p. 339-352.
- POWELL, M.D., SPEARE, D.J., WRIGHT, G.M. Comparative ultrastructural morphology of lamellar epithelial, chloride and mucous cell glycocalyx of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill. **J. Fish Biol.**, 44: 725 – 730, 1994.
- PRIYA, K. K.; RAMESH, M.; SARAVANAN, M.; PONPANDIAN, N. Ecological risk assessment of silicon dioxide nanoparticles in a fresh-water fish *Labeo rohita*: Hematology, ionoregulation and gill Na/K-ATPase activity. **Ecotoxicol. and Environm. Saf.**, 120: 295–302, 2015.
- QU, R.; FENG, M.; WANG, X.; QIN, L.; WANG, C.; WANG, Z.; WANG; L. Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under diferente pH values. **Aquatic Toxicol.** 150: 9–16, 2014.
- QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, São Paulo, 27 (6), 1028-1029, 2004.
- RAMSDEN, C. S.; HENRY, T.B.; HANDY, R.D. Sub-lethal effects of titanium dioxide nanoparticles on the physiology and production of zebrafish. **Aquatic Toxicol.** 126: 404–413, 2013.
- ROBERTS, R. J. The Aquatic Environment. In: **Fish Pathology**. 4 ed. Glasgow: Blackkweel Publishing Ltd, 2012, 1-16.
- ROLA, R. C.; MONTEIRO, M. C.; REIS, S. R. S.; SANDRINI, J. Z. Molecular and biochemical biomarkers responses in the mussel *Mytilus edulis* collected from Southern Brazil coast. **Mar. Pollut. Bullet.**, 64: 766–771, 2012.
- ROSSETTO, A. L. O. F. Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula. 2012. 122f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia ambiental) – Centro tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; SAKURAGUI, M. M.; PAULINO, M. G.; MARISA N. FERNANDES. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. **Environ. Monit. Assess**, 181:29–42, 2011.

SAKURAGUI, M.M.; SANCHES, J.R.; FERNANDES, M.N. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. **J. Comp. Physiol.**, 173: 309-317, 2003.

SANTHOSHKUMAR, T.; RAHUMAN, A. A.; JAYASEELAN, C.; RAJAKUMAR, G.; MARIMUTHU, S.; KIRTHI, A. V.; VELAYUTHAM, K.; THOMAS, J.; SMITH, C.E., PIPER, R.G. Lesions associated with chronic exposure to ammonia. In: RIBELIN, W.E., MIGAKI, G. (Eds.), **The pathol. of fishes**. Madison: University of Wisconsin Press, 1975, p. 497 – 514.

SALATA, O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **J. of Nanobiotech.**, 2-3, 2004.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 38: 995 – 1014, 2005.

SCHENONE, N. F.; AVIGLIANO, E.; GOESSLER, W.; CIRELLI, A. F.; Toxic metals, trace and major elements determined by ICPMS in tissues of *Parapimelodus valenciennis* and *Prochilodus lineatus* from Chascomus Lake, Argentina. **Microchem. J.**, 112: 127–131, 2014.

SCHLENK, D.; DAVIS, K.B.; GRIFFIN, B.R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to cooper sulphate. **Aquacult.**, 177: 367-379, 1999.

SEATON, A.; DONALDSON, K. Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. **The Lancet**, 365: 923-924, 2005.

SEGALA, K. Síntese e Caracterização de nanocompostos funcionais. 2009. 299 f. **Tese** (Doutor) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SHARMA, Y. C.; SRIVASTAVA, V.; SINGH, V. K.; KAUL, S. N.; WENG, C.H. Nano-adsorbents for the removal of metallic pollutants from water and wastewater. **Environ. Technol.**, 30; 583, 2009.

SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. **Environ. Intern.**, 37: 1083–1097, 2011.

SHEPHARD, K. L. The influence of mucus on the diffusion of ions across the esophagus of fish. **Physiol. Zool.**, 55: 23, 1982.

SHEPHARD, K. L. The effect of mucus and mucilaginous materials on ion distributions at epithelial surfaces. Pp. 123- 130. In: CHANTLER, E. & N. A. RATCLIFFE (Eds.). **Mucus and Related Topics**. Cambridge: Company of Biologist Limited, 1989, 471p.

SHI, H., SUI, Y., WANG, X., LUO, Y., JI, L. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 140: 115 – 121, 2005.

- SHIKANO, T.; FUJIO, Y. Immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase in branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and freshwater acclimation. **J. Exp. Biol.**, 201: 3031–3040, 1998.
- SHIOGIRI, N. S.; PAULINO, M. G.; CARRASCHI, S. P.; BARALDI, F. G.; CRUZ, C.; FERNANDES, M. N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environ. Toxicol. and Pharm.**, 34: 388–396, 2012.
- SCHULTZ, A. G.; ONG, K. J.; MacCORMACK, T.; MA, G.; VEINOT, J. G. C.; GOSS, G. G. Silver nanoparticles inhibit sodium uptake in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environ. Sci. Technol.**, 46: 10295 – 10301, 2012.
- SIBBING, F. A.; URIBE, R. Regional specialization in the oro – pharyngeal wall and food processing in the carp *Cyprinus carpio*. **Neth. J. Zool. Leiden**, 35: 377 – 422, 1985.
- SILVA, A. E. P.; ANGELIS, C. F.; MACHADO, L. A. T.; WAICHAMAN, A. V. Influência da precipitação na qualidade da água do Rio Purus. **Acta Amaz.**, Amazonas, 38(4): 733-742, 2008.
- SILVA, A. O.F; Martinez, C. B.R.; Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. **Aquat. Toxicol.**, 156: 161–168, 2014.
- SIMONATO, J.D.; Guedes, C.L.B.; Martinez, C.B.R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicol. and Environ. Saf.**, 69: 112–120, 2008.
- SOLLID, J.; NILSSON, G. E. Plasticity of respiratory structures — Adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. **Resp. Physiol. & Neurobiol.**, 154: 241–251, 2006.
- SRIVASTAVA, V.; GUSAIN, D.; SHARMA, Y. C. Critical review on the toxicity of some widely used engineered nanoparticles. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 54: 6209–6233, 2015.
- STEGEMAN, J.J., BROUWER, M., RICHARD, T.D.G., FÖRLIN, L., FOWLER, B.A., SANDERS, B.M., VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGETT, R.J., KIMERLY, R.A., MEHRLE, P.M., JR, BERGMAN, H.L. (Eds.), **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress**. Chelsea: Lewis Publishers, 235-335, 1992.
- STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptation in nature. **Braz. J. Med. Res.**, 29: 1715-1733, 1996.
- TANIGUCHI, N. On the basic concept of “Nanotechnology”. Proc. Intl. Conf. Eng. Tokyo, Part II, Japan, **Soc. of Prec. Eng.**, 18-23, 1974.

- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress, 2004, 144p.
- THURSTON, R.V., RUSSO, R.J., LUEDTKE, R.J., SMITH, C.E., MEYN, E.L., CHAKOUMALOS, C., WANG, K.C., BROWN, C.J.D. Chronic toxicity of ammonia to rainbow trout. **Trans. Am. Fish. Soc.**, 113, 56 – 73, 1984.
- VAN DER OOST, R.; Beyer, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. and Pharm.**, 13, 57–149, 2003.
- VENKATESAN, J.; KIM, S. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Psidium guajava* extract and its antibacterial and antioxidant properties. **Asian Pacif. J. of Trop. Med.**, 968-976, 2014.
- VITALE, A. M.; MONSERRAT, J.M.; CASTHILO, P.; RODRIGUEZ, E.M. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comp. Biochem. and Physiol.**, 122, 121–129, 1999.
- XIONG, D.; FANG, T.; YU, L.; SIMA, X.; ZHU, W. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. **Sci. of the Total Environ.**, 409, 1444–1452, 2011.
- WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology.**; London: Taylor & Francis, 1996.
- WHITE, C. C.; VIERNES, H.; KREJSA, C. M.; BOTTA, D.; KAVABAGG, D. T. J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. **Anal. Biochem.**, 318: 175-180, 2003.
- WILHELM-FILHO, D.; MARCON, J.L. Antioxidant defenses in fish of the Amazon. In: Val, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds). **Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus: INPA, 299-312. 1996.
- WILCE, M. C.; PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferase. **Biochim. Biophys. Acta**, 1205, 1-18, 1994.
- WEIR, A., WESTERHOFF, P., FABRICIUS, L., HRISTOVSKI, K., VON GOETZ, N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. **Environ. Sci. Technol.**, 46: 2242-2250, 2012.
- WOOD, C.M., MUNGER, R.S., TOEWS, D.P. Ammonia, urea, and H⁺ distribution and the evolution of ureotelism in amphibians. **J. of Exp. Bio.**, 44, 215–233, 1989.
- WOOD, C. M. Toxic responses of the gill. In: **Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts** (ed. W. H. Benson and D. W. Schleuh). Washington, DC: Taylor & Francis, 1–87, 2001.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*. Rima, 2006; 478p.

ZENG, W. M.; GAO, L.; GUO, J. K. A New Sol-Gel Route Using Inorganic Salt for Synthesizing Al₂O₃ Nanopowders. **Nanostruct. Mater.** 10: 543, 1998.

ZHANG, X.; SUN, H.; ZHANG, Z.; NIU, Q.; CHEN, Y.; CRITTENDEN, J. C. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. **Chemosp.**, 67: 160–166, 2007.