

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
MONITORAMENTO AMBIENTAL

BRUNO FERNANDO SANTOS DE SOUZA

**EFEITO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA  
EM GIRINOS DE *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) SOBRE  
BIOMARCADORES EM DIFERENTES NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO  
BIOLÓGICA**

SOROCABA / SP

2019



BRUNO FERNANDO SANTOS DE SOUZA

Efeito de nanotubos de carbono de parede múltipla em girinos de *Lithobates catesbeianus*  
(SHAW, 1802) sobre biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da Universidade Federal de São Carlos; para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Área de Concentração:

Monitoramento Ambiental

Linha de pesquisa:

Ambiente e Saúde

Orientadora:

Profa. Dra. Monica Jones Costa

Coorientadora:

Profa. Dra. Eliane Pintor de Arruda Moraes

Financiamento:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Sorocaba / SP

2019

de Souza, Bruno Fernando Santos

Efeito de nanotubos de carbono de parede múltipla em girinos de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) sobre biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica / Bruno Fernando Santos de Souza. – Sorocaba: [s.n.], 2019.  
125 f. : 29 il.

Orientadora: Dra. Monica Jones Costa.

Coorientadora: Dra. Eliane Pintor de Arruda Moraes.

Dissertação (Mestrado – Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, 2019.

#### Bibliografia

1. Ecotoxicologia. 2. Rã-touro. 3. Resposta fisiológica. 4. Surfactante. 5. Nanotoxicologia. I. de Souza, Bruno Fernando Santos. II. Costa, Monica Jones. III. Arruda-Moraes, Eliane Pintor. IV. Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade. V. Efeito de nanotubos de carbono de parede múltipla em girinos de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) sobre biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica.

CDU –



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Bruno Fernando Santos de Souza, realizada em 28/02/2019:

---

Profa. Dra. Monica Jones Costa  
UFSCar

---

Profa. Dra. Eliane Pintor de Arruda Moraes  
UFSCar

---

Profa. Dra. Cleonir dos Santos Carvalho  
UFSCar

---

Profa. Dra. Raquel Fernanda Salla  
UNICAMP



Dedico deste trabalho a todos os que me cederam um pouco de seu tempo e conhecimento, os bens mais belos a serem doados e os mais preciosos a serem recebidos. De forma especial, ao querido professor Dr. Romário de Araújo Mello (1949 – 2018<sup>†</sup>).



## Agradecimentos

A presente dissertação não seria realizada sem o apoio de diversas pessoas e instituições.

Agradeço especialmente à minha orientadora Professora Doutora Monica Jones Costa, pela valorização da profissão biólogo(a), pelo exemplo moral e ético, por todo o carinho, paciência e tempo dedicado à minha mentoria e por sua amizade ao longo dos anos.

Agradeço à minha coorientadora Professora Doutora Eliane Pintor de Arruda Moraes, pela concessão da utilização do laboratório de pesquisa, pelo carinho, pelo tempo de bancada juntos durante a pesquisa e tempo de dedicação em minha orientação.

Agradeço imensamente às Professoras Doutoras Elaine Conceição de Oliveira, Leonilda Maria Barbosa dos Santos e Silvia Pierre Irazusta pela colaboração em todas as etapas, concessão da nanopartícula aqui utilizada e pela disponibilização de seus laboratórios.

Agradeço às Professoras Doutoras Cleoni dos Santos Carvalho, Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin, Iolanda Cristina Silveira Duarte, Raquel Fernanda Salla Jacob por aceitarem participar da banca de qualificação e de defesa.

Agradeço aos Professores(as) Doutores(as) André Cordeiro Alves Dos Santos, Elizabeth Pelosi Teixeira, Joseli Vergara, Letícia Souto, Lilian Franco-Belussi, Mírian Liza Alves Forancelli Pacheco pela amizade e suporte.

Agradeço especialmente à Cristiane Ronchi de Oliveira, à Heidi Samantha Moraes Utsunomiya e ao Samuel Espinosa Dal Medico pela estimo e por todo o suporte técnico e emocional em todas as etapas desta pesquisa.

Agradeço aos colegas de Pós-Graduação, em particular ao Douglas Eleutério, ao Felipe Augusto Pinto Vidal, à Jéssica Cristina Almeida, à Josimere Conceição de Assis, à Rafaela Tadei e à Thais Marinho pela amizade.

Agradeço aos colegas de laboratório, singularmente, à Amanda Pachu, à Camila Fidelis, à Camila Prata, à Eliane Morgado, à Elisabete Tsukada, à Gyovanna Gonçalves, ao Leonardo Antonio Teixeira de Oliveira, ao Luciano Vinícius da Silva Pereira, à Mariana Oschvat, ao Otávio Braghetto Pescarini e à Rielly Magalhães pela recepção, auxílio e companheirismo.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental e à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela oportunidade do Ensino Superior gratuito e de excelência. Igualmente à Faculdade de Tecnologia de Sorocaba (FATEC-SO) e à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela colaboração.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos durante todo o período de meu treinamento.

Agradeço aos meus amigos Beatriz Pereira, Brenda Saori, Celso Pessôa, Daniele Feliciano, Danúbia Nunes, Evelin Gebaile Schneider, Fernando Urban, Gabriela Pereira, Gabrielle Caetano, Gustavo Meireles, Izabel Carvalho, Jane Dokko, Joelma Prado, Karen Evelin, Layanna Fekete, Letícia Jones, Lucas Fernandes, Luiz Fernando Moura, Maik Wiest, Marília L. Fernandes, Mayara Kisch, Michelle Marrie, Mônica Almeida, Pamela Baldessini, Rafael Beltran, Silas Príncipe, Thais Torres e Verônica Jones Costa pela compreensão e apoio.

Agradeço à minha família por todo o suporte e apoio.



*“Olhe profundamente a natureza, e então  
você vai entender tudo melhor.”*

*Albert Einstein.*

*“O verdadeiro tesouro da Nação está nos  
recursos da terra: solo, água, florestas, minerais  
e vida silvestre.”*

*Rachel Carson.*

*“Na natureza não há recompensas ou  
punições, há consequências.”*

*Robert Green Ingersoll.*



## Resumo

A busca pelo aprimoramento de materiais trouxe consigo o desenvolvimento de nanopartículas, cujas consequências ambientais e à saúde ainda são pouco compreendidas. Agregado a esse contexto, o drástico declínio das populações de anfíbios representa uma problemática, cuja parcial causa é dada a elevada susceptibilidade a poluentes desse grupo. Dessa maneira, o presente estudo se propôs a investigar o potencial tóxico das partículas de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) às concentrações de 0,1 e 10 mg.L<sup>-1</sup> associados ao surfactante Pluronic™ F-127 (0,1%) e ao surfactante isolado em girinos de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*, SHAW, 1802) através de biomarcadores sobre diferentes níveis de organização biológica. Os animais (n = 12 por grupo) foram expostos individualmente (96 horas), tendo os resultados comparados ao grupo controle. Os animais foram submetidos à fotografia, medições corpóreas, contagem da frequência cardíaca e punção sanguínea (contagem total de eritrócitos, diferencial de leucócitos, anormalidades nucleares e ensaio cometa). Houve redução da massa corpórea, sem alteração do tamanho corpóreo, nível de atividade e estágio de desenvolvimento; indicando desvio energético à processos de desintoxicação dos xenobióticos. Também houve taquicardia nos grupos 0,1% Pluronic™ F-127 e 10 mg.L<sup>-1</sup> MWCNT + Pluronic™, sem alteração da menor concentração da nanopartícula, indicando o aumento do desempenho cardíaco relacionado a resposta homeostática para aumentar a perfusão e oxigenação de tecidos responsáveis pela desintoxicação, corroborado pelo aumento de eritrócitos no grupo 0,1% Pluronic™ F-127. A resposta imunológica associada aos xenobióticos indicaram hipersensibilidade (resposta alérgica) aos MWCNTs e neutropenia, possivelmente, provocada pelo surfactante Pluronic™ F-127 em todos os grupos, representando aumento de susceptibilidade à fungos. Ocorreu a promoção de danos genéticos a todos os xenobióticos, entretanto a fixação dos danos promovidos foi visualizada apenas na maior concentração dos MWCNTs. Ainda a pigmentação corpórea dos animais expostos aos MWCNTs reduziu-se, provavelmente, devido ao aumento da secreção de melatonina e decréscimo da estimulação das melanopsinas. Ademais, a associação entre o Pluronic™ F-127 e as MWCNT muitas vezes resultaram em respostas diferentes daquelas quando o surfactante era utilizado isoladamente, provavelmente devidas à competição da interação surfactante / nanopartículas / sistema biológico; indicando a relevância do estudo dos compostos dispersores dos materiais de interesse, assim como o de biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica. De forma geral, os resultados apontam para a urgência da proposta de estratégias e políticas públicas vistas à preservação ambiental, notadamente, à anfíbios anuros.

**Palavras-Chave:** Ecotoxicologia, rã-touro; resposta fisiológica; surfactante; Nanotoxicologia.



## Abstract

The search for materials improvement brought the development of nanoparticles, which environmental and health consequences from its use are slightly understood. Added to that context the drastic populational decline of amphibians represents a concern due to their increased susceptibility to pollutants. Thus, the present study aimed to investigate toxicological potential of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) at concentrations of 0.1 and 10 mg.L<sup>-1</sup> associated with surfactant Pluronic™ F-127 (0,1%) and the isolated surfactant in North American bullfrog tadpole (*Lithobates catesbeianus*, SHAW, 1802) via biomarkers on different levels of biological organization. The animals (n = 12 per group) were individually exposed (96 hours), the results were compared to the control group. The animals were photographed, measured, heart rate and venipunctured for blood sample (total erythrocytes, differential leukocytes, nuclear abnormalities and comet assay). A decrease in body mass, with no change in body size, activity level and stage of development were observed, which indicates energy deviation to detoxification processes of the xenobiotics. There was also tachycardia in the 0.1% Pluronic™ F-127 and 10 mg.L<sup>-1</sup> MWCNT + Pluronic™ groups, with no change in the lowest concentration of the nanoparticle, indicating increased cardiac performance related to homeostatic response to increase perfusion and oxygenation of tissues responsible for detoxification, corroborated by increased erythrocytes in the 0.1% Pluronic™ F-127 group. The immunological response to the xenobiotics indicated hypersensitivity (allergic response) to MWCNTs and neutropenia, possibly caused by Pluronic™ F-127 surfactant in all groups, representing increased susceptibility to fungi. Genetic damage occurred to all xenobiotics, however the damages were conserved only in the highest concentration of MWCNTs. Moreover the body pigmentation of the animals exposed to MWCNTs was reduced, probably due to the increase of melatonin secretion and decreased stimulation of melanopsin. In addition, the association between Pluronic™ F-127 and MWCNTs often resulted in responses different from those when surfactant was used alone, probably due to competition from the surfactant / nanoparticles / biological system interaction, indicating the relevance of the study of the dispersing compounds of the materials of interest, as well as the biomarkers in different levels of biological organization. In general, the results point to the urgency of new strategies and public policies aimed at the environmental preservation, especially to the anuran amphibians.

**Key-Words:** Ecotoxicology; bullfrog; physiological response; surfactant; Nanotoxicology.



## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> – Clarograma simplificado da divergência dos anuros atuais. ....	36
<b>Figura 2</b> – Espécime de rã-touro ( <i>L. catesbeianus</i> ) pós-metamórfica. ....	38
<b>Figura 3</b> – Dentição de <i>L. catesbeianus</i> . ....	39
<b>Figura 4</b> – Modelos moleculares de diferentes tipos de nanoestruturas de carbono de classe $sp^2$ exibindo diferentes dimensões. 0-D, 1-D, 2-D e 3-D. ....	46
<b>Figura 5</b> – Linha do tempo dos principais acontecimentos históricos acerca dos nanomateriais carbonáceos (CNMs). ....	47
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática dos monômeros de Pluronic™ F-127. ....	50
<b>Figura 7</b> – Imagens do local de coleta do ranário comercial onde foram adquiridos os girinos recém eclodidos de rãs-touro utilizados no presente estudo. ....	53
<b>Figura 8</b> – Sistema de exposição desenvolvido para a realização dos ensaios ecotoxicológicos com girinos de rã-touro, <i>L. catesbeianus</i> . ....	56
<b>Figura 9</b> – Foto lateral esquerda de girino de rã-touro ( <i>L. catesbeianus</i> ) no estágio 25 de Gosner, com regiões de amostragem de coloração identificadas pelos quadrados de cor branca (1 mm <sup>2</sup> ). ....	58
<b>Figura 10</b> – Morfologia de leucócitos da espécie <i>L. catesbeianus</i> . ....	59
<b>Figura 11</b> – Fotografias de núcleo e nucleóides após SCGE em aumento de 100X. ....	61
<b>Figura 12</b> – Morfologia nuclear eritrocítica em aumento de 100X. ....	62
<b>Figura 13</b> – Nível de atividade dos girinos de rãs-touro ( <i>L. catesbeianus</i> ) dos diferentes grupos experimentais (n=12 animais cada) após 96 horas com relação ao início do bioensaio. ....	64
<b>Figura 14</b> – Variação do comprimento corpóreo dos girinos de rãs-touro ( <i>L. catesbeianus</i> ) dos diferentes grupos experimentais (n=12 cada) após 96 horas com relação ao início do bioensaio. ....	66
<b>Figura 15</b> – Variação da massa corpórea dos girinos de rãs-touro ( <i>L. catesbeianus</i> ) dos diferentes grupos experimentais (n=12 animais cada) após 96 horas com relação ao início do bioensaio. ....	67
<b>Figura 16</b> – Valores de pigmentação corpórea (porcentagem de escurecimento com relação à cor preta) utilizando como referência uma área de 5 mm <sup>2</sup> da região membranosa superior da nadadeira caudal de girinos de rã-touro nos diferentes grupos experimentais (n=12 animais cada). ....	68

<b>Figura 17</b> – Sistema de exposição.....	69
<b>Figura 18</b> – Vista detalhada dos recipientes de exposição, já contendo os animais, aos diferentes tratamentos experimentais, contrastando a opacidade crescente dos grupos 0,1 mg.L-1 MWCNT + Pluronic™ e 10 mg.L-1 MWCNT + Pluronic™, respectivamente, em relação à translucidez da água dos grupos controle e 0,1% de Pluronic™ F-127. ....	69
<b>Figura 19</b> – Frequência cardíaca in situ (fH - bpm) dos girinos de rãs-touro ( <i>L. catesbeianus</i> ) dos diferentes grupos experimentais (n=6 animais cada) após 96 horas de exposição. ....	71
<b>Figura 20</b> – Massa ventricular relativa (MVR - % massa corpórea) dos girinos de rãs-touro ( <i>L. catesbeianus</i> ) dos diferentes grupos experimentais (n=6 animais cada) após 96 horas de exposição.....	72
<b>Figura 21</b> – Densidade populacional de eritrócitos de girinos de rãs-touro ( <i>L. catesbeianus</i> ) nos diferentes grupos experimentais (n=9 animais cada) após 96 horas de exposição. ....	74
<b>Figura 23</b> – Densidade populacional diferencial de leucócitos em sangue periférico de girinos de rãs-touro ( <i>L. catesbeianus</i> ), nos diferentes grupos (n=9 animais cada).....	76
<b>Figura 24</b> – Mutagenicidade das células do sangue periférico de girinos de rãs-touro ( <i>L. catesbeianus</i> ) dos diferentes grupos experimentais (n=9 animais por grupo, 8 medidas por animal), representada como porcentagem de quebra do DNA após 96 horas de exposição.....	78
<b>Figura 25</b> – Eritrócitos sem anormalidades nucleares do sangue periférico de girinos de rãs-touro ( <i>L. catesbeianus</i> ) dos diferentes grupos experimentais (n=9 animais cada), em 990 células, após 96 horas de exposição.....	79
<b>Figura 26</b> – Eritrócitos com micronúcleo e bud do sangue periférico de girinos de rãs-touro ( <i>L. catesbeianus</i> ) dos diferentes grupos experimentais (n=9 animais cada), em 990 células, após 96 horas de exposição. ....	80

## Lista de equações

- Equação 1** – Cálculo da diluição de solução-mãe para exposição a concentração desejada de xenobióticos. ....55
- Equação 2** – Relação da densidade populacional de células em suspensão líquida para apuração em câmara de Neubauer. ....59
- Equação 3** – Média ponderada do percentual de dano das diferentes classes para estimar o dano causado por cada tratamento. ....60



## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b>	– Lista de parâmetros para análise de qualidade da água. ....	54
<b>Tabela 2</b>	– Valores de referência para diluição ao preparo das soluções de exposição.....	55
<b>Tabela 3</b>	– Comparação entre as classes de categorização de danos genéticos e a sua média absoluta em percentual de danos por célula/categoria. ....	61
<b>Tabela 4</b>	– Parâmetros físicos e químicos da água ao início do bioensaio e após a exposição para cada um dos grupos experimentais. ....	63
<b>Tabela 5</b>	– Respostas obtidas ( $P < 0,05$ ) para os diferentes biomarcadores avaliados, comparando-os com relação ao grupo controle (valores médios $\pm 1$ E.P.M.).	83



## Lista de abreviaturas e siglas

<b>Caltech</b>	<i>California Institute of Technology.</i>
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
<b>C-dots</b>	<i>Carbon nanodots.</i>
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética em Experimentação Animal.
<b>CNM</b>	<i>Carbon Nanomaterial.</i>
<b>CNT</b>	<i>Carbon Nanotube.</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido.
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid.</i>
<b>ENM</b>	<i>Engineered Nanomaterial.</i>
<b>EPM</b>	Erro padrão médio.
<b>ERO</b>	Espécie Reativa de Oxigênio.
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América.
<b>FATEC-SO</b>	Faculdade de Tecnologia de Sorocaba.
<b>HSP</b>	<i>Heat Shock Protein.</i>
<b>IFN</b>	Interferon.
<b>Ig</b>	Imunoglobulina.
<b>IL</b>	Interleucina.
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry.</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase.</i>
<b>MCH</b>	<i>Melanin-Concentrating Hormone.</i>
<b>MSH</b>	<i>Melanocyte-Stimulating Hormone.</i>
<b>MWCNT</b>	<i>Multi-Walled Carbon Nanotube.</i>
<b>NM</b>	Nanomaterial.
<b>NP</b>	Nanopartícula.
<b>PARP</b>	Poli ADP-ribose polimerase.
<b>PBO</b>	<i>Poly(p-phenylene-2,6-benzobisoxazole).</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline.</i>
<b>PEO</b>	<i>Poly(ethylene oxide).</i>
<b>PPO</b>	<i>Poly(propylene oxide).</i>

<b>QSP</b>	Quantidade Suficiente Para.
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species.</i>
<b>SCGE</b>	<i>Single Cell Gel Electrophoresis.</i>
<b>SWCNT</b>	<i>Single-Walled Carbon Nanotube.</i>
<b>TBARS</b>	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substance.</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor.</i>
<b>UFSCar</b>	Universidade Federal de São Carlos.
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas.

## Sumário

1. Introdução .....	27
2. Objetivo .....	31
<b>2.1. Objetivos específicos</b> .....	31
3. Fundamentação teórica.....	33
<b>3.1. Anfíbios</b> .....	33
3.1.1. <i>Características gerais</i> .....	34
3.1.2. <i>Anura</i> .....	36
3.1.3. <i>Espécie Modelo: “Lithobates catesbeianus” (SHAW, 1802)</i> .....	38
3.1.4. <i>Declínio dos anfíbios</i> .....	39
<b>3.2. Ecotoxicologia</b> .....	40
<b>3.3. Nanotecnologia</b> .....	42
3.3.1. <i>Histórico dos nanomateriais carbonáceos</i> .....	45
3.3.2. <i>Características gerais dos Nanotubos de Carbono e Nanotoxicologia</i> .....	48
3.3.3. <i>Dispersão de nanomateriais em suspensões coloidais</i> .....	49
4. Material e Métodos.....	53
<b>4.1. Coleta e manutenção dos animais</b> .....	53
<b>4.2. Delineamento dos ensaios ecotoxicológicos</b> .....	54
<b>4.3. Nível de atividade</b> .....	57
<b>4.4. Massa Corpórea</b> .....	57
4.4.1. <i>Massa ventricular relativa</i> .....	57
<b>4.5. Pigmentação Externa</b> .....	57
<b>4.6. Frequência cardíaca <i>in situ</i></b> .....	58
<b>4.7. Técnicas realizadas hematológicas</b> .....	58
4.7.1. <i>Contagem eritrocitária</i> .....	58
4.7.2. <i>Contagem leucocitária</i> .....	59
4.7.3. <i>Ensaio cometa ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)</i> .....	60
4.7.4. <i>Anormalidades nucleares</i> .....	61
<b>4.8. Forma de análise dos resultados</b> .....	62
5. Resultados e Discussão.....	63
<b>5.1. Mortalidade</b> .....	63
<b>5.2. Determinação do nível de atividade (animais ativos)</b> .....	64
<b>5.3. Estadiamento de Gosner</b> .....	65

5.4.	Tamanho corpóreo .....	65
5.5.	Massa corpórea .....	66
5.6.	Pigmentação Externa .....	67
5.7.	Biomarcadores de desempenho cardíaco: frequência cardíaca <i>in situ</i> e massa ventricular relativa .....	70
5.8.	Densidade de eritrócitos em sangue periférico .....	73
5.9.	Densidade de leucócitos em sangue periférico .....	74
5.10.	Ensaio cometa ou <i>Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)</i> .....	77
5.11.	Anormalidades nucleares.....	79
6.	Considerações Finais .....	81
7.	Conclusões .....	85
8.	Referências.....	87
ANEXO A – Tabela de classificação dos estadiamentos de desenvolvimento (estágios 1º ao 46º) de Gosner (1960). .....		121
ANEXO B – Autorização do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais .....		123
ANEXO C – Autorização da emenda pela Comissão de Ética no Uso de Animais ....		125

## 1. Introdução

Em todo o globo, há o consenso de que diversas espécies, inclusive os anfíbios, estão em um estado de declínio de suas populações (PIMM; RAVEN, 2000; CLAVEL *et al.*, 2011) ou já se encontram em extinção (SOLOW, 2003; JACKSON, 2014; ROBERTS, 2003). Muitos dos motivos apontados para a alta taxa de extinção referem-se às atividades antrópicas, sendo inclusive apontada na academia uma nova Grande Extinção – a Sexta Grande Extinção (WAKE; VREDENBURG, 2008) – e até mesmo o início da Época Geológica “Antropoceno” (EKSTRÖM; SVENSEN, 2014). Mas somente a partir do final dos anos 80 e início dos anos 90 (WAKE, 1991; PECHMANN; WILBUR, 1994), após o primeiro Congresso Mundial de Herpetologia (1989), que a conscientização acerca do declínio de anfíbios começou a ganhar destaque na comunidade científica (STUART *et al.*, 2004; BEEBEE; GRIFFITHS, 2005), tornando-se inclusive tema de livro (WHITTAKER *et al.*, 2013). Dentre as causas do declínio das populações de anfíbios estão as mudanças climáticas (D’AMEN; BOMBI, 2009; BICKFORD *et al.*, 2018; ROWE; CRANDALL, 2018), alterações na incidência de radiação solar (FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2018), patologias causadas por infecções (VOYLES *et al.*, 2011; BRUTYN *et al.*, 2012; KIK *et al.*, 2012; SALLA *et al.*, 2015), ocupação antrópica (HAMER; MCDONNELL, 2008; SMALLBONE *et al.*, 2011; YOUNGQUIST; BOONE, 2014; ZHANG *et al.*, 2016a; COLLINS; FAHRIG, 2017; VILLASEÑOR *et al.*, 2017), competição interespecífica (KATZMANN *et al.*, 2003) e exposição a xenobióticos (MONTALVÃO *et al.*, 2017; PELTZER *et al.*, 2013).

Frequentemente os xenobióticos estão associados ao desequilíbrio da homeostase de diversos organismos não-alvos, como abelhas (DECOURTYE *et al.*, 2005), caramujos (KRUATRACHUE *et al.*, 2011), anfíbios (DAL-MEDICO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2016; RISSOLI *et al.*, 2016; SALLA *et al.*, 2016) e mamíferos em geral (O’BRIEN *et al.*, 1993), inclusos os humanos (HILLEGASS *et al.*, 2013; BHATTACHARJEE *et al.*, 2016). Dos efeitos causados por alguns desses compostos está a carcinogênese ou oncogênese, processo de geração de células tumorais (ISLAS-ESPINOZA; HERAS, 2015; GATTO *et al.*, 2016; BHARDWAJ *et al.*, 2018; CHATTERJEE; GUPTA, 2018; HANNA; HAFEZ, 2018; LENGAR, 2018). O câncer é uma patologia cujas mortes alcançaram o número de oito milhões de pessoas em 2012 e quatorze milhões de novos casos relatados no mesmo ano (STEWART; WILD, 2014). Dentre os fatores desencadeantes dessa patologia, está a exposição a poluentes e/ou outras substâncias presentes no meio de ocupação do organismo (FRANCO *et al.*, 2009;

STEWART; WILD, 2014), cujo mecanismo se deve ao acúmulo de danos ao material genético (FOULDS, 1954; HANAHAN; WEINBERG, 2000; DESAI *et al.*, 2018) por diferentes vias, entre elas o estresse oxidativo (BERTRAM; HASS, 2008; MENA *et al.*, 2009).

Atualmente, há uma enorme variedade de compostos reconhecidamente capazes de desequilibrar a homeostasia dos Anura (MERREN, 1820), tais como metais (DAL-MEDICO *et al.*, 2014; FALFUSHYNSKA *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2017; MONTEIRO *et al.*, 2018), pesticidas (COSTA, *et al.*, 2008; ZAYA *et al.*, 2011; COSTA, *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016; BACH *et al.*, 2018), hormônios (TOMPSETT *et al.*, 2012; SALLA *et al.*, 2016) e várias nanopartículas (NATIONS *et al.*, 2011; YSLAS *et al.*, 2012; SALVATERRA *et al.*, 2013; SARIA *et al.*, 2014; CAREW *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016; SVARTZ *et al.*, 2017).

Diversas técnicas têm sido utilizadas na avaliação dos biomarcadores com impactos ecotoxicológicos sobre organismos não-alvos (BAINY; MARQUES, 2003; DEPLEDGE *et al.*, 1995), como a observação da atividade comportamental (SLOMAN, 2004; FRAKER; SMITH, 2008; DAL-MEDICO *et al.*, 2014; HARTMANN *et al.*, 2016; KOHLER *et al.*, 2018; SCOTT; WHITLOK *et al.*, 2018), alterações morfocolorimétricas (FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2016), aferição de frequência cardíaca (RODRIGUES; PARDAL, 2014; SALLA *et al.*, 2016; LARI *et al.*, 2017; HUREN *et al.*, 2018; JONES-COSTA, *et al.*, 2018), a avaliação de eritrócitos (LANG *et al.*, 2012; PRETORIUS *et al.*, 2016; ZHELEV *et al.*, 2016; QADRI *et al.*, 2017; CHAN *et al.*, 2018; FARAG; ALAGAWANY, 2018), leucócitos (KONDO *et al.*, 1992; BOLS *et al.*, 2001; LIESCHKE; TREDE, 2009; HUANG *et al.*, 2016; BOISSEAU *et al.*, 2017) e as avaliações de danos genéticos (DEPLEDGE, 1996; BLUHM *et al.*, 2018; FRANCO-BELUSSI, *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018). A utilização dessas técnicas em estudos ambientais, de risco ou de avaliação de impacto são importantes ferramentas para a obtenção de informações para a criação ou readequação de regulamentações legislativas e decisões públicas destinadas à conservação da biota e de sítios de ocupação.

Assim como os estudos acerca dos impactos antrópicos ao meio ambiente, a Nanotecnologia também é uma área da Ciência nova e seu advento possibilitou a sintetização de uma vasta gama de novos materiais, deixando de maneira global uma lacuna nas legislações vigentes (FATKHUTDINOVA *et al.*, 2016; BANDALA; BERLI, 2019). As nanopartículas (NPs) são definidas como partículas as quais ao menos uma das faces possui tamanho de 1 a 100 nm (MOTTIER *et al.*, 2017; MISSAOUI *et al.*, 2018). Os nanomateriais (NMs) possuem características físicas e químicas únicas, capazes de conferir melhoramento de condutividade elétrica (KHALIL *et al.*, 2017; MORA *et al.*, 2018) e/ou térmica (UEKI *et al.*, 2018), resistência

mecânica (SEOL *et al.*, 2017), dentre outras, e podem ser utilizados em diferentes aplicações (QU *et al.*, 2018). Dentre as NPs projetadas/manufaturadas, se encontram as baseadas em carbono, também chamadas de nanopartículas carbonáceas, constituídas majoritariamente por ligações Carbono-Carbono. Dentre essas, estão os nanotubos de carbono (CNTs -*Carbon Nanotubes*), NPs tubulares consideradas unidimensionais ou 1D (dimensão) (MOTTIER *et al.*, 2017). Algumas das aplicações dos CNTs remetem à produção de sensores (LYNAM *et al.*, 2009; DUARTE *et al.*, 2014; SAETIA *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2018), células fotovoltaicas (CUI, MARUYAMA, 2019), em aparelhos baseados em spin – engenharia eletrônica (MEENA, CHOUDHARY, 2017; MEENA, CHOUDHARY, 2018), reações de catálise (ESTEVEZ *et al.*, 2018), bioimageamento (GONG *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ-RIVERA *et al.*, 2016), vacinas (PARRA *et al.*, 2013; SCHEINBERG *et al.*, 2013), imunoterapias (FADEL, FAHMY, 2014), terapias gênicas (CHEUNG *et al.*, 2010; BATES, KOSTARELOS, 2013), terapias de hipertermia (SINGH, TORTI, 2013) e purificação de água (DENG *et al.*, 2018). No entanto, em algumas aplicações relativas à utilização desses novos materiais torna-se necessária a preparação de suspensões (MENON *et al.*, 2012) em soluções com surfactantes como o Pluronic™ F-127 (IRAZUSTA *et al.*, 2018), composto amplamente utilizado em *drug-delivery* (KABANOV *et al.*, 2002).

Aliados ao declínio multifatorial dos anfíbios (CATENAZZI, 2015), estudos desenvolvidos com espécies de anfíbios anuros (*e.g.*, *Xenopus laevis*) utilizando CNT vêm sendo realizados. Dentre os biomarcadores avaliados destacam-se os relativos ao estresse oxidativo (SARIA *et al.*, 2014), os danos genéticos avaliados por diferentes técnicas (MOUCHET *et al.*, 2008; SARIA *et al.*, 2014), o atraso do crescimento, a alteração de pigmentação corpórea e visceral (LAGIER *et al.*, 2017) e a obstrução de tecidos/órgãos (MOUCHET *et al.*, 2008).

Levando-se em consideração a particular susceptibilidade de anuros aos xenobióticos devido a apresentarem uma pele extremamente delgada (CZOPEK, 1965; RISSOLI *et al.*, 2016), baixas taxas de catabolismo e depuração quando comparadas às de vertebrados endotérmicos (GARDNER; OBERDÖSTER, 2005), assim como sua toxicidade diferencial (LANONE *et al.*, 2013) este estudo se propôs a avaliar o efeito do nanotubo de carbono de parede múltipla (MWCNT – *Multi-Walled Carbon Nanotube*) e do surfactante Pluronic™ F-127 sobre biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica utilizando girinos da espécie-modelo *Lithobates catesbeinus* (SHAW, 1802) para avaliação de toxicidade ambiental e ocupacional. Uma vez que não há informações acerca das concentrações ambientalmente relevantes de CNTs em corpos da água (ARVIDSSON *et al.*, 2013; LEAD *et al.*, 2018;

SHAREENA et al, 2018), partimos da hipótese de que concentrações desse xenobiótico na faixa de 0,1 a 10 mg.L<sup>-1</sup> de MWCNT (MOUCHET *et al.*, 2010; BACCHETTA *et al.*, 2012; LAGIER *et al.*, 2017) provocarão alterações subcelulares (genotoxicidade e mutagenicidade), hematológicas, imunológicas, morfofisiológicas e comportamentais nos animais, que irão repercutir no estabelecimento de suas populações.

## 2. Objetivo

O objetivo geral foi avaliar a toxicidade após 96 horas de exposição às concentrações de 0,1 e 10 mg.L<sup>-1</sup> de nanopartículas (NPs) de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) associadas ao surfactante Pluronic™ F-127 (0,1%) e ao surfactante isolado, sobre girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), utilizando biomarcadores comportamentais, morfofisiológicos, hematológicos, imunológicos e de genotoxicidade e mutagenicidade com o intuito de contribuir para estabelecimento de marcos regulatórios para o uso destes compostos.

### 2.1. Objetivos específicos

- Determinar o nível de atividade dos girinos de rã-touro expostos ao MWCNT associado ao surfactante Pluronic™ F-127 e ao surfactante isolado;
- Analisar a massa corpórea dos animais ao longo do período de exposição dos girinos de rã-touro expostos ao MWCNT associado ao surfactante Pluronic™ F-127 e ao surfactante isolado;
- Avaliar a massa ventricular dos girinos de rã-touro expostos ao MWCNT associado ao surfactante Pluronic™ F-127 e ao surfactante isolado;
- Avaliar o comprimento dos girinos de rã-touro expostos ao MWCNT associado ao surfactante Pluronic™ F-127 e ao surfactante isolado;
- Determinar comparativamente a pigmentação cutânea dos girinos de rã-touro expostos ao MWCNT associado ao surfactante Pluronic™ F-127 e ao surfactante isolado;
- Analisar a frequência cardíaca *in situ* dos girinos de rã-touro expostos ao MWCNT associado ao surfactante Pluronic™ F-127 e ao surfactante isolado;
- Determinar a densidade populacional de eritrócitos presentes no sistema circulatório dos girinos de rã-touro expostos ao MWCNT associado ao surfactante Pluronic™ F-127 e ao surfactante isolado;
- Realizar a contagem diferencial de leucócitos (neutrófilo, basófilo, eosinófilo, linfócito e monócito) dos girinos de rã-touro expostos ao MWCNT associado ao surfactante Pluronic™ F-127 e ao surfactante isolado;

- Analisar o potencial mutagênico sobre os girinos de rã-touro expostos ao MWCNT associado ao surfactante Pluronic™ F-127 e ao surfactante isolado;
- Avaliar o potencial genotóxico sobre os girinos de rã-touro expostos ao MWCNT associado ao surfactante Pluronic™ F-127 e ao surfactante isolado.

### 3. Fundamentação teórica

Os anfíbios despertam interesse em diversas áreas da Ciência, como a Ecologia, a Etologia, a Filogeografia, a Genética, a Biologia do Desenvolvimento e a Biologia Evolutiva (VITT; CALDWELL, 2013), sendo utilizados em diferentes aplicações, como a clonagem, a reprogramação celular (CIBELLI *et al.*, 2014) e, inclusive, no monitoramento ambiental (CATENAZZI, 2015).

#### 3.1. Anfíbios

Historicamente, o grupo Amphibia surgiu no Período Carbonífero (Era Paleozóica), há aproximadamente 354 milhões de anos, após o surgimento dos Sarcopterygii (nadadeira lobada), Actinistia (representantes atuais: Celacantos) e Dipnoi (peixes pulmonados), e dos primeiros Tetrapoda (do grego, tetra: quatro e poda: pés), no final do Siluriano e do Devoniano, há cerca de 443 e 417 milhões de anos, respectivamente (CAMPBELL; REECE, 2009). Eles resistiram a pelo menos três Grandes Extinções, sendo elas a transição entre as Eras Paleozóica (supercontinente Pangea) e Mesozóica (supercontinentes Gondwana e Laurásia), que dizimou aproximadamente 96% de todas as espécies marinhas há cerca de 251 milhões de anos, a transição no Mesozóico entre os Períodos Triássico e o Jurássico (cerca de 200 milhões de anos atrás) (CAMPBELL; REECE, 2009), período no qual os grupos atuais de anfíbios se diversificaram (ROELANTS *et al.*, 2006), e a transição entre as Eras Mesozóica e Cenozóica (configuração continental atual), conhecida por extinguir a maioria dos dinossauros há cerca de 65,5 milhões de anos (CAMPBELL; REECE, 2009). Os primeiros tetrápodes (*e.g.* *Acanthostega*, *Densignathus*, *Elginerpeton*, *Hynerpeton*, *Ichthyostega*, *Jakubsonia*, *Metaxygnathus*, *Obruchevichthys*, *Sinostega*, *Tiktaalik*, *Tulerpeton*, *Ventastega*, *Ymeria*) surgiram cerca de 370 milhões de anos atrás, com *Gerobatrachus hottoni* sendo considerado o primeiro ancestral comum de Anura e Caudata (ALEXANDER *et al.*, 2011), há aproximadamente 330 milhões de anos (MAURO *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005 ANDERSON *et al.*, 2008).

### 3.1.1. Características gerais

Anfíbios são caracterizados como vertebrados com dois côndilos occipitais na base do crânio, nadadeiras sem suporte, ao menos dois tipos de glândulas na pele, respiração cutânea, ectotermia, com período ativo majoritariamente, noturno (SPARLING *et al.*, 2000) e, predominantemente, carnívoros (BERKOVITZ; SHELLIS, 2017) em ao menos uma das fases de vida. Todos os Amphibia são polifiodontes e sua dentição é variada mesmo entre as ordens, com os Gymnophiona em posse de diversos dentes, dispostos nas premaxilas, maxilas, vômers, palatinos e dentários; os Batrachia (Caudata + Anura) possuem dentes reduzidos, nos Caudata estão dispostos nas mandíbulas superior e inferior e nos Anura há menor quantidade de dentes no palato, com apenas uma espécie dotada de dentes dispostos no dentário (*Gastrotheca guentheri*), sendo muitos edentados (*e.g.*, gênero *Bufo*) (BERKOVITZ; SHELLIS, 2017). Ainda, a maioria dos anfíbios apresenta fertilização externa, sendo observado em Anura o amplexo (ALEXANDER *et al.*, 2011) e ovoposição em ambientes aquáticos ou úmidos, com exceções que chegam ao cuidado parental (CATENAZZI, 2015), armazenando os ovos na região dorsal, boca ou estômago (CAMPBELL; REECE, 2009). Em Amphibia “não há padrão cromossomal para determinação sexual; em alguns o macho é heterogamético (*Rana*), enquanto em outros é a fêmea (*Ambystoma tigrinum*, *Bufo bufo*)” (SPARLING *et al.*, 2000, tradução livre). Majoritariamente, possuem vida livre aquática durante o estágio larval, seguida por metamorfose, gerando um adulto comumente semi-aquático (PESSIER, 2018), caracterizando ocupação de distintos ambientes em diferentes estágios de vida (LINDER *et al.* 2003), o que dá nome ao grupo (do grego: *amphi* ou duas formas e *bios* ou vida), onde o

“processo de metamorfose é uma complexa remodelação dos sistemas corporais iniciado pelos efeitos transcripcionais do hormônio da tireóide [...]. Entre as mudanças importantes durante a metamorfose estão o desenvolvimento do baço e a reabsorção por apoptose mediada da musculatura caudal.” (PESSIER, 2018, tradução livre).

O processo de metamorfose inclui, atualmente, três modelos para sua descrição: o 1º – desdiferenciação induzida pelo hormônio da tireóide, o 2º – comutação gênica ou *gene switching* e o 3º – permutação celular ou *cell switching* (MUKHI *et al.*, 2010); com o eixo hipotálamo-hipófise ou glândula pituitária-tireóide para produção dos hormônios tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) parecido com o humano, mas com diferenças (LAUDET, 2011). Ainda, o longo intestino da fase larval, característico de herbivoria, sofre encurtamento na transição à fase adulta, caracterizada por carnivoria (PESSIER, 2018). Há dentição queratinizada nas fases

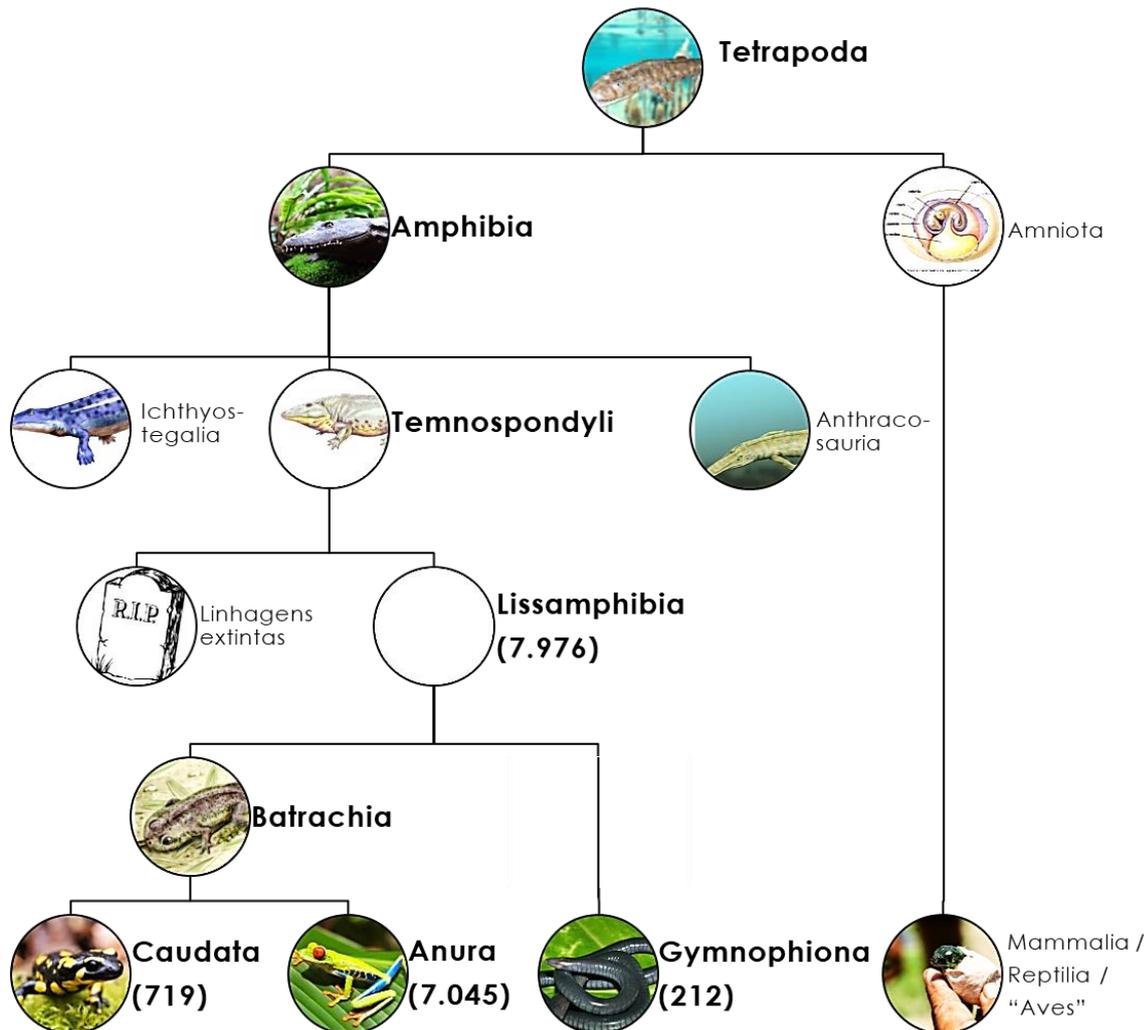
larvais (BERKOVITZ; SHELLIS, 2017). E “o sistema imune sofre drástica reorganização na metamorfose de forma a evitar o reconhecimento indesejado de antígenos dos tecidos adulto emergentes como estranhos” (PESSIER, 2018, tradução livre). Entretanto, nem todos os membros de Amphibia sofrem metamorfose, como os *Plethodontidae* e alguns Anura que possuem desenvolvimento direto (SPARLING *et al.*, 2000).

De maneira geral, a pele dos anfíbios é altamente permeável (CZOPEK, 1965; LILLYWHITE, 2006), com a epiderme constituída por apenas uma ou duas camadas de células queratinizadas (PESSIER, 2018), *stratum corneum*  $\alpha$  (LILLYWHITE, 2006), atuando na absorção de água nas espécies de água doce (LILLYWHITE, 2006; PESSIER, 2018) mediada por aquaporinas (SUZUKI; TANAKA, 2009); na osmoregulação mediada por queratinócitos, captando sais (PESSIER, 2018) – divididas entre “células principais” e “células ricas em mitocôndrias” (KATZ *et al.*, 2000; CAMPBELL *et al.*, 2012); e na respiração, tanto aérea (BENTLEY; SHIELD, 1973) quanto aquática (SHIELD; BENTLEY, 1973), mediada por uma extensa vascularização intraepidermal (PESSIER, 2018). Entretanto, não há queratinização tegumentar em larvas de Anura e há apenas nas extremidades dos membros de Caudata neotênicas aquáticas (PESSIER, 2018). A respiração também pode ocorrer de forma bucofaríngea, branquial ou pulmonar, os quais variam desde sacos simples até estruturas altamente compartimentalizadas compostas por múltiplas câmaras alveolares (CAMPBELL; REECE, 2009; PESSIER, 2018).

O sistema cardiovascular é variável em anfíbios e composto nos adultos por coração com três câmaras (SPARLING *et al.*, 2000) – dois átrios e um ventrículo – com o sangue saindo pelo cone arterioso que se divide em três arcos: o pulmocutâneo (pele e pulmão), o sistêmico (membros e vísceras) e o carótido (cabeça e pescoço) e retornando ao coração pelo seio venoso pelas via veias jugulares (cabeça e pescoço), veias subclavas (membros anteriores e pele) e veia pós-cava (membros posteriores e vísceras) (VITT; CALDWELL, 2013) no átrio direito, enquanto a veia pulmonar retorna pelo átrio esquerdo, havendo pouca mistura entre sangue arterial e venoso na câmara ventricular (SPARLING *et al.*, 2000). Nos adultos há a perda dos dois primeiros arcos aórticos (arcos viscerais no estágio larval), sendo retidos apenas três arcos nos Anura (VITT; CALDWELL, 2013). O sistema linfático é aberto, com seios subcutâneos largos em Anura e corações linfáticos (contráteis e providos de válvulas) encontrados próximos às junções venosas – entre 10 e 20 em Anura e Caudata (VITT; CALDWELL, 2013). O sangue é composto por eritrócitos (hematose), leucócitos (remoção de detritos celulares e defesa a patógenos) e trombócitos (coagulação), com o plasma sanguíneo incolor (VITT; CALDWELL, 2013).

As espécies remanescentes da classe Amphibia compreendem a subclasse Lissamphibia (MAURO, 2010), ver Figura 1, somando 7.976 espécies, divididas entre três ordens: a Anura (*e.g.*, sapos, rãs e pererecas), com 7.045 espécies, 449 gêneros e 54 famílias, a Caudata (*e.g.*, salamandras), com 719 espécies, 68 gêneros e 10 famílias, e a Gymnophiona (*e.g.*, cecílias ou cobras-cegas), com 212 espécies, 33 gêneros e 10 famílias (<https://amphibiaweb.org> em 19 de fevereiro de 2019).

**Figura 1.** Clarograma simplificado da divergência dos anuros atuais. Números entre parênteses descrevem o número de espécies descritas.



Fonte: Autoria própria, com relações filogenéticas baseadas em Hildebrand e Goslow (2006), número de espécies em <https://amphibiaweb.org> (19 de fevereiro de 2019) e fotografias de autoria desconhecida.

### 3.1.2. Anura

Os Anura ocorrem em todos os continentes, com única exceção a Antártica (GALLO *et al.*, 2006) e são o maior grupo em número de espécies dentro de Amphibia. Nos anuros a cauda

“desaparece durante a metamorfose entre a fase larval e a adulta” (ALEXANDER *et al.*, 2011), fato que dá nome ao grupo (Anura: animais sem cauda, do neolatin “an”, prefixo de negação, e do grego “oura”, que significa cauda). Os adultos são carnívoros (ALEXANDER *et al.*, 2011), sua dentição, quando presente, tem a função de prender a presa e evitar que ela escape (BERKOVITZ; SHELLIS, 2017). Apresentam ampla diversidade de cores, tanto aposemáticas (coloração de advertência/defesa) como para camuflagem (ALEXANDER *et al.*, 2011). Possuem corpos sem cauda, com formato cabeça-corpo contínuo (VITT; CALDWELL, 2013), bocas amplas e olhos pronunciados para fora do crânio; possuem quatro membros, sendo os traseiros mais desenvolvidos (maior tamanho e massa muscular), modificados em sua maioria para saltar, mas também para escalar, escavar, nadar ou planar (ALEXANDER *et al.*, 2011). Em algumas espécies há glândulas na pele que secretam muco de sabor desagradável ou mesmo venenoso (CAMPBELL; REECE, 2009).

As larvas, também chamadas de girinos, predominantemente herbívoras, com carnivorismo oportunista (SPARLING *et al.*, 2000), possuem corpo esférico, com intestino longo (ALEXANDER *et al.*, 2011), olhos dispostos na região dorsal, dorso-lateral ou lateral. A região do dorso possui tons preto, marrom, cinza e verde em vários arranjos, e ventre de coloração bronze, prata ou branca, devido à disposição dos cromatóforos – células com pigmentos capazes de promover ou mudar a coloração, podendo apresentar metacromasia com escurecimento/clareamento relacionados aos ciclos de luz (MCDIARMID; ALTIG, 1999), respiração branquial, cutânea e pulmonar nos estágios mais avançados da metamorfose (BURGGREN, 1984) e sistema de linha lateral (ausente em adultos). Inicialmente sem pernas, apresentam uma cauda longa e afilada (CAMPBELL; REECE, 2009), com região muscular e “nadadeiras sem suportes formada por tecido conectivo frouxo” (MCDIARMID; ALTIG, 1999, tradução livre). Durante a metamorfose ocorrem mudanças nas estratégias de trocas gasosas, passando de uma forma cutânea-branquial para cutânea-pulmonar ao longo do desenvolvimento larval (BURGGREEN, 1984; GDOVIN *et al.*, 1998), incluindo mudanças da atividade do circuito neural relacionado à ritmogênese pulmonar (REED *et al.*, 2018).

O desenvolvimento larval de anuros foi dividido por Gosner (1960) em 46 estágios (ANEXO A), sendo o estágio 1 a fertilização, o 19 o início dos batimentos cardíacos, o 23 a formação inicial do padrão de pigmentação pelos cromatóforos (iridóforos/leucóforos/guanóforos – pigmentos opacos ou de aparência leitosa responsáveis por colorações iridescentes e metálicas, melanóforos – pigmentos relativamente insolúveis escuros– e lipóforos/xantóforos – pigmentos solúveis ou transluzentes de cor amarela, laranja ou vermelha, com padrão de aparência de coloração dispersa) e desenvolvimento do disco oral

e dos dentes labiais, o 26 estágio marca o início do desenvolvimento dos membros; o 45 o término da reabsorção caudal e o 46 o término da metamorfose (GOSNER, 1960). Ainda, há alteração da hemoglobina larval e adulta durante a metamorfose (BUCHHOLZ, 2015), localizadas em células diferentes as quais se encontram presentes concomitantemente na circulação sanguínea em densidades populacionais distintas (MUKHI *et al.*, 2010). O coração na fase larval apresenta morfologia tubular com quatro câmaras sequenciais, seio venoso, um único átrio e um único ventrículo não trabeculado e um bulbo arterioso, à semelhança dos Elasmobranchii, diferenciando-se então após a metamorfose mais uma câmara atrial nos adultos de respiração pulmonar e também caracterizado por um ventrículo trabeculado a fim de minimizar a mistura dos sangues arterial e venoso, provenientes do átrio esquerdo e direito, respectivamente (MCDIARMID; ALTIG, 1999). Vale também ressaltar a permanência do seio venoso, onde está localizado o marca-passo, e também do bulbo arterioso também na fase adulta.

### 3.1.3. Espécie Modelo: “*Lithobates catesbeianus*” (SHAW, 1802)

Dentre os anuros, cabe aqui ressaltar a espécie *L. catesbeianus* (Figura 2), a rã-touro Norte Americana, antigamente classificada como *Rana catesbeiana*, que ainda passa por revisões taxonômicas com a última proposição de alteração de nomenclatura proposta por Yuan *et al.* (2016) para *Rana (Aquarana) catesbeiana*, justificando o aumento de parafilia entre os gêneros. Esses animais passam por uma fase pré-metamórfica aquática, em que são denominados girinos e que podem atingir até 17 cm de comprimento (VIEIRA, 1993) no estágio 25 de Gosner (1960).

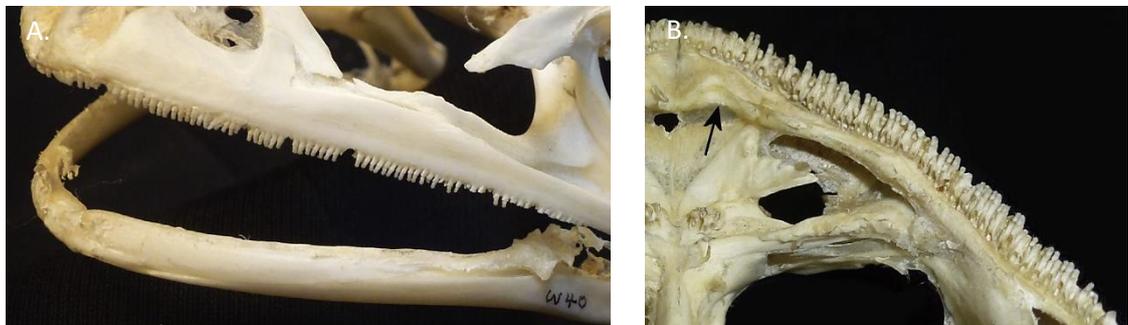
**Figura 2.** Espécime de rã-touro (*L. catesbeianus*) pós-metamórfica. Imagem gentilmente cedida por Raul César Alves.



Fonte: acervo pessoal de Felipe Augusto Pinto Vidal.

A dentição de *L. catesbeianus* (Figura 3) se encontra exclusivamente na maxila superior e vômeres (BERKOVITZ; SHELLIS, 2017) e sua respiração branquial é progressivamente substituída pela pulmonar ao longo da metamorfose, porém mantendo-se a respiração cutânea em todas as fases da vida (BURGGREN; WEST, 1982). Também durante o processo metamórfico, o coração adquire posicionamento mais anterior na fase adulta (MCDIARMID; ALTIG, 1999).

**Figura 3.** Dentição de *L. catesbeianus*. A. vista lateral esquerda mostrando ausência de dentição na maxila inferior. B. vista inferior do crânio sem a maxila inferior mostrando a o desenvolvimento da reposição dentária (seta indica dentes no vômer).



Fonte: Berkovitz e Shellis (2017), com alterações.

#### 3.1.4. Declínio dos anfíbios

Desde a ascensão do gênero *Homo*, em especial devido às recentes ações dos *H. sapiens sapiens* durante as últimas grandes revoluções tecnológicas (*i.e.*, agrícola e industrial), as alterações de configuração do meio ambiente devidas às ações antrópicas vêm causando declínio de diversas espécies em todo o globo (CAMPBELL; REECE, 2009), com uma taxa de extinção acentuada, chegando ao valor de 2.351 vezes mais elevada que a taxa de extinção histórica média; com os anfíbios sendo acometidos de maneira expressiva (CATENAZZI, 2015). De forma geral, o declínio dos anfíbios está relacionado diretamente com alterações das características naturais do hábitat, assim como a sua perda e a presença de patógenos (LINDER *et al.*, 2003). Dentre as alterações das características naturais do hábitat tem se o aumento da intensidade da incidência de radiação ultravioleta sobre a superfície terrestre, a qual tem gerado preocupações relativas à saúde humana (BRASH *et al.*, 1991), assim como para os anfíbios (FRANCO-BELUSSI, 2018) devido a sua ação genotóxica. Ainda que haja considerável plasticidade gênica em Amphibia devido a ploidia e à amplitude de pares de bases

( $10^9$  e  $10^{11}$ ) no seu arcabouço genético (SPARLING *et al.*, 2000), o requerimento conjunto de ambientes aquáticos e terrestres para sobrevivência de muitas espécies de anfíbios os torna particularmente susceptíveis a alterações da qualidade do meio onde estão inseridos (LINDER *et al.*, 2003), característica que os torna bons modelos em ensaios ecotoxicológicos.

### 3.2. Ecotoxicologia

A espécie humana sempre teve interesse pela Toxicologia, desde o momento em que passamos a distinguir alimentos comestíveis daqueles que nos causavam efeitos adversos, incluso a morte, até o uso atual de substâncias projetadas e sintetizadas antropicamente. Alguns desses compostos, tóxicos ou não, são designados como xenobióticos quando considerados “substâncias estranhas ao organismo” (SPARLING, 2016, tradução livre), ou seja, substâncias não-autógenas.

A Toxicologia é uma área da Ciência cujos estudos fomentam pressão política, relacionada diretamente às decisões políticas e regimentares. Essa área da Ciência tem seus primeiros grandes registros há 2.700 a.C. com Sheng Nung, considerado o pai da medicina chinesa (SPARLING, 2016) e o papiro de Ebers, o primeiro grande documento estruturado manuscrito em cerca de 1.500 a.C. (KLAASSEN, 1995). Enquanto Hipócrates, em 400 a.C. na Grécia, introduzia princípios de toxicologia clínica, mas somente 300 anos após foi promulgada em Roma a *Lex Cornelia* (primeira lei contra envenenamentos), (KLAASSEN, 1995).

Ainda relacionado aos compromissos e deveres públicos, a Ecotoxicologia possui destaque como a subárea que tem como intuito a conservação/manutenção do meio ambiente (SPARLING, 2016). Ela deriva da união entre a Ecologia e a Toxicologia (MANAHAN, 2010) e seu objeto é avaliar os efeitos adversos de agentes químicos, físicos e biológicos em diferentes organismos nos mais variados níveis de organização biológica (KLAASSEN, 1995; MANAHAN, 2010; WEXLER *et al.*, 2014; SPARLING, 2016). Apesar de o termo “Toxicologia Ambiental” ser utilizado muitas vezes como seu sinônimo (HODGSON, 2004), este é definido como a área da Toxicologia que conecta a saúde (humana) ao meio ambiente (GUPTA, 2018).

É comumente aceito que o livro “A primavera silenciosa”, de Rachel Carson (1907-1964), publicado em 1962 nos Estados Unidos, durante plena Guerra Fria, tenha marcado o início do que chamamos de Ecotoxicologia como Ciência estruturada. No entanto, o termo que dá nome a esse ramo científico foi cunhado por René Truhaut (1909-1994) em 1969

(SPARLING, 2016), durante a Comissão do Conselho Internacional das Uniões Científicas em Estocolmo, Suécia (TRUHAUT, 1977). Não obstante, o otimismo trazido pelos diversos avanços tecnológicos do período, como os primeiros humanos a caminharem sobre a lua (Neil Armstrong, Edwin Aldrin e Michael Collins na missão Apollo 11 em 1969), deixou a agenda política dispersa em outras temáticas. Com a temática ambiental retornando a assolar as cúpulas políticas somente após o incidente do reator da usina nuclear na cidade de Chernobyl, em 26 de abril de 1986, originando repercussões em todas as esferas e culminando na Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento (CNUMAD) ou *United Nations Conference on Environment and Development* (UNCED), na cidade do Rio de Janeiro, em 1992 (MARKERT *et al.*, 2003), também chamada de ECO-92 por lusófonos ou *Rio de Janeiro Earth Summit* pelos anglófonos. Desde então, algumas reuniões com a temática “Desenvolvimento Sustentável” foram realizadas, como a Conferência Mundial em Desenvolvimento Sustentável na cidade de Jonesburgo, África do Sul, em 2002 (UN, 2002), apelidada de RIO+10 ou *Earth Summit 2002* e, mais recentemente, a Conferência das Nações Unidas sobre Desenvolvimento Sustentável, sediada no Rio de Janeiro, em 2012 (UN, 2012), apelidada de RIO+20 ou *Earth Summit 2012*, ambas com planos de comprometimento (HAINES *et al.*, 2012) entre os países membros da Organização das Nações Unidas (ONU), incluso o Brasil, à busca do desenvolvimento sustentável: “desenvolvimento que atenda às necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras de atender suas próprias necessidades” (WCED, 1987, tradução livre), definido na Comissão Mundial do Meio Ambiente e Desenvolvimento (*World Commission on Environment and Development* – WCED) de 1987.

Embora que de forma estruturada a Ecotoxicologia seja uma Ciência recente, os primeiros relatos descritivos de danos a organismos não-alvos datam entre 23 e 79 d.C. na obra *Historiae Naturalis* de Plínio, o Ancião, que descreve “o dano causado a plantas coníferas em locais de transformação de sulfetos de ferro em óxidos de ferro pelo processo de calcinação” (MARKERT *et al.*, 2003, tradução livre). Essa nova, mas não tão nova, Ciência herda de sua progenitora, a Toxicologia, a avaliação por biomarcadores (SPARLING, 2016). Existem diversas definições ao longo da história para biomarcadores ou marcadores biológicos, entre elas “eventos capazes de sinalizar indicadores em sistemas ou amostras biológicas” (CBMNRC, 1987, tradução livre), “qualquer medida que reflita a interação entre um sistema biológico e um potencial perigo / agente ambiental” (WHO; IPCS, 1993, tradução livre) ou “qualquer resposta biológica frente a químico(s) capaz(es) de oferecer medidas de exposição e/ou efeito tóxico” (DEPLEDGE; FOSSI, 1994, tradução livre). Nesse estudo, o conceito de biomarcador estará restrito a quaisquer características em sistemas bióticos capazes de expressar informação,

entenda característica como propriedade variável inerente a um nível de organização (*e.g.*, organismo ou população). Há ainda os termos biomarcador de efeito, relacionado a características endógenas, biomarcador de susceptibilidade, relacionado às características endógenas ao contato com compostos exógenos, e biomarcador de exposição, que está relacionado às características endógenas ao contato com compostos exógenos, seus metabólitos e/ou o produto da interação do xenobiótico com o organismo (CBMNRC, 1987; WHO; IPCS, 1993; OOST *et al.*, 2003; KROON *et al.*, 2017).

Outras terminologias importantes de comum uso são o termo bioindicador, que denomina um “organismo que contenha a informação sobre a qualidade do ambiente” (MARKERT *et al.*, 2003, tradução livre), e o termo biomonitor, que denomina um “organismo que contenha informação sobre aspectos quantitativos da qualidade do ambiente” (MARKERT *et al.*, 2003, tradução livre); logo, biomonitores são um conjunto seletivo de bioindicadores em situações específicas. Por vezes alguns termos são corriqueiramente confundidos devido às sutilezas de significados e linguagens, como exemplo a terminologia *endpoint*, costumeiramente associada à terminologia biomarcador (MARKERT *et al.*, 2003) sendo, contudo, conceitos distintos no qual *endpoint* ou parâmetro terminal, em tradução literal, se refere às “medidas quantitativas de um efeito” (SPARLING, 2016, tradução livre). De forma simplista e em analogia a um trabalho remunerado hipotético, na Ecotoxicologia os bioindicadores seriam as pessoas de quem se contrata um serviço e os biomarcadores as ferramentas de medida, enquanto os *endpoints* ou parâmetros de normalidade, as escalas da medida.

Dentre as variadas características inerentes à Ecotoxicologia, muitas vezes, esta pode estar diretamente relacionada a aspectos toxicológicos de outras áreas, como a Nanotoxicologia, que se destina a avaliar os efeitos tóxicos oriundos da interação entre organismos não-alvos e nanomateriais.

### **3.3. Nanotecnologia**

A Nanotecnologia é uma Ciência recente que pode ser definida pelo projeto, síntese, aplicação e produtos concebidos por materiais engendrados cujas formas e tamanhos se encontrem em escala nano,  $10^{-9}$  (BUZEA *et al.*, 2007). A sua conceituação foi atribuída na sociedade ocidental durante o encontro da *American Physical Society* (Sociedade Estadunidense de Física – tradução livre), sediado pelo Instituto de Tecnologia da Califórnia

(*California Institute of Technology – Caltech*), em 29 de dezembro de 1959, com a pergunta de Richard Feynman: “O que aconteceria se pudéssemos arranjar os átomos um a um da forma que quisermos?” (BUZEA *et al.*, 2007, tradução livre).

A despeito do senso comum, a natureza é repleta de compostos enquadrados na definição de tamanho das NPs (*loc. cit.* p. 28) – incluindo as chamadas partículas ultrafinas ( $\leq 100$  nm) pelas Ciências Ambiental e da Saúde, como exemplo o vírus da imunodeficiência humana – 100 nm de diâmetro (BUZEA *et al.*, 2007) ou diferentes formas da série de compostos chamados *asbestos* ou amianto (KANE *et al.*, 2018; ROGGLI, 2018). Ainda, nós nos utilizávamos de materiais em escala nanométrica mesmo antes de nossa compreensão sobre eles, como aços e polímeros manufaturados (BUZEA *et al.*, 2007), vidros, cerâmicas (THOMPSON, 2007), dentre outros.

Os NMs possuem diversas aplicações na área biomédica, algumas inerentes à mobilidade intracelular, chegando ao núcleo (PANTÉ, KANN, 2002), capacidade a qual os estudos de terapia gênica com estes materiais se baseiam para projetar os nanocarreadores, compostos em escala nanométrica capazes de transportar compostos entre membranas celulares e/ou nucleares (KIM *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2017), terapia fototérmica (CHEN *et al.*, 2016b; KIM *et al.*, 2016), utilização em teranóstica (QIAN *et al.*, 2017) – combinação de terapia e diagnóstico em uma única técnica, bioimageamento (ZHAO *et al.*, 2017), contraste para tomografia computadorizada e ressonância magnética (CUI *et al.*, 2015) e engenharia tecidual (DEPAN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2012; AKHAVAN *et al.*, 2013; KU, PARK, 2013; AKHAVAN *et al.*, 2014; GOENKA *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2017).

A capacidade de penetração das NPs em sistemas bióticos está relacionada ao seu tamanho e propriedades de superfície, sendo capazes de entrar no organismo por diferentes vias (HOET *et al.*, 2004), se destacando as de trocas gasosas por difusão (*e.g.*, pulmões), pela rápida entrada na corrente sanguínea (NEMMAR *et al.*, 2001) – avaliada via biodistribuição radioativa por  $^{99m}\text{Tc}$  (Tecnécio sestamibi). Logo, o contato de organismos-alvos e não-alvos devem ser estudados, pois “devido à vasta aplicação da Nanotecnologia, as NPs se encontram presentes no ar urbano, na água tratada, nas águas residuais e esgotos, no solo e até mesmo como poeira (mineral) em ambientes de trabalho” (CHEN *et al.*, 2011, tradução livre), dispersas de forma natural (*e.g.*, incêndio florestal, erupção vulcânica, tempestade de areia, erosão de solo), não-intencional (*e.g.*, emissão de gases por veículos, queima de combustíveis fósseis, mineração, demolição, soldagem) e intencional, (*e.g.*, NP engendrada, remediação de lençóis freáticos, imageamento biomédico, medicamento – *drug-delivery*) (KABIR *et al.*, 2018). Dentre os resíduos derivados de NMs podem ser encontrados pó  $\alpha$  e  $\gamma$  de Al cristalino,  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\beta\text{-PbO}$

ortorrômbico, NPs de Fe, Ni, Pb, TiO<sub>2</sub>, Zn, CNTs, grafeno, nanocristais de celulose (SAMADAR et al, 2018), dentre outros.

Entre alguns dos aspectos tóxicos das NPs estão a indução de neurotoxicidade, apoptose, indução de caspases 1, 3 e 5, necrose, teratogenia, disfunção da capacidade mitocondrial, produção de processos inflamatórios – pró- e anti-inflamatórios, alteração das capacidades fagocíticas, da morfologia celular, aumento de secreção de muco, da taxa ventilatória, expressão P38 MAPK (*mitogen-activated protein kinases* ou proteína quinase de ativação mitótica), espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS – reactive oxygen species), expressão de genes classe Th1 (IL-2 – interleucina, IFN- $\gamma$  – interferon e TNF- $\alpha$  – *tumor necrosis factor* ou fator de necrose tumoral), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), de dopamina, norepinefrina, IL-1 $\beta$ , IL-11, IL-17, HSP 27 (*heat shock proteins* – proteínas de choque térmico), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases, ativação de histoninas 2AX, PARP-1 (poli ADP-ribose polimerase), fator de transcrição AP-1 (*activator protein* ou proteína ativadora), NF- $\kappa$ B, genes NLRP3 ou CIAS1 (produção de criopirinas, espécies reativas de ácidos tiobarbitúricos - *thiobarbituric acid reactive substances*: TBARS), diminuição de hemoglobina, hematócrito, entre outros (PANDEY; PRAJAPATI, 2018).

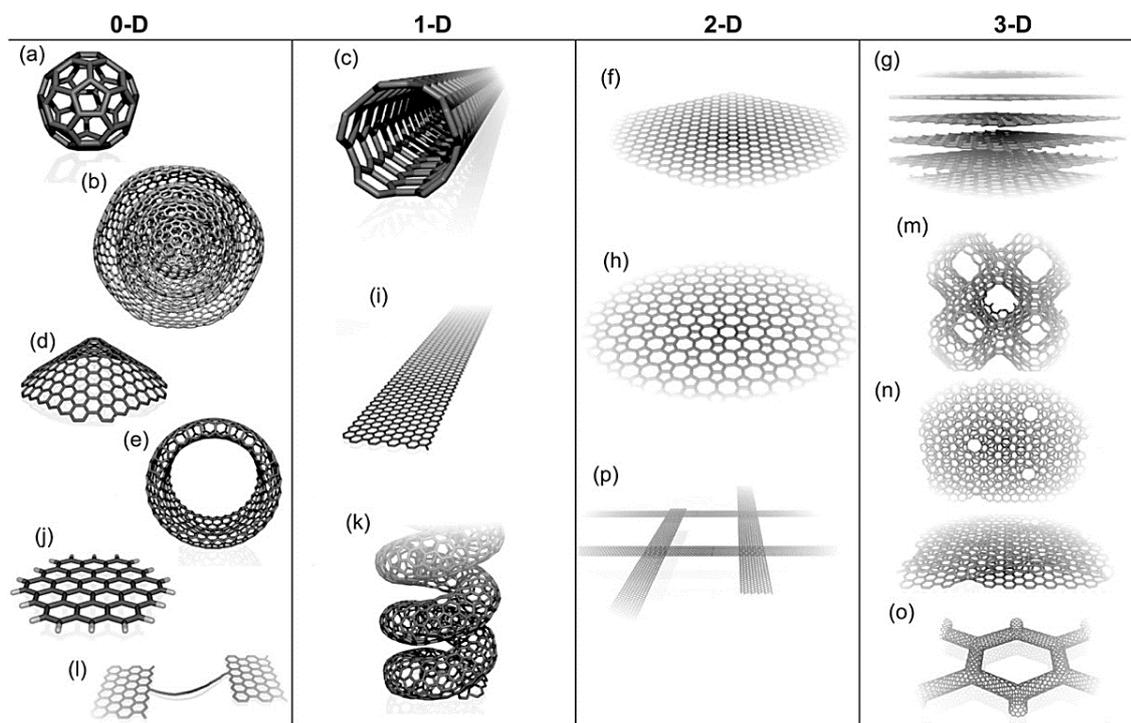
A presença dos NMs de origem natural é tão antiga quanto a formação do planeta, com registros de nanodiamantes formados por impactos de meteoros há 35 milhões de anos (OHFUJI *et al.*, 2015), enquanto os registros dos CNTs oriundos de amostras de gelo datam de ao menos 10 mil anos (MURR *et al.*, 2004; PÉREZ *et al.*, 2009). Já os NMs sintetizados encontram-se presentes em nosso cotidiano desde o século XVII – ouro coloidal com 6 $\pm$ 2 nm (THOMPSON, 2007), com o primeiro estudo toxicológico de cunho declaradamente nanotoxicológico ocorrendo apenas em 1982 (KANTE *et al.*, 1982; PANDEY, PRAJAPATI, 2018). Desde Kante *et al.* (1982), outros estudos têm sido realizados nas últimas três décadas e meia, demonstrando que talvez algumas NPs não sejam tão *brutum fulmen* (“inofensivas”) quanto alguns estudos possam inferir (LEAD *et al.*, 2018). Devido à emergente diversidade das NPs projetadas, sintetizadas/manufaturadas em escala laboratorial e/ou comercial nas últimas cinco décadas (DREYER *et al.*, 2010) – desde 1962 (grafenos), há uma crescente preocupação relacionada à segurança destes compostos e as medidas legais de proteção (JOVANOVIĆ; PALIĆ, 2012; WEXLER, 2014) humana (TOYOKUNI, 2013) e ambiental (ARTIGAS *et al.*, 2012).

### 3.3.1. Histórico dos nanomateriais carbonáceos

As nanopartículas carbonáceas (CNPs – *carbon nanoparticles*) são nanomateriais compostos basicamente de carbono, via ligação Carbono-Carbono (*loc. cit.* p. 29), semelhantes ao grafite e ao diamante (ADLER *et al.*, 2010). O carbono compreende uma das séries atômicas necessárias à vida como conhecemos (SCHIDLOWSKI, 1988; ZEISLER, GUINN, 1990) e constitui um dos elementos mais abundantes da Terra, desempenhando papéis críticos nas biosistemas e à biosfera terrestre (KUMAR *et al.*, 2019). De maneira geral, o carbono faz ligações covalentes em níveis  $sp^1$ ,  $sp^2$  e  $sp^3$  com outros átomos de carbono ou outros átomos não-metálicos (KUMAR *et al.*, 2019); sendo as hibridizações  $sp^2$  carbono-carbono ou C-C decorrentes das formas de fulerenos, grafenos e nanotubos (ZHANG *et al.*, 2016b), conferindo cor preta opaca e grande capacidade de condução elétrica, e as hibridizações  $sp^3$  C-C decorrentes das formas de diamante, conferindo cor transparente, grande capacidade isolante e alta dureza (KUMAR *et al.*, 2019).

Atualmente, são reconhecidas diversas formas de nanomateriais carbonáceos (CNMs – carbon nanomaterials) (Figura 4), muitas vezes relacionadas a eventos iniciados há poucas décadas. Esse fato se dá pois a síntese proposital controlada dos CNMs ou nanomateriais engendrados (ENMs – *engineered nanomaterials*) carbonáceos ocorreu em 1840 por C. Schafhaeuti (1840) (Figura 5), o qual descreveu o processo de exfoliação do grafite com a produção de óxido de grafite por meio da utilização de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), ácido nítrico ( $HNO_3$ ) e dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) (BOEHM, STUMPP, 2007). Muitos ainda consideram que a primeira produção real do grafeno – camadas planares com a espessura de um átomo (MARX, 2014) – foi realizada por Benjamin Collins Brodie em 1859, utilizando cloreto de potássio ( $KClO_3$ ) e ácido nítrico ( $HNO_3$ ) (GAO, 2015; SHAREENA *et al.*, 2018), chamando o óxido de grafite de “*Graphon*” (TIAN *et al.*, 2018). A terminologia grafeno foi introduzida em 1986 (BOEHM *et al.*, 1986), mas propriamente cunhada somente em 1987 (MOURAS *et al.*, 1987), com a terminologia incorporada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*) apenas em 1997 (DREYER *et al.*, 2010). No entanto, a primeira separação do grafeno cristalino – constituído unicamente por carbono – foi realizada anos mais tarde (NOVOSELOV *et al.*, 2004) com a concessão do Prêmio Nobel de Física em 2010 a Konstantin S. Novoselov e Andre K. Geim.

**Figura 4.** Modelos moleculares de diferentes tipos de nanoestruturas de carbono de classe sp<sup>2</sup> exibindo diferentes dimensões. 0-D, 1-D, 2-D e 3-D: (a) C<sub>60</sub>: *Buckminsterfullerene*; (b) cebolas gráficas ou fulerenos gigantes aninhados; (c) nanotubo de carbono; (d) nanocones ou nanochifres –*nanohorns*–; (e) nanotoroides; (f) superfície de grafeno; (g) cristal de grafite 3-D; (h) superfície *Haeckelite*; (i) *nanoribbons* de grafeno; (j) grupamento de grafeno; (k) nanotubo de carbono helicoidal; (l) pequenas correntes de carbono; (m) cristais 3-D de *Schwarzite*; (n) nanoespumas de carbono interconectadas por superfícies de grafenos com canais; (o) rede 3-D de nanotubos e (p) rede 2-D de *nanoribbons*.

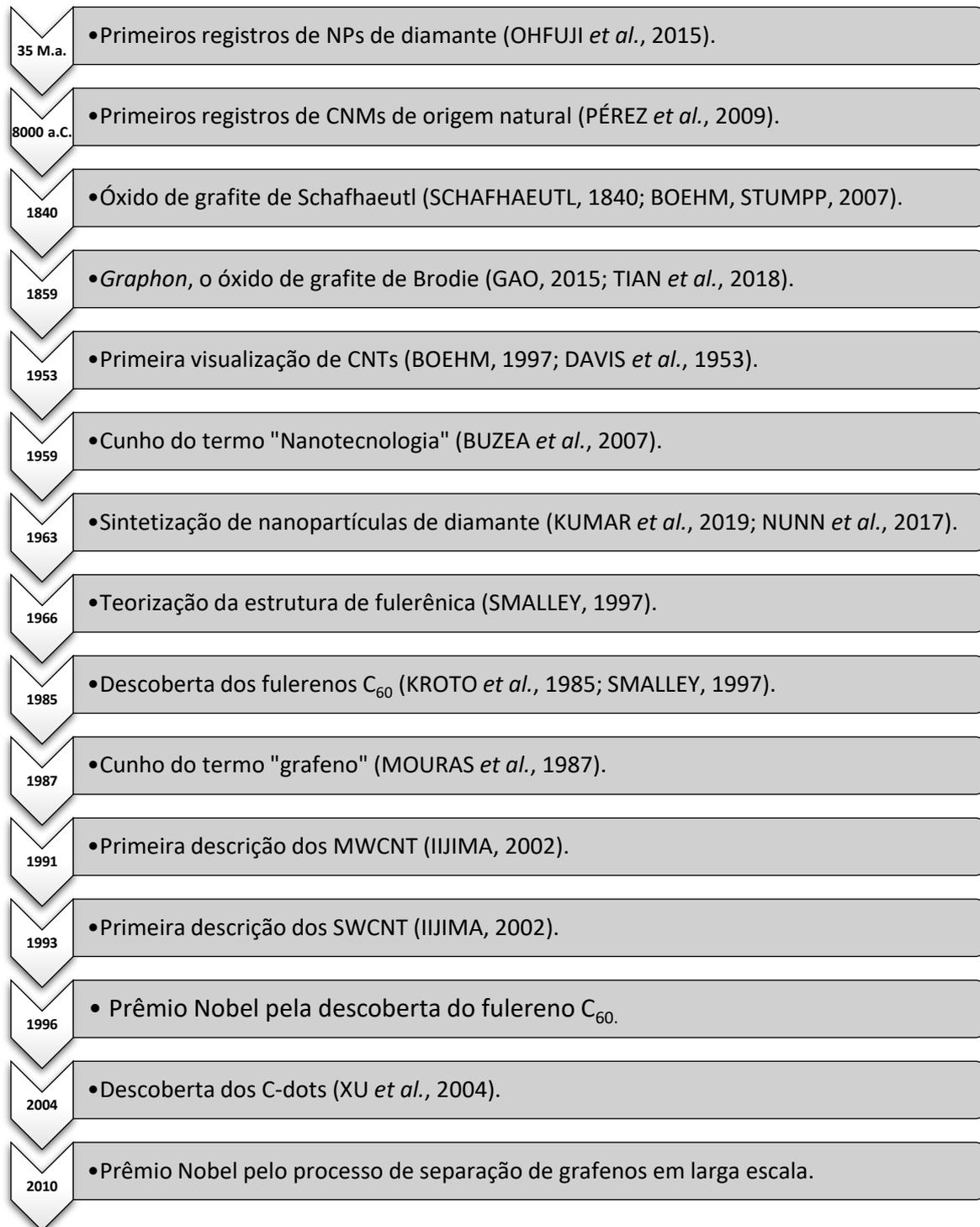


Fonte: TERRONES *et al.* (2010).

Os nanodiamantes eram conhecidos no século XX e sua primeira síntese ocorreu em 1963 por meio de explosões nucleares (KUMAR *et al.*, 2019) em ambientes com pouco oxigênio. Desde então, diversos outros processos têm sido empregados, utilizando até mesmo cavitação por ultrassom e irradiação iônica de grafite (NUNN *et al.*, 2017).

Já em 1985 foi publicada a descoberta dos fulerenos com 60 átomos de carbono (C<sub>60</sub>) – icosaedro pentagonal de diâmetro de 7 Å (10<sup>-10</sup> m) (KROTO *et al.*, 1985), a qual mereceu a concessão do prêmio Nobel a Robert F. Curl, Harold Kroto e Richard E. Smalley em 1996; contudo, a estrutura já havia sido idealizada teoricamente por David Jones em 1966, descrita como gaiola esférica fechada feita a partir de folha grafeno dobrada (SMALLEY, 1997).

**Figura 5.** Linha do tempo dos principais acontecimentos históricos acerca dos nanomateriais carbonáceos (CNMs).



Fonte: Autoria própria.

A primeira descrição dos CNTs ocorreu em 1991 para os MWCNTs e em 1993 para os nanotubos de carbono de parede simples (*single-walled carbon nanotubes* – SWCNT) por Sumio Iijima (IIJIMA, 2002). No entanto, essa descoberta já havia sido reportada por Davis *et*

*al.* em 1953 (BOEHM, 1997; DAVIS *et al.*, 1953), deixando a Academia com incertezas acerca do merecedor do título da descoberta. Já a classe mais recente dos CNMs foi sintetizada em 2004 via purificação de CNTs por eletroforese, chamada de *carbon nanodots* (C-dots) ou nanopontos de carbono, em tradução literal (XU *et al.*, 2004), correspondendo a estruturas com tamanho inferior a 10 nm (NGUYEN *et al.*, 2015; ZHANG; YU, 2016).

Muitas formas e arranjos de materiais podem ser obtidos utilizando a Nanotecnologia (TERRONES *et al.*, 2010) e cada um possui características específicas que os diferenciam em suas propriedades (KUMAR *et al.*, 2019). Alguns desses materiais têm destaque na Academia devido às suas propriedades físicas e químicas e capacidade de interação em meios bióticos, como os nanotubos de carbono.

### 3.3.2. Características gerais dos Nanotubos de Carbono e Nanotoxicologia

Os nanotubos de carbono (CNTs – carbono nanotubes) são materiais de cor preto opaca, com considerável condutividade elétrica e térmica e de grande resistência tênsil, de ligações em camada  $sp^2$ . Definidos como materiais unidimensionais (1D) de estruturas cilíndricas de diminuto diâmetro; variando entre 0,4 a 3 nm para os SWCNT e entre 1,4 a no máximo 100 nm de diâmetro para os MWCNT (IJIMA; ICHIHASHI, 1993; DING *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2001; BAUGHMAN *et al.*, 2002). Suas aplicações estão comumente associadas a componentes eletrônicos, *drug-delivery* e melhora na qualidade de materiais (*loc. cit.* p. 29), como o aumento da resistência das fibras de Kevlar™ (O'CONNOR *et al.*, 2008; O'CONNOR *et al.*, 2009) e de Zylon™ – *poly(p-phenylene-2,6-benzobisoxazole)* (PBO), também chamadas de bibenzoxalato de polifenileno (KUMAR *et al.*, 2002), utilizadas na área de Defesa.

Desde a década de 1990 diversas utilizações têm sido estudadas e aplicadas na sociedade contemporânea, ao ponto de os CNTs serem encontrados no ar (MURR *et al.*, 2004), em águas superficiais (HELLAND *et al.*, 2007) e, inclusive, já ter sido descrita sua bioacumulação em secreções pulmonares de crianças (KOLOSNAJ-TABI *et al.*, 2015). Sua presença nos meios de ocupação humanos é um fato inegável, decorrente do uso cotidiano desses NMs e dos processos que os produzem (*e.g.*, combustão de propano).

Devido às similaridades morfológicas e biopersistência dos CNTs em relação a outras fibras minerais de ocorrência natural, seus efeitos fisiológicos são comumente comparados aos das fibras de amianto ou *asbesto* – fibras de silicato com diâmetro inferior a 100 nm, com a indução de inflamação persistente devido à fagocitose frustrada dos macrófagos (HARIK, 2017; KANE *et al.*, 2018), induzindo a formação de tecidos tumorais (TOYOKUNI, 2013). O

que levanta questionamentos sobre o efeito Janus, como a dualidade dos benefícios e reações indesejadas causadas pelos CNTs (SHVEDOVA *et al.*, 2009).

Ainda é necessário ressaltar que os efeitos, benéficos ou não, de qualquer agente químico e/ou biológico está intrinsecamente relacionado com a forma de contato com o organismo (HARPER *et al.*, 2008). Duas das propriedades mecânicas de partículas associadas à capacidade de promover efeitos em organismos, são: o tamanho (CORADEGHINI *et al.*, 2013; KARLSSON *et al.*, 2009; PASSAGNE *et al.*, 2012) e a dispersão (GAO *et al.*, 2009; OPPENHEIM *et al.*, 1995). A dispersão é uma característica ligada também à propriedade do meio no qual o material de interesse é encontrado e pode ser modulada de forma a evitar a formação de agregados (KENNEDY *et al.*, 2008), os quais são capazes de interagir de maneira diferente da propriedade intrínseca de tamanho, especialmente, às NMs (FRANKLIN *et al.*, 2007).

### 3.3.3. *Dispersão de nanomateriais em suspensões coloidais*

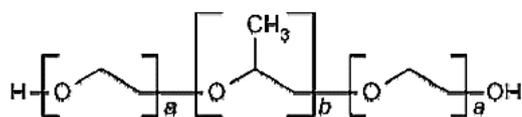
A dispersão de compostos é um fenômeno amplamente utilizado no cotidiano, desde a emulsão de gordura para o preparo de sorvete (GOFF, 1997), em sprays (sólidos amorfos) para secagem rápida (SINGH; MOOTER, 2016) e até mesmo para a utilização de nanopartículas (JOHNSON *et al.*, 2015). Suspensões em fase contínua (GOFF, 1997) de partículas (colóides) em fase descontínua uniformemente dispersas (EVERETT, 1988), na escala entre 1 nm a 1 µm, são denominadas de suspensões coloidais (JONASZ; FOURNIER, 2007); por vezes, denotando soluções de alto peso molecular (HEMMINGS; EGAN, 2013). As suspensões coloidais são empregadas nos mais diversos processos, sendo uma de suas características mais almejadas a estabilidade (ZHAN *et al.*, 2017). Nas soluções coloidais pouco estáveis as partículas tendem a se precipitar, enquanto nas estáveis estas mantêm-se suspensas. Dentre os agentes estabilizadores de suspensões coloidais de NPs se encontram os polímeros e copolímeros (DAI *et al.*, 2008; NASRABADI *et al.*, 2014; PERUMAL *et al.*, 2017).

Os polímeros, de forma geral, são moléculas formadas a partir de pelo menos um bloco molecular altamente repetido (monômero) gerando grandes estruturas moleculares por ligações em cadeia. Polímeros podem formar redes/malhas tridimensionais (ROGOVINA *et al.*, 2008), com ação dispersiva (BODMEIER; WANG, 1993; BROWN, 1956; DUONG *et al.*, 2018). A dispersão inicial ocorre por processos físicos (JOHNSON *et al.*, 2015), como a sonicação, dispersando os materiais por cavitação (CUI *et al.*, 2017), enquanto a manutenção da dispersão ocorre por repulsão eletrostática ou estérica (HONG *et al.*, 2012), criando uma barreira

energética mais intensa que o movimento Browniano das NPs, impedindo o processo de agregação das mesmas (EVERETT, 1988). Tais propriedades, tornam ampla a utilização de polímeros na terapêutica, devido à hidrofobicidade de algumas drogas (CHEN *et al.*, 2019; CRAIG, 2002; HUANG; DAI, 2014; MANZO *et al.*, 2017).

Devido à natureza altamente hidrofóbica dos CNMs (*e.g.* MWCNT) e tendência a formação de agregados (VAISMAN *et al.*, 2006), é frequente o uso de solventes poliméricos para adsorção não-covalente em meios aquosos, preservando as propriedades elétricas de empilhamento eletrônico  $\pi$ - $\pi$ , atrações eletrônicas e forças de van der Waals (CUI *et al.*, 2017). Dentre as classes de substâncias utilizadas para a dispersão dessas NPs encontram-se os copolímeros (polímeros com dois ou mais monômeros distintos), como o Pluronic™ (*Trade Mark* BASF) (IRAZUSTA *et al.*, 2018; MORAES *et al.*, 2013). Os Pluronic™, também conhecidos como poloxâmeros, são copolímeros tribloco constituídos por uma porção hidrofílica de óxido de polietileno ou *poly(ethylene oxide)* (PEO) e uma porção hidrofóbica de óxido de polipropileno ou *poly(propylene oxide)* (PPO), ligados na conformação  $(\text{PEO})_a(\text{PPO})_b(\text{PEO})_a$  (AGAFONOV *et al.*, 2019), ver Figura 6. Adiante, no presente trabalho, o copolímero tribloco Pluronic™ F-127 será mencionado como surfactante devido à propriedade anfipática supracitada. Os Pluronic™ F-68 e F-127 possuem grande capacidade de dispersão de MWCNTs, chegando a valores médios entre 10 e 15 mg.L<sup>-1</sup> para soluções com a concentração do surfactante de 0,025%, e estabilidade, mantendo a solubilização dos CNTs estável pelo período de um mês à concentração mínima de 0,1% para ambos os surfactantes (CLARK *et al.*, 2011).

**Figura 6.** Representação esquemática dos monômeros de Pluronic™ F-127.



Fonte: AGAFONOV *et al.* (2019), com modificações.

Os copolímeros Pluronic™ são comumente utilizados para *drug-delivery* em concentração de até 1% da massa corporal total do organismo (KABANOV *et al.*, 2002) e devido às propriedades surfactantes, estes interagem “com superfícies hidrofóbicas e membranas biológicas, [...] resultando em alterações estruturais da membrana e diminuição da microviscosidade (fluidização membranar)” (BATRAKOVA; KABANOV, 2008, tradução livre). Já foi descrito que além da alta capacidade de dispersão de CNMs, o Pluronic™ também

ocasiona grave depressão nos níveis celulares de ATP, assim como estimulação do citocromo C, aumentando a quantidade de EROs no citoplasma, promovendo a liberação de sinais pró-apoptóticos (KHALIQ *et al.*, 2019). Dessa maneira, cabe salientar que mais estudos tanto do Pluronic™ quanto dos MWCNTs, devido aos efeitos janus de ambos, se fazem necessários para compreender seus potenciais tóxicos, assim como suas eficácias, inclusive ambientais, e os custos-benefícios de seus empregos.



## 4. Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais desenvolvidos ao longo do presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA 4301051018 – ID 001048 e 000610) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), ver ANEXO B e ANEXO C, que segue os preceitos estabelecidos no Brasil pela Lei Arouca, 11.794/2008 (BRASIL, 2008).

### 4.1. Coleta e manutenção dos animais

Os girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) no estágio de desenvolvimento 25 de Gosner (GOSNER, 1960), estágio pré-metamórfico logo após o início da alimentação independente (aproximadamente dez dias após eclosão), foram adquiridos em um ranário comercial na cidade de Santa Bárbara D'Oeste (22°78'S, 47°40'W) (Figura 7). Os animais foram mantidos por um período mínimo de cinco dias em aquários de 60 L com circulação contínua de água declorada, constantemente aerada, em temperatura de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo natural (12h:12h – claro/escuro), com alimentação *ad libitum* de folhas cozidas de espinafre orgânica macerada. Na Tabela 1 estão representados os parâmetros físicos e químicos da água mensurados.

**Figura 7.** Imagens do local de coleta do ranário comercial onde foram adquiridos os girinos recém eclodidos de rãs-touro utilizados no presente estudo.



Fonte: Acervo pessoal de Samuel E. Dal-Médico.

**Tabela 1.** Lista de parâmetros para análise de qualidade da água.

<i>Parâmetro</i>	<i>Amostrador</i>	<i>Aquisição de dados</i>
<i>Temperatura</i>	Sonda multiparamétrica (Horiba U 50) / Termômetro	Direta
<i>pH</i>	Sonda multiparamétrica (Horiba U 50)	Direta
<i>Salinidade</i>	Sonda multiparamétrica (Horiba U 50)	Direta
<i>Turbidez</i>	Sonda multiparamétrica (Horiba U 50)	Direta
<i>Sólidos totais</i>	Sonda multiparamétrica (Horiba U 50)	Direta
<i>Condutividade</i>	Sonda multiparamétrica (Horiba U 50)	Direta
<i>Potencial Óxidoreduutivo</i>	Sonda multiparamétrica (Horiba U 50)	Direta
<i>Oxigênio dissolvido</i>	Sonda multiparamétrica (Horiba U 50)	Direta
<i>Saturação de oxigênio</i>	Sonda multiparamétrica (Horiba U 50)	Direta
<i>Dureza</i>	Teste Labcon (Dureza Total GH / Dureza em Carbonatos KH)	Direta
<i>Amônia</i>	Teste Labcon (Amônia Total)	Direta
<i>Nitrito</i>	Teste Labcon (Nitrito)	Direta
<i>Nitrato</i>	Teste PRODAC (NO <sub>3</sub> )	Direta
<i>Cloro</i>	Teste Labcon (Cloro)	Direta

Fonte: Autoria própria.

## 4.2. Delineamento dos ensaios ecotoxicológicos

A metodologia utilizada para os ensaios ecotoxicológicos foi baseada no trabalho de Nunes *et al.* (2008) e adaptada para anfíbios em acordância ao protocolo E 729 da ASTM (2002). Os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) e o surfactante Pluronic™ F-127 (Sigma-Aldrich) utilizados foram gentilmente cedidos pelas professoras Doutoras Elaine Conceição de Oliveira (Faculdade de Tecnologia de Sorocaba – FATEC-SO), Leonilda Maria Barbosa dos Santos (Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP) e Silvia Pierre Irazusta (FATEC-SO). As nanopartículas utilizadas no presente estudo, compreendem as especificações de alta pureza (95%), com diâmetro entre 10 a 30 nm e comprimento entre 0,5 a 40 µm, produzidas e caracterizadas por Helix Material Solutions, Inc. (Richardson, Texas, EUA); tendo o índice de polidispersão (0,638±0,029) e potencial *Zeta* (-30,1±0,9 mV) sido caracterizado por IRAZUSTA *et al.* (2018).

Foram utilizados 48 animais expostos individualmente, divididos em quatro grupos compostos por 12 animais cada, um controle e três expostos: 0,1% Pluronic™ F-127 (surfactante isolado), 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de MWCNT + 0,1% Pluronic™ F-127 (NP em menor

concentração) e 10 mg.L<sup>-1</sup> de MWCNT + 0,1% Pluronic™ F-127 (NP em maior concentração). A utilização do Pluronic™ F-127 se deve à dispersão dos CNTs para manutenção da solução coloidal (CLARK *et al.*, 2011; IRAZUSTA *et al.*, 2018; MONTEIRO-RIVIERE *et al.*, 2005). Previamente à utilização das soluções com MWCNT, estas foram sonicadas por 15 minutos para garantia da dispersão das NPs, como usualmente realizado para soluções coloidais (*loc. cit.* p. 49).

Foram avaliados biomarcadores em resposta à exposição ao surfactante Pluronic™ F-127 isolado e associado os MWCNT, em concentrações similares àquelas utilizadas por Mouchet *et al.* (2010) – 0,1 a 50 mg.L<sup>-1</sup>, Bacchetta *et al.* (2012) – 1 a 500 mg.L<sup>-1</sup>, e Lagier *et al.* (2017) – 0,05 a 50 mg.L<sup>-1</sup>, na qual 10 mg.L<sup>-1</sup> corresponde à EC50 ou concentração que resulta na metade do efeito máximo para *Xenopus laevis* (LAGIER *et al.*, 2017), uma vez que não existem informações na literatura acerca das concentrações ambientalmente relevantes desta nanopartícula em corpos d'água.

A solução-mãe de concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup> de MWCNT foi preparada 5 dias antes da utilização, havendo respaldo acerca da estabilidade da dispersão coloidal pelo período mínimo de 30 dias (*loc. cit.* p. 50). A solução-mãe do grupo Pluronic™ F-127 foi preparada na mesma data que a solução de nanotubos de carbono à concentração de 10%. Ambas as soluções-mãe foram mantidas ao abrigo de luz. As diluições foram calculadas segundo a Equação 1. A exposição foi realizada retirando-se, primeiramente, o volume de referência a ser inserido da solução-mãe de água deionada dos recipientes de polietileno com os animais e adicionado o mesmo volume para o estabelecimento da concentração desejada, no dia primeiro de exposição. Os volumes de referência para os grupos podem ser observados na Tabela 2.

**Equação 1.** Cálculo da diluição de solução-mãe para exposição a concentração desejada de xenobióticos. Onde *m*, representa massa; *v*, representa volume; 1, representa valores da solução-mãe e 2, representa valores da solução de concentração desejada.

$$m_1 \cdot v_1 = m_2 \cdot v_2$$

Fonte: BROWN *et al.* (2005).

**Tabela 2.** Valores de referência para diluição ao preparo das soluções de exposição.

Parâmetro/Grupos	Controle	0,1% Pluronic™ F-127	0,1 mg.L <sup>-1</sup> MWCNT + Pluronic™	10 mg.L <sup>-1</sup> MWCNT + Pluronic™
Volume de referência (mL)	0	10	0,5	50

Fonte: Autoria própria.

Os animais foram privados de alimentação, dentro das garrafas, durante 48 horas antes do início da exposição aos xenobióticos, período de aclimatação, e durante todo o período de exposição. A aclimatação decorreu em água de clorada. A exposição aos xenobióticos teve a duração de 96 horas, se iniciando logo após a aclimatação. O ensaio foi realizado sem trocas de água, caracterizado por sistema de exposição estático. Os animais foram mantidos individualmente em recipientes de 1,5 L de polietileno, contendo 1 L da solução do devido grupo aerado constantemente, em acórdância à ASTM (2002). Os recipientes de polietileno com os animais foram mantidos em um contêiner com sistema de banho termostatizado (ver Figura 8) em sala climatizada, mantendo a temperatura em  $25 \pm 1$  °C, com variação máxima de 0,5 °C para cada sistema individual. A eutanásia foi realizada após a aferição do parâmetro de massa corpórea, fotografia corporal externa e punção sanguínea; por meio de concussão cefálica (AVMA, 2001; AVMA, 2013), sem o uso de anestésico. Esse método foi empregado, pois não causa efeitos colaterais no desempenho cardíaco dos animais (BURGGREN *et al.*, 1983), diferentemente da sedação.

**Figura 8.** Sistema de exposição desenvolvido para a realização dos ensaios ecotoxicológicos com girinos de rã-touro, *L. catesbeianus*. **A.** Vista geral dos tanques experimentais de cada grupo contendo banho termostatizado e recipientes de polietileno contendo um litro de água com ou sem a presença de xenobióticos. **B.** Animal experimental já dentro do recipiente de exposição. **C.** Contêiner contendo aeração com distribuição de fluxo individual para cada recipiente (vista lateral). **D.** Visão interna do contêiner mostrando sistema de distribuição de fluxo de ar e termostato para aclimatação térmica (vista superior).



Fonte: Autoria própria.

### 4.3. Nível de atividade

Durante o período de aclimação e de exposição, o nível de atividade dos animais foi monitorado duas vezes ao dia, sendo classificados como ativos ou inativos (BRIDGES, 1997), quando apresentassem movimento ou não se locomovem (estado estacionário ou flutuação passiva), respectivamente.

### 4.4. Massa Corpórea

Antes da exposição e imediatamente após a eutanásia os animais foram pesados (AY220, Shimadzu), a fim de obter a variação da massa corpórea dos diferentes grupos experimentais (DAL-MÉDICO *et al.*, 2014).

#### 4.4.1. Massa ventricular relativa

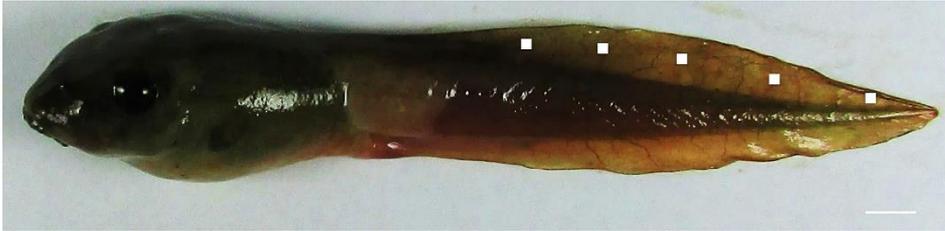
Após a eutanásia o coração foi removido, o ventrículo seccionado e pesado (AY220, Shimadzu). A massa ventricular relativa foi representada como um percentual da massa corpórea (DAL-MÉDICO *et al.*, 2014).

### 4.5. Pigmentação Externa

Após a exposição e antes da eutanásia, os animais foram fotografados (câmera Canon PowerShot Sx400 – 16 Mpx) sob condição de luz padronizada. As imagens foram convertidas para o padrão CIE (“Commission Internationale de l’Éclairage” ou Comissão Internacional de Iluminação) Lab de espaço de cor, o canal L normalizado (preto: L=0 e branco: L=255), adoção de área de referência (pele: 5 mm<sup>2</sup> na região dorso-caudal do girino) e aquisição dos valores de reflectância foram obtidos pela ferramenta histograma do software Adobe Photoshop 6.0. Para cada animal foram confeccionadas duas fotos e o valor de reflectância correspondeu à média para a soma das imagens de cada indivíduo. O escurecimento foi calculado como percentual em relação à reflectância (preto = 100%). Os procedimentos foram baseados na metodologia desenvolvida para anfíbios por Franco-Belussi *et al.* (2016), adotando uma área total de 5 mm<sup>2</sup>, por meio da média dos valores obtidos de cinco áreas de 1 mm<sup>2</sup> distribuídas na região membranosa da nadadeira caudal superior (ver Figura 9). As áreas, no eixo logitudinal, foram

identificadas como região mais anterior membranosa, região de maior altura, região mais posterior membranosa e duas regiões intermediárias estabelecida a partir da região de maior altura e regiões das extremidades mencionadas; e no eixo ventrodorsal para as posições médias da região membranosa da nadadeira caudal superior.

**Figura 9.** Foto lateral esquerda de girino de rã-touro (*L. catesbeianus*) no estágio 25 de Gosner, com regiões de amostragem de coloração identificadas pelos quadrados de cor branca (1 mm<sup>2</sup>). Barra indica 5 mm.



Fonte: Autoria própria.

#### **4.6. Frequência cardíaca *in situ***

Para determinação da frequência cardíaca *in situ*, após a eutanásia, foi realizada uma incisão na região ventral dos organismos, expondo o pericárdio e a contagem visual dos batimentos cardíacos foi realizada de forma a possibilitar a determinação da frequência cardíaca ( $f_H$ ) em batimentos por minuto (bpm), baseado em Costa *et al.* (2008) e Salla *et al.* (2018).

#### **4.7. Técnicas realizadas hematológicas**

Todas as técnicas para análise do sangue foram realizadas por punção sanguínea da veia caudal, com material previamente heparinizado. A heparinização seguiu diluição de 1:50 mL de heparina 5000UI em solução salina de anfíbios (60% de sal da solução salina humana), baseada em Ranzani-Paiva *et al.* (2013).

##### *4.7.1. Contagem eritrocitária*

O sangue foi diluído na proporção 2:98  $\mu$ L (v:v) em solução formol-citrato (3,0 mL de formaldeído 37%, 2,9 g de citrato de sódio em – q.s.p. – 100 mL de água destilada) (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). A suspensão foi introduzida em câmara de Neubauer e o número de eritrócitos foi aferido, utilizando cinco quadrantes do quadrante central, com o resultado

processado, segundo a Equação 2, para obtenção da densidade populacional eritrocítica por animal.

**Equação 2.** Relação da densidade populacional de células em suspensão líquida para apuração em câmara de Neubauer. Volume de referência para conversão adotado em 1 mm<sup>3</sup>.

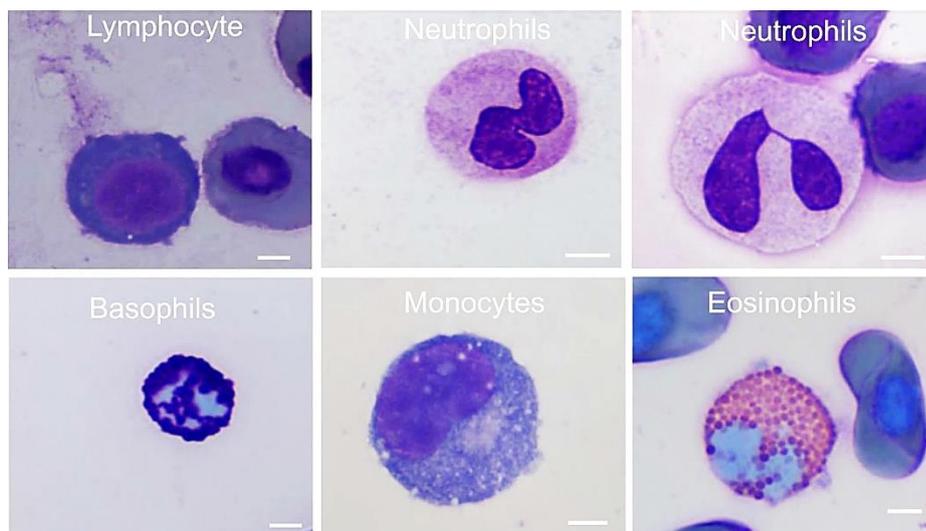
$$\text{Densidade populacional (células.mm}^{-3}\text{)} = \frac{\left( \frac{\text{número de células contadas}}{\text{volume contabilizado} \cdot \text{diluição do sangue}} \right) \cdot \text{volume de referência}}{\text{volume contabilizado}}$$

Fonte: Autoria própria em coautoria com Camila Prata.

#### 4.7.2. Contagem leucocitária

Foi realizada extensão (esfregaço) sanguínea, as lâminas foram fixadas em metanol a 4°C por 20 minutos, secas em temperatura ambiente, coradas com Giemsa 7,5 %. Foram contabilizados 250 leucócitos dos tipos celulares: basófilo, eosinófilo, linfócito, monócito, neutrófilo (Figura 10), baseada na metodologia de Carvalho *et al.* (2017), para a mesma espécie aqui utilizada, Franco-Belussi *et al.* (2018), com alterações.

**Figura 10.** Morfologia de leucócitos da espécie *L. catesbeianus*. Linfócitos (Lymphocyte): núcleos proporcionais largos. Neutrófilos (Neutrophils) com núcleos lobados. Basófilos (Basophils): células pequenas, com grande quantidade de grânulos (amorfos) citoplasmáticos, podendo sobrepor o núcleo. Monócitos (Monocytes): células grandes, com núcleos (periféricos) grandes. Eosinófilos (Eosinophils): núcleo excêntrico (posição variável) com grânulos esféricos (típico) espalhados por todo o citoplasma. Coloração: Giemsa 7,5%. Barra representa 5 µm.



Fonte: Franco-Belussi *et al.* (2018).

#### 4.7.3. Ensaio cometa ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)

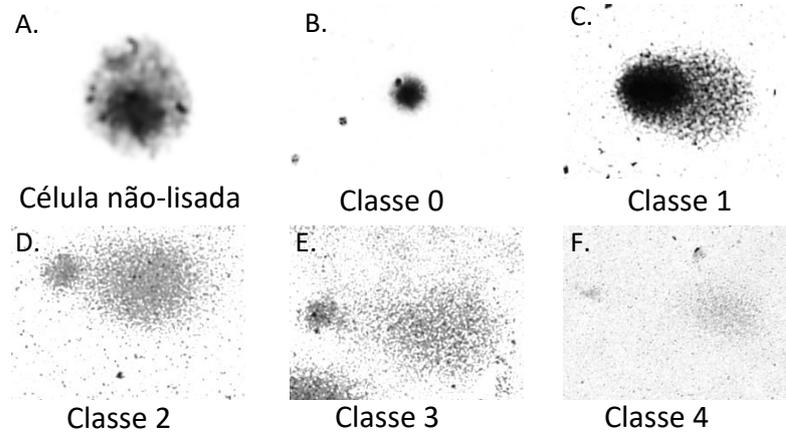
Foram utilizados 10 µL de sangue que foi homogeneizado em 10 µL de tampão fosfato-salino (PBS, livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>) para suspensão celular. A solução de suspensão celular e agarose de baixo ponto de fusão foi homogeneizada (20:80 µL), colocada em lâminas (80 µL) previamente tratadas com agarose e acondicionadas à temperatura de 4 °C durante 20 minutos, seguidos pela imersão em tampão de lise (Triton X-100, DMSO, NaCl, EDTA, base Trizma, Lauril sarcosinato de sódio) pelo período de 1h à 4 °C. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba com tampão de eletroforese durante 25 minutos; se iniciando a corrida após esse período. A corrida de eletroforese foi realizada durante 20 minutos em 36 V e 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com tampão fosfato salino (PBS) livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, secas, fixadas em etanol (absoluto) por 5 minutos e acondicionadas à 4 °C (tempo não superior a 7 dias) até o processamento da coloração por impregnação de prata. A leitura foi realizada a partir de 4 imagens adquiridas por microscópio ótico (Olympus BX41) com emissor de ultra-violeta (Olympus U-RFL-T) e câmera acoplada (Olympus DP-72 12,8 Mpx CCD 12-bit), com categorização de nucleóides em cinco classes (0-4), nas quais a classe inicial representa nenhum dano ao material genético e a classe final representa dano máximo em termos da extensão de dano ao DNA (Figura 11). O procedimento foi baseado em García *et al.* (2004), Mouchet *et al.* (2005) e Olive e Banáth (2006), com modificações. Um gráfico sumarizando o percentual de dano médio por grupo foi gerado, adaptando o cálculo do escore de Collins (2004) e Lovell e Omori (2008), se utilizando da média ponderada dos valores obtidos para cada amostra (Equação 3), considerando o percentual médio de dano para cada classe do escore, com os valores retirados de Dalboni *et al.* (2012), sendo descritos na Tabela 3. A análise desse biomarcador foi realizada sob a coordenação da professora Doutora Silvia Pierre Irazusta, no laboratório de Toxicologia Ambiental e Ocupacional da Faculdade de Tecnologia de Sorocaba (FATEC-SO).

**Equação 3.** Média ponderada do percentual de dano das diferentes classes para estimar o dano causado por cada tratamento.

$$\% \text{ Dano genético médio} = \frac{\sum_{i=n_0}^n \text{valores percentuais médios}}{n}$$

Fonte: Autoria própria.

**Figura 11.** Fotografias de núcleo e nucleóides após SCGE em aumento de 100X. A. célula não lisada durante a preparação para a eletroforese. B. nucleóide sem danos de fragmentação detectados. C. nucleóide com poucos danos. D. nucleóide com danos moderados. E. nucleóide com danos moderados-altos. F. nucleóide com dano genético estrutural alto.



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 3.** Comparação entre as classes de categorização de danos genéticos e a sua média absoluta em percentual de danos por célula/categoria.

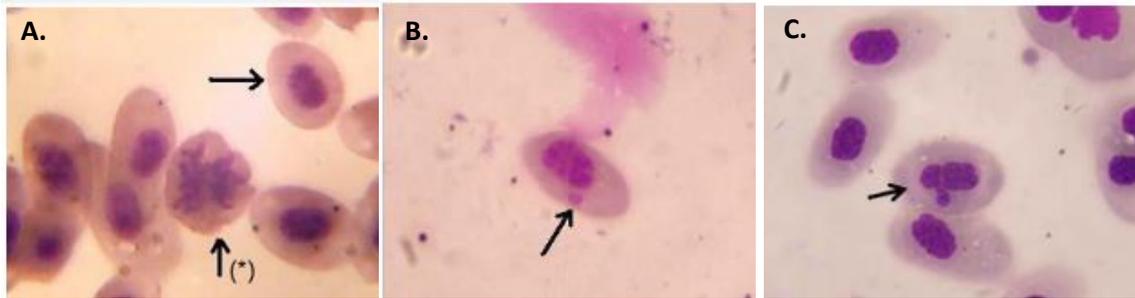
<i>Classes</i>	<b>Percentual de dano do DNA nuclear</b>	<b>Média</b>
<b>0</b>	0%	0%
<b>1</b>	1% a 25%	12,5%
<b>2</b>	26% a 45%	35,0%
<b>3</b>	46% a 70%	57,5%
<b>4</b>	71% a 100%	85,0%

Fonte: Autoria própria, baseado em Dalboni *et al.* (2012).

#### 4.7.4. Anormalidades nucleares

Foi realizada extensão sanguínea, para as observações de anormalidades nucleares. As lâminas foram fixadas em metanol a 4°C por 20 minutos, secas em temperatura ambiente e coradas com Giemsa 7,5 %, durante 15 minutos. Foram avaliadas 1000 células eritrocíticas e quantificado o número de anormalidades por anormalidade e grau encontrado (*e.g.*, 24 células com 2 micronúcleos). Dentre as anormalidades, foram avaliadas micronúcleos e projeções do tipo broto nuclear (*NBud* ou *Bud*) (Figura 12) de acordo com as metodologias de Lajmanovich *et al.* (2014), Pérez-Iglesias *et al.* (2016) e Franco-Belussi *et al.* (2018).

**Figura 12.** Morfologia nuclear eritrocítica em aumento de 100X. Em A., eritrócitos com núcleo normal (seta) e célula em fase mitótica (\*). Em B., micronúcleo (seta). Em C., *bud* (seta).



Fonte: Lajmanovich *et al.* (2014).

#### 4.8. Forma de análise dos resultados

Todos os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software Graphpad Prism 5.01. Foi empregado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os conjuntos de dados paramétricos passaram pelo teste ANOVA One-Way, com pós-teste Tukey-Kramer para dados balanceados ou Bonferroni para dados não-balanceados. Os conjuntos de dados não-paramétricos foram analisados por meio do teste Kruskal-Wallis e pelo pós-teste Dunns. Os valores de P menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

## 5. Resultados e Discussão

Os parâmetros físicos e químicos da água encontram-se em concordância com as normas do protocolo ASTM (2002) e podem ser observados na Tabela 4. A temperatura durante o bioensaio foi de  $25 \pm 1$  °C (termômetros nos recipientes de polietileno).

**Tabela 4.** Parâmetros físicos e químicos da água ao início do bioensaio e após a exposição para cada um dos grupos experimentais.

	Parâmetros	Unidade	Grupos				
			Início do bioensaio (H <sub>2</sub> O dechlorada)	Término do bioensaio			
				Controle	Pluronic™ F-127	0,1 mg.L <sup>-1</sup> MWCNT + Pluronic™	10 mg.L <sup>-1</sup> MWCNT + Pluronic™
Testes Comerciais	Amônia	ppm	0	1 a 2	1 a 2	1	0,5 a 1
	Nitrito	ppm	0	0	0	0	0,25
	Nitrato	mg.L <sup>-1</sup>	0	5	5	5	5
	Cobre	ppm	0	0	0	0	0
	Dureza Total GH	ppm (CaCO <sub>3</sub> )	50	50	50	50	50
	Dureza em Carbonatos KH	°dH	3,5	3	3	3	3,5
	O <sub>2</sub> Dissolvido	ppm	6 a 8	6 a 8	11	6 a 8	11
Sonda Multiparamétrica	pH	log H <sup>+</sup>	8,27	8,35	8,1	8,5	8,29
	ORP (Potencial de Oxi-Redução)	mV	306	279	300	324	399
	Condutividade	mS.cm <sup>-1</sup>	0,323	0,338	0,332	0,338	1,49
	Turbidez	NTU	0	5,4	7,4	3,1	6,1
	O <sub>2</sub> Dissolvido	mg.L <sup>-1</sup>	7,07	7,04	7,03	6,9	6,72
	Saturação O <sub>2</sub>	%	88,1	89,4	90,5	89	87
	Sólidos Totais	g.L <sup>-1</sup>	0,21	0,219	0,216	0,22	0,951
	Salinidade	%	0,02	0,02	0,02	0,02	0,07

Fonte: Autoria própria.

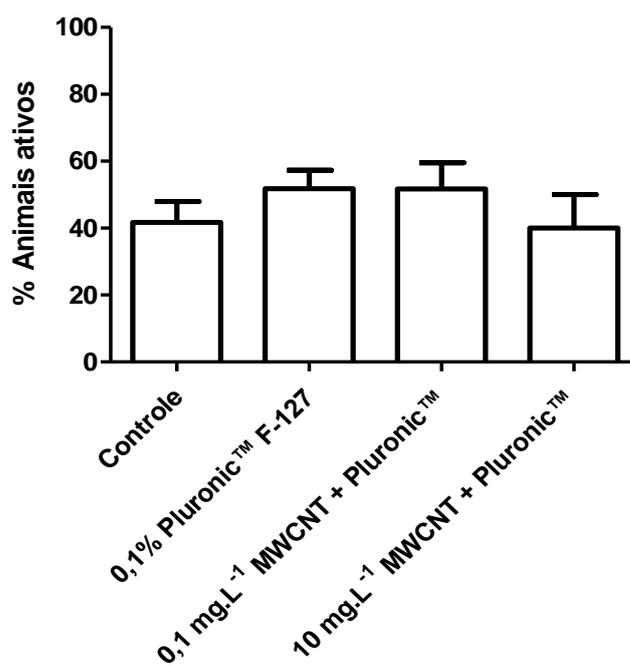
### 5.1. Mortalidade

Foi observada uma mortalidade de 8,3% dos animais do grupo exposto ao Pluronic™ F-127 ( $P < 0,05$ ), valores estes dentro das normativas exigidas pelo protocolo da ASTM (2002). Em contraste, para os demais grupos experimentais, incluso o controle, só foram observados efeitos subletais, descritos a seguir.

## 5.2. Determinação do nível de atividade (animais ativos)

Como pode ser observado na Figura 13, nenhum grupo experimental apresentou variações no nível de atividade ao final das 96 horas de exposição. Variações do nível de atividade de girinos expostos a agentes estressores pode aumentar como uma resposta aversiva de fuga frente ao estímulo aversivo a ele imposto (DAL-MÉDICO *et al.*, 2014). Por outro lado, uma letargia é em alguns casos observada como uma forma de preservação e desvio de energia para o processo de desintoxicação do xenobióticos ou ainda como efeito indireto da inibição da atividade das colinesterases centrais ou da placa nervosa terminal por determinadas classes de poluentes, como no caso dos organofosforados (COSTA *et al.*, 2015) ou de fármacos como o propranolol (MATUS *et al.*, 2018). Contudo, no presente estudo os xenobióticos utilizados parecem não resultar em tal resposta aversiva nos girinos de rã-touro, além de não haver relatos de quaisquer efeitos inibitórios sobre a atividade das colinesterases. Porém, um desvio de energia da atividade natatória para mecanismos de desintoxicação não pode ser descartado, o que impediria um aumento adaptativo do nível de atividade. Isso será discutido mais adiante, quando analisarmos os efeitos sobre os demais biomarcadores.

**Figura 13.** Nível de atividade dos girinos de rãs-touro (*L. catesbeianus*) dos diferentes grupos experimentais (n=12 animais cada) após 96 horas com relação ao início do bioensaio. Valores médios  $\pm$  1EPM. Não houve diferença estatística entre os grupos analisados ( $P>0,05$ ).



### 5.3. Estadiamento de Gosner

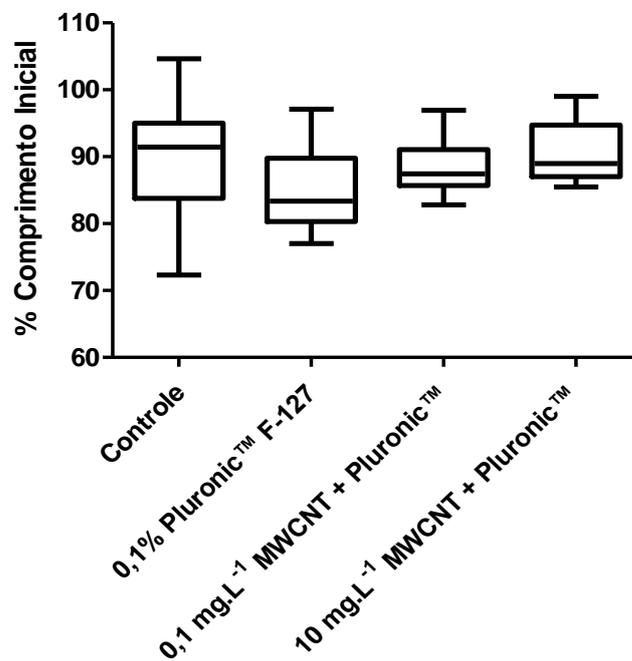
Todos os animais experimentais após as 96 horas de exposição dos diferentes grupos se mantiveram no mesmo estágio de desenvolvimento de Gosner (1960) do início do ensaio (25 de Gosner). Tal observação provavelmente está correlacionada ao curto período de exposição, uma vez que a metamorfose completa dos girinos da espécie a temperaturas semelhantes às aqui utilizadas (21 a 27°C) dura de três a quatro meses (VIZOTTO, 1981). Assim, se tendo em consideração que no início da exposição os animais já se encontravam no estágio 25 de Gosner, seria demandado tempo maior para que os animais chegassem ao estágio 46 de Gosner, ou seja, término do processo metamórfico.

Contudo, já foi demonstrado para diferentes espécies de anfíbios uma aceleração da metamorfose com o intuito do animal fazer a transição entre o meio exclusivamente aquático para o semiaquático ou terrestre a fim de minimizar o estímulo aversivo (VIDAL, 2019). Porém, esses animais acabam apresentando um tamanho final após a metamorfose inferior ao daqueles não expostos, o que pode influenciar negativamente na sua capacidade reprodutiva e competição pela captura de presa, assim como aumentar a susceptibilidade a predadores. Por outro lado, fatores que atrasem ou impeçam o seu desenvolvimento metamórfico completo, como substâncias que hajam no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, como metais como o lítio, podem prejudicar o estabelecimento de suas populações. Não obstante, como supracitado, nenhum destes processos foi observado no presente estudo.

### 5.4. Tamanho corpóreo

A Figura 14 ilustra os resultados médios obtidos para a variação do comprimento dos girinos de rãs-touro em relação ao início do bioensaio. Corroborando os resultados elencados no item 5.3, aqui fica demonstrado morfometricamente que não houve alteração do estágio metamórfico após o bioensaio. É amplamente descrito na literatura que ao longo do processo metamórfico, principalmente devido a reabsorção progressiva da cauda que o comprimento final do animal é paulatinamente reduzido (GOSNER, 1960; ALEXANDER *et al.*, 2011).

**Figura 14.** Variação do comprimento corpóreo dos girinos de rãs-touro (*L. catesbeianus*) dos diferentes grupos experimentais (n=12 cada) após 96 horas com relação ao início do bioensaio. Valores médios  $\pm$  1EPM. Não houve diferença estatística entre os grupos analisados ( $P>0,05$ ).



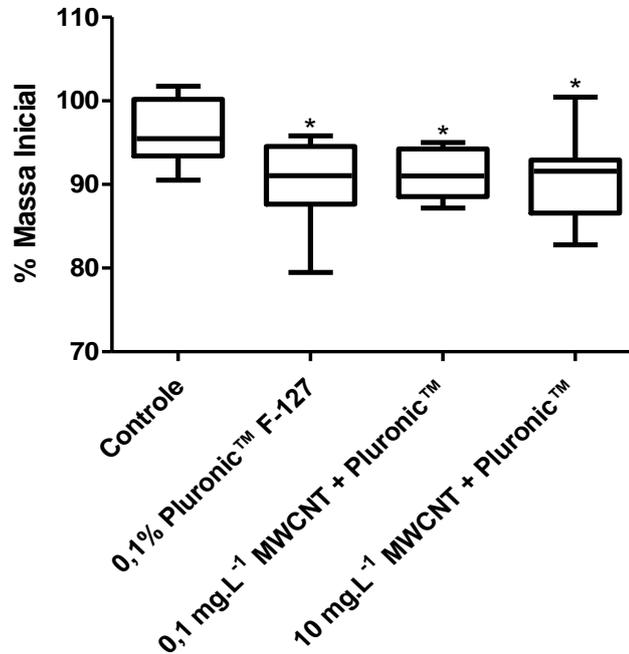
Fonte: Autoria própria.

### 5.5. Massa corpórea

Diferentemente do que foi observado para o comprimento corpóreo e para o estadiamento de Gosner (GOSNER, 1962), todos os animais expostos apresentaram uma variação de massa inferior àquela observada para o controle ( $P<0,0011$ ). Tal fator não pode ser atribuído a uma anorexia resultante da privação de alimento durante o período de exposição, uma vez que a massa corpórea dos indivíduos controle após 96 horas de exposição foi semelhante ( $P>0,05$ ) em relação àquela observada no início da exposição (ver Figura 15).

Por outro lado, a redução da massa corpórea poderia estar associada a perda de líquidos corpóreos, gordura ou mesmo atrofia de órgãos, e tampouco poderia ser atribuída a uma alteração do estadiamento metamórfico, conforme pode ser observado no item 5.3. Contudo, poderia se aventar a hipótese de que os animais expostos não conseguiram aumentar seu nível de atividade como uma resposta aversiva aos xenobióticos, uma vez que a energia que seria utilizada para contração da musculatura esquelética estaria sendo desviada para o processo de depuração e desintoxicação.

**Figura 15.** Variação da massa corpórea dos girinos de rãs-touro (*L. catesbeianus*) dos diferentes grupos experimentais (n=12 animais cada) após 96 horas com relação ao início do bioensaio. Valores médios  $\pm$  1EPM. Os asteriscos acima das barras horizontais denotam uma diferença significativa em relação aos valores observados para o controle (P=0,0011).



Fonte: Autoria própria.

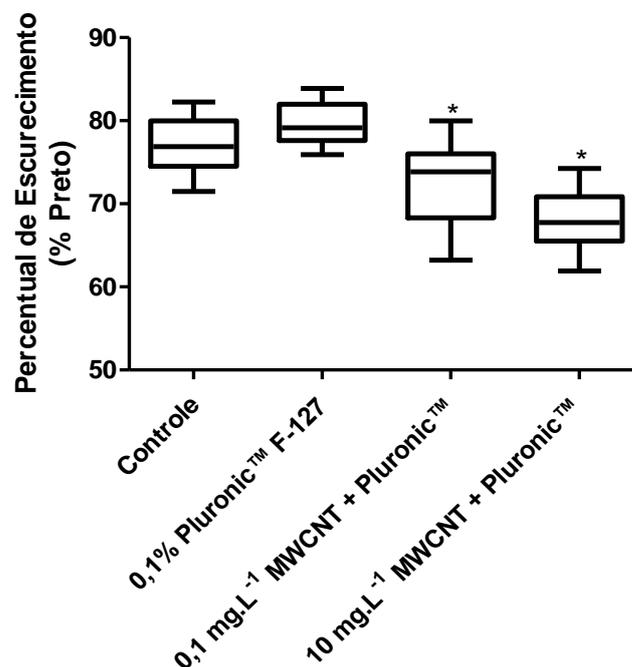
## 5.6. Pigmentação Externa

Existem células na derme dos animais ectotérmicos denominadas melanóforos responsáveis por uma rápida mudança de pigmentação corpórea (BAGNARA e MATSUMOTO, 2006). Tal resposta é denominada alteração de cor fisiológica (OSHIMA, 2001). No interior dos melanóforos existem organelas denominadas melanossomos, onde se encontra o pigmento melanina (FRANCO-BELUSSI, 2014).

Em anfíbios, a dispersão dos pigmentos no interior dos melanóforos, provocando escurecimento cutâneo, pode ocorrer por controle hormonal (BAGNARA e MATSUMOTO, 2006; FRANCO-BELUSSI, 2014) via aumento de secreção do  $\alpha$ -Hormônio Estimulante do Melanócito ( $\alpha$ -MSH) (HADLEY *et al.*, 1985; BAGNARA e MATSUMOTO, 2006), produzido pela adenohipófise (TANAKA; KUROSUMI, 1986). Em contraste, a agregação dos melanossomos é induzida, também, hormonalmente pelo Hormônio Concentrador de Melanina (MCH), sintetizado pelo hipotálamo de vertebrados e secretado pela neurohipófise (FUJII, 2000; KAWAUCHI, 2006; FRANCO-BELUSSI, 2014). Por fim, o último mecanismo de

controle hormonal pigmentário é mediado pela melatonina produzida pela glândula pineal quando há redução da luminosidade, também agregando os melanossomos e resultando em clareamento da pele dos anfíbios (MESSENGER E WARNER, 1977; ASPENGREN *et al.*, 2003; FRANCO-BELUSSI, 2014). Além desse controle hormonal também já é bem caracterizado um controle nervoso noradrenérgico (OSHIMA, 2001) disparado por estímulos estressores (MELIA; DUMAN, 1991; BREMMER, *et al.*, 1996; VALENTINO, *et al.*, 1997; PARDON *et al.*, 2002). Contudo, ainda foi identificado um mecanismo local de controle da pigmentação, por meio do qual o aumento da incidência luminosa sobre os melanóforos ativa opsinas (*e.g.*, melanopsina), dispersando diretamente os melanossomos provocando escurecimento do animal sem mediação neuro-hormonal, o inverso ocorrendo a medida que a intensidade luminosa é reduzida (OSHIMA, 2001).

**Figura 16.** Valores de pigmentação corpórea (porcentagem de escurecimento com relação à cor preta) utilizando como referência uma área de 5 mm<sup>2</sup> da região membranosa superior da nadadeira caudal de girinos de rã-touro nos diferentes grupos experimentais (n=12 animais cada). Valores médios  $\pm$  1EPM. Os asteriscos acima das linhas horizontais denotam uma diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) em relação ao controle.

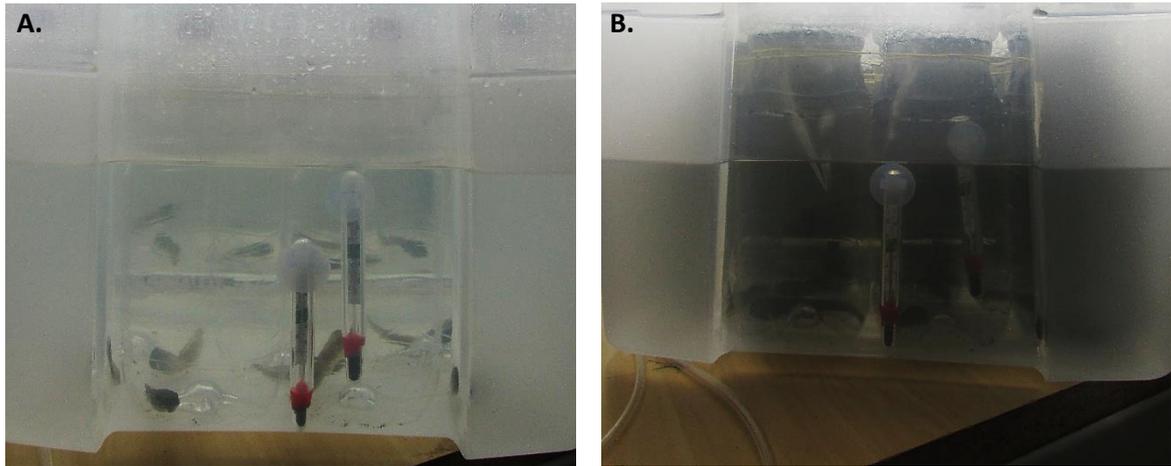


Fonte: Autoria própria.

É sabido que a pigmentação corpórea de diversos animais, dentre eles vertebrados aquáticos apresentam um aumento da pigmentação corpórea em resposta a estímulos como captura, defesa de predadores, mudanças de iluminação ou transparência/coloração da água

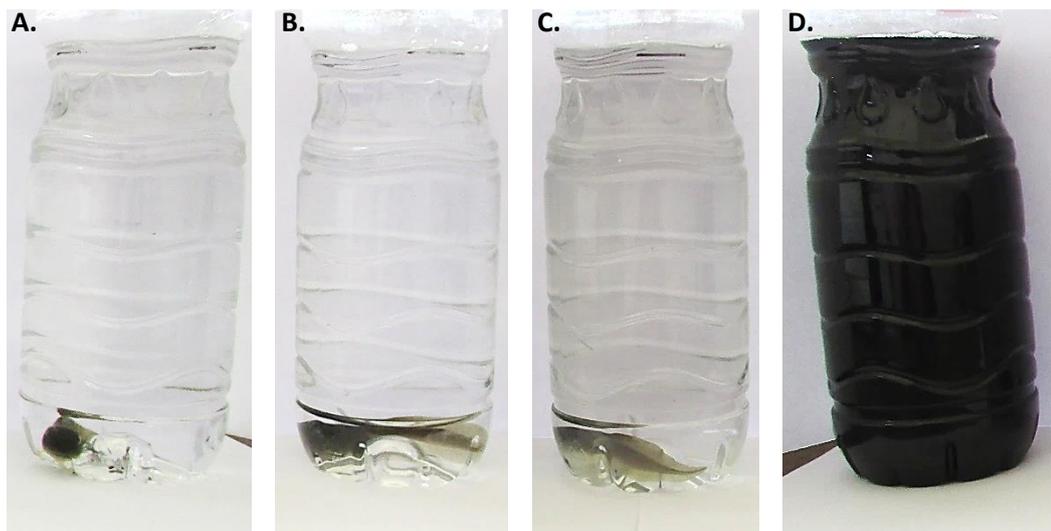
(NUNES, 2011) e também em função a outros estressores de origem antropogênica, como aumento da incidência da radiação ultravioleta (FRANCO-BELUSSI, 2018) e também exposição a poluentes (MATUS *et al.*, 2018).

**Figura 17.** Sistema de exposição. A. Vista frontal do contêiner experimental do grupo controle, evidenciando transparência da água. B. Vista frontal do contêiner experimental do grupo controle do grupo exposto a  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de MWCNT, evidenciando o nítido escurecimento da água dos recipientes de polietileno onde estavam contidos os animais experimentais.



Fonte: Autoria própria.

**Figura 18.** Vista detalhada dos recipientes de exposição, já contendo os animais, aos diferentes tratamentos experimentais, contrastando a opacidade crescente dos grupos  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  MWCNT + Pluronic™ e  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  MWCNT + Pluronic™, respectivamente, em relação à translucidez da água dos grupos controle e 0,1% de Pluronic™ F-127. A. Controle. B. 0,1% Pluronic™ F-127. C.  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  MWCNT + Pluronic™. D.  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  MWCNT + Pluronic™.



Fonte: Autoria própria.

Aparentemente, e de forma inesperada, os animais expostos ao MWCNT, independentemente da concentração, apresentaram uma redução da pigmentação corpórea (ver Figura 16) com relação tanto ao grupo controle quanto ao Pluronic™ F-127 (não diferiram entre si;  $P > 0,05$ ). Contudo, como mostra a Figura 17 e a Figura 18, a incidência de luminosidade nos recipientes de polietileno dos animais expostos ao MWCNT foi reduzida, corroborando a hipótese de uma redução de pigmentação mediada tanto pelo aumento da secreção de melatonina quanto pela redução de ação direta da luminosidade sobre melanopsinas dos melanóforos. Esse fator minimiza a resposta protetiva dos animais contra possíveis danos da incidência de luz solar. Contudo, isso tem implicação direta na capacidade de sobrevivência dos animais em ambientes impactados por concentrações similares desses xenobióticos, tornando os mais visíveis e assim mais susceptíveis à predação em seus ambientes naturais.

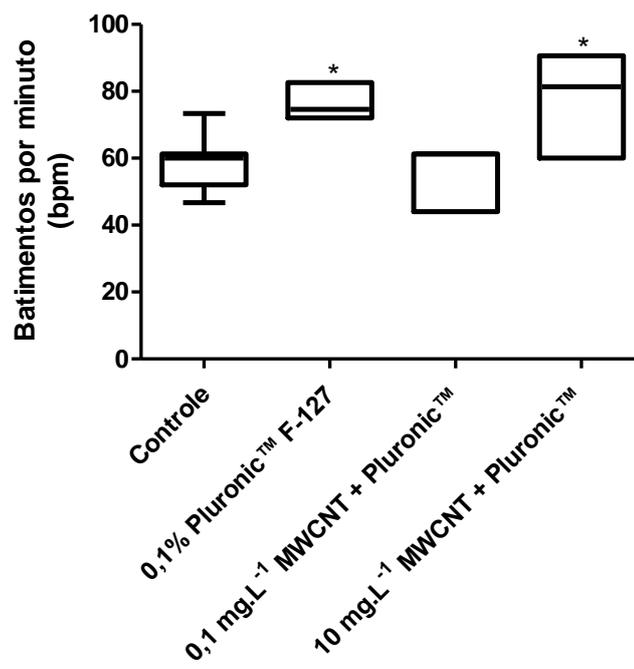
### **5.7. Biomarcadores de desempenho cardíaco: frequência cardíaca *in situ* e massa ventricular relativa**

O débito cardíaco corresponde ao produto entre a frequência cardíaca e o volume sistólico, indicando qual o volume de sangue que o coração pode bombear em um determinado período de tempo (GYTON; HALL, 2006). Indiretamente, se pode inferir que o volume sistólico dependa diretamente da massa do ventrículo, cuja hipertrofia é capaz de aumentar o volume sistólico. Há evidências de que partículas carbonáceas afetam a hemostasia vascular (PEKKANEM *et al.*, 2002; RADOMSKI *et al.*, 2005). A Figura 19 ilustra que tanto o Pluronic™ F-127 quanto o MWCNT à concentração de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  resultaram em uma taquicardia ( $P < 0,0001$ ), enquanto a massa ventricular relativa (Figura 20) dos grupos não variou em relação ao controle ( $P > 0,05$ ). Daí se pode pressupor que no grupo Pluronic™ F-127 e  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de MWCNT o débito cardíaco dos animais destes grupos foi aumentado via exclusivamente um aumento da frequência cardíaca, sem alterações do volume sistólico. Nesse sentido, vale ressaltar que em termos de dispêndio energético seria muito mais econômico aumentar a força de contração a cada batimento (*i.e.*, volume sistólico) do que aumentar o número de batimentos cardíacos em um mesmo período de tempo (*i.e.*, número de pontes cruzadas e conseqüente aumento do gasto de ATP). Talvez esse também tenha sido um fator impeditivo para o aumento do nível de atividade, pelo menos destes dois grupos experimentais. Não obstante, essa taquicardia observada nestes dois grupos indica claramente um aumento da demanda cardíaca, mais uma vez apontando para maior necessidade energética para a

desintoxicação desses xenobióticos. A ausência de variação na massa ventricular relativa (Figura 20), que poderia ser uma estratégia mais econômica energeticamente, não foi aqui observada ( $P>0,05$ ) provavelmente devido ao curto período de exposição (96 horas), pois envolveria um aumento do número de miofibrilas e uma série de rearranjos estruturais dos miócitos.

Vale ressaltar que um aumento da frequência cardíaca é mediado por um aumento da estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos que não apenas aumentam a velocidade do influxo e efluxo de cálcio para e do miócito, como também aumentam a taxa de desligamento do cálcio da troponina-C (COSTA, 1998; COSTA, 2003). Poderia aparecer ilógico, portanto, não ter havido um escurecimento cutâneo dos animais expostos ao MWCNT apesar de ter havido um cronotropismo positivo para o mesmo xenobióticos, uma vez que ambos podem ser mediados por uma estimulação adrenérgica. Contudo, a redução da intensidade luminosa sobre o tegumento dos animais parece ter sido o estímulo preponderante para a variação de pigmentação, enquanto a resposta neurohumoral foi mais intensa sobre o biomarcador cardíaco, tendo-se em vista a necessidade de aumento da performance cardíaca para desintoxicação.

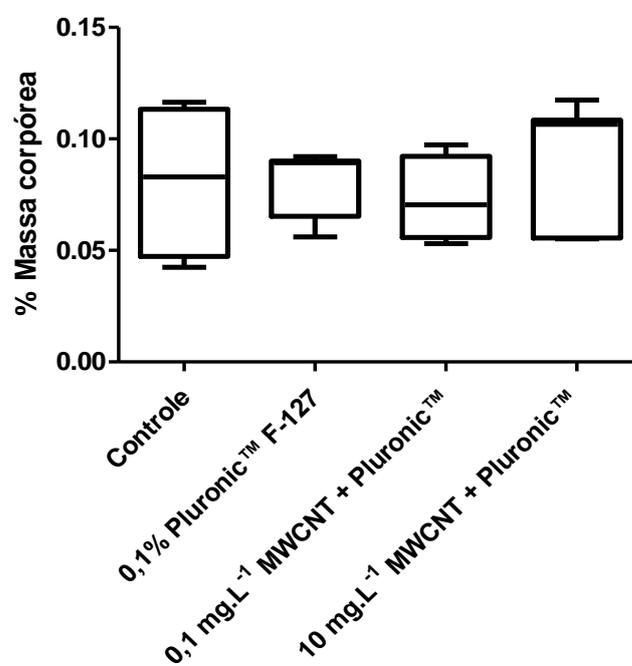
**Figura 19.** Frequência cardíaca *in situ* ( $f_H$  - bpm) dos girinos de rãs-touro (*L. catesbeianus*) dos diferentes grupos experimentais ( $n=6$  animais cada) após 96 horas de exposição. Valores médios  $\pm$  1EPM. Os asteriscos acima das barras horizontais denotam uma diferença significativa em relação aos valores observados para o controle ( $P<0,05$ ).



Podemos aqui hipotetizar que quando o surfactante (Pluronic™ F-127) é utilizado isoladamente sua toxicidade aos sistemas biológicos é maior do que quando ele está associado à nanopartícula, provavelmente devido a sua elevada solubilidade em membranas biológicas, por sua grande lipoficidade. Segundo a revisão de Vaisman *et al.* (2006), por serem moléculas anfipáticas, garantem a solubilização das CNTs em água, ligando sua porção hidrofóbica às mesmas e sua porção hidrofílica à água. Portanto, a ligação dos surfactantes às CNTs diminui a interação dos mesmos com as membranas biológicas, pois minimiza sua capacidade de interação com as membranas celulares.

Portanto, seu efeito isolado é minimizado quando associado à MWCNT e esta última substância só passa a apresentar toxicidade na concentração mais elevada. Portanto, se analisando apenas este biomarcador se pode afirmar que a concentração de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de MWCNT não exerce efeito sobre esse biomarcador. Contudo, futuros estudos serão realizados para testar a validade dessa hipótese.

**Figura 20.** Massa ventricular relativa (MVR - % massa corpórea) dos girinos de rãs-touro (*L. catesbeianus*) dos diferentes grupos experimentais (n=6 animais cada) após 96 horas de exposição. Valores médios ± 1EPM. Não foram observadas diferenças significantes (P>0,05) entre os grupos experimentais.



Fonte: A autoria própria.

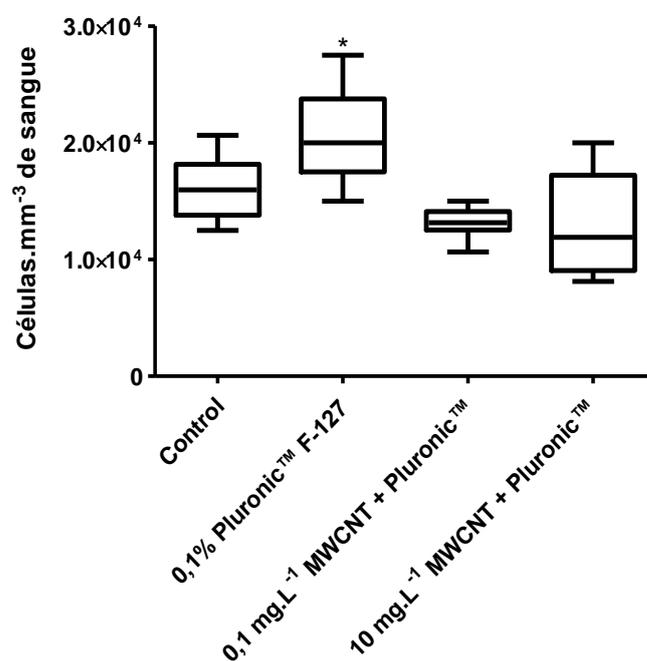
## 5.8. Densidade de eritrócitos em sangue periférico

Nos girinos os eritrócitos são nucleados e a hemoglobina encontra-se no interior dessas células e é o principal sistema de aporte de oxigênio para os tecidos (DORN; BROYLES, 1982; PINDER; BURGGREN, 1983; *loc. cit.* p. 38). Toda a série eritrocítica é produzida majoritariamente pelo fígado em adultos (*Xenopus laevis laevis*) (HADJI-AZIMI *et al.*, 1987) e também pela ilha ventral de sangue e placas dorsais laterais – tecido mesodérmico de mesma origem do fígado – nos estágios larvais (*Xenopus sp.*) (CIAU-UITZ *et al.*, 2014); com as formas celulares adultas (*Hypsiboas cordobae* e *Microhyla ornata*) mais alongadas e maiores (área de citosol e núcleo) em relação às formas embrionárias e juvenis (HOTA *et al.*, 2013; BARAQUET *et al.*, 2014), variando a densidade populacional de eritrócitos e volume celular também ao longo das estações do ano, aumentando durante as épocas reprodutivas (*Rana macrocnemis*) (ARSERIM; MERMER, 2008) e apresentando estágios celulares imaturos com núcleo mais arredondado e citosol de cor cinza-azulado quando corados com Giemsa (GUILHERME *et al.*, 2008; POLLO *et al.*, 2016). Especialmente relevante no presente contexto, é que já foi demonstrado que a eritropoiese é estimulada em anuros adultos na presença de xenobióticos (BARNI *et al.*, 2007), o que também foi observado no presente estudo para girinos (ver Figura 21). Isso pode estar relacionado à diminuição da capacidade de ligação da hemoglobina ao O<sub>2</sub>, o que resulta num menor aporte de oxigênio aos tecidos (KREMYANSKAYA *et al.*, 2012), como descrito em humanos. Além disso, tensoativos, como surfactantes (*e.g.*, Pluronic™ F-127), diminuem a concentração de O<sub>2</sub> disponível em meios aquosos (PENTEADO *et al.*, 2006). Ainda, conjuntamente ou isoladamente, a possível solubilização do muco pelo surfactante, em virtude de sua característica tensoativa anfipática (lipoficidade), como já descrito para outros surfactantes, *e.g.* Triton X-100 (OBERLE *et al.*, 1995), resulta em aumento de permeabilidade, tendo como consequência a perda do oxigênio pela pele, em virtude da alta vascularização tegumentar.

Os resultados aqui obtidos para a contagem de eritrócitos no sangue periférico também apontam para um aumento da demanda de oxigênio dos animais expostos ao Pluronic™ F-127 (P<0,0001) (Figura 21). Isso corrobora os resultados obtidos para a frequência cardíaca em que foi observada uma taquicardia para este mesmo grupo. Associados, o aumento desses biomarcadores resulta em uma maior perfusão dos órgãos responsáveis pela desintoxicação e pela eliminação do surfactante, acompanhada pelo maior aporte de oxigênio para esses tecidos realizarem este processo. Contudo, a mesma analogia não pode ser dita para a maior concentração do MWCNT, em que foi observada também uma taquicardia. Para

especificamente a contagem de eritrócitos não houve alteração ( $P>0,05$ ) para esse grupo. As diferenças entre esses dois tratamentos ainda serão discutidas nesses próximos tópicos quando avaliarmos a viabilidade dessas células transportadoras de oxigênio por meio da genotoxicidade e mutagenicidade.

**Figura 21.** Densidade populacional de eritrócitos de girinos de rãs-touro (*L. catsebeianus*) nos diferentes grupos experimentais (n=9 animais cada) após 96 horas de exposição. Valores médios  $\pm$  1EPM. Os asteriscos acima das barras horizontais denotam uma diferença significativa em relação aos valores observados para o controle ( $P<0,0001$ ).



Fonte: Autoria própria.

## 5.9. Densidade de leucócitos em sangue periférico

As células do sistema imune desempenham grande papel adaptativo frente a adversidades. Dentre os eventos fisiológicos aos quais os leucócitos estão associados, encontram-se a defesa do organismo a patógenos, sendo o aumento do número de células leucocitárias (leucocitose) em sangue periférico indicativo da ocorrência de processo infeccioso e/ou inflamatório (CERNY; ROSMARIN, 2012; WIDICK; WINER, 2016). No entanto, a depressão do sistema imune (leucopenia) pode tornar o organismo mais susceptível a patógenos (DALLAL *et al.*, 2012), o que pode ser ocasionado em decorrência à exposição a xenobióticos, como já demonstrado para a espécie aqui estudada (MARCANTONIO, 2005).

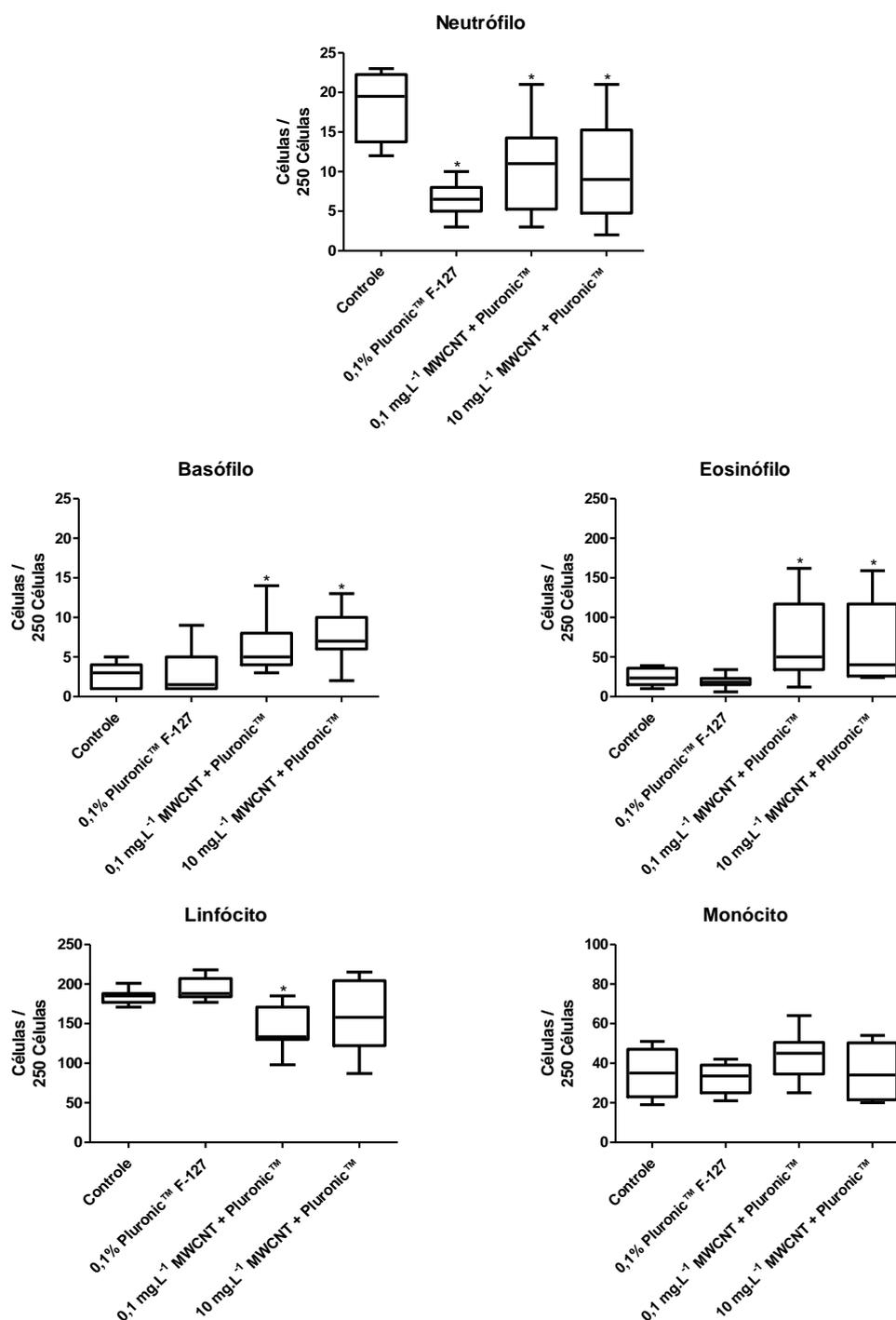
As células aqui analisadas já foram caracterizadas para anfíbios (FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2018). Funcionalmente, assim como para os demais vertebrados, os diferentes tipos de leucócitos desempenham funções imunes específicas. Os neutrófilos têm um papel na defesa inata por fagocitose de bactérias e fungos (PRIEL; KUHNS, 2019). Em contraste, o principal papel atribuído aos basófilos (NAKASHIMA *et al.*, 2018) e também parcialmente aos eosinófilos (JOSE *et al.* 1994; ROSENBERG *et al.*, 2007; KOVALSZKI; WILLEBRAND *et al.*, 2018; WELLER, 2019) está relacionado a respostas inflamatórias alérgicas. Enquanto os basófilos geram respostas alérgicas mediadas principalmente por histaminas (DVORAK, 1998) e atuam conjuntamente com as imunoglobulinas (Ig) E (NAKASHIMA *et al.*, 2018), os eosinófilos produzem efeitos semelhantes por meio da liberação de citocinas (KOVALSZKI; WELLER, 2019). Não só: o recrutamento de eosinófilos também pode ser mediado via basófilos (NAKASHIMA *et al.*, 2014). Além disso, tanto basófilos (BOYCE; FANNING, 2019) quanto eosinófilos (KOVALSZKI; WELLER, 2019) atuam na resposta a parasitos, especialmente contra helmintos. Os linfócitos atuam em respostas antígeno-específico por meio de rearranjo genético de receptores e são comumente divididos em células B (produtoras de imunoglobulinas - anticorpos) e células T citotóxicas e não-citotóxicas (LEWIS; BLUTT, 2019). Assim como os linfócitos, os monócitos também atuam na resposta imune adquirida desempenhando papel fagocítico (LEWIS; BLUTT, 2019). Portanto, conjuntamente, essas células, linfoides (linfócitos e monócitos) e mieloides (basófilos, eosinófilos e neutrófilos), atuam de diferentes formas e em diferentes frentes contra estressores ambientais e/ou biológicos.

Nesse sentido, nossos resultados mostraram (Figura 22) a partir da contagem diferencial de leucócitos, uma neutropenia em todos os grupos expostos em relação ao controle ( $P < 0,0001$ ), também observado por Carvalho *et al.* (2017) para girinos expostos à metais, enquanto houve um aumento do número de basófilos ( $P < 0,0001$ ) e eosinófilos ( $P < 0,0001$ ) apenas para os animais expostos às nanopartículas. Surpreendentemente, houve uma linfopenia em relação ao controle e também ao Pluronic™ F-127 apenas para o grupo exposto a  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de MWCNT ( $P < 0,0001$ ). Por fim, o número de monócitos permaneceu inalterado ( $P > 0,05$ ).

Conforme anteriormente mencionado, o papel central dos neutrófilos contra a infecção por bactérias e fungos pode corroborar a mortalidade de 8,3% no grupo exposto ao surfactante (*loc. cit.* p. 63), uma vez que a neutropenia pode ter sido um fator central para a ocorrência de infecções oportunistas. Tal mortalidade não foi observada para os grupos expostos às nanopartículas, a despeito da neutropenia. Contudo, as consequências da redução dessa

população celular nos grupos expostos às NPs ainda precisam ser melhores investigadas por meio de análises histopatológicas e/ou ensaios crônicos.

**Figura 22.** Densidade populacional diferencial de leucócitos em sangue periférico de girinos de rãs-touro (*L. catesbeianus*), nos diferentes grupos (n=9 animais cada). A. População de neutrófilos em 250 leucócitos ( $P<0,0001$ ). B. População de basófilos em 250 leucócitos ( $P<0,0001$ ). C. População de eosinófilos em 250 leucócitos ( $P<0,0001$ ). D. População de linfócitos em 250 leucócitos ( $P<0,0001$ ). E. População de monócitos em 250 leucócitos ( $P<0,2806$ ). Valores médios  $\pm$  1EPM. Os asteriscos acima das linhas horizontais denotam uma diferença significativa em relação ao controle. Notar diferentes escalas dos gráficos.



Fonte: A autoria própria.

Aqui também ficou evidente, por meio da análise diferencial de populações celulares de basófilos e eosinófilos, que os MWCNT desencadeiam resposta imune alérgica nos girinos de rãs-touro. Isso corrobora a afirmação anterior de que os basófilos participam no recrutamento de eosinófilos. Apesar de serem escassas as informações na literatura acerca do efeito de nanopartículas sobre o sistema imune de anfíbios, já foi demonstrado que as CNT estimulam respostas alérgicas em camundongos, assim como em humanos (ZOLNIK *et al.*, 2010), podendo resultar em efeitos positivos (*e.g.*, melhora da resposta em vacinas) e adversos (*e.g.*, lesões do tipo necrose em derme). Entretanto, apesar da hipersensibilidade (resposta alérgica) oriunda da exposição de organismos não-alvos a nanopartículas poder auxiliar na minimização de efeitos deletérios das mesmas sobre estes animais, a mesma poderia exacerbar respostas homeostáticas que não seriam necessárias em um ambiente impactado.

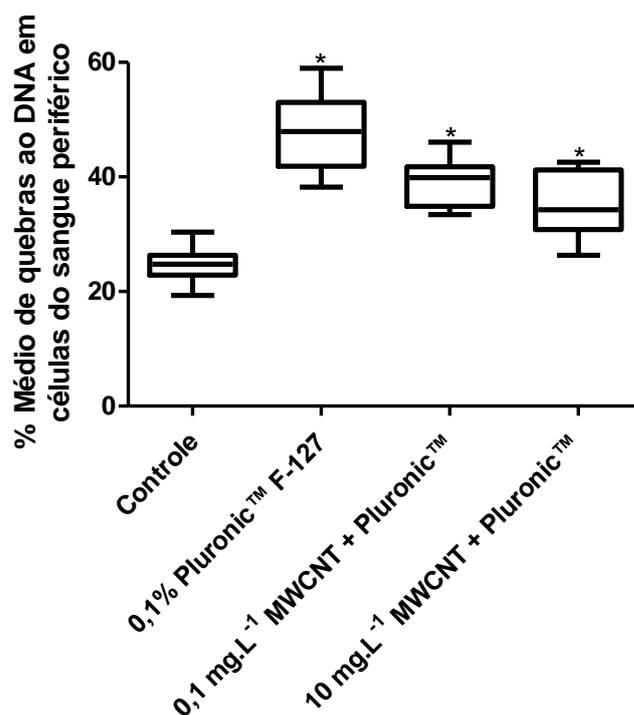
Apesar de aqui não mostrado graficamente, também foram encontrados granulomas (agregados celulares) com regiões de cor preta no seu interior nos animais dos grupos expostos ao MWCNT (ambas as concentrações), fato o qual o qual pode estar relacionado à indução do processo de agregação plaquetária, na formação dos grânulos, induzida por CNTs, como já descrito para humanos (RADOMSKI *et al.*, 2005); porém, as técnicas disponíveis não possibilitaram que tais achados fossem investigados mais a fundo, o que se deve ao fato das escassas amostras de sangue que puderam ser obtidas para cada animal, o que levou à necessidade de selecionar e restringir os biomarcadores.

#### **5.10. Ensaio cometa ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)**

O ensaio cometa pode ser utilizado em células eucariontes. Essa técnica avalia danos quantitativos precoces e potencialmente, dependendo do nível, reversíveis do DNA (KOPPEN *et al.*, 2017) a partir da extensão da cauda resultante da intensidade de fragmentação do mesmo. Dessa forma, esse biomarcador subcelular se mostra bastante sensível em resposta a efeitos precoces da exposição a concentrações subletais de xenobióticos; assim como efeitos crônicos de desequilíbrio homeostático (GORMALLY *et al.*, 2019). Por este motivo, o SCGE tem sido utilizado em diferentes espécies, tecidos e em células isoladas para compreensão dos efeitos de patologias e outros agentes estressores (SINGH, 2016). Inclusive, esse biomarcador já tem sido utilizado para mensurar o potencial mutagênico de nanopartículas (KARLSSON, 2010; KAIN *et al.*, 2012; RAHMAN *et al.*, 2017), com exemplo a NP de TiO<sub>2</sub> no teleósteo marinho

*Trachinotus carolinus* (VIGNARDI *et al.*, 2015), pertencente à mesma classe da nanopartícula utilizada neste trabalho (Figura 23).

**Figura 23.** Mutagenicidade das células do sangue periférico de girinos de rãs-touro (*L. catesbeianus*) dos diferentes grupos experimentais (n=9 animais por grupo, 4 medidas por animal), representada como porcentagem de quebra do DNA após 96 horas de exposição. Valores médios  $\pm$  1EPM. Os asteriscos acima das barras horizontais denotam uma diferença significativa em relação aos valores observados para o controle (P<0,0451).



Fonte: Autoria própria.

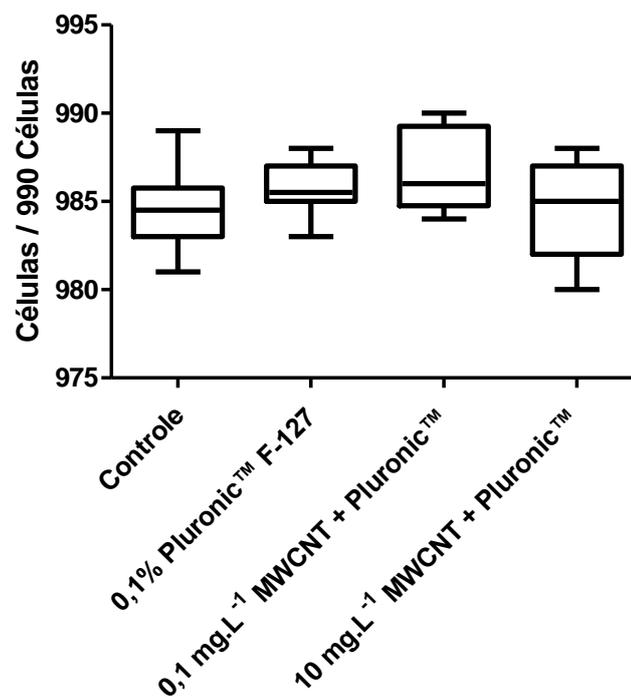
Adicionalmente, surfactantes que também funcionam como agentes dispersivos (*e.g.*, PVA – polivinil álcool) (MAHMOUDI *et al.*, 2009), já foram descritos como causadores de mutagênese (artigo em preparação – coautoria do autor desta dissertação), assim como o surfactante Pluronic™ F-127 aqui utilizado (Figura 23). É importante ressaltar que a mutagenicidade do Pluronic™ F-127 isolado foi superior àquela observada quando este estava associado ao MWCNT, independentemente da concentração, sugerindo uma interação antagônica entre os dois xenobióticos no que tange a este biomarcador. Isso provavelmente está relacionado aos sítios de ligação do surfactante com as membranas biológicas serem os mesmos, reduzindo o potencial tóxico do surfactante quando o mesmo se encontra associado às NPs.

Não obstante, o potencial tóxico efetivo da SCGE só poderá ser corroborado nos tópicos posteriores ao o associarmos à genotoxicidade.

### 5.11. Anormalidades nucleares

As anormalidades nucleares representam possíveis alterações funcionais celulares, prejudicando suas funções fisiológicas ou até as inviabilizando. A Figura 24 ilustra os resultados médios do número de células sem anormalidades morfológicas nucleares. A ausência de diferenças significativas entre as células dos diferentes grupos quanto à morfologia nuclear típica já era esperada, uma vez que o comprometimento da função tecidual exercida (hematose) poderia causar um desequilíbrio homeostático, passível de efeito letal em casos de anormalidades exacerbadas.

**Figura 24.** Eritrócitos sem anormalidades nucleares do sangue periférico de girinos de rãs-touro (*L. catesbeianus*) dos diferentes grupos experimentais (n=9 animais cada), em 990 células, após 96 horas de exposição. Valores médios  $\pm$  1EPM. Não houve diferença estatística entre os grupos analisados ( $P>0,05$ ).

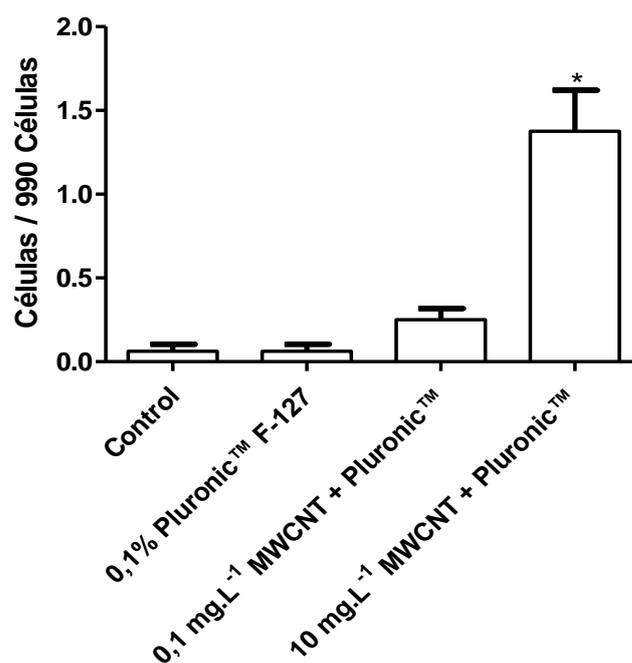


Fonte: Autoria própria.

A Figura 25 apresenta as anormalidades nucleares aqui encontradas nos eritrócitos, aqui tendo sido assim consideradas as células com micronúcleo ou tipo *bud*. Essa figura evidencia o aumento das alterações do tipo micronúcleo e *bud* na concentração mais alta de MWCNT, corroborando a literatura descrita para diversos outros xenobióticos (BARNI *et al.*, 2007), inclusive NPs (LINDERBERG, *et al.*, 2009; VIGNARDI, *et al.*, 2015; MURUGAN, *et al.*, 2016), o qual pode ser uma continuidade e agravamento das alterações anteriormente descritas

para o ensaio cometa. Os resultados apontam que a genotoxicidade representada como aumento da ocorrência de micronúcleo e *bud* somente ocorre na maior concentração de MWCNT e que há uma tendência ao aumento da derivação dos danos causada pela presença de MWCNTs (Pluronic™ F-127 associado). Levando em consideração que o aumento do potencial oncogênico está associado ao aumento do número de anormalidades nucleares, *e.g.*, do tipo micronúcleo e *bud* (TERRADAS, *et al.*, 2009; SAMANTA; DEY, 2012; HATCH, *et al.*, 2013; HATCH; HETZER, 2015; BAKHOUM, *et al.*, 2017; SHAH *et al.*, 2017), devido à instabilidade gênica à qual essas estruturas apresentam; pode-se afirmar que em exposições agudas a baixas concentrações dos xenobióticos utilizados (0,1% Pluronic™ F-127 e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> MWCNT + Pluronic™ + 0,1% Pluronic™ F-127) possuem baixos riscos de formação de neoplasias devido à instabilidade genética causada por esses fatores; entretanto não se pode excluir o aumento do potencial genotóxico quando em exposições crônicas e subcrônicas e/ou à concentrações superiores às, demonstradas acima, de baixo risco. Já foi demonstrado que a exposição a diversas NPs está associada ao aumento da presença de danos ao DNA devido à indução do estresse oxidativo (VIGNARDI *et al.*, 2015). Contudo, essa hipótese para a MWCNT ainda precisa ser avaliada em futuras análises de biomarcadores de estresse oxidativo.

**Figura 25.** Eritrócitos com micronúcleo e *bud* do sangue periférico de girinos de rãs-touro (*L. catesbeianus*) dos diferentes grupos experimentais (n=9 animais cada), em 990 células, após 96 horas de exposição. Valores médios  $\pm$  1EPM. Os asteriscos acima das barras horizontais denotam uma diferença significativa em relação aos valores observados para o controle (P<0.0001).



## 6. Considerações Finais

A tabela a seguir (Tabela 5), sumariza as respostas obtidas para todos os biomarcadores nos diferentes tratamentos. Para o surfactante Pluronic™ F-127 isolado, se pôde observar uma resposta letal, acompanhada de uma redução da massa corpórea em relação ao controle. Para o mesmo tratamento, houve um aumento da frequência cardíaca e também da densidade de eritrócitos no sangue periférico. Associadas, essas respostas parecem indicar um aumento na demanda de oxigênio do animal, muito provavelmente destinada ao processo de desintoxicação do surfactante, uma vez que o animal não apresentou um aumento do nível de atividade e ainda diminuiu a massa, sem acelerar seu desenvolvimento metamórfico – indicado pelo estadiamento do Gosner e do comprimento corpóreo. Somam-se a esses resultados a hipótese já elencada sobre perda de O<sub>2</sub> pela pele vascularizada. Houve ainda indício de mutagenicidade, que não resultaram, durante o período de exposição, em genotoxicidade. Assim, o Pluronic™ F-127 isoladamente exerce um efeito tóxico sobre nosso modelo experimental e gera respostas homeostáticas compensatórias, como um aumento do aporte de oxigênio para o processo de desintoxicação.

Por outro lado, quando avaliamos a responsividade dos animais ao MWCNT associado ao Pluronic™ F-127, as principais diferenças entre a menor e a maior concentração (0,1 e 10 mg.L<sup>-1</sup>) de MWCNT foi aumento do cronotropismo e maior incidência de anormalidades nucleares para a maior concentração (10 mg.L<sup>-1</sup>). Apesar de ter ficado aqui demonstrado o impacto negativo que pode ser gerado por essas nanopartículas quando utilizadas em concentrações elevadas (10 mg.L<sup>-1</sup> MWCNT + Pluronic™), nossos resultados não evidenciam seu real efeito em condições naturais, tendo em vista que os efeitos aqui descritos para os biomarcadores supracitados não foram observados à menor concentração das nanopartículas, concentração mais realística nas atuais condições naturais (0,1 mg.L<sup>-1</sup> MWCNT + Pluronic™). A perda da massa associada a não variação do estadiamento larval e tamanho corpóreo indica desvio de energia para processos de desintoxicação para ambos os grupos expostos ao MWCNT, assim como o visto para o grupo Pluronic™. Ainda a taquicardia observada para o grupo de maior concentração da nanopartícula aponta o aumento do desempenho cardíaco, também observado no grupo Pluronic™, para a intensificação da perfusão de sangue em órgãos/tecidos de metabolização e de eliminação de xenobióticos, como ação sinérgica ao processo de desintoxicação. No entanto, para os grupos expostos ao MWCNT não foi observado um aumento da eritropoiese. Quanto ao sistema imune, houve basofilia e eosinofilia, apontando

para um quadro de hipersensibilidade (alergia), consensual em resposta à exposição a nanopartículas carbonáceas (*e.g.*, fulerenos, grafenos e nanotubos de carbono). Apesar do aumento das populações leucocitárias supracitadas, houve uma neutropenia, o que pode resultar no aumento da susceptibilidade dos girinos a patógenos, em especial fungos, uma das principais causas atuais do declínio de anfíbios. Interessantemente, em ambos os grupos expostos ao surfactante associado à NP, a pigmentação corpórea foi reduzida, o que está diretamente relacionado a uma redução da intensidade luminosa (Figura 17) no meio de exposição em que o animal encontrava devido à presença dos nanotubos. Isso pode ter sido devido tanto a uma resposta hormonal (aumento da secreção de melatonina pela glândula pineal a baixas luminosidades) quanto a um efeito direto da redução da incidência de luz sobre os melanóforos, não mais estimulando as opsinas dispersando os melanossomos. Por fim, diferentemente da menor concentração de NP, em que só foi observada mutagenicidade, para a maior concentração de MWCNT a mesma também resultou em genotoxicidade devida a maior ocorrência de micronúcleos e células tipo *bud* nos eritrócitos, ilustrando que os efeitos da exposição às NPs são concentração-dependente.

Dessa forma, pode-se chegar à conclusão que grande parte dos biomarcadores utilizados foram sensíveis e responsivos aos xenobióticos aqui utilizados, destacando-se a massa corpórea, pigmentação externa, frequência cardíaca, contagem de eritrócitos, muta e genotoxicidade. Conjuntamente, os resultados apontam para a relevância de se avaliar e inter-relacionar biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica, desde os subcelulares, até os de comportamentais e morfométricos (tamanho, massa e estadiamento metamórfico); para que se possa estabelecer um cenário mais realístico e integrado das ações de xenobióticos sobre o organismos-teste.

Conforme descrito anteriormente, as ações do Pluronic™ F-127 isolado foram por vezes diferentes daquelas observadas quando o mesmo se encontrava associado ao MWCNT, provavelmente devido a alterações conformacionais do surfactante após sua associação às NPs, o que deve minimizar sua interação com as membranas biológicas (lipofílicas), devido a interação de sua porção lipofílica com o MWCNT. Não obstante, o Pluronic™ F-127 isolado apresentou não apenas efeitos subletais, mas também letais, fato este que implicaria na morte de parte dos indivíduos e em alterações subletais que poderiam prejudicar a adaptabilidade do animal em seu ambiente natural; e ainda associadas a um possível aumento da permeabilidade cutânea, com conseqüente perda de O<sub>2</sub> para o ambiente. Os efeitos das NPs foram concentração-dependente, mostrando uma maior toxicidade do controle positivo em relação à menor concentração utilizada. Para ambas as concentrações do MWCNT a redução da massa corpórea

e da pigmentação cutânea devem ter repercussões drásticas na capacidade de sobrevivência (captura de presas e fuga de predadores) e de reprodução, o que pode levar ao declínio de suas populações. Por fim, a genotoxicidade que se seguiu à mutagenicidade apenas no grupo MWCNT 10 mg.L<sup>-1</sup> consiste em um outro fator que destaca o efeito tóxico e irreversível da exposição dos animais a este xenobiótico a concentrações mais elevadas. Dessa forma, o presente estudo comprova que tanto o surfactante isolado, quanto associado às MWCNT exibem toxicidade aguda sobre os animais estudados. Dessa forma, urgem que sejam tomadas medidas de regulamentação da liberação desses xenobióticos em águas continentais pelas agências reguladoras, estabelecendo concentrações ambientalmente seguras para os mesmos.

**Tabela 5.** Respostas obtidas (P<0,05) para os diferentes biomarcadores avaliados, comparando-os com relação ao grupo controle (valores médios ± 1 E.P.M.). Com a seta indicando para cima ( ↑ ) significando aumento em relação ao controle e a seta indicando para baixo ( ↓ ) significando diminuição em relação ao controle.

<i>Biomarcadores</i>	<b>Controle</b>	<b>0,1% Pluronic™ F-127</b>	<b>0,1 mg.L<sup>-1</sup> MWCNT + Pluronic™</b>	<b>10 mg.L<sup>-1</sup> MWCNT + Pluronic™</b>
<i>Mortalidade</i>	0,0 ± 0,0 %	8,3%	-	-
<i>Nível de Atividade</i>	41 ± 6 %	-	-	-
<i>Estadiamento de Gosner</i>	25	-	-	-
<i>Tamanho corpóreo</i>	89,9 ± 2,4 mm	-	-	-
<i>Massa corpórea</i>	96,2 ± 1,0 mg	↓	↓	↓
<i>Pigmentação Externa</i>	77,1 ± 0,6 %	-	↓	↓
<i>frequência cardíaca in situ</i>	58,66 ± 2,08 bpm	↑	-	↑
<i>Massa ventricular relativa</i>	0,08 ± 0,01 %	-	-	-
<i>Densidade de eritrócitos em sangue periférico</i>	1,62x10 <sup>4</sup> ± 8,54x10 <sup>2</sup> células.mm <sup>-3</sup>	↑	-	-
<i>Densidade de Linfócitos</i>	184,29 ± 2,4029 células / 250 células	-	↓	-
<i>Densidade de Monócitos</i>	34,714 ± 4,8830 células / 250 células	-	-	-
<i>Densidade de Neutrófilos</i>	18,500 ± 1,5236 células / 250 células	↓	↓	↓
<i>Densidade de Eosinófilos</i>	24,500 ± 2,5626 células / 250 células	-	↑	↑
<i>Densidade de Basófilos</i>	2,8571 ± 0,3031 células / 250 células	-	↑	↑
<i>SCGE (ensaio cometa)</i>	24,8 ± 0,8 % DNA fragmentado	↑	↑	↑
<i>Células sem anormalidade</i>	984,5 ± 0,6 células / 990 células	-	-	-
<i>Micronúcleo + Bud</i>	0,062 ± 0,040 células / 990 células	-	-	↑

Fonte: Autoria própria.



## 7. Conclusões

A partir da análise e discussão dos resultados finais obtidos no presente estudo após a exposição por 96h sobre girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) a concentrações de 0,1 e 10 mg.L<sup>-1</sup> de nanopartículas (NPs) de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT), bem como a seu surfactante Pluronic TM F127 (0,1%), isolados ou associadamente, pôde-se concluir que:

- A exposição ao surfactante isoladamente, diferentemente aos MWCNT, pode ser letal aos animais durante o período de exposição utilizado;
- O nível de atividade dos animais não foi alterado em função à exposição aos xenobióticos, o que indica que não é gerada (ou é inibida) uma resposta aversiva de fuga ou de escape aos estímulos estressores impostos;
- Da mesma forma, pela metamorfose não ter sido acelerada, parece não haver respostas comportamentais de escape ao agente agressor. Não obstante, pode ter havido falta de aporte de oxigênio e de energia para disparar tais processos;
- A redução da pigmentação cutânea dos grupos expostos aos MWCNT torna os animais mais visíveis em um ambiente menos iluminado, aumentando sua susceptibilidade a predadores;
- Um aumento do desempenho cardíaco mediante um processo energeticamente mais custoso (aumento da cronotropia) nos grupos expostos ao surfactante isolado ou associado à maior concentração do MWCNT, sem variação do inotropismo cardíaco, aumenta o débito cardíaco, mas também a demanda energética desse sistema;
- Para o surfactante em particular, a taquicardia e o aumento do número de eritrócitos no sangue periférico, sugerem que a demanda energética para a desintoxicação e/ou eliminação deste composto é mais custosa energeticamente para o animal que o que ocorre para os nanotubos quando a ele associado, bem como por um efeito direto do surfactante sobre o muco que reveste o tegumento, resultando em uma perda de oxigênio devida à sua difusão para o meio aquático;
- Todos os grupos expostos apresentaram uma ativação do sistema imune, uma vez que a contagem diferencial de leucócitos evidenciou que a resposta imune de hipersensibilidade (basofilia e eosinofilia) aos xenobióticos utilizados. Contudo, a neutropenia observada para todos os grupos, particularmente evidenciada ao grupo

exposto unicamente ao surfactante, podendo ter resultado em efeitos letais, indica que os animais podem se tornar susceptíveis a infecções oportunistas;

- Por outro lado, os danos ao DNA das células sanguíneas circulantes foram menores em resposta ao surfactante (apenas mutagenicidade) do que aqueles ocasionados ao grupo exposto à maior concentração de MWCTN, indicando efeitos deletérios mais permanentes e irreversíveis em resposta a uma concentração elevada (porém não ambientalmente relevante) desta nanopartícula.

Conjuntamente, nossos resultados apontam para a urgência em que sejam propostas estratégias e políticas públicas que analisem e proponham normativas que contemplem medidas de efetiva fiscalização, controle e readequação da emissão de nanopartículas nos compartimentos aquáticos continentais no Brasil, bem como dos constituintes necessários à maximização de sua eficácia biológica ou ambiental com vistas à preservação de anfíbios.

## 8. Referências

- ADLER, J.; SORKIN, A.; KALISH, R. Visualization of nanodiamond formation in molten carbon under pressure. **Physics Procedia**, 7, 2-6, 2010. DOI: 10.1016/j.phpro.2010.09.038.
- AGAFONOV, M.; VOLKOVA, T.; KUMEEV, R.; CHIBUNOVA, E.; TEREKHOVA, I. Impact of pluronic F127 on aqueous solubility and membrane permeability of antirheumatic compounds of different structure and polarity. **Journal of Molecular Liquids**, 274, 770-777, 2019. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.11.060.
- AKHAVAN, O.; GHADERI, E.; ABOUEI, E.; HATAMIE, S.; GHASEMI, E. Accelerated differentiation of neural stem cells into neurons on ginseng-reduced graphene oxide sheets. **Carbon**, 66, 395-406, 2014. DOI: 10.1016/j.carbon.2013.09.015.
- AKHAVAN, O.; GHADERI, E.; SHAHSAVER, M. Graphene nanogrids for selective and fast osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Carbon**, 59, 200-211. DOI: 10.1016/j.carbon.2013.03.010.
- ALEXANDER, B.; BAGGALEY, A.; DENNIS-BRYAN, K.; MCDONALD, F.; MUNSEY, E.; PRESTON, P.; TUSON, C.; YELLAND, A. **El libro de la naturaleza**. Tradutores: CORRIENTE, A.; ANTÓN, J. L. L.; MASSÓ, Y.; PIJOAN-ROTGE, M. 1ª Ed. Madri: Dorling Kindersley Limited, 2011. 647 p. ISBN: 978-84-460-3428-5.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA). **AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition**. 1ª Ed. Schaumburg: American Veterinary Medical Association, 2013. 102 p. ISBN: 978-1-882691-21-0.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA). Report of the AVMA Panel on Euthanasia. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 218, 5, 669-696, 2001. PMID: 11280396.
- ANDERSON, J. S.; REISZ, R. R.; SCOTT, D.; FRÖBISCH, N. B.; SUMIDA, S. S. A stem batrachian from the Early Permian of Texas and the origin of frogs and salamanders. **Nature Letters**, 453, 515-518, 2008. DOI: 10.1038/nature06865.
- ARSERIM, S.; MERMER, A. Hematology of the Uludağ Frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludağ National Park (Bursa, Turkey). **European Union Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 25, 1, 39-46, 2008. ISSN: 1300-1590.
- ARTIGAS, J.; ARTS, G.; BABUT, M.; CARACCILO, A. B.; CHARLES, S.; CHAUMOT, A.; COMBOURIEU, B.; DAHLLÖF, I.; DESPRÉAUX, D.; FERRARI, B.; FRIBERG, N.; GARRIC, J.; GEFFARD, O.; GOURLAY-FRANCÉ, C.; HEIN, M.; HJORTH, M.; KRAUSS, M.; DE LANGE, H. J.; LAHR, J.; LEHTONEN, K. K.; LETTIERI, T.; LIESS, M.; LOFTS, S.; MAYER, P.; MORIN, S.; PASCHKE, A.; SVENDSEN, C.; USSEGLIO-POLATERA, P.; BRINK, N. V. D.; VINDIMIAN, E.; WILLIAMS, R. Towards a renewed research agenda in ecotoxicology. **Environmental Pollution**, 160, 201-206, 2012. DOI: 10.1016/j.envpol.2011.08.011.

- ARVIDSSON, R.; MOLANDER, S.; SANDÉN, B. A. Review of potential environmental and health risks of the nanomaterial graphene. **Human and Ecological Risk Assessment**, 19, 873-887, 2013. DOI: 10.1080/10807039.2012.702039.
- ASPENGRÉN, S.; SKÖLD, H. L.; QUIROGA, G.; MÅRTENSSON, L.; WALLIN, M. Noradrenaline- and Melatonin-Mediated Regulation of Pigment Aggregation in Fish Melanophores. **Pigment Cell Research**, 16, 1, 59-64, 2003. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2003.00003.x.
- ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). **E 729: standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians**. EUA, 2002.
- BACCHETTA, R.; TREMOLADA, P.; BENEDETTO, C. D.; SANTO, N.; FASCIO, U.; CHIRICO, G.; COLOMBO, A.; CAMATINI, M.; MANTECA, P. Does carbon nanopowder threaten amphibian development?. **Carbon**, 50, 4607-4618, 2012. DOI: 10.1016/j.carbon.2012.05.047.
- BACH, N. C.; MARINO, D. J. G.; NATALE, G. S.; SOMOZA, G. M. Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (Amphibia:Anura). **Chemosphere**, 202, 289-297, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.110.
- BAGNARA, J. T.; MATSUMOTO, J. **Comparative Anatomy and Physiology of Pigment Cells in Nonmammalian Tissues**. In: NORDLUND, J. J.; BOISSY, R. E.; HEARING, V. J.; KING, R. A.; ORTONNE, J. P. (Eds.) **The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology**. New York, Oxford: Oxford University Press, 9-40, 2006. DOI: 10.1002/9780470987100.ch2.
- BAINY, A. C. D.; MARQUES, M. R. F. Global analysis of biomarker responses in aquatic organisms exposed to contaminants. **Comments on Toxicology**, 9, 5-6, 2003. DOI: 10.1080/08865140390450368.
- BAKHOUM, S. F.; KABECHE, L.; COMPTON, D. A.; POWELL, S. N.; BASTIANS, H. Mitotic DNA Damage Response: At the Crossroads of Structural and Numerical Cancer Chromosome Instabilities. **Trends in Cancer**, 3, 3, 225-234, 2017. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.02.001.
- BANDALA, E. R.; BERLI, M. Engineered nanomaterials (ENMs) and their role at the nexus of Food, Energy, and Water. **Materials Science for Energy Technologies**, 2, 1, 29-40, 2019. DOI: 10.1016/j.mset.2018.09.004
- BARNI, S.; BONCOMPAGNI, E.; GROSSO, A.; BERTONE, V.; FREITAS, I.; FASOLA, M.; FENOGLIO, C. Evaluation of *Rana ssk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. **Aquatic Toxicology**, 81, 45-54, 2007. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.10.012
- BARRAQUET, M.; SALAS, N. E.; MARTINO, A. L. Variation in the erythrocyte size among larvae, juveniles and adults of *Hypsiboas cordobae* (Anura, Hylidae). **Basic and Applied Herpetology**, 28, 137-143, 2014. DOI: 10.11160/bah.12010.

- BATES, K; KOSTARELOS, K. Carbon nanotubes as vectors for gene therapy: past achievements, present challenges and future goals. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65, 15, 2023-2033, 2013. DOI: 10.1016/j.addr.2013.10.003.
- BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, 130, 2, 98-106, 2008. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.04.013.
- BAUGHMAN, R. H.; ZAKHIDOV, A. A.; DE HEER, W. A. Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications. **Science**, 297, 5582, 787-792, 2002. DOI: 10.1126/science.1060928.
- BEEBEE, T. J. C.; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology?. **Biological Conservation**, 125, 3, 271-285, 2005. DOI: 10.1016/j.biocon.2005.04.009.
- BENTLEY, P. J.; SHIELD, J. W. Respiration of some urodele and anuran amphibia—II. In air, role of the skin and lungs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 46, 1, 29-38, 1973. DOI: 10.1016/0300-9629(73)90555-0.
- BERKOVITZ, B.; SHELLIS, P. **The tooth of non-mammalian vertebrates**. 1<sup>a</sup> Ed. Londres:Academic Press, 2017. 342 p. ISBN: 978-0-12-802850-6.
- BERTRAM, C.; HASS, R. Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. **Biological Chemistry**, 389, 211-220, 2008. DOI: 10.1515/BC.2008.031.
- BHARDWAJ, A.; BAHL, C.; SHARMA, S.; SINGH, N.; BEHERA, D. Interactive potential of genetic polymorphism in xenobiotic metabolising and DNA repair genes for predicting lung cancer predisposition and overall survival in North Indians. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 826, 15-24, 2018. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2017.12.006.
- BHATTACHARJEE, P.; PAUL, S.; BHATTACHARJEE, P. Risk of occupational exposure to asbestos, silicon and arsenic on pulmonary disorders: understanding the genetic-epigenetic interplay and future prospects. **Environmental Research**, 147, 425-434, 2016. DOI: 10.1016/j.envres.2016.02.038.
- BICKFORD, D. P.; ALFORD, R.; CRUMP, M. L.; WHITFIELD, S.; KARRAKER, N.; DONNELLY, M. A. Impacts of climate change on amphibian biodiversity. In: DELLASALA, D. A.; GOLDSTEIN, M. I. (Org.) **Encyclopedia of the Anthropocene**. s.l.: Elsevier. p. 113-121. DOI: 10.1016/B978-0-12-809665-9.10022-9. ISBN: 978-0-12-813576-1.
- BLUHM, K.; HEGER, S.; REDELSTEIN, R.; BRENDT, J.; ANDERS, N.; MAYER, P.; SCHAEFFER, A.; HOLLERT, H. Genotoxicity of three biofuel candidates compared to reference fuels. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2018. DOI: 10.1016/j.etap.2018.10.003.

- BODMEIER, R.; WANG, J. Microencapsulation of Drugs with Aqueous Colloidal Polymer Dispersions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 82, 2, 191-194, 1993. DOI: 10.1002/jps.2600820215.
- BOEHM, H. P. The first observation of carbon nanotubes. **Carbon**, 35, 4, 581-584, 1997. DOI: 10.1016/S0008-6223(97)83730-X.
- BOEHM, H. P.; SETTON, R.; STUMPP, E. Nomenclature and terminology of graphite intercalation compounds. **Carbon**, 24, 2, 241-245, 1986. DOI: 10.1016/0008-6223(86)90126-0.
- BOEHM, H. P.; STUMPP, E. Citation errors concerning the first report on exfoliated graphite. **Carbon**, 45, 7, 1381-1383, 2007. DOI: 10.1016/j.carbon.2006.12.016
- BOISSEAUX, P.; NOURY, P.; THOMAS, H.; GARRIC, J. Immune responses in the aquatic gastropod *Lymnaea stagnalis* under short-term exposure to pharmaceuticals of concern for immune systems: Diclofenac, cyclophosphamide and cyclosporine A. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 139, 358-366, 2017. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.02.003.
- BOLS, N. C.; BRUBACHER, J. L.; GANASSIN, R. C.; LEE, L. E. J. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, 25, 8-9, 853-873, 2001. DOI: 10.1016/S0145-305X(01)00040-4.
- BOYCE, J.; FANNING, L. **Mast Cells, Basophils, and Mastocytosis**. In: RICH, R. R.; FLEISHER, T. A.; SHEARER, W. T.; SCHROEDER, H. W.; FREW, A. J. WEYAND, C. M. **Clinical Immunology: Principles and Practice**. 5 Ed. Elsevier, 2019. ISBN: 978-0-7020-6896-6. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6896-6.00023-5.
- BRASIL. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 dez. 2008.
- BRASH, D. E.; RUDOLPH, J. A.; SIMON, J. A.; LIN, A.; MCKENNA, G. J.; BADEN, H. P.; HALPERIN, A. J.; PONTÉN, J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 88, 22, 10124-10128, 1991. DOI: 10.1073/pnas.88.22.10124.
- BREMNER, J. D.; KRYSTAL, J. H.; SOUTHWICK, S. M.; CHARNEY, D. S. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. preclinical studies. **Synapse**, 23, 1, 28-38, 1996. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2396(199605)23:1<28::AID-SYN4>3.0.CO;2-J.
- BRIDGES, C. M. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 16, 9, 1935-1939, 1997. DOI: 10.1002/etc.5620160924.
- BROWN, G. L. Formation of films from polymer dispersions. **Journal of Polymer Science banner**, 22, 102, 423-434, 1956. DOI: 10.1002/pol.1956.1202210208.

- BROWN, T. L.; LEMAY, H. E.; BURSTEN, B. E.; BURDGE, J. R. **Química: a Ciência central**. 9ª Ed. São Paulo: Pearson, 2005. ISBN: 85-87918-42-7.
- BRUTYN, M.; D'HERDE, K.; DHAENENS, M.; VAN ROOIJ, P.; VERBRUGGHE, E.; HYATT, A. D.; CROUBELS, S.; DEFORCE, D.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCKF.; MARTEL, A. PASMANS, F. *Batrachochytrium dendrobatidis* zoospore secretions rapidly disturb intercellular junctions in frog skin. **Fungal Genetics and Biology**, 49, 10, 830-837, 2012. DOI: 10.1016/j.fgb.2012.07.002.
- BURGGREN, W. **Transition of respiratory processes during amphibian metamorphosis: from egg to adult**. In: SEYMOUR, R. S. (ed). **Respiration and metabolism of embryonic vertebrates: perspectives in vertebrate science**. 3ª Ed. Dordrecht:Springer, 1984. ISBN: 978-94-009-6538-6. Online ISBN: 978-94-009-6536-2. DOI: 10.1007/978-94-009-6536-2\_3.
- BURGGREN, W. W.; WEST, N. H. Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. **Respiration Physiology**, 47, 2, 1982. DOI: 10.1016/0034-5687(82)90108-6.
- BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, 2, 4, MR17-MR71, 2007. DOI: 10.1116/1.2815690.
- CAMPBELL, N. A.; REECE, J. B. **Biology**. 8ª Ed. São Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2009. 1416 p. ISBN: 987-0-8053-6844-4.
- CAMPBELL, R. C.; VOYLES, J.; COOK, D. I.; DINUDOM, A. **Frog skin epithelium: electrolyte transport and chytridiomycosis**. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 44, 431-434, 2012. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.12.002.
- CAREW, A. C.; HOQUE, M. E.; METCALFE, C. D.; PEYROT, C.; WILKINSON, K. J.; HELBING, C. C. Chronic sublethal exposure to silver nanoparticles disrupts thyroid hormone signaling during *Xenopus laevis* metamorphosis. **Aquatic Toxicology**, 159, 99-108, 2015. DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.12.005.
- CARVALHO, C. S.; UTSUNOMIYA, H. S. M.; PASQUOTO, T.; LIMA, R.; COSTA, M. J.; FERNANDES, M. N. Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. **Environmental Pollution**, 221, 445-452, 2017. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.12.012.
- CATENAZZI, A. State of the world's amphibians. **Annual Review of Environment and Resources**, 40, 91-119, 2015. DOI: 10.1146/annurev-environ-102014-021358.
- CBMNRC (Committee on Biological Markers of the National Research Council). Biological markers in environmental health research. **Environmental Health Perspectives**, 74, 3-9, 1987. DOI: 10.1289/ehp.74-1474499.

- CERNY, J.; ROSMARIN, A. G. Why Does My Patient Have Leukocytosis?. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, 26, 2, 303-319, 2012. DOI: 10.1016/j.hoc.2012.01.001.
- CHAN, W. Y.; LAU, P. M.; YEUNG, K. W.; KONG, S. K. The second generation tyrosine kinase inhibitor dasatinib induced eryptosis in human erythrocytes – an in vitro study. **Toxicology Letters**, 295, 10-21, 2018. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.05.030.
- CHATTERJEE, A.; GUPTA, S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. **Cancer Letters**, 433, 33-42, 2018. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.06.028.
- CHEN, G.-Y.; PANG, D. W.-P.; HWANG, S.-M.; TUAN, H.-Y.; HU, Y.-C. A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. **Biomaterials**, 33, 2, 418-427, 2012. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.071.
- CHEN, M.; YIN, J.; LIANG, Y.; YUAN, S.; WANG, F.; SONG, M.; WANG, H. Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish. **Aquatic Toxicology**, 174, 54-60, 2016a. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.02.015.
- CHEN, Y.; PUI, Y.; CHEN, H.; WANG, S.; SERNO, P.; TONNIS, W.; CHEN, L.; QIAN, F. Polymer-Mediated Drug Supersaturation Controlled by Drug–Polymer Interactions Persisting in an Aqueous Environment. **Molecular Pharmaceutics**, 16, 1, 205-213, 2019. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00947.
- CHEN, Y.; WANG, L.; SHI, J. Two-dimensional non-carbonaceous materials-enabled efficient photothermal cancer therapy. *Nano Today*, 11, 292-308, 2016b. DOI: 10.1016/j.nantod.2016.05.009.
- CHEN, Z.; YADGAR, A. M.; ZHAO, L.; MI, Z. A review of environmental effects and management of nanomaterials. **Toxicological and Environmental Chemistry**, 93, 6, 1227-1250, 2011. DOI: 10.1080/02772248.2011.580579.
- CHEUNG, W.; PONTORIERO, F.; TARATULA, O.; CHEN, A. M.; HE, H. DNA and carbon nanotubes as medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 62, 6, 633-649, 2010. DOI: 10.1016/j.addr.2010.03.007.
- CIAU-UITZ, A.; MONTEIRO, R.; KIRMIZITAS, A.; PATIENT, R. Developmental hematopoiesis: Ontogeny, genetic programming and conservation. **Experimental Hematology**, 42, 8, 669-683, 2014. DOI: 10.1016/j.exphem.2014.06.001.
- CIBELLI, J.; GURDON, J.; WILMUT, I.; JAENISCH, R.; LANZA, R.; WEST, M. D.; CAMPBELL, K. H. S. **Principles of cloning**. 2<sup>a</sup> Ed. Londres:Academic Press, 2014. 562 p. ISBN: 978-0-12-386541-0.
- CLARK, M. D.; SUBRAMANIAN, S.; KRISHNAMOORTI, R. Understanding surfactant aided aqueous dispersion of multi-walled carbon nanotubes. **Journal of Colloid and Interface Science**, 354, 1, 144-151, 2011. DOI: 10.1016/j.jcis.2010.10.027.

- CLAVEL, J.; JULLIARD, R.; DEVICTOR, V. Worldwide decline of specialist species: toward a global functional homogenization?. **Frontiers in Ecology and the Environment**, 9, 222-228, 2011. DOI: 10.1890/080216.
- COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. **Molecular Biotechnology**, 26, 249-261, 2004.
- COLLINS, S. J.; FAHRIG, L. Responses of anurans to composition and configuration of agricultural landscapes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 239, 399-409, 2017. DOI: 10.1016/j.agee.2016.12.038.
- CORADEGHINI, R.; GIORIA, S.; GARCÍA, C. P.; NATIVO, P.; FRANCHINI, F.; GILLILAND, D.; PONTI, J.; ROSSI, F. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. **Toxicology Letters**, 217, 3, 205-216, 2013. DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.11.022.
- COSTA, M. J. **Efeito da temperatura sobre a contratilidade cardíaca e o controle intracelular de cálcio no miocárdio ventricular de pirambóia, *Lepidosiren paradoxa***. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2003.
- COSTA, M. J. **Função cardíaca in vivo e in vitro de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, submetida a alterações agudas de temperatura**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1998.
- COSTA, M. J.; MONTEIRO, D. A.; OLIVEIRA NETO, A. L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. **Ecotoxicology**, 17, 153-163, 2008. DOI: 10.1007/s10646-007-0178-5.
- COSTA, M. J.; RIBEIRO, L. R.; SALLA, R. F.; GAMERO, F. U.; ALVES, L. M. L. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Effects of the organophosphorus pesticide Folisuper 600 (methyl parathion) on the heart function of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Brazilian Journal of Biology**, 72, 100-106, 2015. DOI: 10.1590/1519-6984.08314.
- CRAIG, D. Q. M. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, 231, 2, 131-144, 2002. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00891-2.
- CUI, K.; MARUYAMA, S. Multifunctional graphene and carbon nanotube films for planar heterojunction solar cells. **Progress in Energy and Combustion Science**, 70, 1-21, 2019. DOI: 10.1016/j.peccs.2018.09.001.
- CUI, X.-Z.; ZHOU, Z.-G.; YANG, Y.; WEI, J.; WANG, J.; WANG, M.-W.; YANG, H.; ZHANG, Y.-J.; YANG, S. P. PEGylated WS<sub>2</sub> nanosheets for X-ray computed tomography imaging and photothermal therapy. **Chinese Chemical Letters**, 26, 6, 749-754, 2015. DOI: 10.1016/j.ccllet.2015.03.034.
- CZOPEK, J. Quantitative studies on the morphology of respiratory surfaces in amphibians. **Acta Anatomica**, 62, 296-323, 1965. DOI: 10.1159/000142756.

- D'AMEN, M.; BOMBI, P. Global warming and biodiversity: evidence of climate-linked amphibian declines in Italy. **Biological Conservation**, 142, 12, 3060-3067, 2009. DOI: 10.1016/j.biocon.2009.08.004.
- DAI, W.-G.; DONG, L. C.; LI, S.; DENG, Z. Combination of Pluronic/Vitamin E TPGS as a potential inhibitor of drug precipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, 355, 1-2, 31-37, 2008. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.12.015.
- DALBONI, S. P.; CAMPAGNARO, B. P.; TONINI, C. L.; VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S. The Concurrence of Hypercholesterolemia and Aging Promotes DNA Damage in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Open Journal of Blood Diseases**, 02, 51-55, 2012.
- DALLAL, R. M.; LEIGHTON, J.; TRANG, A. Analysis of leukopenia and anemia after gastric bypass surgery. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, 8, 2, 164-168, 2012. DOI: 10.1016/j.soard.2011.02.006.
- DAL-MEDICO, S. E.; RISSOLI, R. Z.; GAMERO, F. U.; VICTÓRIO, J.A.; SALLA, R. F.; ABDALLA, F. C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CARVALHO, C. S.; COSTA, M. J. Negative impact of a cadmium concentration considered environmentally safe in Brazil on the cardiac performance of bullfrog tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 104, 168–174, 2014. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.003.
- DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística sem matemática para psicologia: Usando SPSS para Windows**. Porto Alegre, Artmed. 2006.
- DAVIS, W. R.; SLAWSON, R. J.; RIGBY, G. R. An Unusual Form of Carbon. **Nature**, 171, 756, 1953. DOI: 10.1038/171756a0.
- DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; GENECQUE, E.; LE MENACH, K.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAU, S.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Comparative Sublethal Toxicity of Nine Pesticides on Olfactory Learning Performances of the Honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 48, 242-250, 2005. DOI: 10.1007/s00244-003-0262-7.
- DENG, Y.; OK, Y. S.; MOHAN, D.; PITTMANC. U.; DOU, X. Carbamazepine removal from water by carbon dot-modified magnetic carbon nanotubes. **Environmental Research**, 2018. DOI: 10.1016/j.envres.2018.11.035.
- DEPAN, D.; GIRASE, B.; SHAH, J. S.; MISRA, R. D. K. Structure–process–property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds. **Acta Biomaterialia**, 7, 9, 3432-3445, 2011. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.05.019.
- DEPLEDGE, M. H. Genetic ecotoxicology: an overview. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 200, 1-2, 57-66, 1996. DOI: 10.1016/S0022-0981(96)02639-1.

- DEPLEDGE, M. H.; AAGAARD, A.; GYÖRKÖS, P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, 31, 1-3, 19-27, 1995. DOI: 10.1016/0025-326X(95)00006-9.
- DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. **Ecotoxicology**, 3, 3, 161-172, 1994. DOI: 10.1007/BF00117081.
- DESAI, A.; YAN, Y.; GERSON, S. L. Advances in therapeutic targeting of the DNA damage response in cancer. **DNA Repair**, 66-67, 24-29, 2018. DOI: 10.1016/j.dnarep.2018.04.004.
- DING, R. G.; LU, G. Q.; YAN, Z. F.; WILSON, M. A. Recent Advances in the Preparation and Utilization of Carbon Nanotubes for Hydrogen Storage. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 1, 1, 7-29, 2001. DOI: 10.1166/jnn.2001.012.
- DORN, A. R.; BROYLES, R. H. Erythrocyte differentiation during the metamorphic hemoglobin switch of *Rana catesbeiana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 79, 18, 5592-5596, 1982. DOI: 10.1073/pnas.79.18.5592.
- DREYER, D. R.; RUOFF, R. S.; BIELAWSKI, C. W. From conception to realization: an historical account of graphene and some perspectives for its future. **Angewandte Chemie International Edition**, 49, 49, 9336-9344, 2010. DOI: 10.1002/anie.201003024.
- DUARTE, E. H.; SANTOS, W. P.; HUDARI, F. F.; NETO, J. L. B.; SARTORI, E. R.; ANTONIA, L. H. D.; PEREIRA, A. C.; TARLEY, C. R. T. A highly improved method for sensitive determination of amitriptyline in pharmaceutical formulations using an unmodified carbon nanotube electrode in the presence of sulfuric acid. **Talanta**, 127, 26-32, 2014. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.03.068.
- DUONG, T. V.; GODERIS, B.; HUMBEECK, J. V.; MOOTER, G. V. D. Microstructure of Pharmaceutical Semicrystalline Dispersions: The Significance of Polymer Conformation. **Molecular Pharmaceutics**, 15, 2, 629-641, 2018. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01007.
- DVORAK, A. M. Histamine Content and Secretion in Basophils and Mast Cells. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, 33, 3-4, III-IV, 169-320, 1998. DOI: 10.1016/S0079-6336(98)80006-5.
- EKSTRÖM, A.; SVENSEN, H. H. Naturkatastrofer i menneskets tidsalder: Mot en tverrfaglig forståelse av antropocen-begrepet. **Tidsskrift for kulturforskning**, 13, 3, 6-21, 2014. ISSN: 1502-7473.
- ESTEVEZ, L. M.; OLIVEIRA, H. A.; PASSOS, F. B. Carbon nanotubes as catalyst support in chemical vapor deposition reaction: a review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 65, 1-12, 2018. DOI: 10.1016/j.jiec.2018.04.012.
- EVERETT, D. H. **Basic principles of colloid science**. 1<sup>a</sup> Ed. Londres: The Royal Society of Chemistry, 1988. 260 p. ISBN: 0851864430.

- FADEL, T. R.; FAHMY, T. M. Immunotherapy applications of carbon nanotubes: from design to safe applications. **Trends in Biotechnology**, 32, 4, 198-209, 2014. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.02.005.
- FALFUSHYNSKA, H.; GNATYSHYNA, L.; FEDORUK, O.; MITINA, N.; ZAICHENKO, A.; STOLIAR, O.; STOIKA, R. Hepatic metallothioneins in molecular responses to cobalt, zinc, and their nanoscale polymeric composites in frog *Rana ridibunda*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, 172-173, 45-56, 2015. DOI: 10.1016/j.cbpc.2015.04.006.
- FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, 279, 73-83, 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.11.007.
- FATKHUTDINOVA, L. M.; KHALIULLIN, T. O.; VASIL'YEVA, O. L.; ZALYALOV, R. R.; MUSTAFIN, I. G.; KISIN, E. R.; BIRCH, M. E.; YANAMALA, N.; SHVEDOVA, A. A. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 299, 125-131, 2016. DOI: 10.1016/j.taap.2016.02.016.
- FOULDS, L. The experimental study of tumor progression: a review. **Cancer Research**, 14, 5, 327-339, 1954. PMID: 13160960.
- FRAKER, S. L.; SMITH, G. R. Direct and interactive effects of ecologically relevant concentrations of organic wastewater contaminants on *Rana pipiens* tadpoles. **Environmental Toxicology**, 19, 3, 250-256, 2004. DOI: 10.1002/tox.20017.
- FRANCO, R.; SANCHÉZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mutation Research**, 674, 3-22, 2009. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.11.012.
- FRANCO-BELUSSI, L. **Ação antiinflamatória do hormônio  $\alpha$ -MSH em anuros: estudo sistêmico e *in vitro***. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista, 2014. 150 p.
- FRANCO-BELUSSI, L.; FANALI, L. Z.; OLIVEIRA, C. UV-B affects the immune system and promotes nuclear abnormalities in pigmented and non-pigmented bullfrog tadpoles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 180, 109-117, 2018. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.01.022.
- FRANCO-BELUSSI, L.; SKÖLD, H. N.; OLIVEIRA, C. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. **Journal of Experimental Biology**, 219, 1378-1383, 2016. DOI: 10.1242/jeb.134973.
- FRANKLIN, N. M.; ROGERS, N. J.; APTE, S. C.; BATLEY, G. E.; GADD, G. E.; CASEY, P. S. Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. **Environmental Science and Technology**, 41, 24, 8484-8490, 2007. DOI: 10.1021/es071445r.

- FUJII, R. The Regulation of Motile Activity in Fish Chromatophores. **Pigment Cell Research**, 13, 5, 300-319, 2000. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2000.130502.x.
- GALLO, V.; BRITO, P. M.; SILVA, H. M. A.; FIGUEIREDO, F. J. **Paleontologia de vertebrados**: grandes temas de contribuições científicas. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2006. 330 p. ISBN: 85-7193-133-X.
- GAO, J.; YOUN, S.; HOVSEPYAN, A.; LLANEZA, V. L.; WANG, Y.; BITTON, G.; BONZONGO, J.-C. J. Dispersion and Toxicity of Selected Manufactured Nanomaterials in Natural River Water Samples: Effects of Water Chemical Composition. **Environmental Science and Technology**, 43, 9, 3322-3328, 2009. DOI: 10.1021/es803315v.
- GAO, W. **Graphene oxide**: reduction recipes, spectroscopy, and applications. 1ª Ed. Switzerland: Springer International, 2015. p. 147. ISBN: 978-3-319-15499-2. E-ISBN: 978-3-319-15500-5. DOI: 10.1007/978-3-319-15500-5.
- GARCÍA, O.; MANDINA, T.; LAMADRID, A. I.; DIAZ, A.; REMIGIO, A.; GONZALEZ, Y.; PILOTO, J.; GONZALEZ, J. E.; ALVAREZ, A. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutation Research**, 556, 25-34, 2004. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.035.
- GARDNER, S. C. M.; OBERDÖSTER, E. **Toxicology of Reptiles**. 1ª Ed. CRC Press, 2005. 328 p. ISBN: 9780849327155.
- GATTO, F.; SCHULZE, A.; NIELSEN, J. Systematic analysis reveals that cancer mutations converge on deregulated metabolism of arachidonate and xenobiotics. **Cell Reports**, 16, 3, 878-895, 2016. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.06.038. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.06.038.
- GDOVIN, M. J.; TORGERSON, C. S.; REMMERS, J. E. The fictively breathing tadpole brainstem preparation as a model for the development of respiratory pattern generation and central chemoreception. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 124, 3, 275-286, 1998. DOI: 10.1016/S1095-6433(99)00116-6.
- GOENKA, S.; SANT, V.; SANT, S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, 173, 75-88, 2014. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.10.017.
- GOFF, H. D. Colloidal aspects of ice cream—A review. **International Dairy Journal**, 7, 6-7, 363-373, 1997. DOI: 10.1016/S0958-6946(97)00040-X.
- GONG, H.; PENG, R.; LIU, Z. Carbon nanotubes for biomedical imaging: The recent advances. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65, 15, 1951-1963, 2013. DOI: 10.1016/j.addr.2013.10.002.
- GORMALLY, B. G. M.; FULLER, R.; MCVEY, M.; ROMERO, L. M. DNA damage as an indicator of chronic stress: Correlations with corticosterone and uric acid. **Comparative**

**Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 227, 116-122, 2019. DOI: 10.1016/j.cbpa.2018.10.007

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos larvae with notes on identification. **Herpetologica**, 16, 3, 183–190, 1960. Retirado de: <<https://www.jstor.org/stable/3890061>>.

GUILHERME, S.; VÁLEGA, M.; PEREIRA, M. E.; SANTOS M. A.; PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 70, 3, 411-421, 2008. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.08.016.

GUPTA, P. K. **Environmental and ecotoxicology**. In: GUPTA, P. K (ed). **Illustrated Toxicology: with study questions**. 1<sup>a</sup> Ed. Estados Unidos da América: Academic Press, 2018. ISBN: 978-0-12-813213-5. DOI: 10.1016/B978-0-12-813213-5.00014-6.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiología médica**. 11<sup>a</sup> Ed. Madrid, España: Elsevier, 2006.

HADJI-AZIMI, I.; COOSEMANS, V.; CANICATTI, C. Atlas of adult *Xenopus laevis laevis* hematology. **Developmental and Comparative Immunology**, 11, 4, 807-814, 1987. DOI: 10.1016/0145-305X(87)90068-1.

HADLEY, M. E.; MIEYR, J. H.; MARTIN, B. E.; CASTRUCCI, A. M. L. [Nle<sup>4</sup>, DPhe<sup>7</sup>]-alpha-MSH: a superpotent melanotropin with prolonged action on vertebrate chromatophores. **Compared Biochemistry and Physiology – Part A: Physiology**, 81, 1-6, 1985. DOI: 10.1016/0300-9629(85)90259-2.

HAINES, A.; ALLEYNE, G.; KICKBUSCH, I.; DORA, C. From the Earth Summit to Rio+20: integration of health and sustainable development. **The Lancet**, 379, 9832, 9-15, 2012. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60779-X.

HAMER, A. J.; MCDONNELL, M. J. Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: a review. **Biological Conservation**, 141, 10, 2432-2449, 2008. DOI: 10.1016/j.biocon.2008.07.020.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100, 1, 57-70, 2000. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

HANNA, V. S.; HAFEZ, E. A. A. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. **Journal of Advanced Research**, 11, 23-32, 2018. DOI: 10.1016/j.jare.2018.03.005.

HARIK, V. M. Geometry of carbon nanotubes and mechanisms of phagocytosis and toxic effects. **Toxicology Letters**, 273, 69-85, 2017. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.03.016.

HARPER, S.; USENKO, C.; HUTCHISON, J. E.; MADDUX, B. L. S.; TANGUAY, R. L. In vivo biodistribution and toxicity depends on nanomaterial composition, size, surface functionalisation and route of exposure. **Journal of Experimental Nanoscience**, 3, 3, 195-206, 2008. DOI: 10.1080/17458080802378953.

- HARTMANN, J. T.; BEGGEL, S.; AUERSWALD, K.; STOECKLE, B. C.; GEIST, J. Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, 170, 279-288, 2016. DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.06.014.
- HATCH, E. M.; FISCHER, A. H.; DEERINCK, T. J.; HETZER, M. W. Catastrophic Nuclear Envelope Collapse in Cancer Cell Micronuclei. **Cell**, 154, 1, 47-60, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.007.
- HATCH, E. M.; HETZER, M. W. Linking Micronuclei to Chromosome Fragmentation. **Cell**, 161, 7, 1502-1504, 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.06.005.
- HELLAND, A.; WICK, P.; KOEHLER, A.; SCHIMID, K.; SOM, C. Reviewing the Environmental and Human Health Knowledge Base of Carbon Nanotubes. **Environmental Health Perspectives**, 2007. DOI: 10.1289/ehp.9652.
- HEMMINGS JR., H. C.; EGAN, T. D. **Pharmacology and Physiology for Anesthesia**. 1 Ed. Saunders, 2013. 544 p. ISBN: 978-1-4377-1679-5. DOI: 10.1016/C2009-0-41712-4.
- HERNÁNDEZ-RIVERA, M.; ZAIBAQ, N. G.; WILSON, L. J. Toward carbon nanotube-based imaging agents for the clinic. **Biomaterials**, 101, 229-240, 2016. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.05.045.
- HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G. E. JR. **Análise da estrutura dos vertebrados**. 2ª Ed. São Paulo : Artheneu, 2006. ISBN: 85-7454-088-9.
- HILLEGASS, J. M.; MILLER, J. M.; MACPHERSON, M. B.; WESTBOM, C. M.; SAYAN, M.; THOMPSON, J. K.; MACURA, S. L.; PERKINS, T. N.; BEUSCHEL, S. L.; ALEXEEVA, V.; PASS, H. I.; STEELE, C.; MOSSMAN, B. T.; SHUKLA, A. Asbestos and erionite prime and activate the NLRP3 inflammasome that stimulates autocrine cytokine release in human mesothelial cells. **Particle and Fibre Toxicology**, 10, 39, 1-14, 2013. DOI: 10.1186/1743-8977-10-39.
- HODGSON, E. **A textbook of modern toxicology**. 3ª Ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2004. 557 p. ISBN: 0-471-26508-X.
- HOET, P. H. M.; BRÜSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O. V. Nanoparticles: known and unknown health risks. **Journal of Nanobiotechnology**, 2, 12, 1-15, 2004. DOI: 10.1186/1477-3155-2-12.
- HONG, B. J.; COMPTON, O. C.; AN, Z.; ERYAZICI, I.; NGUYEN, S. T. Successful Stabilization of Graphene Oxide in Electrolyte Solutions: Enhancement of Biofunctionalization and Cellular Uptake. **ACS Nano**, 6, 1, 63-73, 2012. DOI: 10.1021/nn202355p.
- HOTA, J.; DAS, M.; MAHAPATRA, P. K. Blood Cell Profile of the Developing Tadpoles and Adults of the Ornate Frog, *Microhyla ornata* (Anura: Microhylidae). **International Journal of Zoology**, 2013. DOI: 10.1155/2013/716183.

- HUANG, Y.; DAI, W.-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 4, 1, 18-25, 2014. DOI: 10.1016/j.apsb.2013.11.001.
- HUANG, X.; LIN, D.; NING, K.; SUI, Y.; HU, M.; LU, W.; WANG, Y. Hemocyte responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus* exposed to nano-TiO<sub>2</sub> and seawater acidification. **Aquatic Toxicology**, 180, 1-10, 2016. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.09.008.
- HUREN, S.; FRASER, T. W. K.; GOMES, T.; MAYER, I.; CHRISTENSEN, T. Sub-lethal UV radiation during early life stages alters the behaviour, heart rate and oxidative stress parameters in zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 166, 359-365, 2018. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.09.082.
- IJIMA, S. Carbon nanotubes: past, present, and future. **Physica B**, 323, 1-5, 2002. DOI: 10.1016/s0921-4526(02)00869-4.
- IJIMA, S.; ICHIHASHI, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. **Nature**, 363, 603-605, 1993. DOI: 10.1038/363603a0.
- IRAZUSTA, S. P.; OLIVEIRA, E. C.; CERAGIOLI, H. J.; DE SOUZA, B. F. S.; MENDONÇA, M. C. P.; SOARES, E. S.; AZEVEDO JÚNIOR, R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CRUZ, Z. M. A. Stress oxidativo e alterações enzimáticas induzidas por nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) funcionalizados com polietileno glicol no tecido hepático de camundongos. **Revinter**, 11, 1, 5-25, 2018. DOI: 10.22280/revintervol11ed1.366.
- ISLAS-ESPINOSA, M.; HERAS, A. WEF nexus: From cancer effects of xenobiotics to integrated sustainable Technologies. **Sustainable Production and Consumption**, 2, 128-135, 2015. DOI: 10.1016/j.spc.2015.07.003.
- JACKSON, A. Added credence for late dodo extinction date. **Historical Biology**, 26, 6, 699-701, 2014. DOI: 10.1080/08912963.2013.838231.
- JOHNSON, D. W.; DOBSON, B. P.; COLEMAN, K. S. A manufacturing perspective on graphene dispersions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 20, 5-6, 367-382, 2015. DOI: 10.1016/j.cocis.2015.11.004.
- JONASZ, M.; FOURNIER, G. R. **Light Scattering by Particles in Water: Theoretical and Experimental Foundations**. Academic Press, 2007. 714 p. ISBN: 978-0-12-388751-1. DOI: 10.1016/B978-0-12-388751-1.X5000-5.
- JONES-COSTA, M.; Franco-Belussi, L.; Vidal, F. A. P.; Gongora, N. P.; Castanho, L. M.; Carvalho, C. S.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; ABDALLA, F. C.; Duarte, I. C. S.; Oliveira, C.; OLIVEIRA, C. R. ; SALLA, R. F. . Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS). **Ecotoxicology And Environmental Safety**, 151, 184-190, 2018. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.01.022.

- JOSE, P. J.; GRIFFITHS-JOHNSON, D. A.; COLLINS, P. D.; WALSH, D. T.; MOQBEL, R.; TOTTY, N. F.; TRUONG, O.; HSUAN, J. J.; WILLIAMS, T. J. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, 179, 3, 881, 1994. DOI: 10.1084/jem.179.3.881.
- JOVANOVIĆ, B.; PALIĆ, D. Immunotoxicology of non-functionalized engineered nanoparticles in aquatic organisms with special emphasis on fish—Review of current knowledge, gap identification, and call for further research. **Aquatic Toxicology**, 118-119, 141-151, 2012. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.04.005.
- KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, 82, 2-3, 198-212, 2002. DOI: 10.1016/S0168-3659(02)00009-3.
- KABIR, E.; KUMAR, V.; KIM, K.-Y.; YIP, A. C. K.; SOHN, J. R. Environmental impacts of nanomaterials. **Journal of Environmental Management**, 225, 261-271, 2018. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.07.087.
- KAIN, J.; KARLSSON, H. L.; MÖLLER, L. DNA damage induced by micro- and nanoparticles - interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay. **Mutagenesis**, 27, 4, 491-500, 2012. DOI: 10.1093/mutage/ges010.
- KANE, A. B.; HURT, R. H.; GAO, H. The asbestos-carbon nanotube analogy: An update. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2018. DOI: 10.1016/j.taap.2018.06.027.
- KANTE, B.; COUVREUR, P.; DUBOIS-KRACK, G.; DE MEESTER, C.; GUIOT, P.; ROLAND, M.; MERCIER, M.; SPEISERU, P. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles I: free nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 71, 7, 786-790, 1982. DOI: 10.1002/jps.2600710716.
- KARLSSON, H. L. The comet assay in nanotoxicology research. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 398, 2, 651-666, 2010. DOI: 10.1007/s00216-010-3977-0.
- KATZ, U.; ROZMAN, A.; ZACCONE, G.; FASULO, S.; GABBAY, S. Mitochondria-rich cells in anuran Amphibia: chloride conductance and regional distribution over the body surface. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, 125, 131-139, 2000. DOI: 10.1016/S1095-6433(99)00168-3.
- KATZMANN, S.; WARINGER-LÖSCHENKOHL, A.; WARINGER, J. A. Effects of inter- and intraspecific competition on growth and development of *Bufo viridis* and *Bufo bufo* tadpoles. **Limnologica – Ecology Management of Inland Waters**, 33, 2, 122-130, 2003. DOI: 10.1016/S0075-9511(03)80041-5.
- KAWACHI, H. Functions of melanin-concentrating hormone in fish. **Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**, 305A, 9, 751-760, 2006. DOI: 10.1002/jez.a.310.
- KHALIL, A. M.; HASSAN, M. L.; WARD, A. A. Novel nanofibrillated cellulose/polyvinylpyrrolidone/silver nanoparticles films with electrical conductivity

properties. **Carbohydrate Polymers**, 157, 10, 503-511, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.008.

KHALIQ, N. U.; PARK, D. Y.; YUN, B. M.; YANG, D. H.; JUNG, Y. W.; SEO, J. H.; HWANG, C. S.; YUK, S. H. Pluronic: Intelligent building units for targeted cancer therapy and molecular imaging. **International Journal of Pharmaceutics**, 556, 30-44, 2019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.064.

KIK, M.; STEGE, M.; BOONYARITTICHAIKIJ, R.; VAN ASTEN, A. Concurrent *Ranavirus* and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs (*Phyllobates* and *Dendrobates* species), the Netherlands, 2012: a first report. **The Veterinary Journal**, 194, 2, 247-249, 2012. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.09.016.

KIM, J.; KIM, J.; JEONG, C.; KIM, W. J. Synergistic nanomedicine by combined gene and photothermal therapy. **Advanced Drug Delivery**, 98, 99-112, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2015.12.018.

KLAASSEEN, C. D. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 5<sup>a</sup> ed. Estados Unidos da América: McGraw-Hill, 1995.

KARLSSON, H. L.; GUSTAFSSON, J.; CRONHOLM, P.; MÖLLER, L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. **Toxicology Letters**, 188, 2, 112-118, 2009. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.03.014.

KENNEDY, A. J.; HULL, M. S.; STEEVENS, J. A.; DONTSOVA, K. M.; CHAPPELL, M. A.; GUNTER, J. C.; WEISS, C. A. Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 27, 9, 1932-1941, 2009. DOI: 10.1897/07-624.1.

KOHLER, S. A.; PARKER, M. O.; FORD, A. T. Species-specific behaviours in amphipods highlight the need for understanding baseline behaviours in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, 202, 173-180, 2018. DOI: 10.1016/j.aquatox.2018.07.013.

KOLOSNAJ-TABI, J.; JUST, J.; HARTMAN, K. B.; LAOUDI, Y.; BOUDJEMAA, S.; ALLOYEAU, D.; SZWARC, H.; WILSON, L. J.; MOUSSA, F. Anthropogenic carbon nanotubes found in the airways of parisian children. **EBioMedicine**, 2, 11, 1697-1704, 2015. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.10.012.

KONDO, Y.; IMAI, Y.; HOJO, H.; HASHIMOTO, Y.; NOZOE, S. Selective inhibition of T-cell-dependent immune responses by bisbenzylisoquinoline alkaloids in vivo. **International Journal of Immunopharmacology**, 14, 7, 1181-1186, 1992. DOI: 10.1016/0192-0561(92)90053-N.

KOOPEN, G.; AZQUETA, A.; POURRUT, B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R.; LANGIE, S. A. S. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, 32, 3, 397-408, 2017. DOI: 10.1093/mutage/gex002.

KOVALSZKI, A.; WELLER, P. F. **Eosinophils and Eosinophilia**. In: RICH, R. R.; FLEISHER, T. A.; SHEARER, W. T.; SCHROEDER, H. W.; FREW, A. J. WEYAND,

- C. M. **Clinical Immunology: Principles and Practice**. 5 Ed. Elsevier, 2019. ISBN: 978-0-7020-6896-6. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6896-6.00024-7.
- KREMYANSKAYA, M.; MASCARENHAS, J.; HOFFMAN, R. Why Does My Patient Have Erythrocytosis?. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, 26, 2, 267-283, 2012. DOI: 10.1016/j.hoc.2012.02.011.
- KROON, F.; STRENTEN, C.; HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. **PLOS One**, 12, 4, 1-43, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0174762.
- KROTO, H. W.; HEATH, J. R.; O'BRIEN, S. C.; CURL, R. F.; SMALLEY, R. E. C60: buckminsterfullerene. *Letters to Nature*, 318, 162-163, 1985. DOI: 10.1038/318162a0.
- KRUATRACHUE, M.; SUMRITDEE, C.; POKETHITIYOOK, P.; SINGHAKAEW, S. Histopathological effects of contaminated sediments on golden apple snail (*Pomacea canaliculata*, Lamarck 1822). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 86, 610–614, 2011. DOI: 10.1007/s00128-011-0265-4.
- KU, S. H.; PARK, C. B. Myoblast differentiation on graphene oxide. **Biomaterials**, 34, 8, 2017-2023, 2013. DOI: doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.052.
- KUMAR, S.; DANG, T. D.; ARNOLD, F. E.; BHATTACHARYYA, A. R.; MIN, B. G.; ZHANG, X.; VAIA, R. A. ; PARK, C.; ADAMS, W. W.; HAUGE, R. H.; SMALLEY, R. E.; RAMESH, S. WILLIS, P. A. Synthesis, Structure, and Properties of PBO/SWNT Composites. **Macromolecules**, 35, 24, 9039-9043, 2002. DOI: 10.1021/ma0205055.
- KUMAR, S.; NEHRA, M.; KEDIA, D.; DILBAGHI, N.; TANKESHWAR, K.; KIM, K. H. Nanodiamonds: emerging face of future nanotechnology. **Carbon**, 143, 678-699, 2019. DOI: 10.1016/j.carbon.2018.11.060.
- LAGIER, L.; MOUCHET, F.; LAPLANCHE, C.; MOTTIER, A.; CADARSI, S.; EVARISTE, L.; SARRIEU, C.; LONCHAMBON, P.; PINELLI, E.; FLAHAUT, E.; GAUTHIER, L. Surface area of carbon-based nanoparticles prevails on dispersion for growth inhibition in amphibians. **Carbon**, 119, 72–81, 2017. DOI: 10.1016/j.carbon.2017.04.016.
- LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; ATTADEMO, A. M.; JUNGES, C. M.; PELTZER, P. M.; BASSÓ, A.; LORENZATTI, E. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 769, 7-12, 2014. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2014.04.009.
- LANG, E.; QADRI, S. M.; LANG, F. Killing me softly – Suicidal erythrocyte death. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 44, 8, 1236-1243, 2012. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.04.019.

- LANONE, S.; ANDUJAR, P.; KERMANIZADEH, A.; BOCZKOWSKI, J. Determinants of carbon nanotube toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65, 15, 2063-2069, 2013. DOI: 10.1016/j.addr.2013.07.019.
- LARI, E.; STEINKEY, D.; PYLE, G. G. A novel apparatus for evaluating contaminant effects on feeding activity and heart rate in *Daphnia spp.* **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 135, 381-386, 2017. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.10.018.
- LAUDET, V. The Origins and Evolution of Vertebrate Metamorphosis. **Current Biology**, 21, 18, R726-R737, 2011. DOI: 10.1016/j.cub.2011.07.030.
- LEAD, J. R.; BATLEY, G. E.; ALVAREZ, P. J. J.; CROTEAU, M.-N.; HANDY, R. D.; MCLAUGHLIN, M. J.; JUDY, J. D.; SCHIRMER, K. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects: an updated review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 37, 8, 2029-2063, 2018. DOI: 10.1002/etc.4147.
- LENGAR, P. Identifying pathways affected by cancer mutations. **Genomics**, 110, 5, 318-328, 2018. DOI: 10.1016/j.ygeno.2017.12.004.
- LEWIS, D. E.; BLUTT, S. E. **Organization of the Immune System**. In: RICH, R. R.; FLEISHER, T. A.; SHEARER, W. T.; SCHROEDER, H. W.; FREW, A. J. WEYAND, C. M. **Clinical Immunology: Principles and Practice**. 5 Ed. Elsevier, 2019. ISBN: 978-0-7020-6896-6. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6896-6.00024-7.
- LIESCHKE, G. J.; TREDE, N. S. Fish immunology. **Current Biology**, 19, 16, R678-R682, 2009. DOI: 10.1016/j.cub.2009.06.068.
- LILLYWHITE, H. B. Water relations of tetrapod integument. **Journal of Experimental Biology**, 209, 202-226, 2006. DOI: 10.1242/jeb.02007.
- LIN, J.; CHEN, X.; HUANG, P. Graphene-based nanomaterials for bioimaging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 105, B, 242-254, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2016.05.013.
- LINDER, G.; KREST, S. K.; SPARLING, D. W. **Amphibian decline: an integrated analysis of multiple stressor effects**. 1<sup>a</sup> Ed. Carolina do Norte:SETAC Press, 2003. 345 p. ISBN: 1-880611-55-4.
- LINDBERG, H. K.; FALCK, G. C.-M.; SUHONEN, S.; VIPPOLA, M.; VANHALA, E.; CATALÁN, J.; SAVOLAINEN, K.; NORPPA, H. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. **Toxicology Letters**, 186, 3, 166-173, 2009. DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.11.019.
- LIU, Z.; LI, G.; LONG, C.; XU, J.; CEN, J.; YANG, X. The antioxidant activity and genotoxicity of isogarcinol. **Food Chemistry**, 253, 5-12, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.074.
- LOVELL, D.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, 23, 171-182, 2008.

- LYNAM, C.; GILMARTIN, N.; MINETT, A. I.; O'KENNEDY, R.; WALLACE, G. Carbon nanotube-based transducers for immunoassays. **Carbon**, 47, 10, 2337-2343, 2009. DOI: 10.1016/j.carbon.2009.04.017.
- MAHMOUDI, M.; SIMCHI, A.; IMANI, M. Cytotoxicity of Uncoated and Polyvinyl Alcohol Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, 113, 22, 9573-9580, 2009. DOI: 10.1021/jp9001516.
- MANAHAN, S. E. **Environmental chemistry**. 9ª Ed. Nova Iorque: CRC Press, 2010. 753 p. ISBN: 978-1-4200-5920-5.
- MANZO, L. P.; CERAGIOLI, H.; BONET, I. J.; NISHIJIMA, C. M.; VIEIRA, W. F.; OLIVEIRA, E. C.; DESTRO-FILHO, J.-P.; SARTORI, C. R.; TAMBELI, C. H.; PARADA, C. A. Magnetic, but not non-magnetic, reduced graphene oxide in spinal cord increases nociceptive neuronal responsiveness. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 13, 5, 1841-1851, 2017. DOI: 10.1016/j.nano.2017.02.019.
- MARCANTONIO, A. S. Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã-touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802: toxicidade aguda e crônica e parâmetros hematológicos. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2005. 96 p.
- MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. **Bi indicators and biomonitoring: principles, concepts and applications**. Volume 6: Trace Metals and other Contaminants in the Environment. 1ª Ed. Holanda: Elsevier Science, 2003. 997 p. ISBN: 0-08-044177-7.
- MARS, W.; BORNMANN, L.; BARTH, A.; LEYDESDORFF, L. Detecting the historical roots of research fields by reference publication year spectroscopy (RPYS). **Journal of the Association for Information Science and Technology**, 65, 4, 751-764, 2014. DOI: 10.1002/asi.23089.
- MATUS, G. N.; PEREIRA, B. V. R.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; COSTA, M. J.; SANTOS, A. C. A.; NUNES, B. Behavior and histopathology as biomarkers for evaluation of the effects of paracetamol and propranolol in the neotropical fish species *Phalloceros harpagos*. **Environmental Science and Pollution Research**, 25, 28, 28601-28618, 2018. DOI: 10.1007/s11356-018-2839-8.
- MAURO, D. S. A multilocus timescale for the origin of extant amphibians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 56, 2, 554-561, 2010. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.04.019.
- MAURO, D. S.; VENCES, M.; ALCOBENDAS, M.; ZARDOYA, R.; MEYER, A. Initial diversification of living amphibians predated the breakup of Pangaea. **The American Naturalist**, 165, 5, 590-599, 2005. DOI: 10.1086/429523.
- MCDIARMID, R. W.; ALTIG, R. **Tadpoles: the biology of anuran larvae**. 1ª Ed. Chicago: The University of Chicago, 1999. 444 p. ISBN: 0-226-55762-6.

- MEENA, S.; CHOUDHARY, S. Effects of functionalization of carbon nanotubes on its spin transport properties. **Materials Chemistry and Physics**, 2017, 175-181, 2018. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2018.06.077.
- MEENA, S.; CHOUDHARY, S. Spin transport in carbon nanotubes bundles: an ab-initio study. **Physics Letters**, 381, 39, 3431-3439, 2017.
- MELIA, K. R.; DUMAN, R. S. Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 88, 19, 8382-8386, 1991. DOI: 10.1073/pnas.88.19.8382.
- MENA, S.; ORTEGA, A.; ESTRELA, J. M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. **Mutation Research**, 674, 36-44, 2009. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.017.
- MENON, J. U.; KONA, S.; WADAJKAR, A. S.; DESAI, F.; VADLA, A.; NGUYEN, K. T. Effects of surfactants on the properties of PLGA nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 100A, 8, 1998-2005, 2012. DOI: 10.1002/jbm.a.34040.
- MESSENGER, E. A.; WARNER, A. E. The action of melatonin on single amphibian pigment cells in tissue culture. *British Journal of Pharmacology*, 61, 4, 607-614, 1997. PMID: 202360.
- MISSAOUI, W. N.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Toxicological status of nanoparticles: what we know and what we don't know. **Chemico-Biological Interactions**, 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.07.015.
- MONTALVÃO, M. F.; DE SOUZA, J. M.; GUIMARÃES, A. T. B.; MENEZES, I. P. P.; CASTRO, A. L. S.; RODRIGUES, A. S. L.; MALAFAIA, G. The genotoxicity and cytotoxicity of tannery effluent in bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Chemosphere**, 183, 491-502, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.080.
- MONTEIRO, J. A. N.; CUNHA, L. A.; COSTA, M. H. P.; REIS, H. S.; AGUIAR, A. C. S.; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; BURBANO, R. M. R.; ROCHA, C. A. M. Mutagenic and histopathological effects of hexavalent chromium in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (*Anura, Ranidae*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 163, 400-407, 2018. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.07.083.
- MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; INMAN, A. O.; WANG, Y. Y.; NEMANICH, R. J. Surfactant effects on carbon nanotube interactions with human keratinocytes. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 1, 4, 293-299, 2005. DOI: 10.1016/j.nano.2005.10.007.
- MORA, A.; HAN, F.; LUBINEAU, G. Estimating and understanding the efficiency of nanoparticles in enhancing the conductivity of carbon nanotube/polymer composites. **Results in Physics**, 10, 81-90, 2018. DOI: 10.1016/j.rinp.2018.05.019.
- MORAES, A. S.; PAULA, R. F. O.; PRADELLA, F.; SANTOS, M. P. A.; OLIVEIRA, E. C.; GLEHN, F. V.; CAMILO, D. S.; CERAGIOLI, H.; PETERLEVITZ, A.; BARANAUSKAS, V.; VOLPINI, W.; FARIAS, A. S.; SANTOS, L. M. B. The

Suppressive Effect of IL-27 on Encephalitogenic Th17 Cells Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes Reduces the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, 19, 9, 682-687, 2013. DOI: 10.1111/cns.12121.

MOTTIER, A.; MOUCHET, F.; PINELLI, E.; GAUTHIER, L.; FLAHAUT, E. Environmental impact of engineered carbon nanoparticles: from releases to effects on the aquatic biota. **Current Opinion in Biotechnology**, 46, 1-6, 2017. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.11.024.

MOUCHET, F.; GAUTHIER, L.; MAILHES, C.; FERRIER, V.; DEVAUX, A. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. **Environmental Toxicology**, 20, 1, 74-84, 2005. DOI: 10.1002/tox.20080.

MOUCHET, F.; LANDOIS, P.; PUECH, P.; PINELLI, E.; FLAHAUT, E.; GAUTHIER, L. Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes. **Nanomedicine**, 5, 6, 963-974, 2010. DOI: 10.2217/nnm.10.60.

MOUCHET, F.; LANDOIS, P.; SARREJMEJEAN, E.; BERNARD, G.; PUECH, P.; PINELLI, E.; FLAHAUT, E.; GAUTHIER, L. Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, 87, 2, 127-137, 2008. DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.01.011.

MOURAS, S.; HAMWI, A.; DJURADO, D.; COUSSEINS, J. C. Synthesis of first stage graphite intercalation compounds with fluorides. **Revue de Chimie minérale**, 24, 572-582, 1987. ISSN: 0035-1032.

MUKHI, S.; CAI, L.; BROWN, D. D. Gene switching at *Xenopus laevis* metamorphosis. **Developmental Biology**, 338, 117-126, 2010. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.10.041.

MURR, L. E.; BANG, J. J. ; ESQUIVEL, E. V.; GUERRERO, P. A.; LOPEZ, D. A. Carbon Nanotubes, Nanocrystal Forms, and Complex Nanoparticle Aggregates in common fuel-gas combustion sources and the ambient air. **Journal of Nanoparticle Research**, 6, 2, 241-251, 2004. DOI: 10.1023/B:NANO.0000034651.91325.40.

MURR, L. E.; SOTO, K. F.; ESQUIVEL, E. V.; BANG, J. J.; GUERRERO, P. A.; LOPEZ, D. A.; RAMIREZ, D. A. Carbon nanotubes and other fullerene-related nanocrystals in the environment: a TEM study. **Journal of The Minerals, Metals & Materials Society**, 56, 6, 28-31, 2004. DOI: 10.1007/s11837-004-0106-6.

MURUGAN, K.; NATARAJ, D.; MADHIYAZHAGAN, P.; SUJITHA, V.; CHANDRAMOHAN, B.; PANNEERSELVAM, C.; DINESH, D.; CHANDIRASEKAR, R.; KOVENDAN, K.; SURESH, U.; SUBRAMANIAM, J.; PAULPANDI, M.; VADIVALAGAN, C.; RAJAGANESH, R.; WEI, H.; SYUHEI, B.; AZIZ, A. T.; ALSALHI, M. S.; DEVANESAN, S.; NICOLETTI, M.; CANALE, A.; BENELLI, G. Carbon and silver nanoparticles in the fight against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: genotoxicity and impact on behavioral traits of non-target

- aquatic organisms. **Parasitology Research**, 115, 3, 1071-1083, 2016. DOI: 10.1007/s00436-015-4837-9.
- MUZI, L.; MOUCHET, F.; CADARSI, S.; JANOWSKA, I.; RUSSIER, J.; MÉNARD-MOYON, C.; RISULEO, G.; SOULA, B.; GALIBERT, A. M.; FLAHAUT, E.; PINELLI, E.; GAUTHIER, L.; BIANCO, A. Examining the impact of multi-layer graphene using cellular and amphibian models. **2D Materials**, 3, 2016. DOI: 10.1088/2053-1583/3/2/025009.
- NAKASHIMA, C.; OTSUKA, A.; KABASHIMA, K. Recent advancement in the mechanism of basophil activation. **Journal of Dermatological Science**, 91, 1, 3-8, 2018. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2018.03.007.
- NAKASHIMA, C.; OTSUKA, A.; KITO, A.; HONDA, T.; EGAWA, G.; NAKAJIMA, S.; NAKAMIZO, S.; ARITA, M.; KUBO, M.; MIYACHI, Y.; KABASHIMA, K. Basophils regulate the recruitment of eosinophils in a murine model of irritant contact dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 134, 1, 100-107e.12, 2014. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.02.026.
- NASRABADI, H. T.; ABBASI, E.; DAVARAN, S.; KOUHI, M.; AKBARZADEH, A. Bimetallic nanoparticles: Preparation, properties, and biomedical applications. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, 44, 1, 376-380, 2016. DOI: 10.3109/21691401.2014.953632.
- NATIONS, S.; WAGES, M.; CAÑAS, J. E.; MAUL, J.; THEODORAKIS, C.; COBB, G. P. Acute effects of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO and CuO nanomaterials on *Xenopus laevis*. **Chemosphere**, 83, 8, 1053-1061, 2011. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.01.061.
- NEMMAR, A.; VANBILLOEN, H.; HOYLAERTS, M. F.; HOET, P. H. M.; VERBRUGGEN, A.; NEMERY, B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 164, 9, 2001. DOI: 10.1164/ajrccm.164.9.2101036.
- NGUYEN, V.; SI, J.; YAN, L.; HOU, X. Electron-hole recombination dynamics in carbon nanodots. **Carbon**, 95, 659-663, 2015. DOI: 10.1016/j.carbon.2015.08.066.
- NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S. V.; GRIGORIEVA, I. V.; FIRSOV, A. A. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, 306, 5696, 666-669, 2004. DOI: 10.1126/science.1102896
- NUNES, B. The use of cholinesterases in ecotoxicology. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, 212, 29-59, 2011. DOI: 10.1007/978-1-4419-8453-1\_2
- NUNES, B.; GAIO, A. R.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrookia* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 71, 341-354, 2008. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.12.006.

- OBERLE, R. L.; MOORE, T. J.; KRUMMEL, D. A. P. Evaluation of mucosal damage of surfactants in rat jejunum and colon. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 33, 2, 75-81, 1995. DOI: 10.1016/1056-8719(94)00060-H.
- O'BRIEN, D. J.; KANEENE, J. B.; POPPENG, R. H. The use of mammals as sentinels for human exposure to toxic contaminants in the environment. **Environmental Health Perspectives**, 99, 351-368, 1993. DOI: 10.1289/ehp.9399351.
- O'CONNOR, I.; HAYDEN, H.; COLEMAN, J. N.; GUN'KO, Y. K. High-Strength, High-Toughness Composite Fibers by Swelling Kevlar in Nanotube Suspensions. **Small**, 5, 4, 466-469, 2009. DOI: 10.1002/sml.200801102.
- O'CONNOR, I.; HAYDEN, H.; COLEMAN, J. N.; GUN'KO, Y. K. Kevlar coated carbon nanotubes for reinforcement of polyvinylchloride. **Journal of Materials Chemistry**, 18, 46, 5585-5588, 2008. DOI: 10.1039/B813143K.
- OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, 1, 23-29, 2006. DOI: 10.1038/nprot.2006.5.
- OLIVEIRA, C. R.; FRACETO, L. F.; RIZZI, G. M.; SALLA, R. F.; ABDALLA, F. C.; COSTA, M. J.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, 149, 304-313, 2016. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.01.076.
- OOST, R. V. D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental riskassessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13, 57-149, 2003. DOI: 10.1016/S1382-6689(02)00126-6.
- OPPENHEIM, B. A.; HERBRECHT, R.; KUSNE, S. The Safety and Efficacy of Amphotericin B Colloidal Dispersion in the Treatment of Invasive Mycoses. **Clinical Infectious Diseases**, 21, 5, 1145-1153, 1995. DOI: 10.1093/clinids/21.5.1145.
- OSHIMA, N. Direct Reception of Light by Chromatophores of Lower Vertebrates. **Pigment Cell and Melanoma**, 14, 5, 312-319, 2001. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2001.140502.x
- PANDEY, R. K.; PRAJAPATI, V. K. Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, 107, parte A, 1278-1293, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.110.
- PANTÉ, N.; KANN, M. Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of ~ 39 nm. **Molecular Biology of the Cell**, 13, 425-434, 2002. DOI: 10.1091/mbc.01-06-0308.
- PARDON, M.-C.; GOULD, G. G.; GARCIA, A.; PHILLIPS, L.; COOK, M. C.; MILLER, S. A.; MASON, P. A.; MORILAK, D. A. Stress reactivity of the brain noradrenergic system in three rat strains differing in their neuroendocrine and behavioral responses to stress: implications for susceptibility to stress-related neuropsychiatric disorders. **Neuroscience**, 115, 1, 229-242, 2002. DOI: 10.1016/S0306-4522(02)00364-0.

- PARRA, J.; ABD-SOMOVILLA, A.; MERCADER, J. V.; TATON, T. A.; ABAD-FUENTES, A. Carbon nanotube-protein carriers enhance size-dependent self-adjuvant antibody response to haptens. **Journal of Controlled Release**, 170, 2, 242-251, 2013. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.05.019.
- PASSAGNE, I.; MORILLE, M.; ROUSSET, M.; PUJALTÉ, I.; L'AZOU, B. Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells. **Toxicology**, 299, 2-3, 112-124, 2012. DOI: 10.1016/j.tox.2012.05.010.
- PECHMANN, J. H. K.; WILBUR, H. M. Putting declining amphibian populations in perspective: natural fluctuations and human impacts. **Herpetologica**, 50, 1, 65-84, 1994.
- PEKKANEN, P.; PETERS, A.; HOEK, G.; TIITTANEN, P.; BRUNEKREEF, B.; DE HARTOG, J.; HEINRICH, J.; IBALD-MULLI, A.; KREYLING, W. G.; LANKI, T.; TIMONEN, K. L.; VANNINEN, E. Particulate Air Pollution and Risk of ST-Segment Depression During Repeated Submaximal Exercise Tests Among Subjects With Coronary Heart Disease. **Circulation**, 106, 933-938, 2002. DOI: 10.1161/01.CIR.0000027561.41736.3C.
- PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; ATTADEMO, A. M.; JUNGES, C. M.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; REPETTI, M. R.; SIGRIST, M. E.; BELDOMÉNICO, H. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 98, 142-151, 2013. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.010.
- PENTEADO, J. C. P.; SEOUD, O. A. E.; CARVALHO, L. R. F. Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. **Química Nova**, 29, 5, 1038-1046, 2006. DOI: 10.1590/S0100-40422006000500025.
- PÉREZ, S. FARRÉ, M. BARCELÓ, D. Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, 28, 6, 820-832, 2009. DOI: 10.1016/j.trac.2009.04.001.
- PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; FRANCO-BELUSSI, L.; MORENO, L.; TRIPOLE, S.; OLIVEIRA, C.; NATALE, G. S. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. **Environmental Science and Pollution Research**, 23, 10, 9852-9861, 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-6153-z.
- PERREAULT, F.; FARIA, A. F.; ELIMELECH, M. Environmental applications of graphene-based nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, 16, 2015. DOI: 10.1039/C5CS00021A.
- PERUMAL, S.; LEE, H. M.; CHEONG, I. W. High-concentration graphene dispersion stabilized by block copolymers in ethanol. **Journal of Colloid and Interface Science**, 497, 1, 359-367, 2017. DOI: 10.1016/j.jcis.2017.03.027.

- PESSIER, A. P. **Amphibia**. In: TERIO, K. A.; MCAALOOSE, D.; LEGER, J. S. Eds. **Pathology of zoo animals**. 1ª Ed. Estados Unidos da América: Academic Press, 2018. 1136 p. ISBN: 978-0-12-805306-5. DOI: 10.1016/B978-0-12-805306-5.00038-9.
- PIMM, S. L.; RAVEN, P. Extinctions by numbers. **Nature**, 403, 6772, 843-845, 2000. DOI: 10.1038/35002708.
- PINDER, A.; BURGGREN, W. Respiration during chronic hypoxia and hyperoxia in larval and adult bullfrogs (*Rana catesbeiana*). II. Changes in respiratory properties of whole blood. **The Journal of Experimental Biology**, 105, 205-213, 1983.
- POLLO, F. E.; GRENAT, P. R.; OTERO, M. A.; SALAS, N. E.; MARTINO, A. L. Assessment in situ of genotoxicity in tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae* (Barrio 1965) inhabiting aquatic ecosystems associated to fluorite mine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 133, 466-474, 2016. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.08.003.
- PRETORIUS, E.; OLUMUYIWA-AKEREDOLU, O. O. O.; MBOTWE, S.; BESTER, J. Erythrocytes and their role as health indicator: Using structure in a patient-oriented precision medicine approach. **Blood Reviews**, 30, 4, 263-274, 2016. DOI: 10.1016/j.blre.2016.01.001.
- PRIEL, D. L.; KUHNS, D. B. **Assessment of Neutrophil Function**. In: RICH, R. R.; FLEISHER, T. A.; SHEARER, W. T.; SCHROEDER, H. W.; FREW, A. J. WEYAND, C. M. **Clinical Immunology: Principles and Practice**. 5 Ed. Elsevier, 2019. ISBN: 978-0-7020-6896-6. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6896-6.00094-6.
- QADRI, S. M.; BISSINGER, R.; SOLH, Z.; OLDENBORG, P. A. Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes. **Blood Reviews**, 31, 6, 349-361, 2017. DOI: 10.1016/j.blre.2017.06.001.
- QIAN, X.; HAN, X.; CHEN, Y. Insights into the unique functionality of inorganic micro/nanoparticles for versatile ultrasound theranostics. **Biomaterials**, 142, 13-30, 2017. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.07.016.
- QU, Y.; HE, F.; YU, C.; LIANG, X.; LIANG, D.; MA, L.; ZHANG, Q.; LV, J.; WU, J. Advances on graphene-based nanomaterials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, 90, 764-780, 2018. DOI: 10.1016/j.msec.2018.05.018.
- RADOMSKI, A.; JURASZ, P.; ALONSO-ESCOLANO, D.; DREWS, M.; MORANDI, M.; MALINSKI, T.; RADOMSKI, M. W. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. **British Journal of Pharmacology**, 146, 882-893, 2005. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706386.
- RAHMAN, L.; JACOBSEN, N. R.; AZIZ, S. A.; WU, D.; WILLIAMS, A.; YAUK, C. L.; WHITE, P.; WALLIN, H.; VOGEL, U.; HALAPPANAVAR, S. Multi-walled carbon nanotube-induced genotoxic, inflammatory and pro-fibrotic responses in mice: Investigating the mechanisms of pulmonary carcinogenesis. **Mutation**

**Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 823, 28-44, 2017. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2017.08.005.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; DE PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1ª Ed. Maringá: Eduem, 2013.

REED, M. D.; ICEMAN, K. E.; HARRIS, M. B.; TAYLOR, B. E. The rostral medulla of bullfrog tadpoles contains critical lung rhythmogenic and chemosensitive regions across metamorphosis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology**, 225, 7-15, 2018. DOI: 10.1016/j.cbpa.2018.05.024.

RISSOLI, R. Z.; ABDALLA, F. C.; COSTA, M. J.; RANTIN, F. T.; MCKENZIE, J.; KALININ, A. C. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, 156, 37-44, 2016. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.083.

ROBERTS, D. L.; SOLOW, A. R. When did dodo become extinct?. **Nature**, 426, 6964, 245, 2003. DOI: 10.1038/426245a.

RODRIGUES, E. T.; PARDAL, M. A. The crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. **Environment International**, 70, 158-182, 2014. DOI: 10.1016/j.envint.2014.05.018.

ROELANTS, K.; GOWER, D. J.; WILKILSON, M.; LOADER, S. P.; BIJU, S. D.; GUILAUME, K.; MORIAU, L.; BOSSUYT, F. Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 104, 3, 887-892, 2006. DOI: 10.1073/pnas.0608378104.

ROGGLI, V. L. Measuring EMPs in the lung what can be measured in the lung: asbestiform minerals and cleavage fragments. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2018. DOI: 10.1016/j.taap.2018.06.026

ROGOVINA, L. Z.; VASIL'EV, V. G.; BRAUDO, E. E. Definition of the concept of polymer gel. **Polymer Science Series C**, 50, 1, 85-92, 2008. DOI: 10.1134/S1811238208010050.

ROSENBERG, H. F.; PHIPPS, S.; FOSTER, P. S. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 119, 6, 1303-1310, 2007. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.03.048.

ROWE, C. L.; CRANDALL, E. A. The acute thermal respiratory response is unique among species in a guild of larval anuran amphibians - implications for energy economy in a warmer future. **Science of the Total Environment**, 618, 229-235, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.332.

SAETIA, K.; SCHNORR, J. M.; MANNARINO, M. M.; KIM, S. Y.; RUTLEDGE, G. C.; SWAGER, T. M.; HAMMOND, P. T. Spray-Layer-by-Layer Carbon Nanotube/Electrospun Fiber Electrodes for Flexible Chemiresistive Sensor

- Applications. **Advanced Functional Materials**, 24, 492-502, 2014. DOI: 10.1002/adfm.201302344.
- SALLA, R. F.; GAMERO, F. U.; RIBEIRO, L. R.; RIZZI, G. M.; DAL MEDICO, S. E.; ROSSOLI, R. Z.; VIEIRA, C. A.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; LEITE, D. S.; ABDALLA, F. C.; TOLEDO, L. F.; COSTA, M. J. Cardiac adaptations of bullfrog tadpoles in response to chytrid infection. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Integrative Physiology**, 323A: 487–496, 2015. DOI: 10.1002/jez.1945.
- SALLA, R. F.; GAMERO, F. U.; RISSOLI, R. Z.; DAL-MEDICO, S. E.; CASTANHO, L. M.; CARVALHO, C. S.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; KALININ, A. L.; ABDALLA, F. C.; COSTA, M. J. Impact of an environmental relevant concentration of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, 144, 1862-1868, 2016. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.042.
- SALLA, R. F.; RIZZI-POSSIGNOLO, G. M.; OLIVEIRA, C. R.; LAMBERTINI, C.; FRANCO-BELUSSI, L.; LEITE, D. S.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; ABDALLA, F. C.; JENKINSON, T. S.; TOLEDO, L. F.; JONES-COSTA, M. Novel findings on the impact of chytridiomycosis on the cardiac function of anurans: sensitive vs. tolerant species. **PeerJ**, 6, e5891, 2018. DOI: 10.7717/peerj.5891.
- SALVATERRA, T.; ALVES, M. G.; DOMINGUES, I.; PEREIRA, R.; RASTEIRO, M. G.; CARVALHO, R. A.; SOARES, A. M. V. M.; LOPES, I. Biochemical and metabolic effects of a short-term exposure to nanoparticles of titanium silicate in tadpoles of *Pelophylax perezii* (Seoane). **Aquatic Toxicology**, 128-129, 190-192, 2013. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.12.014.
- SAMADAR, P.; OK, Y. S.; KIM, K.-H.; KWON, E. E.; TSANG, D. C. W. Synthesis of nanomaterials from various wastes and their new age applications. **Journal of Cleaner Production**, 197, parte 1, 1190-1209. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.06.262.
- SAMANTA, S.; DEY, P. Micronucleus and its applications. **Diagnostic Cytopathology**, 40, 1, 84-90, 2012. DOI: 10.1002/dc.21592.
- SANTOS, L. R. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; BORGES, R. E.; OLIVEIRA, C. Effects of Thermal Stress on Hepatic Melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (*Anura*). **The Anatomical Record**, 297, 864-875, 2014. DOI: 10.1002/ar.22884.
- SARIA, R.; MOUCHET, F.; PERRAULT, A.; FLAHAUT, E.; LAPLANCHE, C.; BOUTONNET, J.C.; PINELLI, E.; GAUTHIER, L. Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in *Xenopus laevis* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 22-29, 2014. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.05.010.
- SCHAFHAEUTL, C. On the combinations of carbon with silicon and iron, and other metals, forming the different species of cast iron, steel, and malleable iron. **The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science**, 16, 570-590, 1840. DOI: 10.1080/14786444008650094.

- SCHEINBERG, D. A.; MCDEVITT, M. R.; DAO, T.; MULVEY, J. J.; FEINBERG, E.; ALIDORI, S. Carbon nanotubes as vaccine scaffolds. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65, 2016-2022, 2013. DOI: 10.1016/j.addr.2013.07.013.
- SCHIDLOWSKI, M. A 3,800-million-year isotopic record of life from carbon in sedimentary rocks. **Nature**, 333, 313-318, 1988. DOI: 10.1038/333313a0.
- SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, 68, 4, 369-392, 2004. DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.03.016.
- SEOL, J. B.; NA, S. H.; GAULT, B.; KIM, J. E.; HAN, J. C.; PARK, C. G.; RAABE, D. Core-shell nanoparticle arrays double the strength of steel. **Scientific Reports**, 7, 2017. DOI: 10.1038/srep42547.
- SHAH, P.; WOLF, K.; LAMMERDING, J. Bursting the Bubble – Nuclear Envelope Rupture as a Path to Genomic Instability?. **Trends in Cell Biology**, 27, 8, 546-555, 2017. DOI: 10.1016/j.tcb.2017.02.008.
- SHAREENA, T. P. D.; MCSHAN, D.; DASMAHAPATRA, A. K.; TCHOUNWOU, P. B. A Review on graphene-based nanomaterials in biomedical applications and risks in environment and health. **Nano-Micro Letters**, 10-53, 2018. DOI: 10.1007/s40820-018-0206-4.
- SHIELD, J. W.; BENTLEY, P. J. Respiration of some urodele and anuran amphibia—I. In water, role of the skin and gills. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 46, 1, 17-28, 1973. DOI: 10.1016/0300-9629(73)90554-9
- SHVEDOVA, A. A.; KISIN, E. R.; PORTER, D.; SCHULTE, P.; KAGAN, V. E.; FADEEL, B.; CASTRANOVA, V. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus?. **Pharmacology and Therapeutics**, 121, 2, 192-204, 2009. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2008.10.009.
- SINGH, A.; MOOTER, G. V. D. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 100, 27-50, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2015.12.010.
- SINGH, N. P. The comet assay: Reflections on its development, evolution and applications. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 767, 23-30, 2016. DOI: 10.1016/j.mrrev.2015.05.004.
- SINGH, R.; TORTI, S. V. Carbon nanotubes in hyperthermia therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65, 15, 2045-2060, 2013. DOI: 10.1016/j.addr.2013.08.001.
- SMALLBONE, L. T.; LUCK, G. W.; WASSENS, S. Anuran species in urban landscapes: relationships with biophysical, built environment and socio-economic factors. **Landscape and Urban Planning**, 101, 1, 43-51, 2011. DOI: 10.1016/j.landurbplan.2011.01.002.

- SMALLEY, R. E. Discovering the fullerenes. **Reviews of Modern Physics**, 69, 3, 723-730, 1997. DOI: 10.1103/revmodphys.69.723.
- SPARLING, D. W. **Ecotoxicology Essentials**: environmental contaminants and their biological effects on animals and plants. USA:Academic Press, 2016. 478p.
- SPARLING, D. W.; LINDER, G.; BISHOP, C. A. **Ecotoxicology of amphibians and reptiles**. 1<sup>a</sup> ed. Estados Unidos da América:SETAC Press, 2000. 877 p. ISBN: 1-880611-28-7.
- STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World cancer report 2014**. 1<sup>a</sup> Ed. França, Léon: International Agency for Research on Cancer, 2014. 630 p. ISBN: 978-92-832-0443-5.
- STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, 306, 5702, 1783-1786, 2004. DOI: 10.1126/science.1103538.
- SUZUKI, M.; TANAKA, S. Molecular and cellular regulation of water homeostasis in anuran amphibians by aquaporins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, 153, 231-241, 2009. DOI: 10.1016/j.cbpa.2009.02.035.
- SVARTZ, G.; PAPA, M.; GOSATTI, M.; JORDÁN, M.; SOLDATI, A.; SAMTER, P.; GURAYA, M. M.; COLL, C. P.; CATÁN, S. P. Monitoring the ecotoxicity of  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Ni/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanomaterials by means of a battery of bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 144, 200-207, 2017. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.06.029.
- TANAKA, S.; KUROSUMI, K. Differential subcellular localization of ACTH and  $\alpha$ -MSH in corticotropes of the rat anterior pituitary. **Cell and Tissue Research**, 243, 2, 229-238, 1986. DOI: 10.1007/BF00251036.
- TANG, Z. K.; ZHANG, L.; WANG, N.; ZHANG, X. X.; WEN, G. H.; LI, G. D.; WANG, J. N.; CHAN, C. T.; SHENG, P. Superconductivity in 4 angstrom single-walled carbon nanotubes. **Science**, 292, 5526, 2462-6465, 2001. DOI: 10.1126/science.1060470.
- TERRADAS, M.; MARTÍN, M.; TUSELL, L.; GENESCÀ, A. DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response. **DNA Repair**, 8, 10, 1225-1234, 2009. DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.07.004.
- TERRONES, M.; BOTELLO-MÉNDEZ, A. R.; CAMPOS-DELGADO, J.; LÓPEZ-URÍAS, F.; VEJA-CANTÚ, Y. I.; RODRÍGUES-MACÍAS, F. J.; ELÍAS, A. L.; MUNÓZ-SANDOVAL, E.; CANO-MÁRQUEZ, A. G.; CHARLIER, J. C.; TERRONES, H. Graphene and graphite nanoribbons: Morphology, properties, synthesis, defects and applications. **Nanotoday**, 5, 4, 351-372, 2010. DOI: 10.1016/j.nantod.2010.06.010.
- THOMPSON, D. Michael Faraday's recognition of ruby gold: the birth of modern nanotechnology. **Gold Bulletin**, 40, 4, 267-269, 2007. DOI: 10.1007/BF03215598.
- TIAN, P.; TANG, L.; TENG, K. S.; LAU, S. P. Graphene quantum dots from chemistry to applications. **Materials Today Chemistry**, 10, 221-258, 2018. DOI: 10.1016/j.mtchem.2018.09.007.

- TOMPSETT, A. R.; WISEMAN, S.; HIGLEY, E.; PRYCE, S.; CHANG, H.; GIESY, J. P.; HECKER, M. Effects of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on sexual differentiation and development of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 156, 3-4, 202-210, 2012. DOI: 10.1016/j.cbpc.2012.06.002.
- TOYOKUNI, S. Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65, 15, 2098-2110, 2013. DOI: 10.1016/j.addr.2013.05.011
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 1, 2, 151-173, 1977. DOI: 10.1016/0147-6513(77)90033-1.
- UEKI, Y.; FUJITA, N.; KAWAI, M.; SHIBAHARA, M. Molten salt thermal conductivity enhancement by mixing nanoparticles. **Fusion Engineering and Design**, 2018. DOI: 10.1016/j.fusengdes.2018.04.121.
- UN (UNITED NATIONS). **Report of the United Nations conference on sustainable development**. 1<sup>a</sup> Ed. Nova Iorque: United Nations publication, 2012. 86 p.
- UN (UNITED NATIONS). **Report of the world summit on sustainable development**. 1<sup>a</sup> Ed. Nova Iorque: United Nations publication, 2002. 167 p. ISBN: 92-1-104521-5.
- VAISMAN, L.; WAGNER, H. D.; MAROM, G. The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes. **Advances in Colloid and Interface Science**, 128-130, 37-46, 2006. DOI: 10.1016/j.cis.2006.11.007.
- VALENTINO, R. J.; CURTIS, A. L. ; PAGE, M. E.; PAVCOVICH, L. A.; FLORIN-LECHNER, S. M. Activation of the Locus Ceruleus Brain Noradrenergic System during Stress: Circuitry, Consequences, and Regulation. **Advances in Pharmacology Part F: Catecholamines in The Central Nervous System**, 42, 781-784, 1997. DOI: 10.1016/S1054-3589(08)60863-7.
- VIDAL, F. A. P. **Efeito do contaminante emergente Lítio e da suplementação de Selenio sobre a metamorfose de girinos de rã touro, *Lithobates catesbeianus***. Sorocaba: Universidade Federal de São Carlos, 2019.
- VIEIRA, M. I. Capítulo V, **Algumas Características da Rã Touro**. In: Rã Touro Gigante. Características e Reprodução. 4a Edição. São Paulo, 1993.
- VIGNARDI, A. P.; HASUE, F. M.; SARTÓRIO, P. V.; CARDOSO, C. M.; MACHADO, A. S. D.; PASSOS, M. J. A. C. R.; SANTOS, T. A. C.; NUCCI, J. M.; HEWER, T. L. R.; WATANABE, I.-S.; GOMES, V.; PHAN, N. V. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). **Aquatic Toxicology**, 158, 218-229, 2015. DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.11.008.
- VILLASEÑOR, N. R.; DRISCOLL, D. A.; GIBBONS, P.; CALHOUNA. J. K.; LINDENMAYER, D. B. The relative importance of aquatic and terrestrial variables for frogs in an urbanizing landscape: key insights for sustainable urban development.

- Landscape and Urban Planning**, 157, 26-35, 2017. DOI: 10.1016/j.landurbplan.2016.06.006.
- VIZOTTO, L. D. Produção de girinos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE AQUICULTURA e ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTORES, 1980, Jaboticabal, SP. **Anais...** Brasília, DF: ABRAQ; ABCR, 1980, p. 125-152.
- VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. 4ª Ed. Londres: Academic Press, 2013. 773 p. ISBN: 978-0-12-386919-7. DOI: 10.1016/C2010-0-67152-5.
- VOYLES, J.; ROSENBLUM, E. B.; BERGER, L. Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. **Microbes and Infection**, 13, 1, 25-32, 2011. DOI: 10.1016/j.micinf.2010.09.015.
- WAKE, D. B. Declining amphibian populations. **Science**, 253, 5022, 860–860, 1991. DOI: 10.1126/science.253.5022.860.
- WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105, s.n., 11466-11473, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0801921105.
- WCED (World Commission on Environment and Development). **Our common future**. Oxford: Oxford University Press, 1987. 400 p. ISBN: 9780192820808.
- WEXLER, P. **Encyclopedia of toxicology**. 3ª Ed. London: Academic Press, 2014, 5218 p. ISBN: 978-0-12-386454-3.
- WEXLER, P.; ABDOLLAHI, M.; PEYSTER, A. D.; GAD, S. C.; GREIM, H.; HARPER, S.; MOSER, V. C.; RAY, S.; TARAZONA, J.; WIEGAND, T. J. **Encyclopedia of Toxicology**. 3ª Ed. Reino Unido, Londres: Academic Press, 2014.
- WHITLOCK, S. E.; GLÓRIA PEREIRA, M.; SHORE, R. F.; LANE, J.; ARNOLD, K. E. Environmentally relevant exposure to an antidepressant alters courtship behaviours in a songbird. **Chemosphere**, 211, 17-24, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.074.
- WHITTAKER, K.; KOO, M. S.; WAKE, D. B.; VREDENBRUG, V. T. Global declines of amphibians. In: LEVIN, S. A. (Org.) **Encyclopedia of biodiversity**. 2ª Ed. Amsterdã: Academic Press, 2013. p. 691-699. DOI: 10.1016/B978-0-12-384719-5.00266-5. ISBN: 978-0-12-384720-1.
- WIDICK, P.; WINER, E. S. Leukocytosis and Leukemia. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, 43, 4, 575-587, 2016. DOI: 10.1016/j.pop.2016.07.007.
- WILLEBRAND, R.; DIETSCHMANN, A.; NITSCHKE, L.; KRAPPMANN, S.; VOEHRINGER, D. Murine eosinophil development and allergic lung eosinophilia are largely dependent on the signaling adaptor GRB2. **European Journal of Immunology**, 48, 11, 1786-1795, 2018. DOI: 10.1002/eji.201847555.

- WHO (World Health Organisation); IPCS (International Programme on Chemical Safety). **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155.** 1<sup>a</sup> Ed. Finlândia: World Health Organization, 1993. ISBN: 92 4 157155 1.
- XU, X.; RAY, R.; GU, Y.; PLOEHN, H. J.; GEARHEART, L.; RAKER, K.; SCRIVENS, W. A. Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. **Journal of the American Chemical Society**, 126, 40, 12736-12737, 2004. DOI: 10.1021/ja040082h.
- YIN, F.; GU, B.; LIN, Y.; PANWAR, N.; TJIN, S. C.; QU J.; LAU, S. P.; YONG, K.T. Functionalized 2D nanomaterials for gene delivery applications. **Coordination Chemistry Reviews**, 347, 77-97, 2017. DOI: 10.1016/j.ccr.2017.06.024.
- YOUNGQUIST, M. B.; BOONE, M. D. Movement of amphibians through agricultural landscapes: the role of habitat on edge permeability. **Biological Conservation**, 175, 148-155, 2014. DOI: 10.1016/j.biocon.2014.04.028.
- YSLAS, E. I.; IBARRA, L. E.; PERALTA, D. O.; BARBERO, C. A.; RIVAROLA, V. A.; BERTUZZI, M. L. Polyaniline nanofibers: Acute toxicity and teratogenic effect on *Rhinella arenarum* embryos. **Chemosphere**, 87, 11, 1374-1380, 2012. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.02.033.
- YUAN, Z. Y.; ZHOU, W. W.; CHEN, X.; POYARKOV, N. A.; CHEN, H. M.; JANG-LIAW, N. H.; CHOU, W. H.; MATZKE, N. J.; IIZUKA, K.; MIN, M. S.; KUZMIN, S. L.; ZHANG, Y. P.; CANNATELLA, D. C.; HILLIS, D. M.; CHE, J. Spatiotemporal diversification of the true frogs (Genus *Rana*): a historical framework for a widely studied group of model organisms. **Systematic Biology**, 66, 5, 824-842, 2016. DOI: 10.1093/sysbio/syw055.
- ZAYA, R. M.; AMINI, Z.; WHITAKER, A. S.; KOHLER, S. L.; IDE, C. F. Atrazine exposure affects growth, body condition and liver health in *Xenopus laevis* tadpoles. **Aquatic Toxicology**, 104, 3-4, 243-253, 2011. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.04.021.
- ZEISLER, R.; GUINN, V. P. **Nuclear Analytical Methods in the Life Sciences.** 1<sup>a</sup> Ed. Totowa: The Humana Press Inc., 1990. p. 776. ISBN: 978-1-4612-6777-5. E-ISBN: 978-1-4612-0473-2. DOI: 10.1007/978-1-4612-0473-2.
- ZHAN, W.; SHU, Y.; SHENG, Y.; ZHU, H.; GUO, Y.; WANG, L.; GUO, Y.; ZHANG, J.; LU, G.; DAI, S. Surfactant-Assisted Stabilization of Au Colloids on Solids for Heterogeneous Catalysis. **Angewandte Chemie**, 56, 16, 4494-4498, 2017. DOI: 10.1002/anie.201701191.
- ZHANG, J.; TERRONES, M.; PARK, C. R.; MUKERJEE, R.; MONTHIOUX, M.; KORATKAR, N.; KIM, Y. S.; HURT, R.; FRACKOWIAK, E.; ENOKI, T.; CHEN, Y.; BIANCO, A. Carbon science in 2016: status, challenges and perspectives. **Carbon**, 98, 708-732, 2016b. DOI: 10.1016/j.carbon.2015.11.060.
- ZHANG, J.; YU, S. H. Carbon dots: large-scale synthesis, sensing and bioimaging. **Materials Today**, 19, 7, 382-393, 2016. DOI: 10.1016/j.mattod.2015.11.008.

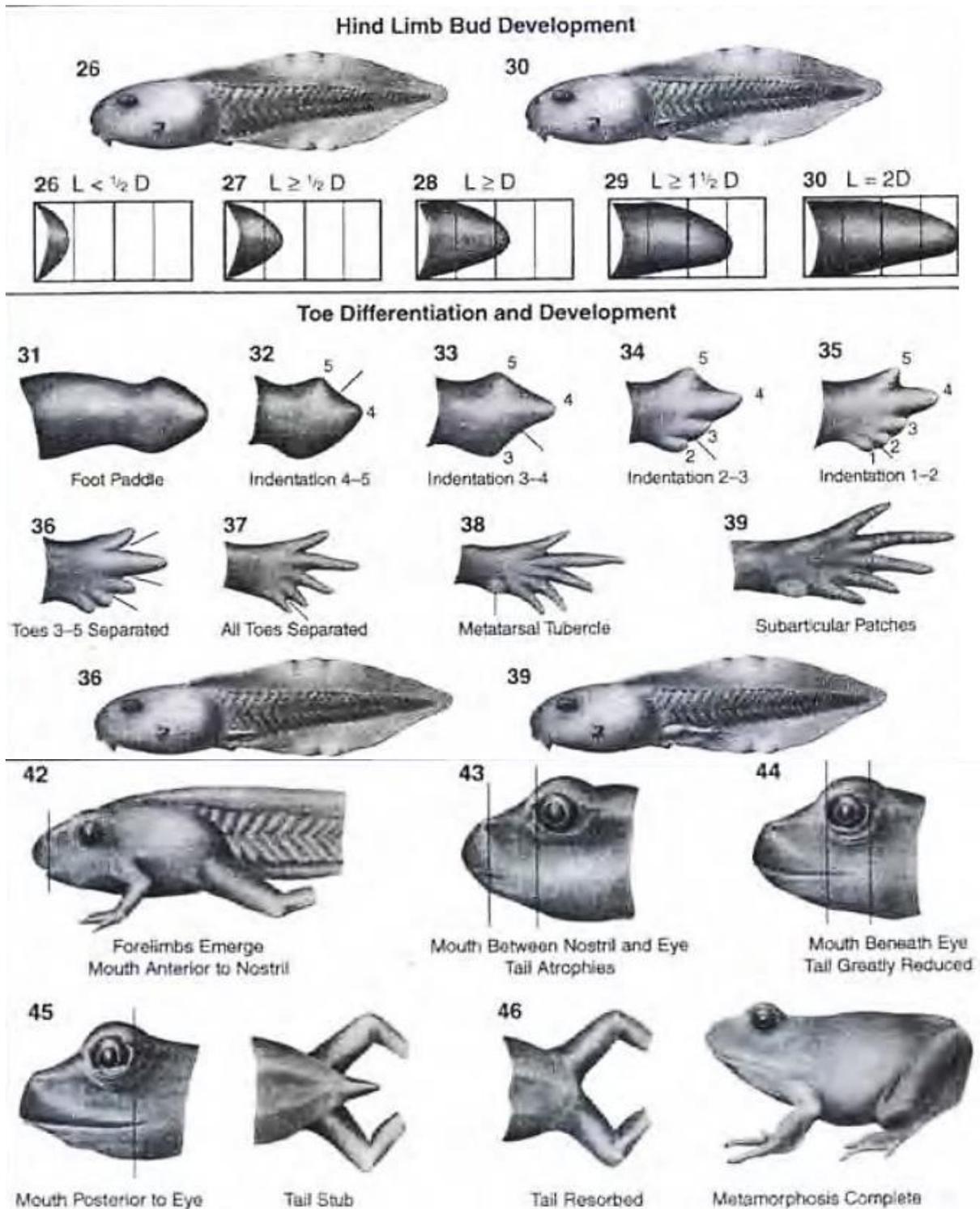
- ZHANG, P.; ZHOU, H.; CHEN, Y. Q.; LIU, Y. F.; QU, L. H. Mitogenomic perspectives on the origin and phylogeny of living amphibians. **Systematic Biology**, 53, 3, 391-400, 2005. DOI: 10.1080/10635150590945278.
- ZHANG, W.; LI, B.; SHU, X.; PEI, E.; YUAN, X.; SUN, Y.; WANG, T.; WANG, Z. Responses of anuran communities to rapid urban growth in Shanghai, China. **Urban Forestry & Urban Greening**, 20, 365-374, 2016a. DOI: 10.1016/j.ufug.2016.10.005.
- ZHAO, H.; DING, R.; ZHAO, X.; LI, Y.; QU, L.; PEI, H.; YILDIRIMER, L.; WU, Z.; ZHANG, W. Graphene-based nanomaterials for drug and/or gene delivery, bioimaging, and tissue engineering. **Drug Discovery Today**, 22, 9, 1302-1317, 2017. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.04.002.
- ZHAO, Y.; YANG, Z.; FAN, W.; WANG, Y.; LI, G.; CONG, H.; YUAN, H. Carbon nanotube/carbon fiber electrodes via chemical vapor deposition for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Arabian Journal of Chemistry**, 2018. DOI: 10.1016/j.arabjc.2018.11.002.
- ZHELEV, Z. M.; MEHTEROV, N. H.; POPGEORGIEV, G. S. Seasonal changes of basic erythrocyte-metric parameters in *Pelophylaxridibundus* (Amphibia: Ranidae) from anthropogenically polluted biotopes in Southern Bulgaria and their role as bioindicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 124, 406-417, 2016. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.11.011.
- ZOLNIK, B. S.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; SADRIEH, N.; DOBROVOLSKAIA, M. A. Minireview: Nanoparticles and the Immune System. **Endocrinology**, 151, 2, 458-465, 2010. DOI: 10.1210/en.2009-1082.



ANEXO A – Tabela de classificação dos estadiamentos de desenvolvimento (estágios 1º ao 46º) de Gosner (1960).



Fonte: Gosner (1960).



Fonte: Gosner (1960).

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos larvae with notes on identification. **Herpetologica**, 16, 3, 183-190, 1960. Retirado de: <<https://www.jstor.org/stable/3890061>>.

## ANEXO B – Autorização do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais

Pró Reitoria  
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos



---

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito de nanopartículas de óxido de grafeno reduzido sobre biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica em girinos de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802)", protocolada sob o CEUA nº 4301051018 (ID 001048), sob a responsabilidade de **Eliane Pintor de Arruda Moraes** e equipe; *Mônica Jones Costa; Mônica Jones Costa; Sílvia Pierre Irazusta; Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin; Lillian Franco-Belussi; Raquel Fernanda Salla; Cristiane Ronchi de Oliveira; Bruno Fernando Santos de Souza; Leonardo Antonio Teixeira de Oliveira; Camilla Prada; Luciano Vinicius da Silva Pereira; Otávio Braghetto Pescarini* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 06/11/2018.

We certify that the proposal "Effects of reduced graphene oxide nanoparticles on biomarkers in different levels of biological organisation of *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) tadpoles", utilizing 60 Amphibians (males and females), protocol number CEUA 4301051018 (ID 001048), under the responsibility of **Eliane Pintor de Arruda Moraes** and team; *Mônica Jones Costa; Mônica Jones Costa; Sílvia Pierre Irazusta; Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin; Lillian Franco-Belussi; Raquel Fernanda Salla; Cristiane Ronchi de Oliveira; Bruno Fernando Santos de Souza; Leonardo Antonio Teixeira de Oliveira; Camilla Prada; Luciano Vinicius da Silva Pereira; Otávio Braghetto Pescarini* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 11/06/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 10/2018 a 03/2019      Área: Biologia

Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais		
Espécie:	Anfíbios	sexo:	Machos e Fêmeas
		idade:	10 a 16 dias
		N:	60
Linhagem:	Lithobates catesbeianus	Peso:	2 a 4 g

---

Local do experimento: Laboratório de Ecotoxicologia e Biomarcadores em Animais (LEBA), Universidade Federal de São Carlos campus Sorocaba; Laboratório de Fisiologia da Conservação (LaFisC), Universidade Federal de São Carlos campus Sorocaba; Laboratório de Estudos em Macroinvertebrados Bentônicos (LEMB), Universidade Federal de São Carlos campus Sorocaba e Laboratório de Toxicologia Ambiental e Ocupacional, Faculdade de Tecnologia de Sorocaba.

São Carlos, 06 de fevereiro de 2019



Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos



Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho  
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos

---

Rodovia Washington Luis, Km 235, Bairro Monjolinho - CEP 13565-905 São Carlos/SP - tel: 55 (16) 3351-8028  
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8h às 12h e das 14h às 16h - e-mail: ceua@ufscar.br  
CEUA Nº 4301051018



## ANEXO C – Autorização da emenda pela Comissão de Ética no Uso de Animais

Pró Reitoria  
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos



São Carlos, 06 de fevereiro de 2019  
CEUA N 4301051018

Ilmo(a). Sr(a)  
Responsável: Eliane Pintor De Arruda Moraes  
Área: Biologia

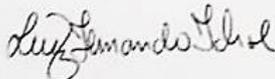
Título da proposta: \*Efeito de nanopartículas de óxido de grafeno reduzido sobre biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica em girinos de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802)\*.

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSCar (02/00610)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 06/dezembro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Venho por meio deste requisitar a emenda para modificação do composto a ser testado, passando de óxido de grafeno reduzido para nanotubo de carbono de parede múltipla, estando ambas na mesma categoria de classificação de material (nanopartícula carbonácea); e incluindo a mudança do título do projeto. A mudança do composto a ser testado deve-se ao problema com o fornecimento da nanopartícula, que havia sido doada para o projeto e no percurso até o destino (LaFisC-UFSCar) sofreu perdas (volume/massa) inviabilizando a experimentação com este composto no que tangia a proposta do projeto inicial. A proposição, alteração por nanotubos de carbono de parede múltipla, se deu pela presença do composto em quantia necessária para realização do projeto e por ser da mesma classe de material que o [óxido de grafeno reduzido], proposto inicialmente, incluindo aplicações semelhantes e a sua presença em diferentes aspectos do cotidiano humano. Não há mudança acerca dos membros da equipe, com exceção a correção do nome "Camila Prada" por "Camila Prata" (erro de digitação), CPF 342.662.068-52. Não há mudança quanto as técnicas de amostragem. Não há mudanças quanto ao cronograma, mantendo o prazo para conclusão em março de 2019. Nenhum experimento foi realizado, estando em espera do parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos com relação as alterações do projeto. A análise do projeto com pedido de resposta foi realizada com base no arquivo enviado em 23/10/2018 (Projeto de Pesquisa Retificado) ao invés do submetido em 06/12/2018 (Projeto de Pesquisa Atualizado). O projeto com as alterações mencionadas está anexado a atualização da proposta sob o nome do arquivo [Projeto de Pesquisa Retificado II], com sublinhado nas regiões alteradas, junto à submissão a resposta dessa emenda. Solicito urgência na análise das alterações do presente projeto, devido a data limite para conclusão, para que possa ser realizada a experimentação com os animais".

Comentário da CEUA: ""



Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos



Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho  
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos

---

Rodovia Washington Luís, Km 235, Bairro Monte Santo - CEP 13545-905 São Carlos/SP - tel: 55 (16) 3351-8028  
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8h às 12h e das 14h às 16h - e-mail: ceua@ufscar.br  
CEUA N 4301051018