

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS DE SOROCABA
CENTROS DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

SAMUEL ESPINOSA DAL MEDICO

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS EM GIRINOS DE RÃ-
TOURO, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), EXPOSTOS A NANOTUBOS
DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA E AO SEU SURFACTANTE ISOLADO
PLURONIC™ F-127**

SOROCABA

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS DE SOROCABA
CENTROS DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

SAMUEL ESPINOSA DAL MEDICO

ANÁLISE DE BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS EM GIRINOS DE RÃ-
TOURO, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), EXPOSTOS A NANOTUBOS
DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA E AO SEU SURFACTANTE ISOLADO
PLURONIC™ F-127

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia para a Sustentabilidade da Universidade Federal de São Carlos do *Campus* de Sorocaba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA)

Orientação: Profa. Dra. Monica Jones Costa

Coorientação: Profa. Dra. Raquel Fernanda Salla

SOROCABA
2021

SAMUEL ESPINOSA DAL MEDICO

ANÁLISE DE BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS EM GIRINOS DE RÃ-TOURO, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), EXPOSTOS A NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA E AO SEU SURFACTANTE ISOLADO PLURONIC™ F-127

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia para a Sustentabilidade da Universidade Federal de São Carlos do *Campus* de Sorocaba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA)

Orientação: Profa. Dra. Monica Jones Costa

Coorientação: Profa. Dra. Raquel Fernanda Salla

Presidente: Profa. Dra. Monica Jones Costa

Universidade Federal de São Carlos – *Campus* Sorocaba

Vice-Presidente: Profa. Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob

Universidade Federal de São Carlos – *Campus* Sorocaba

Membro Titular: Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

Universidade Federal de São Carlos – *Campus* Sorocaba

Membro Titular: Profa. Dra. Silvia Pierre Irazusta

Faculdade de Tecnologia de Sorocaba – FATEC SO

SOROCABA

2021

Espinosa Dal Medico, Samuel

Análise de biomarcadores morfológicos em girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802), expostos a nanotubos de carbono de parede múltipla e ao seu surfactante isolado Pluronic TM F-127 / Samuel Espinosa Dal Medico -- 2021.
109f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Monica Jones Costa
Banca Examinadora: Cleoni dos Santos Carvalho, Silvia Pierre Irazusta
Bibliografia

1. Ecotoxicologia. 2. Anfíbios. 3. Nanomateriais. I. Espinosa Dal Medico, Samuel. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979

AGRADECIMENTOS

O caminho percorrido até a conclusão deste trabalho foi repleto de percalços, muitos destes criados por mim mesmo, devido as conjunturas atuais, enquanto outros estiveram fora do meu controle. Contudo, sempre estive assistido por pessoas que acreditam no meu potencial, por mais que eu o questione inúmeras vezes. A todas essas pessoas que, direta ou indiretamente, estiveram envolvidas na construção desta dissertação, tornando possível a conclusão deste estudo, deixo os meus sinceros agradecimentos bem como a minha admiração.

Primeiramente agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Monica Jones, a pessoa que mais acreditou no meu potencial acadêmico desde a graduação e que, além de minha orientadora, é o membro mais importante da família que escolhi. Sua história de vida, profissionalismo e altruísmo servem de exemplo a todas as pessoas que cruzam seu caminho. Dra. Mo é mulher, é Professora, é pesquisadora, é mãe, é minha família de coração. Somente um familiar para dedicar tanto do seu tempo a me ajudar e socorrer, mesmo que para isso tenha deixado de estar com sua filha Letícia Jones, minha irmã de coração, a quem também agradeço por dividir o tempo com sua tão requisitada e admirada mãe, bem como pelas horas divertidas que dividimos juntas. Dra. Monica Jones é também uma das docentes da UFSCar Sorocaba que mais se dedicou aos projetos de mitigação dos prejuízos causados pela Covid-19. Compartilho com ela uma relação profissional bem como um amor incondicional. Muito obrigado por ser minha orientadora e minha melhor amiga.

Agradeço a minha coorientadora Dra. Raquel Fernanda Salla, agora também Professora Doutora Raquel, por todos os incentivos e auxílios, bem como por todo o tempo dedicado a mim. Você sempre foi a “discípula” que superou o “mestre”, e hoje ocupa um lugar de brilho acadêmico, dispondo-se a fazer de mim um mestre verdadeiro. Somos amigas sinceras e comadres, dividindo um amor que ultrapassa os muros da Universidade. Muito obrigado.

Agradeço a minha família, minha mãe Tania, meu pai Rafael e minhas irmãs Rafaela e Tarissa, que sempre me incentivaram e insistiram para que eu desse continuidade à formação acadêmica. Este trabalho existe graças a vocês também, que forneceram os alicerces emocionais e a infraestrutura domiciliar, e inclusive tempo e trabalho quando eu menos poderia oferecer; o que possibilitou a conclusão desta

Dissertação. São minha família, a quem posso sempre recorrer, sobretudo pelo amor que compartilhamos. Muito obrigado.

Agradeço à Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes da UFSCar de São Carlos, a qual gentilmente cedeu o uso do micrótomo e do material necessário para a continuidade da minha pesquisa, bem como pelas contribuições que seu espaço de trabalho, o LZBC, trouxe para produção deste trabalho. Muito obrigado.

Agradeço à Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias e à Dra. Cláudia Inês da Silva, por cederem espaço, materiais e equipamentos no LEMA, contribuindo para a aquisição de dados e análise dos resultados. Agradeço especialmente à Dra. Elaine, com a qual compartilho muito afeto, que, além do exemplo profissional, mostrou ser um grande exemplo de superação frente aos percalços que surgiram nos últimos meses. Muito obrigado.

Agradeço à Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho e Profa. Dra. Silvia Pierre Irazustra, que novamente aceitaram compor a minha banca. Suas contribuições ao trabalho são sempre muito importantes. Muito Obrigado.

Agradeço às minhas colegas e amigas do Laboratório de Fisiologia da Conservação (LaFisC) Elisabete, Mariana, Amanda e Rielly, pelo companheirismo nas horas de trabalho e momentos de caminhadas pelo *campus*. Muito obrigado.

Agradeço à CAPES pelo fomento durante o mestrado, o que viabilizou a conclusão desta dissertação. Muito obrigado.

Agradeço ao PPGBMA, por me aceitar como aluno e oferecer todo o suporte acadêmico para alcançar este momento do processo de formação enquanto mestre. Muito obrigado.

Agradeço à Profa. Dra. Cristiane, por aceitar participar da minha banca e pelas direções a serem tomadas neste projeto. Muito obrigado.

Agradeço às colegas e aos colegas do LEMA, que me receberam e me assistiram enquanto compartilhávamos o ambiente de trabalho. Muito obrigado.

Agradeço também às colegas e aos colegas pós-graduandos do LZBC, da UFSCar de São Carlos, com as quais e os quais ganhei aprendizados e recebi companheirismo durante a minha permanência. Muito obrigado.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho. Muito obrigado.

RESUMO

O presente trabalho avaliou os efeitos hepáticos dos nanotubos de carbono (NTCs) [10 mg.L⁻¹] (grupo NT; n=9) associados ao Pluronic™ F-127 (0,1%), bem como o efeito deste isolado (grupo ST; n=9) por meio da análise de biomarcadores hepáticos após a exposição por 96h de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802). A área das células melanomacrofágicas (A.MMC), a área ocupada pelos sinusóides (A.SINUS), a área ocupada pelos hepatócitos (A.HP) e a contagem do número de hepatócitos (C.HP) foram quantificadas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e; foi calculada a porcentagem de área tecidual ocupada por lipídios (A.SB) por histoquímica (Sudan Black). Observamos reduções da A.SINUS (P<0,001) dos grupos ST e NT com relação ao controle (CT; n=9) e também na C.HP (P=<0,001). Neste último também foram observadas diferenças (P<0,001) entre os grupos ST e NT. Para A.SB, foram observadas diferenças (P<0,001) entre todos grupos (CT<ST, CT<NT, ST<NT). Nossos resultados indicam que a redução da A.SINUS (redução da vascularização hepática) deve desencadear a morte celular, levando à redução da C.HP. O menor aporte de sangue leva ao acúmulo de lipídeos no citoplasma (esteatose hepática), o que aumenta a A.SB e leva à hipertrofia dos hepatócitos. Contudo, ao calcular o IBR (índice integrado de resposta de biomarcadores), a A.SINUS não se mostrou muito responsiva; logo, a redução na C.HP deve estar associada à produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), que também leva à lipidose hepática e então ao aumento da A.SB, bem como à morte celular e redução da C.HP. Embora sejam necessários outros estudos com distintos biomarcadores, fica aqui apontada a urgência em se regulamentar a produção e o descarte de nanomateriais e de seus surfactantes.

Palavras-chave: anuros, ecotoxicologia, nanomateriais de carbono, surfactantes, histopatologia.

ABSTRACT

This work assessed the hepatic effect of carbon nanotubes (CNT) [10 mg.L⁻¹] (NT group; n=9) associated with Pluronic[™] F-127 (0,1%), as well as its isolated effect (ST group; n=9), by the analysis of hepatic biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), after 96h of exposure. The melanomacrophage cells area (A.MMC), sinusoidal area (A.SINUS), parenchymal area (A.HP), and the number of hepatocytes (C.HP) were assessed using hematoxylin-eosin (HE). The percentage of area occupied by lipids (A.SB) were assessed using a histochemistry technique (Sudan Black). We observed a reduction of the A.SINUS (P<0,001) for ST and NT groups compared to the CT group (n=9), as well as for the C.HP (P<0,001). In the latter, we also observed differences (P<0,001) between the ST and NT groups. For A.SB, were observed differences among all the groups (CT<ST, CT<NT, ST<NT). Our findings indicate that the reduction of A.SINUS (i.e., reduced hepatic vascularization) may trigger the cell death, leading to the C.HP reduction. The lower blood flux leads to lipidic cytoplasmic accumulation (hepatic steatosis), with increases in the A.SB and, hence, lead to the hepatocytes' hypertrophy. However, the calculation of the IBR index (Integrated Biomarker Response) demonstrated that the A.SINUS was a very slight responsive biomarker. Therefore, the C.HP reduction should be associated with the synthesis of reactive oxygen species (ROS), which also leads to hepatic steatosis. This increases the A.SB, leading to cell death and to the reduction of the C.HP. Although future studies with distinct biomarkers are needed, the present study points to the urgency of the Brazilian regulating agencies to define safe normatives regarding the production and disposal of nanomaterials.

Keywords: anurans, ecotoxicology, carbon nanomaterials, surfactants, histopathology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. a. Representação de um nanotubo de carbono de parede dupla (DWCNT), o exemplo mais simples de Multi Wallled Carbon Nanotube (MWCNT). b. Eletromicrografia de transmissão de um MWCNT. 16

Figura 2. Distribuição do número de publicações utilizando anfíbios como modelo de ecotoxicidade de nanopartículas em função da espécie ou conjunto de espécies e da classe do nanomaterial. 20

Figura 3. A: organização do lobo hepático indicando o fluxo de sangue venoso (setas cheias pretas) e do sangue arterial (setas cheias brancas); destaque para o fluxo de bile pelo ducto biliar (seta descontínua preta) em sentido contrário ao fluxo sanguíneo. B: corte histológico de fígado de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*, SHAW 1802) evidenciando a tríade portal (T), um cordão de hepatócitos (H), sinusóide (S) e um agregado de células melanomacrofágicas (seta); HE, aumento de 100x, barra 100 μm . 37

Figura 4. Representação de um sinusóide hepático com seus principais tipos celulares. A. hepatócito; B. espaço de Disse; C. célula de Kupffer; D. célula endotelial sinusoidal; E. célula do Ito; F. eritrócito. 38

Figura 5. Escala de comprimento em metros (m) em relação à escala nanométrica (nm). Para efeito de comparação, o planeta Terra é aproximadamente 100 milhões de vezes maior que a bola de futebol, que por sua vez é 100 milhões de vezes maior que o fullereno. 41

Figura 6. Representação de uma folha de grafeno que, quando enrolada sobre si mesma, constitui um nanotubo de carbono. Notar os anéis hexagonais em formato de favos de mel que constituem as ligações do tipo sp²-sp². 46

Figura 7. Local de coleta dos animais experimentais. A: tanque de desova; B: tanque de animais pré-metamórficos; C: área seca para animais adultos. (Fonte: autoria própria). 56

Figura 8. Sistema de exposição para ensaios ecotoxicológicos, proposto por NUNES *et al.* (2008) e adaptado por SOUZA *et al.* (2019). A: Vista geral do sistema de exposição; B: caixa com banho termostaticado, contendo os recipientes individuais e aeração independente; C: animal experimental acondicionado no recipiente individual; D: vista superior do sistema, evidenciando a aeração independente para cada recipiente e o aquecedor termostaticado. 57

Figura 9. A: micrótomo utilizado para a secção dos cortes histológicos; B: disposição da bancada para a técnica de coloração HE; C: Fotomicroscópio utilizado para o fotodocumentar as lâminas; D: interface do programa utilizado para a aquisição de dados (*Leica Application Suite*). 60

Figura 10. Separação dos canais de cor azul (B), verde (C) e vermelha (D), para a quantificação da área de CMMs (E), área de sinusóides (F), e contagem de hepatócitos (G), respectivamente. A: corte histológico de fígado (aumento de 400x, HE) de um animal controle (não utilizado para a análise de resultados). 62

Figura 11. Separação dos canais de cor vermelha (B), para a quantificação da área ocupada pelas gotículas lipídicas (C), e seleção da área de tecido hepático (excluindo os sinusóides). A: corte histológico de fígado (aumento de 1000x, SB) de um animal controle (não utilizado para a análise de resultados). 64

Figura 12. Área de células melanomacrofágicas (A.MMC) expressa em μm^2 . Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. 69

Figura 13. Cortes histológicos dos três grupos experimentais: (A) grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e (C) grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT) evidenciando a presença de células melanomacrofágicas (CMMs) (pontas das setas brancas) e de eosinófilos (e). Notar a presença de hepatócitos vacuolizados (pontas das setas amarelas) em todos os grupos. HE, aumento de 400x, barra: 50 μm . 70

Figura 14. Área dos sinusóides (A.SINUS) expressa em μm^2 . Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). O (*) indica diferença estatisticamente relevante ($P < 0,05$) dos grupos expostos em relação ao controle. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. 72

Figura 15. Cortes histológicos dos três grupos experimentais: (A) grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e (C) grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT) evidenciando os sinusóides (S) contendo eritrócitos, além de células melanomacrofágicas (CMMs) (pontas das setas brancas). Notar a presença de hepatócitos vacuolizados (pontas das setas amarelas) em todos os grupos. HE, aumento de 400x, barra: 50µm. 73

Figura 16. Área dos hepatócitos (A.HP) expressa em µm². Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). Resultados apresentados como média ± desvio padrão. 77

Figura 17. Quantificação do número de hepatócitos (C.HP). Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). O (#) indica diferença estatisticamente relevante (P<0,05) entre os grupos expostos, e o (*) indica diferença estatisticamente relevante (P<0,05) destes grupos em relação ao controle. Resultados apresentados como média ± desvio padrão. 77

Figura 18. Cortes histológicos dos três grupos experimentais: (A) grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e (C) grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT) evidenciando os hepatócitos (pontas das setas amarelas). Também são visíveis as células melanomacrofágicas (CMMs) (pontas das setas brancas). HE, aumento de 400x, barra: 50 µm. 78

Figura 19. Análise qualitativa do tecido hepático, evidenciando alterações morfológicas possivelmente relacionadas à hipertrofia. (A) grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e (C) grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). Notar o citoplasma dos hepatócitos em B e C (pontas das setas amarelas) com progressivo aumento da eosinofilia em relação a A, além de um aparente aumento de volume do citoplasma. HE, aumento de 400x, barra: 50 µm. 80

Figura 20. Área ocupada por lipídios (A.SB) expressa em %. Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). O (*) indica diferença estatisticamente relevante (P<0,05) dos grupos expostos em relação ao controle. Resultados apresentados como média ± desvio padrão. 83

Figura 21. Análise qualitativa do tecido hepático corado com Sudan Black, evidenciando a marcação positiva para lipídios. (A) Grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e (C) grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). Notar a presença mais proeminente de vacúolos contendo lipídios em B e C (pontas das setas amarelas) em relação a A. Pontas das setas brancas indicam os pigmentos das células melanomacrofágicas (CMMs). Aumento de 1000x, barra: 20 µm. 84

Figura 22. Gráfico em radar representando o IBR. Valores mais distantes de zero indicam maior responsividade do biomarcador. Notar que A.HP e A.SB foram os mais responsivos para ambos os grupos expostos, ao passo que C.HP foi responsivo apenas para o grupo NT. Grupo CT representa os valores ZERO. 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações sobre o delineamento experimental de ensaios ecotoxicológicos com anfíbios e nanopartículas carbonáceas (NTC). 21

Tabela 2. Caracterização dos nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) para uso como xenobiótico. (*) dados fornecidos pelo fabricante. (#) dados fornecidos por IRAZUSTA et al. (2018). 55

Tabela 3. Valores de média e desvio padrão dos biomarcadores morfológicos para A.MMC, A.SINUS e A.HP expressos em área (μm^2), com os respectivos N amostrais. Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). Biomarcadores: área de células melanomacrófagicas (A.MMC), área de sinusóides (A.SINUS), área de hepatócitos (A.HP). O (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) dos grupos expostos em relação ao controle, enquanto que NS denota ausência de diferença significativa ($P > 0,05$) entre quaisquer grupos experimentais. 68

Tabela 4. Valores de média e desvio padrão da contagem de hepatócitos, com respectivos n amostrais. Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). O (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos expostos em relação ao controle, o (#) denota diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupo NT e o ST. NS denota ausência de diferença significativa ($P > 0,05$) entre quaisquer grupos experimentais. 76

Tabela 5. Resumo das respostas apresentadas pelos biomarcadores entre os grupos expostos, bem como destes em relação ao grupo controle. As setas (\downarrow) representam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) de diminuição do parâmetro; enquanto as setas (\leftrightarrow) indicam que não houve diferença significativa ($P < 0,05$). Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). Biomarcadores: área de melanomacrófagos (A. MMC), área de sinusóides (A. SINUS), área de hepatócitos (A. HP), contagem de hepatócitos (C. HP), porcentagem de área ocupada por lipídios (A.SB). 85

Tabela 6. Índices de correlação (r) de Pearson e Spearman, obtidos a partir dos dados quantitativos dos biomarcadores hepáticos: área de células melanomacrófagicas (A.MMC), área de sinusóides (A.SINUS), contagem de hepatócitos (C.HP), área de hepatócitos (A.HP). Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). Valor de r em negrito indica uma correlação forte. (*) Dados submetidos ao teste de correlação de Pearson. (NS) Valores de r não significativos ($P > 0,05$). 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Atomic Force Microscope
ATP	Adenosina Trifosfato
AVMA	American Veterinary Medical Association
ASTM	American Society for Testing and Materials
Bd	Batrachochytrium dendrobatidis (quitridiomicose)
CE	Contaminante Emergente
CES	Células Endoteliais Sinusoidais
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CVD	Chemical Vapor Deposition
CMM	Células Melanomacrofágicas
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DWCNT	Double Wallled Carbon Nanotube
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GSH	Glutathione reduzida
HE	Hematoxilina Eosina
IBR	Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores
LEIA	Laboratório de Ecotoxicologia e Integridade Ambiental
LZBC	Laboratório de Zoolofisiologia e Bioquímica Comparativa
MWCNT	Multi Wallled Carbon Nanotube
NM	Nanomateriais
NO	Óxido Nítrico
NP	Nanopartícula
NTC	Nanotubos de carbono
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI	Índice de Polidispersão
PZ	Potencial Zeta
STM	Scanning Tunneling Microscope
SWCNT	Single Wallled Carbon Nanotube
TH	Hormônios Tireoideanos
TG	Triglicerídeos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	JUSTIFICATIVA	19
3	OBJETIVOS E HIPÓTESES	24
3.1	<i>Objetivos gerais e hipóteses</i>	24
3.2	<i>Objetivos específicos</i>	24
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
4.1	<i>Anfíbios</i>	25
4.1.1	<i>Visão Geral</i>	25
4.1.2	<i>Causas do declínio</i>	27
4.2	<i>Ecotoxicologia</i>	30
4.2.1	<i>Bioensaios</i>	32
4.2.2	<i>Biomarcadores</i>	33
4.3	<i>Visão geral do fígado</i>	35
4.4	<i>Nanociência e nanotecnologia</i>	40
4.4.1	<i>Visão Geral</i>	40
4.4.2	<i>Propriedades e aplicações</i>	43
4.4.3	<i>Nanotubos de Carbono</i>	44
4.4.4	<i>Nanotoxicologia</i>	47
4.4.5	<i>Efeitos biológicos dos nanomateriais manufaturados</i>	50
4.4.6	<i>Uso do Pluronic™ F-127</i>	52
5	MATERIAIS E MÉTODOS	54
5.1	<i>Caracterização das nanopartículas e preparo das soluções</i>	54
5.2	<i>Coleta e aclimação dos animais</i>	55
5.3	<i>Delineamento Experimental dos Ensaio Ecotoxicológicos</i>	56
5.4	<i>Eutanásia e coleta dos órgãos</i>	58
5.5	<i>Microtomia e coloração das lâminas</i>	58
5.6	<i>Forma de Análise dos Resultados</i>	61
5.6.1	<i>Aquisição dos dados morfométricos</i>	61
5.6.2	<i>Análise qualitativa das lâminas</i>	63
5.6.3	<i>Análise histoquímica</i>	63
5.6.4	ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTAS DE BIOMARCADORES	65
5.6.5	<i>Análise Estatística</i>	65
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
6.1	<i>Área ocupada pelas células melanomacrogáficas (CMMs - μm^2)</i>	67
6.2	<i>Área ocupada pelos sinusóides (A.SINUS - μm^2)</i>	72
6.3	<i>6.3 Área de hepatócitos (A.HP) e Contagem de hepatócitos (C.HP)</i>	76
6.4	<i>Porcentagem da área hepática ocupada por lipídeos (A.SB)</i>	82
	84

6.5	<i>Correlações entre os biomarcadores</i>	85
6.6	<i>Índice integrado de resposta de biomarcadores</i>	87
7	Dificuldades encontradas	89
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
9	CONCLUSÕES	91
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1 INTRODUÇÃO

Descendentes dos primeiros vertebrados terrestres, os anfíbios surgiram na Terra há mais de 360 milhões de anos (CARROLL, 2009; VITT; CALDWELL, 2013). Constituem uma classe de vertebrados diversa em estratégias de vida e em número de espécies, das quais mais de 8.000 já foram descritas (AMPHIBIAWEB.ORG; CARROLL, 2009; VITT; CALDWELL, 2013). Apesar dessa longa história de sobrevivência, nos últimos anos, diversos fatores têm contribuído para a redução de mais de 70% das espécies de anfíbios do mundo (BARINAGA, 1990; HAYES *et al.*, 2010). As causas desse declínio incluem: doenças infecciosas, introdução de espécies exóticas, mortes em rodovias, mudanças climáticas, uso comercial, destruição e degradação de habitats e poluição (FAHRIG *et al.*, 1994; ALFORD; RICHARDS, 1999; COLLINS, 2010; HAYES *et al.*, 2010; BLAUSTEIN *et al.*, 2011; COELHO *et al.*, 2012; ALROY, 2015; SALLA *et al.*, 2015).

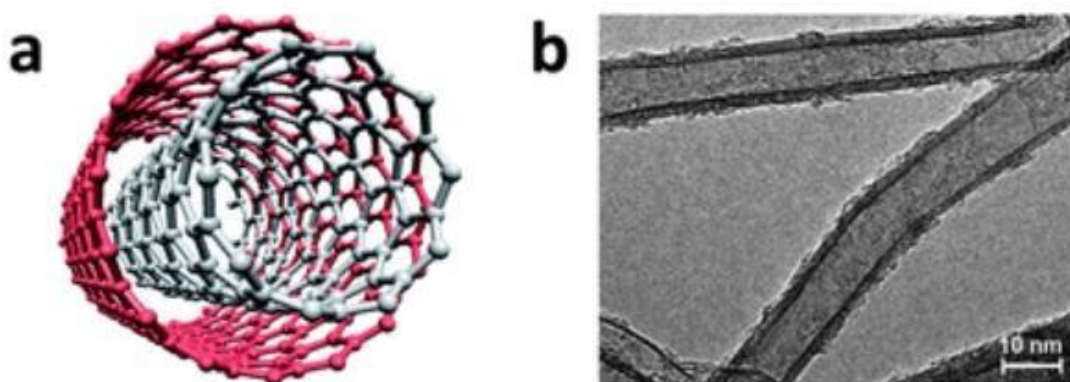
Destacando-se a poluição, os anfíbios são animais especialmente sensíveis a poluentes, em virtude das particularidades de sua biologia e ecologia (LINDER, BISHOP, 2000; QUARANTA *et al.*, 2009; SPARLING). Seus ovos não possuem casca, o desenvolvimento embrionário é externo e a maioria das espécies possui ciclo de vida aquático/terrestre (SPARLING; LINDER, BISHOP, 2000; QUARANTA *et al.*, 2009; AMARAL *et al.*, 2019; SLABY *et al.*, 2019). Além disso, devido ao seu importante papel para a respiração, a pele dos anfíbios é delgada, úmida e ricamente vascularizada, sendo permeável a gases, íons, fluidos e, portanto, também permeável a compostos químicos exógenos, os xenobióticos (SPARLING; LINDER, BISHOP, 2000; WAKE; VREDENBURG, 2000; QUARANTA *et al.*, 2009).

Tanto efluentes domésticos e industriais, bem como compostos lixiviados das lavouras, geram poluentes tóxicos de preocupação ambiental, pois contaminam o solo, o ar e a água (GAGNÉ *et al.*, 2006; ARIAS-ESTÉVEZ, *et al.*, 2008; MO *et al.*, 2018). Essas atividades antrópicas são fonte de diversos xenobióticos, como metais, surfactantes, hidrocarbonetos aromáticos e, notadamente, contaminantes emergentes (GAGNÉ *et al.*, 2006; ANASTOPOULOS; KYZAS, 2014; MO *et al.*, 2018). Os últimos estão presentes em uma grande gama de produtos químicos sintetizados pelo ser humano, como cosméticos, produtos de uso doméstico, pesticidas, medicamentos, dentre outros (GAGNÉ *et al.*, 2006; STASINAKIS *et al.*, 2012; GAVRILESCU, *et al.*, 2015). Como muitos desses produtos contêm nanomateriais (NMs) em sua

composição, esses novos materiais, fruto da nanotecnologia, passam a se enquadrar entre os contaminantes emergentes (WEIR *et al.*, 2012; BOURDIOL *et al.*, 2013).

A nanotecnologia é a engenharia em escala atômica ou molecular e envolve uma grande variedade de tecnologias que medem, manipulam ou incorporam materiais com ao menos uma de suas dimensões entre 1 e 100 nm, chamados de nanomateriais (SATYANARAYANA; RATHIKA, 2011; ASTM, 2012; RAUSCHER; ROEBBEN, 2014). As principais classes de NMs incluem os compostos por materiais contendo metais e óxidos metálicos, nanocristais semicondutores (chamados de *quantum dots*), cerâmicos, poliméricos, lipídicos e os baseados em carbono (KLEINE *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2017). De especial relevância para este trabalho, os NMs carbonáceos, representados pelos fulerenos, grafeno e nanotubos de carbono (NTCs) (figura 1), constituem alótropos dos átomos de carbono (FREIXA *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2017). Os últimos são moléculas cilíndricas, com diâmetro de um a poucos nanômetros e comprimento de até poucos micrômetros compostos por folhas de grafite de espessura atômica, enroladas sobre si mesmas (ASHBY, 2009; PRASEK, 2011; TOMA, 2016).

Figura 1. a. Representação de um nanotubo de carbono de parede dupla (DWCNT), o exemplo mais simples de Multi Wallled Carbon Nanotube (MWCNT). b. Eletromicrografia de transmissão de um MWCNT.



Fonte: adaptado de PRASEK *et al.* (2011)

Pelo fato de se aproximarem da dimensão atômico-molecular, os nanomateriais exibem propriedades físicas e químicas aprimoradas, com promissoras aplicações na

área comercial, médica e ambiental (DRAGIEVA; STOYNOV; KLABUNDE, 2001; CAO, 2004; KLEINE *et al.*, 2008; TOMA, 2016). Se por um lado as propriedades únicas dos NMs são um atrativo para o setor comercial, por outro, levantam preocupações quanto aos seus riscos para a saúde humana e do meio ambiente (DEPLEDGE, 2005; OBERDÖRSTER, 2009; HESS, 2010; OWEN).

Estudos têm demonstrado diversas respostas adversas de anfíbios expostos a NMs, a maior parte deles com *Xenopus laevis* e *Lithobates catesbeianus* (AMARAL *et al.*, 2019). Nanopartículas (NPs) metálicas inibem o crescimento desses animais, além de agirem como desreguladores endócrinos, prejudicando a metamorfose (NATIONS *et al.*, 2011; CAREW *et al.*, 2015). Relatou-se também que a exposição às NPs orgânicas (alginato-quitosano e lipídicas sólidas) aumenta o número de eosinófilos e de agregados de células melanomacrofágicas no fígado (OLIVEIRA *et al.*, 2016, 2019). No que tange os NMs carbonáceos, a exposição a concentrações relativamente altas (até 500 mg.L⁻¹) de NTCs resultaram em obstrução de órgãos como brânquias e intestino, ocorrendo também em outros órgãos, além destas vias de entrada (MOUCHET *et al.*, 2008; BACCHETTA *et al.*, 2012; LAGIER *et al.*, 2017).

Na União Européia, os nanomateriais possuem uma regulamentação própria que contempla até mesmo a avaliação de sua segurança, sendo que nos Estados Unidos, estão sob o controle da FDA (Food and Drug Administration) (RAUSCHER; RASMUSSEN; SOKULL-KLÜTTGEN, 2017; SMITH, 2018). No Brasil, embora projetos de lei para regulamentar o uso da nanotecnologia estejam tramitando no Senado desde 2005, ainda não existe uma legislação para este tipo de tecnologia, sendo que parte desta morosidade advém de interesses econômicos escusos (FERREIRA; SANT'ANNA, 2015; LAZZARETTI; HUPFFER, 2019).

Isso, mais uma vez, impacta a saúde humana e do meio ambiente, já que, com um gama cada vez maior de produtos contendo NMs, a ausência de uma regulamentação resulta na falta de controle de qualidade destes materiais nanoestruturados e no descarte indevido dos mesmos (LAZZARETTI; HUPFFER, 2019). Assim, o presente trabalho buscou avaliar e agregar mais conhecimento sobre os efeitos que um potencial contaminante de preocupação emergente, os nanotubos de parede múltipla (MWCNT) associados ao seu surfactante (Pluronic™ F-127), bem como ao surfactante isolado, podem exercer na morfologia e fisiologia hepática de anfíbios pré-metamórficos. Isso se mostra relevante na atual realidade brasileira, visto

que o obscurantismo científico que se instaurou neste país nos últimos três anos tem levado a danos possivelmente irreparáveis em nossa história natural.

2 JUSTIFICATIVA

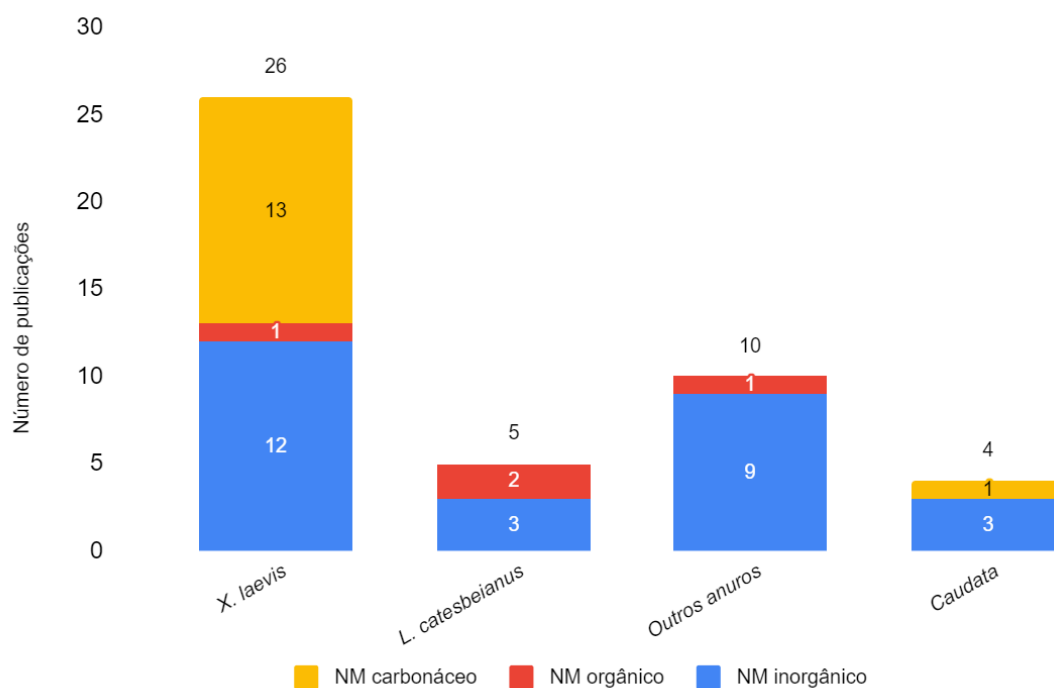
Os avanços da nanotecnologia vêm resultando em um número cada vez maior de aplicações dos NMs em atividades industriais e produtos de uso cotidiano. São, portanto, potenciais contaminantes de ecossistemas aquáticos e terrestres, uma vez que, conseqüentemente, serão descartados no meio ambiente, podendo contaminar o solo, águas superficiais e lençóis freáticos, resultando em efeitos potencialmente deletérios na biota aquática (KLAINÉ *et al.*, 2008; HANDY *et al.*, 2011). Assim, os NMs se enquadram dentre os contaminantes de preocupação emergente, visto que seus efeitos ambientais devem ser percebidos nos próximos anos (BOURDIOL *et al.*, 2013; SAUVÉ; DESROSIERS, 2014; GAVRILESCU, *et al.*, 2015).

Como já elencado, vêm sendo observados efeitos deletérios dos NMs em anfíbios expostos aos mesmos. Isso merece a atenção da comunidade científica, visto que esses animais vêm sofrendo um drástico declínio de suas populações nos últimos 30 anos. Recentemente, o artigo de revisão de AMARAL *et al.* (2019) reuniu 36 trabalhos científicos relacionados à toxicidade, modos de ação e interação de NMs em anfíbios. Recorrendo à plataforma de pesquisa do Web of Science, os autores buscaram trabalhos até dezembro de 2018, utilizando como palavras-chave: “amphibians” e “nanoparticles”, “amphibians” e “nanomaterials”, “tadpoles” e “nanoparticles”, “tadpoles” e “nanomaterials”. Fazendo uso dessa mesma metodologia, entre o período de janeiro de 2019 e junho de 2020 foram publicados mais seis outros artigos; totalizando 42 trabalhos científicos.

A figura 2 apresenta o número desses estudos em função das espécies estudadas - ou conjunto de espécies estudadas -, de acordo com a classe de NMs. Para tanto, o número total de publicações nessa figura não corresponde ao supracitado, visto que no trabalho de Thompson *et al.* (2017) foi avaliado o efeito de um mesmo NM em duas espécies distintas. Embora a maior parte das pesquisas tenha avaliado a toxicidade de NMs inorgânicos em anfíbios, o primeiro estudo deste tipo foi com nanotubos carbono (AMARAL *et al.*, 2019), no qual se avaliou a toxicidade aguda e a genotoxicidade em larvas de axolote (*Ambystoma mexicanum*) expostos a altas concentrações de DWCNT (Nanotubos de carbono de parede dupla, o tipo mais simples de MWCNT) (MOUCHET *et al.*, 2007). Hoje os nanomateriais baseados em carbono contemplam 33% dos estudos avaliando a ecotoxicidade de NMs em anfíbios; contudo, nenhum destes trabalhos avaliou alterações histopatológicas em

órgãos e tecidos sensíveis à exposição a xenobióticos, como pode ser conferido na Tabela 1. Logo, este é o primeiro trabalho a se propor avaliar alterações histopatológicas e histoquímicas no fígado de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) expostos aos MWCNT.

Figura 2. Distribuição do número de publicações utilizando anfíbios como modelo de ecotoxicidade de nanopartículas em função da espécie ou conjunto de espécies e da classe do nanomaterial.



Fonte: autoria própria

Tabela 1. Informações sobre o delineamento experimental de ensaios ecotoxicológicos com anfíbios e nanopartículas carbonáceas (NTC). DWCNT: Double Walled Carbon Nanotubes; *A. mexicanum*: *Ambystoma mexicanum*; *X. laevis*: *Xenopus laevis*; MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão; MWCNT: Multi Walled Carbon Nanotubes; MLG: Grafeno de camadas múltiplas; OG: óxido de grafeno; ND: nanodiamante.

Nanomaterial	Espécie/fase de desenvolvimento	Tempo de exposição	End points	Referência
DWCNT	<i>A. mexicanum</i> (larva)	12 dias	Mortalidade Genotoxicidade	MOUCHET <i>et al.</i> , 2007
DWCNT	<i>X. laevis</i> (larva)	12 dias	Mortalidade Genotoxicidade Análise do intestino: macroscópica, microscopia de luz, MET e Raman	MOUCHET <i>et al.</i> , 2008
DWCNT MWCNT		12 dias	Mortalidade Genotoxicidade Análise macro e micro do fígado e intestino (MET e Raman)	MOUCHET <i>et al.</i> , 2010
DWCNT		12 dias	Mortalidade Genotoxicidade Análise do intestino (Histologia e Raman)	MOUCHET <i>et al.</i> , 2011
MWCNT		12 dias	Mortalidade Genotoxicidade Análise macro e micro de fígado, brânquias e intestino	BOURDIOL <i>et al.</i> , 2013

MWCNT	2 até 24 h	Mortalidade Inibição do crescimento Comportamento anormal Estresse oxidativo Mutagenicidade Análise macroscópica de brânquias e fígado	SARIA <i>et al.</i> , 2014
MLG	12 dias	Mortalidade Inibição do crescimento Genotoxicidade Dissecção e análise macroscópica do intestino	MUZI <i>et al.</i> , 2016
DWCNT MWCNT OG	12 dias	Inibição do crescimento Análise macroscópica de brânquias e intestino	LAGIER <i>et al.</i> , 2017
OG	12 dias	Genotoxicidade Citometria de fluxo Expressão gênica: estresse oxidativo, desintoxicação e reparo do DNA	EVARISTE <i>et al.</i> , 2019
OG	4 e 21 dias	Comportamento motor e nível de atividade Patologia do intestino Presença de GO	LI <i>et al.</i> , 2020

		(TEM, Raman) Análise de neurotransmissores		
ND	<i>X. laevis</i> (embrião)	Microinjeções de ND em embriões	Mortalidade e malformações	MARCON <i>et al.</i> , 2010

Fonte: autoria própria

3 OBJETIVOS E HIPÓTESES

3.1 OBJETIVOS GERAIS E HIPÓTESES

Este trabalho buscou avaliar alterações histopatológicas no fígado de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW 1802), no estágio 25 de Gosner, após a exposição aguda (96h) a concentrações de 10 mg.L⁻¹ de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) associados ao surfactante Pluronic™ F-127 (0,1%), bem como a este composto isolado.

Assim, o presente estudo tem como hipóteses:

(1) o diâmetro nanométrico dos MWCNT, somado ao caráter anfipático do surfactante Pluronic™ F-127, possibilitará alcançarem a circulação hepática, resultando em efeitos no fígado; (2) serão observados indícios de estresse oxidativo no fígado (3) os animais expostos ao surfactante isolado bem como os animais expostos ao Pluronic™ F-127+MWCNT apresentarão um maior número de células melanomacrofágicas em relação aos animais do grupo controle; (4) o Pluronic™ F-127 aumentará permeabilidade dos MWCNT e, conseqüentemente, seus efeitos deletérios; (5) será evidenciada a ocorrência de esteatose hepática tanto nos animais expostos ao Pluronic™ F-127 isolado quanto nos animais expostos ao Pluronic™ F-127 associado aos nanotubos de carbono.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) contabilizar a área das células melanomacrofágicas do tecido hepático;
- b) analisar alteração no diâmetro dos sinusóides ou mesmo a congestão destes;
- c) observar possíveis alterações na organização tecidual do parênquima hepático;
- d) calcular a área do parênquima hepático.
- e) contabilizar o número de hepatócitos;
- f) avaliar se os animais expostos aos xenobióticos apresentaram esteatose hepática.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 ANFÍBIOS

4.1.1 Visão Geral

Os anfíbios compõem uma antiga classe de vertebrados, oriunda dos primeiros vertebrados terrestres, que surgiram entre 380 e 365 milhões de anos atrás (CARROLL, 2009; VITT; CALDWELL, 2013; WAKE; KOO, 2018). Os primeiros anuros viveram na era mesozoica, há 250 milhões de anos; já as famílias modernas existem há mais de 110 milhões de anos tendo, inclusive, sobrevivido à grande extinção do final do período Cretáceo (WAKE; KOO, 2018). São animais adaptados a viverem em muitos biomas, desde os trópicos até acima do Círculo Ártico, ocorrendo em quase todos os continentes, exceto na Antártica e na maioria das ilhas oceânicas (FROST *et al.*, 2006; LINDER *et al.*, 2010). Ocupam quase todos os habitats terrestres e de água doce, a diversas temperaturas e altitudes (VENTURINO *et al.*, 2003; FROST *et al.*, 2006).

Diversa em espécies, habitats e modos de vida, essa classe apresenta grande importância ecológica em muitos ecossistemas sendo, inclusive, os vertebrados mais abundantes em algumas comunidades, funcionando como espécies-chave (MURPHY; PHILLIPS; BEASLEY, 2000; SPARLING *et al.*, 2003; WAKE; KOO, 2018). Essa classe é dividida em três grupos: 1) Caudata ou Urodela, representado pelas salamandras e tritões; 2) Gymnophiona ou Apoda, representado pelas cobras-cegas ou cecílias; e, 3) Anura, representado pelos sapos, rãs e pererecas (HADDAD; PRADO, 2005; FROST *et al.*, 2006; HADDAD, 2008). Das mais de 8.000 espécies descritas, a grande maioria é de anfíbios anuros, algo em torno de 80%, compondo o maior número de representantes tanto no Brasil quanto no mundo (HADDAD, 2008; WAKE; KOO, 2018).

Importante destacar também que a grande maioria dos anfíbios sofre metamorfose ao longo de seu desenvolvimento, uma característica única dentre as demais classes de vertebrados (LINDER *et al.*, 2010). A fase larval da grande maioria das espécies ocorre no ambiente aquático; onde passam por transformações fisiológicas, bioquímicas, estruturais e, inclusive, comportamentais, até se transformarem um indivíduo adulto de hábito terrestre, aquático ou semi-aquático (LINDER *et al.*, 2010; HADDAD *et al.*, 2013; WAKE; KOO, 2018; KYKUYAMA *et al.*,

2019). Contudo, nem todos os anfíbios sofrem metamorfose; quase todas as cecílias possuem desenvolvimento direto, assim como certas espécies de anuros e de urodelos (HADDAD *et al.*, 2013; LINDER *et al.*, 2010; WAKE; KOO, 2018). Além disso, algumas salamandras são neotênicas, como o axolote (*Ambystoma mexicanum*), mantendo-se no estado larval ao longo de toda a vida (MURPHY; PHILLIPIS; BEASLEY, 2000; WAKE; KOO, 2018).

Embora as fases de ovo, larva e adulto constituam o mesmo indivíduo, cada um destes estágios é uma entidade única em relação a sua interação com o ambiente (SPARLING *et al.*, 2000). Diversos fatores afetam os estágios de desenvolvimento e crescimento dos anfíbios, como disponibilidade de recursos, competição, predação, radiação UV, temperatura e oxigênio dissolvido, além de compostos químicos que acabam por atingir os corpos d'água (MURPHY, PHILLIPIS; BEASLEY, 2000; MORRISON; HERO, 2003; SKELLY, 2004; HADDAD; PRADO, 2005; TURRIAGO; PARRA; BERNAL, 2015). No estágio larval, muitos desses estressores podem influenciar a celeridade do processo metamórfico pois, a exemplo dos ovos, que são um estágio vulnerável do ciclo de vida dos anfíbios, quanto mais rápido eclodirem, mais vantajoso para a espécie (MURPHY, PHILLIPIS; BEASLEY, 2000; MORRISON; HERO, 2003).

A fase larval, chamada de girino nos anuros, é geralmente aquática de água-doce, dotada de ecologia própria e de uma variedade de formas, tamanhos e cores (HADDAD, 2008; HADDAD *et al.*, 2013; WAKE; KOO, 2018). Sua morfologia externa pouco se assemelha a do adulto: a cabeça e corpo são compostos, possuem uma cauda muscular desprovida de vértebras, além de nadadeiras ventrais e dorsais sem suporte ósseo (MCDIARMID & ALTIG, 1999). A metamorfose é marcada por profundas mudanças pós-embrionárias, com intensa expressão gênica mediada, principalmente, pelos hormônios tireóideos (HT), processo que envolve tanto o ganho de massa quanto mudanças estruturais em tecidos e órgãos (MURPHY, PHILLIPIS; BEASLEY, 2000; WELLS, 2007; HADDAD *et al.*, 2013; VIDAL *et al.*, 2021).

Durante a metamorfose, as mudanças externas são as mais marcantes e envolvem tanto o desenvolvimento de membros quanto a regressão da cauda (BROWN; CAI, 2007; HADDAD *et al.*, 2013). Muitos órgãos funcionais presentes nos girinos são remodelados, como o fígado, a pele, o tecido hemocitopoético, o músculo esquelético e o sistema nervoso; já as brânquias regridem (FURLOW; NEFF, 2006; BROWN; CAI, 2007; HADDAD *et al.*, 2013). O intestino, antes longo e estruturalmente

simples, sobre um encurtamento de 75%, diferenciando-se em um órgão complexo que condiz com as mudanças no padrão alimentar (ISHIZUYA-OKA; SHI, 2005; FURLOW; NEFF, 2006). Enquanto os adultos são predadores por excelência, os girinos possuem dieta que varia de acordo com a espécie, podendo ser consumidores de algas, detritívoros, filtradores, carnívoros e até onívoros (MURPHY, PHILLIPIS; BEASLEY, 2000; HADDAD, 2008).

4.1.2 Causas do declínio

Não bastassem os desafios impostos pelo ambiente natural, os anfíbios ainda enfrentam uma acentuada redução de suas populações no Brasil e no mundo em virtude de fatores antropogênicos (BLAUSTEIN; WAKE, 1990; ALFORD; RICHARDS, 1999; STUART *et al.*, 2004). Suas áreas de ocorrência estão sendo suprimidas e fragmentadas, isolando pequenas e grandes populações desses animais, que precisam se dispersar, migrar, alcançar corpos d'água para se reproduzir e até mesmo desviar de locais alterados por humanos, mas que, inevitavelmente, acaba resultando em um aumento na incidência de mortes em rodovias (FAHRIG *et al.*, 1994; CARR; FAHRIG, 2002; CUSHMAN, 2006; BECKER, *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2012).

Esses habitats também são negativamente impactados pelo despejo de diversos contaminantes, cujas fontes vêm de escoamentos e efluentes de lavouras, áreas de mineração, áreas urbanas e indústrias (ANASTOPOULOS; KYZAS, 2014; MO *et al.*, 2018). Os poluentes incluem metais-traços, pesticidas, fertilizantes, fármacos, surfactantes, contaminantes emergentes, dentre outros (DAL-MEDICO *et al.*, 2014; JONES-COSTA *et al.*, 2018; SLABY *et al.*, 2019; WAKE & VREDENBURG, 2008). Estes podem afetar os anfíbios tanto de forma letal quanto subletal, com prejuízos para reprodução, crescimento e desenvolvimento, maior frequência de anormalidades, alterações comportamentais e reduzida resistência às doenças (ALFORD; RICHARDS, 1999; EGEE-SERRANO *et al.*, 2012; LEARY *et al.*, 2018; SLABY *et al.*, 2019). Deve-se considerar que as características da biologia e ecologia dos anfíbios os tornam mais susceptíveis aos contaminantes ambientais. São animais cuja pele delgada e ricamente vascularizada constitui a principal superfície de trocas gasosas em larvas e adultos, mas não uma barreira eficiente contra compostos exógenos, já que é permeável e desprovida de escamas (SPARLING *et al.*, 2000;

WAKE & VREDENBURG, 2008; KARDONG, 2019). Suas taxas de depuração e eliminação de xenobióticos são mais lentas, em virtude do baixo metabolismo relacionado à ectotermia (GARDNER; OBERDÖSTER, 2005). Além disso, como a maior parte das espécies possui um ciclo de vida dividido entre o ambiente aquático e o terrestre ou semi-terrestre, estão sujeitos aos poluentes em todas as suas fases de desenvolvimento, sobretudo durante o período embrionário e larval (SPARLING; LINDER, BISHOP, 2000).

Alterações globais, como a depleção da camada de ozônio e o aquecimento, associadas ao acúmulo atmosférico de gases de efeito estufa também afetam a sobrevivência desses animais (ALFORD; RICHARDS, 1999). O aumento da incidência de radiação ultravioleta (UV), principalmente durante os períodos embrionários e larvais dos anfíbios, causam malformações, induzem à eclosão precoce e deprimem o sistema imune (PAHKALA; LAURILA; MERILÄ, 2001; MITCHELL *et al.*, 2012; CECCATO *et al.*, 2016; FRANCO-BELUSSI; FANALI, DE OLIVEIRA, 2018). Em virtude da ectotermia, os anfíbios são especialmente sensíveis e pouco tolerantes às mudanças de temperatura do ambiente, pois a mesma afeta sua fisiologia e capacidade de sobrevivência, aumentando a incidência de doenças, modificando a temperatura que seria ótima para sua sobrevivência, que resulta em maior perda d'água, estando também associada ao aumento de infecções (ALFORD; RICHARDS, 1999; POUND; FOGDEN; CAMPBELL, 1999; SPARLING *et al.*, 2000; KIESECKER; BLAUSTEIN; BELDEN, 2001; DEUTSCH *et al.*, 2008; WAKE; VREDENBURG, 2008; COLLINS, 2010; NOWAKOWSKI *et al.*, 2016).

O uso comercial de anfíbios, principalmente destinado para alimentação e como animais de estimação e animais-modelo em laboratório, resulta em um volume de animais retirados da natureza suficientemente grande para extirpar populações e espécies (SCHLAEPFER *et al.*, 2005). Na Ásia, por exemplo, as populações de espécies de *Ranidae* são afetadas pela sua superexploração para consumo humano (STUART *et al.*, 2004). Fato é que existe, mundialmente, uma exploração comercial desses animais sustentada tanto pelo comércio ilegal quanto pelos criadouros; ambos responsáveis pela introdução de espécies invasoras e disseminação de doenças (DASZAK, 1999; GRATWICKE *et al.*, 2009; COLLINS, 2010). Vale ressaltar o importante papel que os comércios ilegais de vida selvagem possuem na disseminação de doenças, como o próprio novo coronavírus (SARS-CoV-2), causador da covid-19, doença declarada como uma pandemia pela Organização Mundial da

Saúde (OMS) desde março de 2020 (TRAVIS; WATSON, 2011; ROTHAN; BYRAREDDY, 2020). Os primeiros pacientes relatados com essa doença haviam visitado um comércio de peixes e animais silvestres da cidade de Wuhan, na China (LU; STRATTON; TANG, 2020; ROTHAN; BYRAREDDY, 2020).

Para os anfíbios, as espécies introduzidas não apenas causam um desequilíbrio ecológico, como também contribuem para a disseminação de doenças associadas à redução de suas populações, como os ranavírus e a quitridiomiose (DASZAK, 1999; COLLINS, 2010; SMITH; SAX; LAFFERTY, 2006). A primeira inclui um grupo de vírus causadores de infecções sistêmicas, enquanto a segunda é causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (DASZAK, 1999; BRIGGS; KNAPP; VREDENBURG *et al.*, 2010; TEACHER; CUNNINGHAM; GARNER, 2010). A quitridiomiose chama a atenção pois, além de ser uma das principais causas do declínio e extinção de espécies de anfíbios, tem afetado de forma deletéria até mesmo populações em regiões relativamente pouco impactadas pela ação humana (MORELL, 1999; SALLA, *et al.*, 2018). Mesmo que a sensibilidade ou a resistência ao *Bd* varie entre as espécies, populações e áreas de ocorrência, as ações antrópicas não apenas têm disseminado esta doença, como também alterado as condições ambientais que implicam na resistência à mesma (COLLINS, 2010; JAMES *et al.*, 2015).

Evidentemente que os efeitos desses fatores variam de acordo com o local de ocorrência das espécies e a sensibilidade destas às alterações promovidas por humanos, bem como ao nível de modificação de seus habitats (PECHMANN *et al.*, 1991; KIESECKER; BLAUSTEIN; BELDEN, 2001). Contudo, as ações antrópicas associadas aos declínios de anfíbios não ocorrem isoladas, mas associadas a estressores naturais, como predação, competição e disponibilidade de recursos, afetando estes animais no nível molecular, fisiológico, morfológico e populacional (BLAUSTEIN *et al.*, 2011).

O declínio das populações de anfíbios foi primeiramente abordado no Primeiro Congresso Mundial de Herpetologia, que ocorreu em Canterbury, Inglaterra, em 1989 (BARINAGA, 1990). À época, uma conversa casual entre os pesquisadores trouxe à tona uma percepção em comum: que seus animais de estudo estavam desaparecendo (BARINAGA, 1990; COLLINS; STORFER, 2003). Assim, havia a evidência empírica, mas não era possível apontar a causa (COLLINS; STORFER, 2003). Até a metade da década de 1990, o debate científico buscou levantar

informações para avaliar se o declínio observado era uma ocorrência local ou, de fato, uma realidade global (ALFORD; RICHARDS, 1999; WAKE & VREDENBURG, 2008). Contudo, as evidências ao longo dos últimos anos eliminaram qualquer dúvida: as populações de anfíbios estão em declínio por todo o mundo nas últimas décadas (BARINAGA, 1990; WAKE, 1991; HOULAHAN *et al.*, 2000; LINDER *et al.*, 2003; VENTURINO *et al.*, 2003).

Hoje, 41% das espécies descritas de anfíbios estão ameaçadas de extinção, gerando o questionamento quanto às consequências desta perda de diversidade (MONASTERSKY, 2014; IUCN.org, 2019). Os anfíbios modernos vivem neste planeta há mais de 100 milhões de anos e seu declínio é um enigma, que pode indicar limites do meio ambiente e de sua capacidade de resiliência (WAKE, 1991; WAKE; KOO, 2018). Em relação a outros organismos, os anfíbios podem apresentar grandes valores de biomassa, formando parte integral da cadeia trófica de vários ecossistemas aquáticos e terrestres, tanto quanto consumidores de presas menores, quanto como alimento para predadores maiores (SPARLING *et al.*, 2003; VENTURINO *et al.*, 2003). Para os seres humanos, esses animais fazem parte da cultura e da subsistência, servindo de alimento e controlando pragas agrícolas (ASA, 2019). A perda na diversidade de anfíbios reflete também na saúde humana. Além de serem predadores de espécies transmissoras de doenças, são fonte de compostos biologicamente ativos com aplicações nas pesquisas farmacêuticas; logo, seu declínio limita a descoberta de novos biomedicamentos e tratamentos contra câncer, patógenos e outras doenças (CLARKE, 1997; HADDAD, 2008; NALBANTSOY *et al.*, 2016; ASA, 2019).

4.2 ECOTOXICOLOGIA

As aglomerações humanas em centros urbanos, as atividades agrícolas e industriais, bem como a mineração, são responsáveis pelo despejo de grandes quantidades de contaminantes no meio ambiente (GAGNÉ *et al.*, 2006; ARIAS-ESTÉVEZ, *et al.*, 2008; JORDANOVA, *et al.*, 2013; ANASTOPOULOS; KYZAS, 2014; MO *et al.*, 2018). Embora pensar em poluição tradicionalmente remeta à indústria, os escoamentos de lavouras, áreas urbanas e o esgoto municipal são fontes de químicos utilizados no dia a dia, como aditivos, pesticidas, produtos de higiene pessoal e medicamentos (THOMAS *et al.*, 2017). À medida que esses compostos químicos

sintéticos, ou mesmo de ocorrência natural, são identificados ou suspeitos de estarem no meio ambiente, causando possíveis efeitos adversos, estes são classificados como contaminantes emergentes (CEs) (SAUVÉ; DESROSIERS, 2014; THOMAS *et al.*, 2017; PHILIP *et al.*, 2018).

Contudo, ainda são esparsas as informações sobre o comportamento e o efeito dos CEs no ambiente, além de os métodos para identificar e tratar estes compostos serem complexos e custoso, um desafio ainda maior tendo para a realidade de países subdesenvolvidos (REHMAN *et al.*, 2015; MO *et al.*, 2018; PHILIP *et al.*, 2018). Ademais, qualificar um composto como emergente é relativo, pois tanto pode ser um químico que passou a ser descartado no ambiente recentemente, quanto um contaminante que já estava presente no meio ambiente há algum tempo, cuja preocupação quanto aos seus efeitos surgiu posteriormente, i.e., um contaminante de interesse emergente (SAUVÉ; DESROSIERS, 2014). Um exemplo é o uso do diclorodifeniltricloroetano (DDT) que, após ser largamente utilizado por anos para eliminar mosquitos e outras pragas, sobretudo durante a Segunda Guerra Mundial, foi banido em muitos países na década de 1970, sendo totalmente proibido no Brasil somente em 2009 (JARMAN; BALLSCHMITER, 2012; SAUVÉ; DESROSIERS, 2014).

Falar sobre o DDT remete ao influente livro “Primavera Silenciosa” (*Silent Spring*), publicado por Rachel Carson em 1962, que trouxe à tona o pensar sobre os contaminantes emergentes (JARMAN; BALLSCHMITER, 2012; SAUVÉ; DESROSIERS, 2014). Na obra, a autora faz uma exaustiva leitura das pesquisas com pesticidas químicos, principalmente o DDT, alertando sobre seu uso indiscriminado. Estes não apenas matam as espécies-alvo, mas afetam também o solo e a água, as plantas cultiváveis e as árvores, levando ao desaparecimento de muitas aves, daí o título do livro (JARMAN; BALLSCHMITER, 2012; PARKS, 2017; SAUVÉ; DESROSIERS, 2014). Com sua publicação, Carson não apenas ajudou a iniciar o movimento ambiental contemporâneo, como também impulsionou o surgimento da ecotoxicologia (JARMAN; BALLSCHMITER, 2012; SPARLING, 2017).

A ecotoxicologia é uma disciplina que integra a ecologia e a toxicologia (CHAPMAN, 1995). Enquanto a primeira estuda as interações dos organismos com o meio ambiente em todos os seus níveis, a segunda estuda os efeitos adversos causados por agentes físicos, químicos e biológicos em organismos (CHAPMAN, 2002; WEXLER; HAYES, 2019). O termo surgiu em 1969 durante uma palestra de René Truhaut no encontro do Comitê de Conselho Internacional de Uniões Científicas

(Committee of the International Council of Scientific Unions), em Estocolmo (TRUHAUT, 1977). Truhaut propôs a ecotoxicologia como um novo ramo da toxicologia, interessado em estudar os efeitos tóxicos causados por poluentes (naturais e sintéticos) sobre os constituintes do ecossistema (TRUHAUT, 1977; SPARLING, 2018).

Assim, a ecotoxicologia tem por objetivo compreender e prever os efeitos de compostos químicos tóxicos em nível de populações, comunidades naturais e ecossistemas (CHAPMAN, 1995, 2002; WEXLER; HAYES, 2019). Essa disciplina também incorpora a química e a fisiologia que, respectivamente, permitem caracterizar um contaminante e compreender seus efeitos em distintos níveis de organização biológica (SPARLING, 2018). Os dois principais pilares da ecotoxicologia são os biomarcadores e os bioensaios, ferramentas essenciais para determinar e mensurar diversos efeitos de substâncias estranhas (xenobióticos) a um organismo (BLAISE; GAGNÉ, 2009; WEXLER; HAYES, 2019).

4.2.1 Bioensaios

Os bioensaios, ou ensaios biológicos, utilizam organismos vivos ou células vivas para determinar os potenciais efeitos tóxicos de compostos químicos, bem como para rastrear a presença destes em ambientes contaminados (CHAYEN; BITENSKY, 2005; KOZLOVA; ZWINDERMAN; CHRISTOF, 2005). Muito utilizados pela ecotoxicologia, os ensaios biológicos começaram modestos, analisando efeitos tóxicos em um único organismo em maiores níveis de organização biológica (PRESTON, 2002; BLAISE; GAGNÉ, 2009). Tão logo, foi percebida a necessidade de considerar os distintos componentes da biota para se avaliar adequadamente um poluente, a ponto de alcançarem a complexidade de testes utilizando microcosmos e mesocosmos, os quais abrangem microrganismos, plantas, vertebrados e invertebrados em seus bioensaios (KOZLOVA; ZWINDERMAN; CHRISTOF, 2005; BLAISE; GAGNÉ, 2009).

Embora seja possível detectar compostos tóxicos no ambiente por meio de análises químicas, estas, além de utilizarem equipamentos sofisticados e caros, representam a parcela de uma dinâmica que é ainda mais complexa, como biotransformação por constituintes da biota ou mesmo interação com outros

contaminantes (WHITFIELD, 2001; KOZLOVA; ZWINDERMAN; CHRISTOF, 2005; KLAINÉ *et al.*, 2008). Essas análises físicas e químicas de potenciais poluentes acabam enfrentando a influência de certas variáveis: 1) muitos compostos químicos e poluentes causam efeitos deletérios a concentrações inferiores à capacidade analítica dos laboratórios; 2) raramente os toxicantes em potencial são encontrados isolados, mas sim como uma mistura difícil de ser estimada por análises químicas, podendo interagir de várias maneiras nos organismos, inclusive sinergisticamente, tornando-se mais tóxicas; e, 3) as características físicas e químicas da água, como dureza, pH e oxigênio dissolvido, influenciam na toxicidade do contaminante, a exemplo do zinco, cuja concentração letal para os peixes é mais elevada em águas com maior dureza (CAIRNS; VAN DER SCHALIE, 1980; GRUBER, 1989). Os organismos refletem uma visão integrada da carga de poluentes, pois preservam um contínuo registro do ambiente ao longo de suas vidas (WHITFIELD, 2001; VENTURINO *et al.*, 2003). Nesse sentido, os bioensaios para testes de ecotoxicidade representam uma excelente ferramenta para elucidar os possíveis riscos inerentes a substâncias químicas que, porventura, venham a ser liberadas no ambiente (CRANE *et al.*, 2008).

4.2.2 Biomarcadores

Os marcadores biológicos, ou biomarcadores, configuram uma resposta biológica a determinado composto químico, fornecendo uma medida da exposição e, às vezes, até mesmo uma medida do seu efeito tóxico (PEAKALL, 1994). Em um sentido amplo, representam qualquer medida que reflète a interação entre um sistema biológico e um agente ambiental, seja este biológico, físico ou químico (WHO, 1993). Podem ser definidos como uma alteração em componentes celulares ou bioquímicos, ou ainda em processos, estruturas e funções, induzida por xenobióticos e passíveis de serem medidos em um sistema biológico ou em uma amostra (NAS, 1975). Os biomarcadores têm o potencial de incrementar os métodos de avaliação da exposição a fatores ambientais, além de permitirem estimar a dose ou concentração *biologicamente eficaz*, oriunda de diferentes meios de exposição (WHO, 1995). Uma vez iniciada a exposição de um organismo a um contaminante, a quantidade deste composto disponível no meio representa a *dose externa*, enquanto a quantidade internalizada via ingestão, inalação ou absorção dérmica, representa a *dose interna*;

já a recém citada *dose biologicamente eficaz*, é aquela necessária para gerar uma resposta biológica ou um prejuízo à saúde do organismo (NRC, 1987; KENDALL *et al.*, 1996).

Os marcadores biológicos são usualmente classificados em três tipos: *de exposição*, *de efeito* e *de susceptibilidade* (NRC, 1987). Os biomarcadores *de susceptibilidade* indicam que o organismo é especialmente sensível a um xenobiótico, tendo a capacidade inata ou adquirida de responder à exposição (NRC, 1987; WHO, 1993). Os *de exposição* refletem três respostas possíveis: 1) identificam a presença de uma substância exógena no sistema biológico; 2) refletem a interação de um xenobiótico com algum componente endógeno; ou ainda, 3) indicam outro evento biológico relacionado à exposição. Os marcadores biológicos são geralmente utilizados para prever a dose/concentração de exposição que induzem mudanças passíveis de identificação e potencialmente mensuráveis (NRC, 1987; WHO, 1993; KENDALL *et al.*, 1996). Assim, os biomarcadores *de efeito* são alterações bioquímicas, fisiológicas, comportamentais, entre outras, capazes de serem mensuradas e que podem predizer três situações: 1) indicar um componente endógeno do sistema; 2) mensurar a capacidade funcional do sistema; ou, 3) apontar um estado alterado do sistema que prenuncia um comprometimento ou doença (NRC, 1987; WHO, 1993).

Assim, os biomarcadores fazem a conexão entre poluentes presentes no ambiente e sua ação em um organismo podendo, portanto, auxiliar na avaliação do *status* das populações de anfíbios e na predição se determinado composto químico liberado no ambiente resulta em um potencial risco a organismos não-alvos (VENTURINO *et al.*, 2003). Nesse contexto, os biomarcadores histopatológicos se mostram uma ferramenta sensível para analisar os efeitos de poluentes em organismos aquáticos, desempenhando um importante papel na avaliação de possíveis danos teciduais causados por agentes químicos em estudos de campo e de laboratório (AYAS *et al.*, 2007; ABDEL-MONEIM, 2012; JONES-COSTA *et al.*, 2018; DI GIULIO; NEWMAN, 2019). Além disso, possuem vantagens práticas, como a facilidade de coletar e armazenar a amostra e a possibilidade de avaliar vários tipos celulares de diferentes órgãos de um mesmo animal (HANDY *et al.*, 2002).

4.3 VISÃO GERAL DO FÍGADO

O fígado é um órgão imprescindível para diversos processos corpóreos fundamentais à manutenção da vida, como biotransformação, desintoxicação e metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, incluindo a síntese de ureia (CRAWSHAW; WEINKLE, 2000; AKYOSHI; INOUE, 2012). Possui importante papel no metabolismo energético, processando e estocando nutrientes absorvidos pelo trato digestório para atender à demanda de outras partes do corpo (AKYOSHI; INOUE, 2012). É também o órgão que produz e secreta a bile, liberada no duodeno para emulsificar gorduras (MEIER; STIEGER, 2002; KARDONG, 2019).

Esse órgão funciona como um biofiltro ativo de compostos tóxicos oriundos do ambiente, i.e., xenobióticos, bem como de compostos produzidos pelo organismo, e.g. bilirrubina; os biotransformando em compostos solúveis para serem excretados pela urina (NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). É um órgão que recebe grande parte do débito cardíaco, servindo também de reservatório de sangue (LAUTT; GREENWAY, 1987; ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010). O sangue chega ao fígado via vasos aferentes (veia porta e artéria hepática), que é então distribuído pelos capilares sinusóides, perfundindo as células do parênquima hepático e então sai deste órgão via vaso eferente (veia hepática), sendo drenado pela veia cava inferior (LAUTT; GREENWAY, 1987; ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010).

Nos anfíbios, além das funções supracitadas, comuns a outros táxons, o fígado é um órgão importante para a produção de vitelo em fêmeas, apesar de responder a agentes tóxicos e doenças de maneira similar a outros vertebrados (CRAWSHAW; WEINKLE, 2000). Nos anfíbios anuros, o fígado é um órgão funcional desde o girino até o adulto, sofrendo remodelação durante a metamorfose, deixando de produzir amônia, para compor o ciclo da ureia (PAIK; COHEN, 1960; VIERTAL; RICHTER, 1999). É também um importante centro hematopoiético nos embriões e girinos, sobretudo para síntese de eritrócitos; nos adultos, esta atividade se mantém vestigial, dando lugar à medula óssea (MANIATIS; INGRAM, 1971; CRAWSHAW; WEINKLE, 2000; HELMER; WHITESIDE, 2005; OKUI *et al.*, 2013).

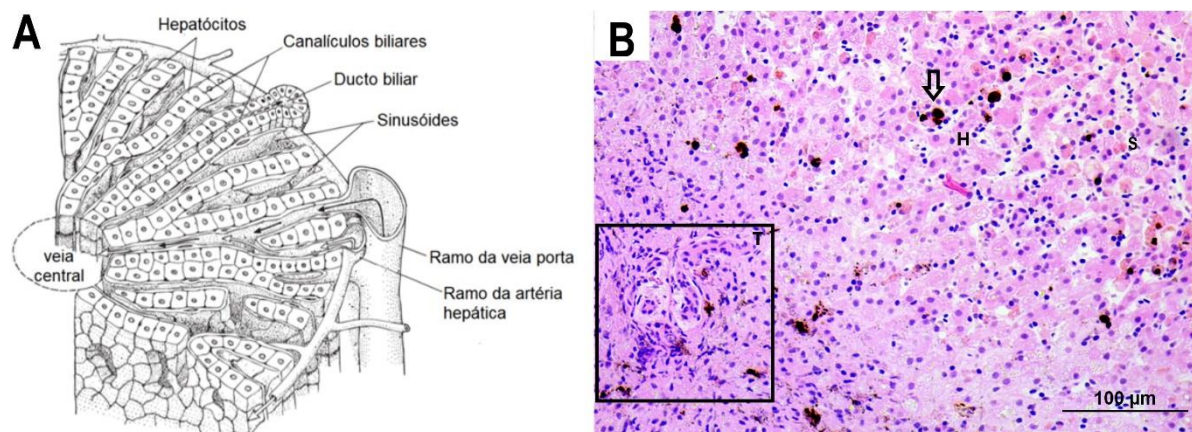
Na fase larval, o fígado está localizado entre as convoluções do intestino anterior e do intestino médio, repousando ventral e posteroventralmente ao esôfago (VIERTAL; RICHTER, 1999). Na fase pós-metamórfica, encontra-se logo abaixo do coração, na porção crânio-ventral da cavidade celômica, estendendo-se até o último

par de costelas (CRAWSHAW; WEINKLE, 2000; HELMER; WHITESIDE, 2005). É um órgão formado pelos lobos direito e esquerdo, totalmente separados por tecido conjuntivo, mas que podem ainda se subdividir parcialmente em lobos menores (CRAWSHAW; WEINKLE, 2000). A vesícula biliar se encontra na linha média entre os lobos direito e esquerdo e seu canal se conecta ao duodeno logo após o estômago (CRAWSHAW; WEINKLE, 2000; HELMER; WHITESIDE, 2005).

A maior parte do sangue que chega ao fígado vem da veia porta, oriundo do trato digestório e do baço (LAUTT; GREENWAY, 1987; NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). Pobre em oxigênio, mas rico em compostos absorvidos pelo trato alimentar, o sangue portal contém nutrientes, compostos tóxicos, além de hormônios e fatores de crescimento (NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). Já a artéria hepática supre o fígado com sangue arterializado (ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010; NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). Ambos os vasos primeiro se dividem para irrigar os lobos esquerdo e direito e seguem se ramificando em vênulas e arteríolas que alcançam os lóbulos hepáticos (vasos perilobulares) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). Esses vasos aferentes, juntamente com os ductos biliares, constituem a tríade portal (ou trato portal), que é circundada por tecido conjuntivo (CRAWSHAW; WEINKLE, 2000; AKYOSHI; INOUE, 2012).

Os lóbulos hepáticos são unidades estruturais de forma poliédrica, delimitados por tecido conjuntivo (RANI *et al.*, 2006; AKYOSHI; INOUE, 2012). Possuem um vaso eferente no centro (veia centrolobular), de onde partem as placas hepáticas: cordões de hepatócitos, com espessura de uma célula, dispostos radialmente do centro do lóbulo até a periferia (figura 3) (CRAWSHAW; WEINKLE, 2000; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010). Essas placas são separadas por uma rede de capilares sinusóides (figura 3), que conectam os vasos perilobulares à veia centrolobular (AKYOSHI; INOUE, 2012). A tríade portal está disposta nas arestas de sua forma poliédrica (cantos dos lóbulos), juntamente com nervos, vasos linfáticos, macrófagos e células tronco hemocitopoiéticas, no chamado espaço porta (RANI *et al.*, 2006; ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010; AKYOSHI; INOUE, 2012).

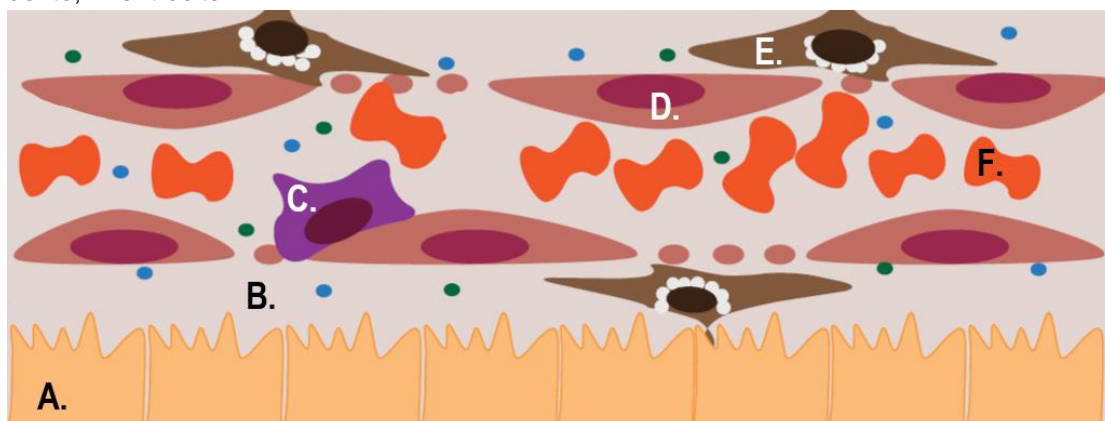
Figura 3. A: organização do lobo hepático indicando o fluxo de sangue venoso (setas cheias pretas) e do sangue arterial (setas cheias brancas); destaque para o fluxo de bile pelo ducto biliar (seta descontinua preta) em sentido contrário ao fluxo sanguíneo. B: corte histológico de fígado de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*, SHAW 1802) evidenciando a tríade portal (T), um cordão de hepatócitos (H), sinusóide (S) e um agregado de células melanomacrofágicas (seta); HE, aumento de 100x, barra 100 μ m.



Fonte: adaptado de KARDONG, 2019 (A); autoria própria (B).

O sangue que se distribui nos lóbulos da periferia até o centro é uma mistura de sangue portal e arterial: os ramos terminais das vênulas penetram o parênquima junto com os ramos terminais das arteríolas, dividindo-se em capilares sinusóides (figura 3A) (ABDEL-MISIH; BLOOMSTON, 2010; NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). Os sinusóides hepáticos possuem um endotélio descontínuo, formando fenestras, desprovido de lâmina basal, o que facilita a saída de solutos e componentes fluidos do sangue (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SØRENSEN; SMEDSRØD, 2020). Na superfície luminal dos sinusóides encontram-se as células melanomacrofágicas ou células de Kupffer (figura 4), uma linhagem de macrófagos abundantes na região portal que produzem e armazenam melanina, importante para a absorção e neutralização de radicais livres gerados pelo estresse oxidativo (AGIUS; ROBERTS, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Além disso, as células de Kupffer são importantes na resistência a patógenos, fagocitam fragmentos celulares e eritrócitos velhos, acumulando o ferro na forma de hemossiderina, além de destruírem, desintoxicarem e reciclarem componentes materiais e endógenos (AGIUS; ROBERTS, 2003; FRANCO-BELUSSI; CASTRUCCI; OLIVEIRA, 2013; GUTIERRE *et al.*, 2018)

Figura 4. Representação de um sinusóide hepático com seus principais tipos celulares. A. hepatócito; B. espaço de Disse; C. célula de Kupffer; D. célula endotelial sinusoidal; E. célula do Ito; F. eritrócito.



Fonte: adaptado de SØRENSEN; SMEDSRØD, 2020.

Enquanto os melanomacrófagos são células ativas na fagocitose de partículas maiores de 200 nm, as CES, células endoteliais sinusoidais (figura 4) retiram do sangue macromoléculas e nanopartículas menores que 200 nm (SØRENSEN; SMEDSRØD, 2020). Juntas, essas células compõem a barreira sinusoidal, eliminando componentes presentes no sangue, incluindo colóides, restos celulares, resíduos de hemoglobina, colágeno, colesterol, entre outros (GUIDA *et al.*, 1998; SETERNES; SØRENSEN; SMEDSRØD, 2002; AGIUS; ROBERTS, 2003; FENOGLIO *et al.*, 2005; SØRENSEN; SMEDSRØD, 2020). Isso representa o modelo basal de dupla célula para a eliminação de resíduos (*the dual cell principle of waste clearance*), presente em todas as classes de vertebrados (SØRENSEN *et al.*, 2012; SØRENSEN; SMEDSRØD, 2020).

Entre o sinusóide e a placa de hepática, existe um espaço extracelular perisinusoidal ou espaço de Disse (figura 4), onde se encontram as células do Ito (figura 4), ou células estreladas hepáticas (WAKE, 1980; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Eram chamadas de lipócitos, por conta de sua função de armazenar vitamina A na forma de gotículas lipídicas, mas também secretam fatores de crescimento e citocinas que regulam o diâmetro do lúmen sinusoidal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). Em quadros histopatológicos de fibrose hepática induzida por injúria ou inflamação, as células estreladas se diferenciam em miofibroblastos produtores de matriz extracelular contendo colágeno (WAKE, 1980; FRIEDMAN *et al.*, 1985; BLOMHOFF; WAKE, 1991; NAGY;

THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). Ainda sobre o espaço de Disse, as membranas dos hepatócitos voltadas para essa região (domínio basolateral) projetam inúmeras microvilosidades para o espaço perisinusoidal (WEIBEL *et al.*, 1969; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Possuem também diversos receptores e proteínas de membrana próprias; desta maneira, as membranas basolaterais dos hepatócitos contam com especializações importantes, não apenas para retirar diversas moléculas do sangue, mas também para secretar outras moléculas produzidas ou modificadas pelos hepatócitos (MARIN, 2008; NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020).

Os hepatócitos representam os principais componentes do parênquima hepático, protagonizando a maior parte das funções metabólicas e sintéticas do fígado (NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). Por conta dessa versatilidade, são palco de uma série de processos importantes para a homeostase. A começar pelas suas vias de destoxificação, geralmente associadas às enzimas do retículo sarcoplasmático, que biotransformam metabólitos e toxicantes apolares em compostos hidrossolúveis menos tóxicos, capazes de serem excretados pelos rins, sendo que nem sempre esses compostos se tornam menos tóxicos (FENOGLIO *et al.*, 2005; ROTH; JAESCHKE; LUYENDYK, 2019). Participam do metabolismo energético, tanto produzindo glicose (gliconeogênese), quanto a armazenando na forma de glicogênio (glicogênese); também sintetizam lipídios, seja para a produção de ATP, seja para exportação de lipoproteínas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; ROTH; JAESCHKE; LUYENDYK, 2019). Em termos de síntese de compostos, os hepatócitos produzem importantes proteínas plasmáticas como albumina e fatores de coagulação, bem como sais biliares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; ROTH; JAESCHKE; LUYENDYK, 2019).

Estruturalmente, são grandes células poligonais com pequenos núcleos arredondados, cujas membranas laterais estão em contato com outros hepatócitos, constituindo as placas hepáticas (AKYOSHI; INOUE, 2012; NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). Os hepatócitos vizinhos se mantêm unidos por meio de desmossomos e zônulas de oclusão, possuindo também junções do tipo *gap*, permitindo o câmbio intercelular de pequenas moléculas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). Na região onde se encontram as junções estreitas, as membranas de dois hepatócitos adjacentes formam invaginações, delimitando um espaço extracelular tubular, o canalículo biliar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020).

Esses canalículos biliares desembocam em canais mais largos, os ductos biliares ou canais de Hering, que são revestidos parte por células epiteliais biliares (colangiócitos), parte por hepatócitos (SAXENA; THEISE, 2004; NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). Os ductos biliares da tríade portal são totalmente revestidos por colangiócitos e penetram no parênquima hepático pelos canais de Hering; assim, a bile flui desde os canalículos biliares até o espaço porta, em contracorrente em relação ao fluxo sanguíneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; NAGY; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2020). Como o fígado é o principal centro de biotransformação de toxicantes e metabólitos, a bile é um importante rota de excreção de xenobióticos pelas fezes (SLITT, 2020). É composta principalmente por água, além de conter eletrólitos inorgânicos (sódio, potássio, cálcio e bicarbonato), pigmentos como bilirrubina conjugada (não-tóxica e solúvel em água), fosfolípidios e sais biliares (HUDSON; SMITH, 1975; MARIN, 2008; RESHETNYAK, 2013). Os últimos correspondem aos principais solutos orgânicos da bile e são sintetizados nos hepatócitos a partir do colesterol na forma de ácidos biliares que, conjugados com glicina e taurina, formam os sais biliares, menos tóxicos e mais hidrossolúveis (RESHETNYAK, 2013; MEIER; STIEGER, 2002). Estes são secretados no duodeno pelo trato biliar e pela vesícula biliar, onde atuam como um surfactante, emulsificando as gorduras e vitaminas lipossolúveis ingeridas (RESHETNYAK, 2013; MEIER; STIEGER, 2002).

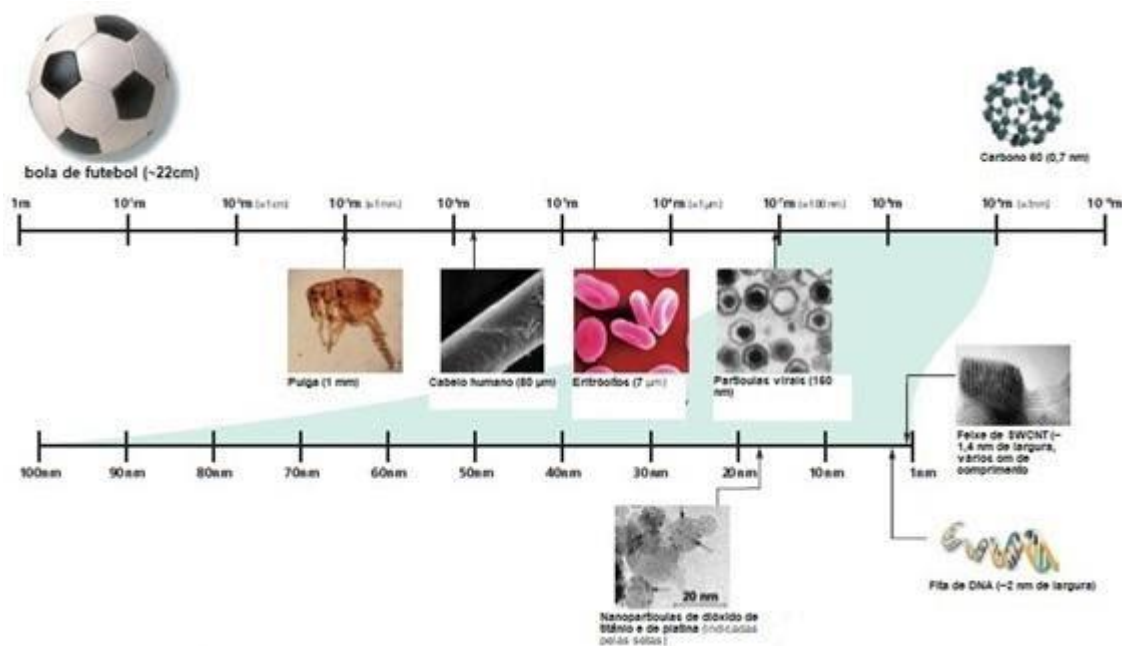
4.4 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA

4.4.1 Visão Geral

A expressão nano deriva da palavra grega *nánnos*, que significa anão (SATYANARAYANA; RAI, 2011). É utilizada como prefixo para se referir a uma dimensão física que representa um bilionésimo do metro (10 m), cuja escala está representada na Figura 5 (ASHBY *et al.*, 2009). Esse conceito de *nanômetro* foi primeiramente proposto por Richard Zsigmondy, vencedor do Prêmio Nobel de química em 1925, termo que cunhou para caracterizar o tamanho das partículas (HULLA *et al.*, 2015). Ao passo que Norio Taniguchi foi o primeiro a utilizar a expressão *nanotecnologia*, em 1974, para descrever os processos semicondutores que ocorrem na ordem de nanômetros (ASHBY *et al.*, 2009; HULLA *et al.*, 2015).

Assim, a nanotecnologia envolve a produção, processamento e aplicação de materiais com escala de tamanho de 1 a 100 nm em ao menos uma de suas dimensões (ROCO, 2003; AITKEN *et al.*, 2006; BUZEA *et al.*, 2007; HANDY *et al.*, 2011).

Figura 5. Escala de comprimento em metros (m) em relação à escala nanométrica (nm). Para efeito de comparação, o planeta Terra é aproximadamente 100 milhões de vezes maior que a bola de futebol, que por sua vez é 100 milhões de vezes maior que o fullereno.



Fonte: The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, Plymouth, UK, 2004.

Embora seja uma área de ciência e tecnologia relativamente nova (CRANE *et al.*, 2008), a possibilidade de explorar a dimensão nanométrica surgiu através do físico e laureado Richard Feynman, com a sua palestra *There's a plenty of room at the bottom*, apresentada à Sociedade Americana de Física, no Instituto de Tecnologia da Califórnia em 1959 (SATYANARAYANA; RAI, 2011; TOMA, 2016; KHAN *et al.*, 2017). Na ocasião, Feynman apresentou aos ouvintes o campo da miniaturização e da capacidade do ser humano em criar dispositivos cada vez menores e mais poderosos, introduzindo o conceito de manipular a matéria em nível atômico (SATYANARAYANA; RAI, 2011; HULLA *et al.*, 2015).

Essa realidade apenas se tornaria factível com o desenvolvimento de sofisticadas ferramentas para investigar e manipular a matéria em escala nanométrica (THE ROYAL SOCIETY & THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004). Nesse

sentido, Gerd Binnig e Heinrich Rohrer dariam um grande passo ao criarem, em 1982, o microscópio de tunelamento (STM - *Scanning Tunneling Microscope*), o que lhes garantiu o Prêmio Nobel quatro anos depois, no mesmo ano em que Binnig anunciaria o microscópio de força atômica (AFM - *Atomic Force Microscope*), equipamentos estes capazes de produzir imagens de uma superfície com resolução atômica, além de poderem captar, deslizar ou arrastar átomos ou moléculas sobre superfícies (THE ROYAL SOCIETY & THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; TOMA, 2016).

Esses materiais sempre existiram no meio ambiente na forma de partículas ultrafinas e nanopartículas (NPs), que seriam frações da matéria com tamanho entre 1 e 100 nm, sendo que as NPs possuem pelo menos duas ou três de suas dimensões na escala nanométrica (KLEINE *et al.*, 2008; ASTM, 2012). Estas ocorrem naturalmente como vírus, colóides, cinzas vulcânicas, em aspersões oceânicas, incêndios florestais e tempestades de poeira, bem como em argilas, matéria orgânica, óxidos de ferro e outros minerais, todos com importante papel nos processos biogeoquímicos (BLEEKER *et al.*, 2013; BUZEA *et al.*, 2007; HANDY *et al.*, 2011; KLEINE *et al.*, 2008; SADIK, 2013). Nesse sentido, a exposição do ser humano às partículas ultrafinas e NPs tem ocorrido ao longo de sua existência, embora isso tenha aumentado drasticamente a partir da Revolução Industrial (HULLA *et al.*, 2015). Isso advém do fato de que essas frações nanométricas da matéria têm origem em atividades antrópicas, capazes de gerar poluentes em escala nanométrica a partir de materiais comuns, produzidas incidentalmente (HANDY *et al.*, 2011; BLEEKER *et al.*, 2013; SADIK, 2013). As mesmas podem ser formadas pela degradação de objetos de plástico, pelo desgaste de pneus sob fricção, pela emissão de partículas ultrafinas e aerossóis por escapamentos de veículos, bem como por vapores de soldagem (KITTELSON *et al.*, 2004; IMHOF *et al.*, 2005; DAHL *et al.*, 2006; SADIK, 2013; GIGAULT *et al.*, 2018).

Contudo, o escopo deste trabalho são os nanomateriais manufacturados (NMs). Estes são intencionalmente produzidos nessa escala de tamanho para aplicações específicas (BUZEA *et al.*, 2007; CALLAGHAN; MACCORMACK, 2017; MENDONZA; BROWN, 2018). As principais classes de NMs incluem os compostos por materiais contendo metais, inclusive óxidos, nanocristais semicondutores (*quantum dots*), cerâmicas, poliméricas, lipídicas e, notadamente, as baseadas em carbono (KLAINE *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2017).

4.4.2 Propriedades e aplicações

Quando reduzidos à escala nanométrica, os materiais se aproximam da dimensão-atômico molecular, conferindo grandes mudanças em suas propriedades (MURTY, *et al.*, 2013; TOMA, 2016). Estas dizem respeito ao ponto de fusão, à condutividade elétrica, à permeabilidade magnética, à fluorescência e à reatividade química (BAI & LIU, 2013). Parte disso se deve ao aumento da área superficial relativa, que é inversamente proporcional ao tamanho da partícula; assim, um material na escala nanométrica possui a maior parte dos seus átomos na superfície, bem como uma maior a quantidade deste material está em contato com o seu entorno, o que influencia em sua reatividade (THE ROYAL SOCIETY & THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; BAI & LIU, 2013; MURTY *et al.*, 2013; TOMA, 2016).

Outro fator ligado às mudanças das propriedades são os efeitos quânticos, que passam a desempenhar um papel dominante na escala nanométrica, afetando o comportamento óptico, elétrico e magnético dos nanomateriais (THE ROYAL SOCIETY & THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004). Esse efeito é observado em NPs de metais nobres, que exibem uma distinta faixa de luz UV visível, chamada de ressonância plasmônica (KHAN, 2017). Esse efeito ocorre quando a dimensão do material é menor que o comprimento de onda incidente, fazendo com que os elétrons se acoplem harmonicamente ao campo magnético oscilante; razão pela qual as NPs de ouro apresentam cor avermelhada quando em solução (TOMA, 2016).

Assim, com suas propriedades mecânicas, catalíticas, ópticas e de condutividade elétrica únicas, os NMs possuem aplicações para uma vasta gama de campos, com uma crescente demanda para ciências dos materiais, dispositivos eletrônicos, indústria de alimentos, pesquisa biomédica, entre outras (KLEINE *et al.*, 2008; JAIN *et al.*, 2018). Na área de energia, a nanotecnologia traz aprimoramentos para as metas de redução de carbono cada vez mais restritivas, melhorando a condutividade térmica de fluidos para coleta de energia, otimizando a eficiência de células de combustível e desenvolvendo materiais mais duráveis e com menor peso para instrumentos de geração de energia eólica (AHMADI *et al.*, 2018). Possuem também aplicações para a melhoria da qualidade dos materiais utilizados na indústria da construção, acrescentando também novas funcionalidades aos mesmos, a exemplo de tintas antimicrobianas e autolimpantes, coberturas anticorrosivas e

aplicação de nanotecnologia de células solares em tintas e vidros para a captura de energia solar (HANUS & HARRIS, 2013).

Na indústria de produção e processamento de alimentos, a nanotecnologia oferece potencial para a melhoria da qualidade e segurança, sendo aplicada para a suplementação de conteúdo vitamínico e mineral, uso de nano-emulsões carreadoras de componentes bioativos, agentes de sabor, antioxidantes, conservantes e fármacos (HUANG *et al.*, 2010; THIRUVENGADAM *et al.*, 2018). Também existem aplicação de nanocompostos em embalagens de alimentos com propriedades antimicrobianas, além do uso de nanosensores para detecção de patógenos e químicos durante o trânsito e estocagem de alimentos (HUANG *et al.*, 2010; THIRUVENGADAM *et al.*, 2018). No tratamento e diagnóstico de câncer, a nanociência possibilita o desenvolvimento de nanossensores como biomarcadores tumorais, capazes de se serem identificados na corrente sanguínea, bem como incrementando as formas de dispensação de fármacos para o tratamento de câncer, melhorando a farmacocinética e reduzindo a toxicidade sistêmica causada pela quimioterapia (NIH, 2015).

Nos bens de consumo, produtos de cuidado pessoal e roupas é onde os NMs estão mais presentes, seguidos de artigos esportivos e produtos de limpeza e de higiene pessoal (HANSEN *et al.*, 2013). As inovações oferecidas pela nanotecnologia têm potencial de mudar vários aspectos da vida humana, desde o tratamento de doenças e seus diagnósticos, até a composição de produtos, além de aplicações para energia limpa e recuperação ambiental (RIDGE, 2018). Muitos estudos da área já deixaram a bancada de laboratório e hoje se encontram nas prateleiras e comércios virtuais, fazendo da nanotecnologia uma realidade presente no dia a dia (VANCE *et al.*, 2015).

4.4.3 Nanotubos de Carbono

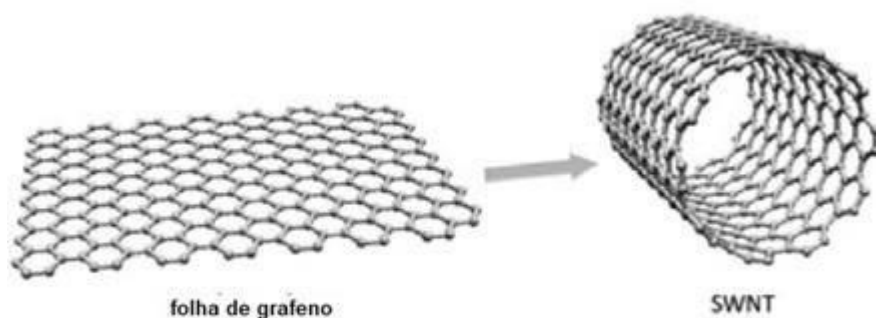
O carbono é um elemento único que apresenta diversas formas alotrópicas a temperatura ambiente, a saber: diamante, grafite, carbono livre e aglomerado e nanotubos de carbono (MURTY, *et al.*, 2013). As diferenças nas propriedades desses materiais decorrem da forma como os seus átomos estão ligados entre si, podendo formar ligações carbono-carbono tipo sp^2 , dando origem ao grafite e aos nanomateriais carbonáceos, ou do tipo sp^3 , dando origem ao diamante

(SATYANARAYANA & RAI, 2011; MURTY, *et al.*, 2013). Assim, os nanotubos de carbono correspondem a uma dessas formas alotrópicas do carbono, juntamente com os fullerenos e o grafeno (FREIXA *et al.*, 2018).

Em 1985, Kroto e Smalley - laureados em 1996 - descobriram a primeira nanoespécie de carbono, o fullereno (*bucky ball*), uma molécula com formato de esfera oca (icosaédrica) composta por 60 átomos de carbono organizados em pentágonos e hexágonos (KLAINÉ *et al.*, 2008; MURTY, *et al.*, 2013; TOMA, 2016). Seis anos depois, ao analisar a fuligem formada pela descarga elétrica entre dois eletrodos de carbono pelo microscópio eletrônico, Sumio Iijima acidentalmente descobriu os nanotubos de carbono (ASHBY, 2009). O grafeno só seria sintetizado por Geim e colaboradores em 2004, os primeiros a isolarem uma camada única de grafite, lhes rendendo o Prêmio Nobel em 2010 (ALLEN *et al.*, 2010; BRODY, 2012).

Os nanotubos de carbono (NTCs) são moléculas cilíndricas cujo diâmetro varia entre um a poucos nanômetros e o comprimento até poucos micrômetros (ASHBY, 2009). Sua estrutura básica é composta por uma folha de grafite da espessura de um átomo, enrolada sobre si mesma (Figura 6); essa folha é o grafeno, formada por anéis hexagonais de carbono com ligações tipo carbono-carbono sp^2 , cujo aspecto remete a favos de mel (PRASEK, 2011; TOMA, 2016). Dependendo das condições de processamento, formam-se dois tipos de NTs, os de parede simples, chamados de Single Walled Nanotubes (SWCNTs), que possuem apenas uma camada de átomos, e os de parede múltipla, chamados de Multi-Walled Nanotubes (MWCNT), contendo várias camadas de átomos sobrepostas (ASHBY, 2009; TOMA, 2016; KHAN *et al.*, 2017). São materiais que exibem propriedades únicas, como alta força de tensão, condutividade térmica, estabilidade e resiliência (HERRERA-HERRERA *et al.*, 2012). Possuem aplicações diversas na área médica, engenharia eletrônica, óptica, indústria automotiva, dispositivos fotovoltaicos, tratamento de água e em cosméticos (BAKRY *et al.*, 2007; BENN *et al.*, 2011; DE VOLDER *et al.*, 2013; FREIXA *et al.*, 2018).

Figura 6. Representação de uma folha de grafeno que, quando enrolada sobre si mesma, constitui um nanotubo de carbono. Notar os anéis hexagonais em formato de favos de mel que constituem as ligações do tipo sp²-sp².



Fonte: PRASEK *et al.*, 2011.

Pesquisadores ao redor do mundo têm inventado diversas metodologias para sintetizar NTCs, sendo os métodos arco voltaico, ablação por *laser* e deposição química a vapor (CVD - *Chemical Vapor Deposition*) os mais comuns (ASHBY, 2009). Essas técnicas envolvem processos drásticos, como a aplicação de feixes de *lasers* ou de descargas elétricas em substratos contendo carbono e elementos metálicos (Ni, Co, Fe e Y) que atuam como catalisadores. Contudo, os materiais carbonáceos acabam sendo contaminados por esses compostos metálicos presentes nos catalisadores, sendo um dos fatores de toxicidade desses NMs (TOMA, 2016).

O método arco-voltaico, utilizado por Iijima para produzir os primeiros MWCNTs, consiste na evaporação de átomos de carbono pelo plasma de gás hélio inflamado por uma alta corrente com baixa voltagem, a temperaturas próximas do ponto de fusão do grafite (3000-4000 °C) (MURTY *et al.*, 2013, TOMA, 2016). A técnica de ablação a *laser* utiliza este tipo de luz para vaporizar um alvo de grafite dentro de um forno tubular feito de quartzo à temperatura de 1200°C e sob fluxo de gás inerte (MURTY *et al.*, 2013). No método CVD (*Chemical Vapor Deposition*), a fonte de carbono vem de gases hidrocarbonetos (etileno ou acetileno) aquecidos a temperaturas de 500 a 1000 °C em um forno de quartzo contendo catalisadores compostos por ligas metálicas de Al, Fe e Co (MURTY, *et al.*, 2013; TOMA, 2016). Todos esses processos permitem sintetizar tanto nanotubos de parede simples quanto de parede múltipla, sendo a CVD uma técnica relativamente barata e que possibilita a produção de espécies de carbono em larga escala, apesar da menor qualidade estrutural (MÉHN *et al.*, 2004; MURTY, *et al.*, 2013; TOMA, 2016).

4.4.4 Nanotoxicologia

Desde a década de 1990 tem crescido o investimento público e privado em nanotecnologia, resultando no desenvolvimento de centenas de produtos contendo materiais nanoestruturados (HESS, 2010). Em 2015, o gabinete de Ciência e Tecnologia dos Estados Unidos emitiu um pedido de informação com sugestões oferecidas pela nanotecnologia na solução de problemas nacionais e globais (WHITMAN; KALIL, 2015). Sob a Iniciativa Nacional de Nanotecnologia estadunidense (NNI - National Nanotechnology Initiative), cientistas, engenheiros e educadores estão construindo um futuro no qual a revolução na indústria e tecnologia será conduzida pela habilidade de controlar e entender a matéria em escala nano (WHITMAN; KALIL, 2015).

Assim, as projeções para as próximas décadas podem estar corretas, pois os avanços no campo da nanociência e nanotecnologia vêm resultando numa infinidade de aplicações em bens de consumo, remediação de áreas contaminadas, energia renovável, alimentos, biomedicina, construção civil, dentre outras (HANUS, HARRIS, 2013; VANCE *et al.*, 2015; THOMÉ *et al.*, 2016; AHMADI *et al.*, 2018; QU *et al.*, 2018; THIRUVENGADAM *et al.*, 2018). Tais avanços têm trazido à tona questionamentos relacionados à segurança dos NMs para a saúde humana e para o meio ambiente, uma vez que experiências anteriores relacionadas à poluição aérea por amianto estão associadas à morte e carcinogênese pulmonar por partículas ultrafinas no ar (DOCKERY *et al.*, 1993; KANE & HURT, 2008; OBERDÖRSTER, 2009; ELSAESSER & HOWARD, 2012).

Além disso, a presença de NMs no meio ambiente acaba por ser inevitável, seja pelo seu processo de manufatura, seja pelos bens de consumo (HANDY *et al.*, 2011). O mesmo ocorre com NTCs despejados no ambiente natural tanto de forma direta, em virtude de seu uso em produtos que os contenham em sua composição, quanto indireta, pelos despejos oriundos de estações de tratamento de esgoto, incineradores e aterros (PETERSEN *et al.*, 2011; JACKSON *et al.*, 2013). Uma vez no meio ambiente, podem contaminar o solo, migrar para águas superficiais e lençóis freáticos e interagir com a biota aquática (KLAINÉ *et al.*, 2008).

Se por um lado os entusiastas da nanotecnologia a veem como a próxima Revolução Industrial, por outro, organizações ambientais ainda são controversas quanto às políticas de regulamentação e incentivo a esta tecnologia, pois veem uma

nova história de exposição a toxicantes (HESS, 2010). De fato, apesar do rápido desenvolvimento da nanotecnologia, as informações sobre os efeitos dos NMs para os humanos e o meio ambiente ainda demandam respostas, o que os coloca dentro da categoria dos contaminantes emergentes (ELSAESSER; HOWARD, 2012; SAUVÉ; DESROSIERS, 2012; KALANTARI, 2013). Assim, a nanotoxicologia tem sido proposta como um novo ramo da Toxicologia, uma disciplina que busca preencher as lacunas no conhecimento sobre os possíveis problemas causadas pelos NMs manufaturados, contribuindo para o desenvolvimento de uma nanotecnologia segura e sustentável (DONALDSON, 2004; ARORA *et al.*, 2011). Assim, a mesma pode ser definida como a ciência que estuda os efeitos adversos dos nanomateriais em organismos e no meio ambiente (WALTERS; POOL; SOMERSET, 2016).

Na avaliação da possível toxicidade dos NMs, a sua detalhada caracterização física e química é um fator crítico para correlacionar os efeitos de sua superfície altamente reativa com quaisquer respostas biológicas ou tóxicas (SAYES; WARHEIT, 2009). Nanomateriais possuem uma superfície altamente reativa assim, compreender sua interação com componentes bioquímicos ou com as células é essencial para o entendimento de seus efeitos (SAYES; WARHEIT, 2009; ELSAESSER; HOWARD, 2012). Nesse sentido, as ferramentas de caracterização são essenciais nos estudos de materiais emergentes, pois permitem compreender suas propriedades físicas e químicas e avaliar o potencial de suas aplicações (MURTY, *et al.*, 2013). Para auxiliar nesse trabalho, diversas técnicas são usualmente aplicadas para caracterizar NMs, como a microscopia eletrônica de transmissão e varredura, bem como a microscopia de força atômica, difração de raio-X e espectroscopia Raman (ASHBY, 2009, MURTY, *et al.*, 2013).

Na avaliação dos possíveis efeitos tóxicos dos NMs, a detalhada caracterização físico-químicas destes é um fator crítico para correlacionar os efeitos de sua superfície com quaisquer respostas biológicas ou tóxicas (SAYES & WARHEIT, 2009). Nanomateriais possuem uma superfície altamente reativa, e compreender sua interação com componentes bioquímicos ou com as células são essenciais para o entendimento de seus efeitos (SAYES & WARHEIT, 2009; ELSAESSER & HOWARD, 2012).

Contudo, perguntas pairam no ar, pois quando em contato com sistemas biológicos, o comportamento dos NMs é intrincado e difícil de categorizar (ELSAESSER; HOWARD, 2012). NMs podem tanto ser facilmente eliminados quando

absorvidos por um organismo, ou pequenos demais para serem filtradas pelo mesmo, como também podem exercer efeitos tóxicos decorrentes de sua composição, como metais ou da própria nanopartícula (ELSAESSER & HOWARD, 2012; SAUVÉ; DESROSIERS, 2012). Quando comparada com a toxicologia clássica, a nanotoxicologia possui algumas particularidades: enquanto a primeira possui uma metodologia bem definida, quase sempre relacionando a massa à dose-resposta, o mesmo conceito não se aplica aos NMs, uma vez que diversos fatores influenciam no seu comportamento e toxicidade (VON DER KAMMER, 2011; ELSAESSER & HOWARD, 2012; FARINDE, 2019). Entre esses fatores podemos citar: a composição química do NM, o tamanho deste, sua área de superfície e, notadamente, a funcionalização de sua superfície e solubilidade (VON DER KAMMER, 2011).

Quanto a funcionalização, o polímero Pluronic™ F-127, que será melhor descrito no item 4.4.6, otimiza a estabilidade da solução coloidal, até mesmo contribuindo para as propriedades da superfície do NM, como solubilidade, reatividade e redução da toxicidade, em alguns casos (MUDALIGE *et al.*, 2019). A estabilidade da dispersão do nanomaterial é altamente influenciada pela carga de sua superfície, medida pelo Potencial Zeta (PZ), que corresponde à função entre a carga da superfície de uma partícula e qualquer solvente adsorvido a mesma (ZUIN; MARCOMINNI, 2007; SPEED *et al.*, 2015; WALTERS; POOL; SOMERSET, 2016). Se a dispersão exibe um PZ suficientemente negativo (< -25 mV) ou suficientemente positivo ($> +25$ mV), as partículas se repelem o suficiente para garantir uma dispersão estável (ZUIN; MARCOMINNI, 2007; MUDALIGE *et al.*, 2019).

Outro parâmetro a ser considerado diz respeito ao grau de não uniformidade no tamanho de distribuição das partículas, chamado de Índice de Polidispersão (PI) (ZUIN; MARCOMINNI, 2007; DANAEI, 2018). O PI mede a heterogeneidade de uma colóide com base no tamanho, e pode ser determinado a partir de eletromicrografias (ZUIN; MARCOMINNI, 2007). A Organização de Padrões Internacionais (ISO) estabelece que valores de PI inferiores a 0,05 ($PI < 0,05$) são mais comuns em colóides com partículas de quase mesmo tamanho (monodispersas), enquanto valores de PI superiores a 0,7 ($PI > 0,7$) são comuns em amostras com partículas de tamanho variado (ZUIN; MARCOMINNI, 2007; ISO 22,412:2017). Os parâmetros do NM utilizado neste trabalho, i.e., MWCNT funcionalizados com Pluronic™ F-127, são apresentados no item 5.1.

4.4.5 Efeitos biológicos dos nanomateriais manufaturados

Na literatura, os NMs são conhecidos por interagirem com sistemas biológicos, causando estresse oxidativo e inflamação, com consequente lipoperoxidação de membrana, depleção de glutathiona (GSH), além de danos às mitocôndrias e ao DNA (MANKE *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2014; JAIN *et al.*, 2018). Quanto aos NTCs, parâmetros físicos e químicos como tamanho, presença de metais e superfície reativa, são responsáveis pelos seus efeitos pró-oxidativos, sendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) uma das observações mais reportadas (MANKE *et al.*, 2013).

Em experimentos com ratos expostos aos MWCNT, Reddy e colaboradores (2010) observaram danos e lesões progressivas ao fígado e aos rins, utilizando biomarcadores de injúria celular e inflamação. Quando inalados, são persistentes nos pulmões e na pleura, cuja estrutura facilita sua entrada e deposição, resultando em incompleta remoção e fagocitose (STELLA, 2011; MANKE *et al.*, 2013). Além disso, aglomerados de MWCNT e partículas ultrafinas de asbesto compartilham similaridades morfológicas (MURR & SOTO, 2004). Tanto para as fibras de asbesto quanto para os NTCs, já foi observada a “fagocitose frustrada”, na qual macrófagos alveolares são lancinados ao fagocitarem partículas maiores que os mesmos, liberando EROs nos pulmões, com consequente resposta inflamatória (DONALDSON *et al.*, 2013; KUEMPEL *et al.*, 2017). Também foram descritos efeitos genotóxicos, seja diretamente, pela interação dos nanotubos com o DNA, seja indiretamente, pela indução do estresse oxidativo (MANKE *et al.*, 2013).

Como já citado, as NPs metálicas compõem a maior parte dos trabalhos avaliando a toxicidade dos NMs em anfíbios. Dentre os efeitos observado, as NPs de prata (AgNP) agiram como disruptores endócrinos, causando perturbação na sinalização dos hormônios tireoideanos (TH) durante a metamorfose de *Xenopus laevis* (CAREW *et al.*, 2015). Em girinos de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*), foi relatado aumento no número de agregados de células melanomacrofágicas no fígado nos animais expostos ao alginato-quitosano, uma nanopartícula orgânica, possivelmente por reconhecerem a NP como uma toxina (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Adicionalmente, foi relatado um aumento de eosinófilos para o mesmo animal experimental, quando exposto às nanopartículas lipídicas sólidas, possivelmente pelo fato destas desencadearem resposta inflamatória (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

No que diz respeito aos NTCs, evidenciou-se toxicidade aguda pela exposição aos MWCNTs em larvas de *X. leavis*, mesmo a baixas concentração (10 mg.L^{-1}), possivelmente em virtude do bloqueio físico das brânquias e do trato digestório (MOUCHET *et al.*, 2008). Em experimento similar, observou-se reduzido crescimento dos animais expostos, associado ao prejuízo na absorção de nutrientes pelo intestino em virtude de obstrução causado por esses nanomateriais de carbono, além de distúrbios respiratórios que, neste caso, são decorrentes da obstrução de brânquias (LAGIER *et al.*, 2017). Em outro experimento, também com *X. leavis*, os animais expostos ao nano pó de carbono bioacumularam esse NM, principalmente no estômago e no intestino, mas também foram encontradas em outros órgãos e tecidos, inclusive no sangue, revelando uma possível translocação dessas partículas para outros órgãos (BACCHETTA *et al.*, 2012).

Vale ressaltar que os anfíbios dependem da pele para regular seu balanço hídroeletrolítico e a respiração. Uma vez no organismo, os NMs, além de se distribuírem pela corrente sanguínea, podem se acumular tanto na pele quanto nas brânquias que, juntamente com o trato digestório, são importantes vias de entrada de xenobióticos (MOUCHET *et al.*, 2007; MCCOY & PERALTA, 2018; AMARAL *et al.*, 2019). Além disso, podem alcançar o fígado e os rins, órgãos cujas alterações induzidas por uma resposta adversa a um toxicante se dão precocemente, em virtude do papel central que exercem na metabolização e eliminação de xenobióticos, respectivamente (MOORE; SIMPSON, 1992).

Contudo, não se pode descartar o fato de que a espécie modelo estudada não necessariamente sofre danos hepáticos quando exposta aos NTCs. Fato é que Mouchet e colaboradores, expondo larvas de *X. leavis* à mesma concentração de MWCNTs que utilizamos (10 mg.L^{-1}), durante 12 dias (diferentemente das 96h do nosso experimento), não observaram alterações no crescimento dos animais, nem efeitos genotóxicos (MOUCHET *et al.*, 2010). Ademais, até o momento, nenhum dos estudos que avaliaram a toxicidade dos NTCs em anfíbios analisou a capacidade destes em depurar esses NMs. No trabalho de Thompson e colaboradores utilizando duas espécies de girinos anuros, a rã-da-floresta (*Lithobates sylvaticus*) e a própria rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), observaram que os animais expostos a nanopartículas de ouro durante 21 dias, reduziram em mais de 83% a quantidade destas partículas internalizadas após permanecerem 5 dias em água livre das mesmas. Ao passo que, após 15 dias em água livre dessas NPs de ouro, estas foram

depuradas a ponto de não mais serem detectadas (THOMPSON *et al.* 2018). Isso denota que a nossa espécie modelo, ao menos para as nanopartículas de ouro, possui a capacidade de excretar partículas de tamanho nanométrico e não as bioacumular. Isso pode vir a ser conclusivo na escolha de biomarcadores sensíveis a pequenas alterações hepáticas, como será observado nos capítulos seguintes.

4.4.6 Uso do Pluronic™ F-127

Importante ressaltar que em algumas aplicações relativas à utilização dos MWCNT, torna-se necessária a preparação de suspensões em soluções contendo surfactantes, como o Pluronic™ F-127, composto amplamente utilizado em drug-delivery (KABANOV *et al.*, 2002; MENON *et al.*, 2012; IRAZUSTA *et al.*, 2018).

Também conhecidos como poloxâmeros, os pluronics são formulações comerciais de copolímeros formados por duas cadeias hidrofílicas compostas de óxido de polietileno (PEO), separadas por uma cadeia hidrofóbica de óxido de polipropileno (PPO), constituindo um arranjo tri-bloco do tipo PEO-PPO-PEO (AGAFONOV *et al.* 2019; KHALIQ *et al.*, 2019). Em soluções aquosas, formam as típicas misturas, cujas cadeias hidrofílicas permanecem voltadas para o meio de solução, e as porções hidrofóbicas formando um núcleo, fazendo do “poloxamer” um potencial carreador de fármacos não solúveis em água (LIU *et al.*, 2016; AGAFONOV *et al.* 2019).

Por conta de sua alta reatividade de superfície, os NTCs possuem um caráter altamente hidrofóbico, formando agregados em soluções aquosas, os quais são mediados por fortes forças intermoleculares, difíceis de serem quebradas (VAISMAN; WAGNER; MAROMA, 2006; ASTM, 2020). Para tanto, os surfactantes representam os compostos químicos ideais para desfazer esses aglomerados, uma vez que são adsorvidos pela superfície dos NTCs, mantendo estes em um arranjo individualizado (KHARE, *et al.*, 2011; KRISHNAMOORTI, 2011). Estudos demonstraram que o Pluronic™ F-127 a 0,1% possui uma boa capacidade de dispersão dos MWCNT, mesmo em concentrações acima de 10 mg.L⁻¹, com a vantagem dessa capacidade de solubilização pouco sofrer efeito do pH (CLARK; SUBRAMANIAN; KRISHNAMOORTI, 2011; KHARE *et al.*, 2011).

Embora entre suas características, como baixa toxicidade, biocompatibilidade e propriedade de gelificação, as aplicações dos Pluronics são limitadas em virtude de

sua natureza instável, sendo facilmente desintegrados dentro de sistemas fisiológicos (KHALIQ et al., 2019). Assim, estudos corroboram a baixa toxicidade do Pluronic™ F-127, o qual, inclusive, já foi testado como um veículo para otimizar a absorção dérmica do anestésico sevoflurano em rãs-touro adultas, reduzindo assim a toxicidade deste anestésico (ARDENTE et al., 2008). Contudo, em um estudo com embriões de *Danio rerio*, já foi demonstrado que o Pluronic™ F-127, quando associado às NPs de óxido de grafeno, aumentam a biodisponibilidade desse NM e, conseqüentemente, seus efeitos tóxicos, resultando em uma menor taxa de sobrevivência dos embriões (SHAMSI et al., 2020). Em um estudo com ratos, doses de Pluronic F-68 iguais ou superiores a 100 mg/kg, administradas diariamente por via endovenosa durante um mês, resultaram na indução de células espumosas pulmonares e em leves alterações degenerativas nos túbulos proximais dos rins, indicando que esse surfactante é capaz de induzir a fosfolipidose (MAGNUSSON; OLSSON; NYBERG, 1986).

Além disso, já foram observados efeitos deletérios de surfactantes em girinos de rã-touro expostos ao alquilbenzeno linear sulfonado (LAS), o surfactante mais amplamente utilizado em lavanderia (JONES-COSTA et al. 2018; FRANCO-BELUSSI et al., 2021). Assim como a exposição ao polioxietileno amina (POEA), surfactante presente nas formulações comerciais de glifosato para facilitar a entrada do princípio ativo na cutícula das plantas, que, assim como o LAS, desencadeia efeitos subletais em girinos de *Lithobates catesbeianus* (COSTA et al., 2008; RISSOLI et al., 2016). Assim, optou-se no presente estudo avaliar, além do efeito dos MWCNT já encontrado associado a este surfactante, os efeitos do Pluronic™ F-127 isolado, bem como associado aos NTCs.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos em consonância com as normas estabelecidas pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 2000) e com as normas de eutanásia da *American Veterinary Medical Association* (AVMA, 2020). Os protocolos de coleta, aclimatação, exposição e eutanásia dos animais utilizados no presente estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFSCar (4301051018 – ID 001048 e 000610).

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS E PREPARO DAS SOLUÇÕES

Para a aquisição e caracterização dos xenobióticos e preparo das soluções de exposição, este projeto contou com a parceria das Professoras Doutoras Elaine Conceição de Oliveira e Silvia Pierre Irazusta, ambas da Faculdade de Tecnologia de Sorocaba (Fatec-So), e com a parceria da Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), as quais gentilmente forneceram o surfactante Pluronic™ F-127 (Sigma-Aldrich) e os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) utilizados no presente estudo. Os nanotubos já haviam sido previamente caracterizados pelo fabricante Helix Material Solutions, Inc. (Richardson, Texas, EUA) e por IRAZUSTA *et al.* (2018). Estas informações constam na Tabela 2. O uso do surfactante Pluronic™ F-127 se faz necessário para a manutenção da solução coloidal, logo, o efeito isolado deste também foi analisado.

O surfactante foi preparado na concentração de 10% e o MWCNT na concentração de 200 mg.L⁻¹, denominados de soluções-mães. A partir destas soluções mães, foram preparadas 0,1% de solução para o Pluronic™ F-127 e de 10 mg.L⁻¹ para o MWCNT. O meio de exposição dos animais a estes compostos foi em 1 L de água. A concentração de MWCNT utilizada neste trabalho (10 mg.L⁻¹) é uma dentre as quatro utilizadas por MOUCHET *et al.* (2010), autores estes já citados nos itens 2 e 4.4.5. e que, além de 10 mg.L⁻¹, também testaram as concentrações de 0,1; 1, e 50 mg.L⁻¹ de MWCNT.

Como já discorrido no item 4.4.6, para otimizar a estabilidade da solução coloidal, os NTCs foram funcionalizados com o polímero Pluronic™ F-127, o que até mesmo contribuí para as propriedades da superfície do NM, como solubilidade,

reatividade e até mesmo toxicidade (MUDALIGE *et al.*, 2019). Assim, faz-se uso de técnicas de caracterização dos NMs para melhor compreender a química de suas superfícies, algo especialmente importante à luz da nanotoxicologia, visto que esta possui algumas particularidades em relação à toxicologia clássica (ELSAESSER; HOWARD, 2012; MUDALIGE *et al.*, 2019). Enquanto a tradicional toxicologia possui uma metodologia bem definida, com a dose quase sempre relacionada à massa, esse conceito não se aplica aos nanomateriais (ELSAESSER; HOWARD, 2012). Além disso, o comportamento das nanopartículas, quando em contato com sistemas biológicos, é intrincado e difícil de categorizar, uma vez que sofrem influência até mesmo do meio sofrendo influência (ELSAESSER; HOWARD, 2012). , uma vez que podem ser distintos mesmo entre partículas de mesma composição (ELSAESSER; HOWARD, 2012).

Tabela 2. Caracterização dos nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) para uso como xenobiótico. (*) dados fornecidos pelo fabricante. (#) dados fornecidos por IRAZUSTA *et al.* (2018).

*Pureza	95%
*Diâmetro (nm)	10 a 30
*Comprimento (µm)	0,5 a 40
#Índice de polidispersão	0,638±0,029
#Potencial Zeta	-30,1±0,9 mV

Fonte: tabela de autoria própria elaborada a partir dos dados fornecidos por Helix Material Solutions, Inc., IRAZUSTA *et al.* (2018) e SOUZA (2019).

5.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS

Os exemplares de girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), foram adquiridos em um ranário comercial localizado na cidade de Santa Bárbara D'Oeste (22°46'52.525"S/47°24'26.456"W), interior de São Paulo, já no estágio de desenvolvimento 25 de Gosner (GOSNER, 1960) (Figura 7). É nesse estágio pré-metamórfico que se inicia a alimentação independente. Os animais então foram imediatamente transportados ao Laboratório de Fisiologia da Conservação (LaFisC), do Departamento de Biologia da UFSCar (DBio) e mantidos por um período de cinco dias em aquários contendo 50 L de água decolorinada, constantemente aerada, à

temperatura controlada (25 ± 1 °C) e fotoperíodo natural (12h:12h – claro/escuro), com alimentação *ad libitum* de folhas espinafre orgânica maceradas e cozidas. A água desses aquários foi substituída a cada 48h, sempre após a alimentação.

Figura 7. Local de coleta dos animais experimentais. A: tanque de desova; B: tanque de animais pré-metamórficos; C: área seca para animais adultos. (Fonte: autoria própria).



Fonte: autoria própria

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

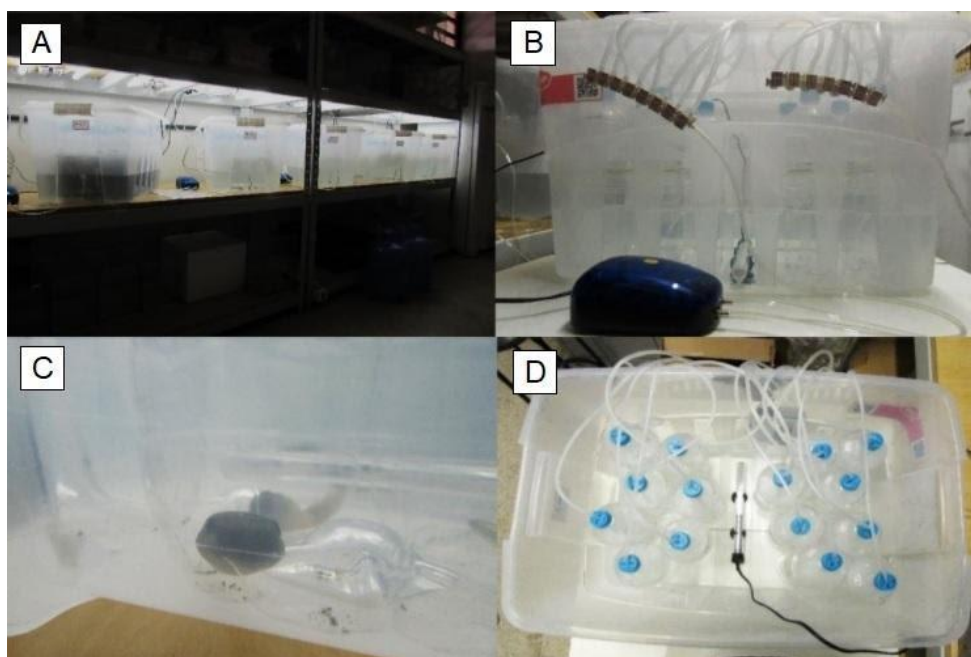
Os animais ($n = 45$) foram divididos em três grupos experimentais, utilizando-se a seguinte notação: grupo controle (CT=15), grupo exposto ao surfactante isolado (ST=15; 0,1% Pluronic™ F-127), e grupo exposto ao surfactante associado aos nanotubos de carbono (NT=15; 10 mg.L^{-1} MWCNT + 0,1% Pluronic™ F-127).

Cada animal foi mantido individualmente em recipientes de polietileno de 1,5 L (garrafas de água estéreis), contendo 1 L de água decolorada, sob constante aeração, como proposto pela metodologia de NUNES *et al.* (2008) para peixes e adaptada por VIDAL *et al.* (2019) para girinos de rãs-touro (Figura 8). Todos os recipientes foram mantidos no interior de caixas plásticas, preenchidas por água no mesmo nível dos recipientes, à temperatura constante de 25 ± 1 °C. Essas caixas foram alocadas na Sala de Bioensaios do Departamento de Biologia da UFSCar e climatizadas à mesma temperatura da água da aclimação (25 ± 1 °C) e também com fotoperíodo controlado (12h:12h – claro/escuro).

Nas 48h anteriores à exposição, os animais foram submetidos à aclimação nos recipientes individuais anteriormente descritos, onde permaneceram até o término do ensaio, privados de alimento e sem trocas de água (sistema de exposição estático). Em cada um dos meios de exposição individuais, foi adicionado um volume de solução-mãe que, em 1 L de água, correspondem à diluição esperada para cada xenobiótico em cada tratamento. Assim, para o grupo ST, foram adicionados 10 mL de solução 10% Pluronic™ F-127 em 1 L de água, que corresponde à concentração

de 0,1% para o surfactante; para o grupo NT, foram adicionados 10 mL de solução 10% Pluronic™ F-127 + 50mL de solução de NTCs 200 mg.L⁻¹ em 1 L de água, que corresponde à concentração de 0,1% e 10 mg.L⁻¹ para o surfactante e o NTC, respectivamente. O grupo controle (CT) foi desprovido de qualquer adição de toxicantes, apenas foram adicionados 60 mL de água de clorada. A exposição teve duração de 96h e, transcorrido este período, os animais foram eutanasiados e destinados a diferentes análises. Para este estudo em particular, nove animais de cada grupo experimental foram utilizados, enquanto os seis animais remanescentes de cada grupo experimental foram destinados a outro trabalho do nosso Laboratório.

Figura 8. Sistema de exposição para ensaios ecotoxicológicos, proposto por NUNES *et al.* (2008) e adaptado por SOUZA *et al.* (2019). A: Vista geral do sistema de exposição; B: caixa com banho termostático, contendo os recipientes individuais e aeração independente; C: animal experimental acondicionado no recipiente individual; D: vista superior do sistema, evidenciando a aeração independente para cada recipiente e o aquecedor termostático.



Fonte: SOUZA, 2019.

5.4 EUTANÁSIA E COLETA DOS ÓRGÃOS

Após a exposição e divisão do n amostral (vide item 5.3), os espécimes destinados a este trabalho foram eutanasiados por concussão cefálica (AVMA, 2020) e a cavidade celômica exposta por meio de uma incisão na região ventral, no sentido crânio-caudal. Foram coletadas secções do lobo hepático dos animais e estes imediatamente transferidos para tubos de micro teste contendo fixador (paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M; pH 7,4), durante 24h. Transcorrido esse tempo, os órgãos foram lavados três vezes com tampão fosfato-salino (0,2 M, pH 7,2). Em seguida, as secções dos órgãos foram desidratadas em concentrações crescentes de soluções alcoólicas: 15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95%, 100%, mantidas durante 1h em cada uma dessas concentrações. As amostras permaneceram em álcool 100% overnight, para então serem embebidas (24h) e emblocadas em historesina (Leica; lote R8, Alemanha).

5.5 MICROTOMIA E COLORAÇÃO DAS LÂMINAS

A microtomia do material emblocado foi realizada no Laboratório de Zoolofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC), do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar de São Carlos, em parceria com a Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes. Já o procedimento de coloração e registro fotográfico das lâminas foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia e Integridade Ambiental (LEIA), do Departamento de Biologia da UFSCar de Sorocaba, em parceria com a Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias Zacarin e com a Dra. Cláudia Inês da Silva.

Os blocos de historesina (JB-4, Leica Polysciences, Germany) contendo os lobos hepáticos, foram seccionados em micrótomo Microm® HM360 (Figura 9A), à espessura de 3 µm, em diferentes profundidades do órgão. Os cortes foram colocados para flutuar em água destilada, sendo recolhidos com lâminas de vidro devidamente identificadas, onde permaneceram aderidos após a secagem em estufa a 37 °C por 4h. Ao todo, foram cortados 6 blocos por grupo (n = 6). Os blocos remanescentes (n = 3) foram preservados para a eventual necessidade de análises futuras.

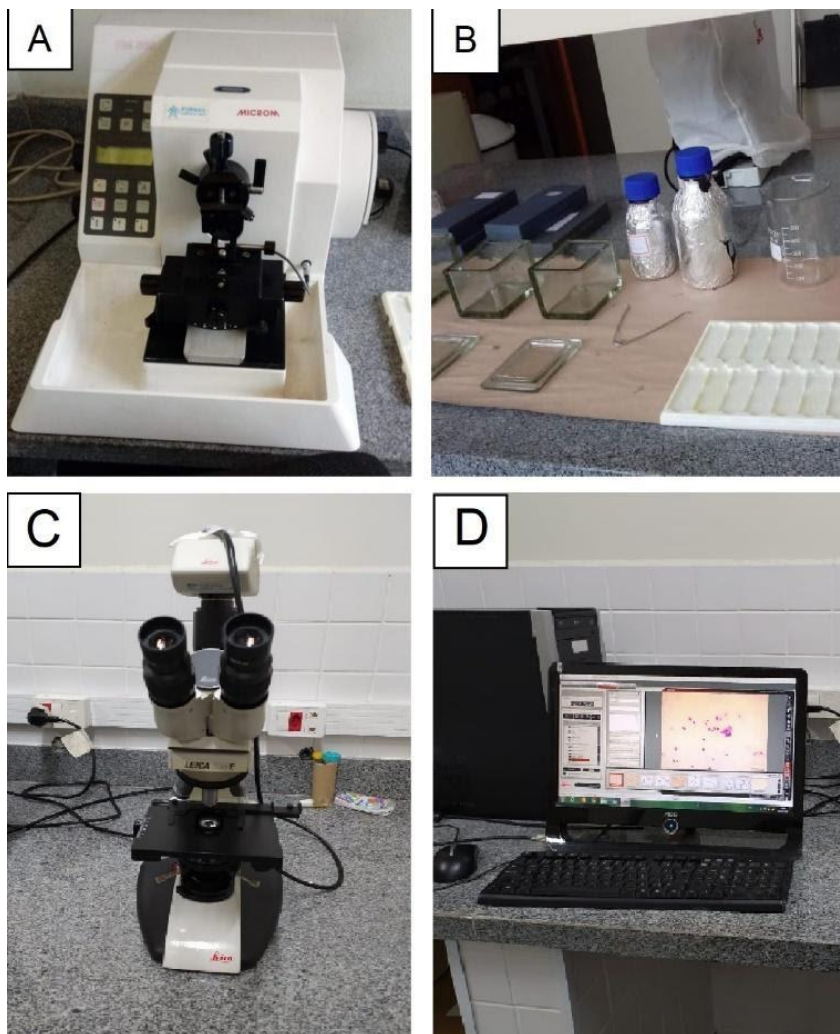
Ao todo, confeccionou-se de seis a sete lâminas por animal, contendo de 10 a 12 cortes cada. Estas foram destinadas para distintas técnicas de coloração, sendo

duas para Hematoxilina-Eosina (HE) (Figura 9B) e uma para histoquímica (Sudan Black). As demais lâminas foram devidamente armazenadas para análises futuras.

Para a coloração dos cortes com HE, fez-se uso da metodologia de OLIVEIRA *et al.* (2016) para fígado de girinos de rãs-touro. Para a histoquímica, fez-se uso do corante Sudan Black (SB) para a detecção de lipídios totais (PEARSE 1960). As lâminas então foram montadas com DPX Mountant (Sigma-Aldrich®) e, após a secagem, foram analisadas no fotomicroscópio (Leica® DM E) (Figura 9C). Com o auxílio do software *Leica Application Suite* (versão 4.5.0; Leica Microsystems, Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) (Figura 9D). A aquisição das imagens foi feita de acordo com a seguinte protocolo: 1) HE - de 50 a 70 imagens por animal nos aumentos de 100x e 400x; 2) SB - 60 imagens por animal no aumento de 1000x.

Para a aquisição dos dados, foram fotodocumentadas distintas regiões de diferentes cortes e lâminas, escolhidos aleatoriamente. Para a análise das fotomicrografias, fez-se uso de um *software* Image-Pro Plus® (Media-Cybernetics Inc., versão 6,0), como será descrito a seguir.

Figura 9. A: micrótopo utilizado para a secção dos cortes histológicos; B: disposição da bancada para a técnica de coloração HE; C: Fotomicroscópio utilizado para o fotodocumentar as lâminas; D: interface do programa utilizado para a aquisição de dados (*Leica Application Suite*).



Fonte: autoria própria.

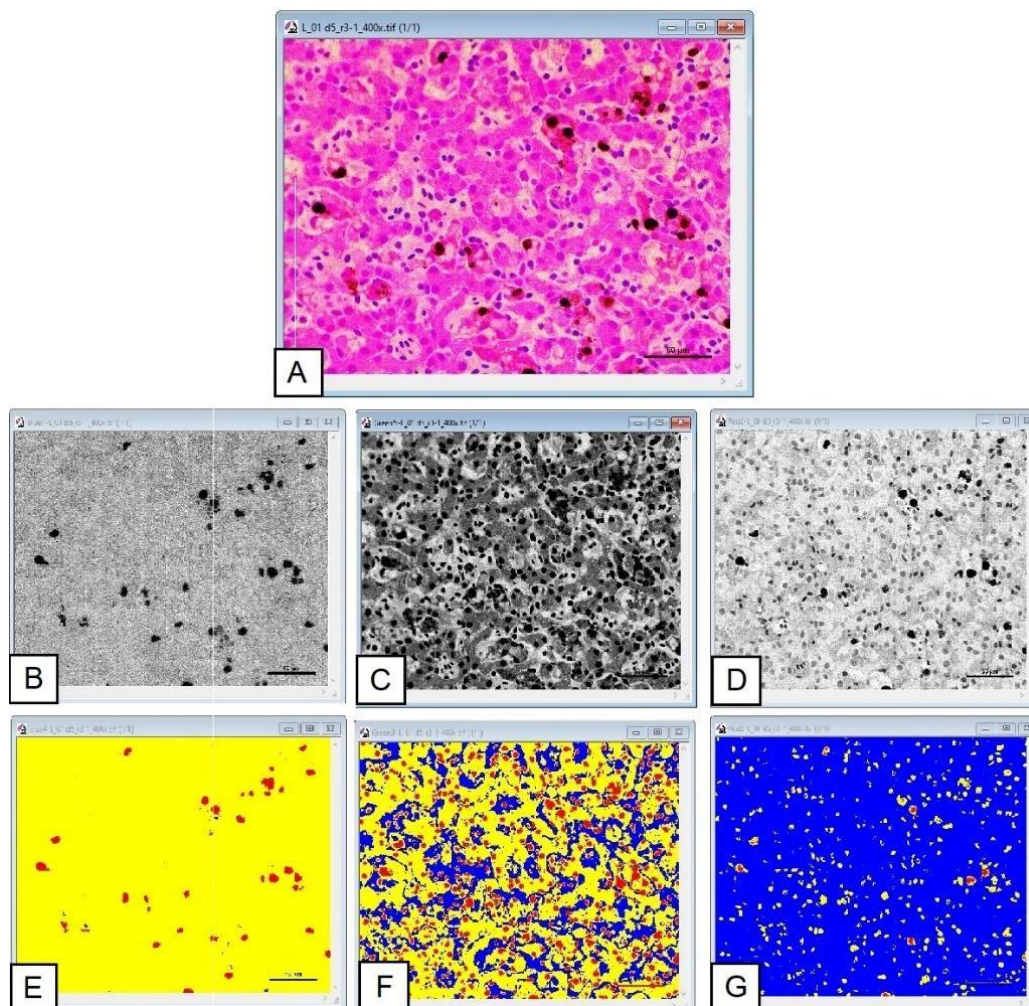
5.6 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

5.6.1 Aquisição dos dados morfométricos

Para a análise dos biomarcadores morfométricos, seguiu-se o protocolo proposto por DE SOUZA SANTOS *et al.* (2014). Das lâminas coradas com HE, foram selecionadas, aleatoriamente, 10 imagens por animal, processadas via *software* Image-Pro Plus® (Media-Cybernetics Inc., versão 6,0). Neste *software*, cada fotomicrografia é devidamente calibrada a partir de uma medida de tamanho conhecido, no caso, a barra de escala. As imagens então têm seus canais de cores vermelho, verde e azul separados (Figura 10 B, C e D), evidenciando diferentes componentes teciduais. Assim, destacam-se as regiões a serem quantificadas pelo *software*, identificadas por cores distintas (Figura 10 E, F e G). Julgamos que essa metodologia resulta em uma análise quantitativa mais precisa, evidenciando variações sutis nos valores de área entre as imagens analisadas.

Ao todo, atribuiu-se quatro biomarcadores morfométricos: área de células melanomacrofágicas (A.MMC), área ocupada pelos capilares sinusóides (A.SINUS), área dos hepatócitos (A.HP) e contagem de hepatócitos (C.HP), para imagens com aumento de 400x. Todos os biomarcadores foram quantificados por área de pixels e convertidos pelo programa em micrômetros quadrados (μm^2), salvo o número de hepatócitos, que apenas foram quantificados (Figura 9G). Feita a aquisição, exportou-se os dados para o programa Office Excel® (Microsoft Inc.) com a finalidade de organizá-los em correspondência a cada tratamento (CT, ST e NT), uma vez que as lâminas tiveram suas identificações cobertas (leitura às cegas) durante a aquisição das imagens e a análise dos dados quantitativos.

Figura 10. Separação dos canais de cor azul (B), verde (C) e vermelha (D), para a quantificação da área de CMMs (E), área de sinusóides (F), e contagem de hepatócitos (G), respectivamente. A: corte histológico de fígado (aumento de 400x, HE) de um animal controle (não utilizado para a análise de resultados).



Fonte: autoria própria.

5.6.2 Análise qualitativa das lâminas

Ao longo da aquisição das imagens das lâminas coradas com HE-, os cortes foram avaliados a fim de evidenciar alterações visíveis na organização do tecido hepático. Isso incluiu infiltrados de células de defesa, congestão de vasos e sinusóides, além da morfologia dos núcleos de hepatócitos. A análise qualitativa não implicou tratamento estatístico; assim, as alterações observadas serão comentadas logo no início dos resultados e discussão.

5.6.3 Análise histoquímica

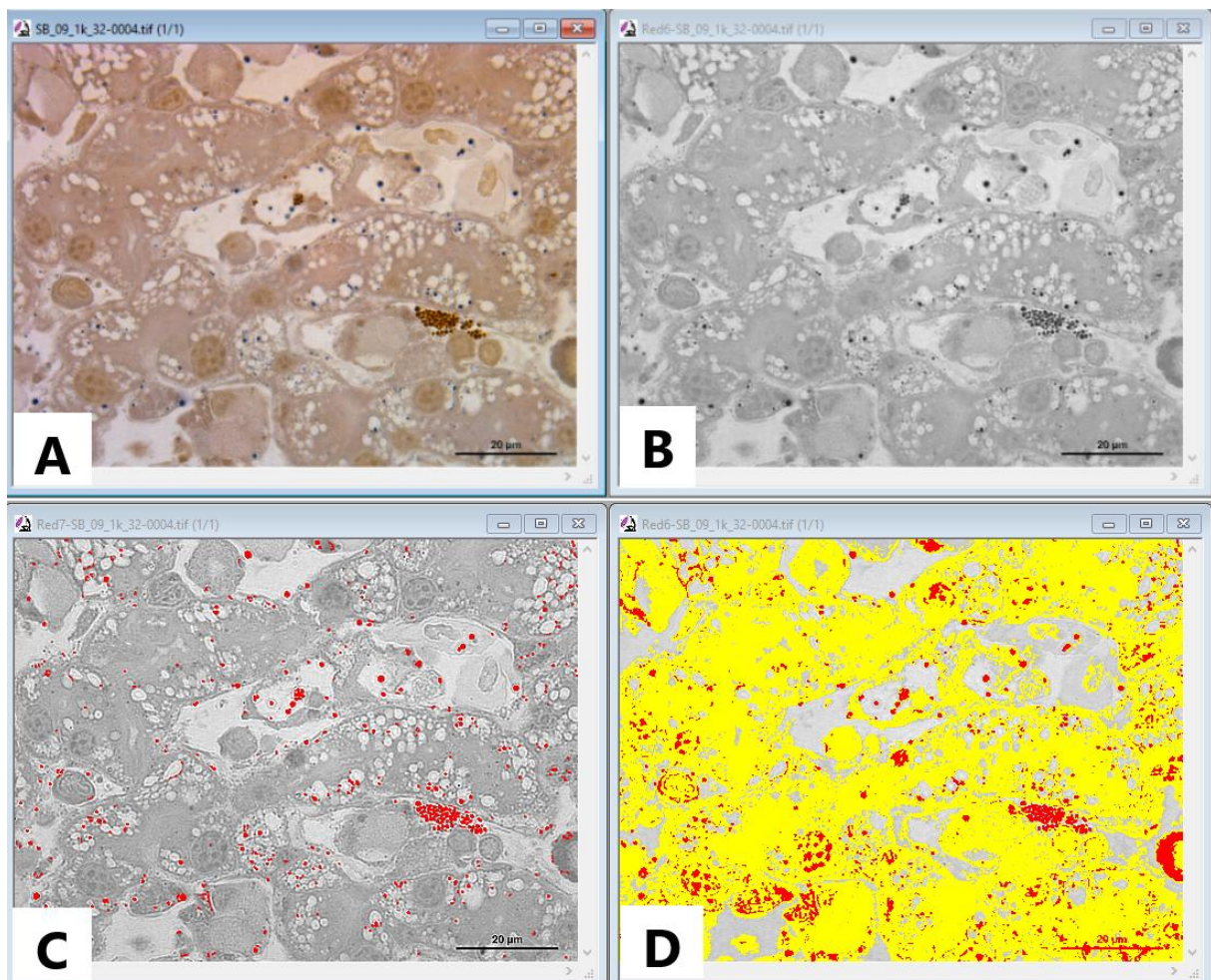
Utilizando um protocolo similar ao descrito anteriormente, foram selecionadas, de forma aleatória, 60 imagens por animal dos cortes coradas com SB (Sudan Black) e igualmente processadas via *software* Image-Pro Plus® (Media-Cybernetics Inc., versão 6,0). Assim como para os cortes corados com HE, cada fotomicrografia dos cortes corados com SB (Figura 11 A) foi devidamente calibrada a partir de uma medida de tamanho conhecido (barra de escala), separando-se o canal de cor vermelha destas imagens (Figura 11 B), de maneira que as marcações positivas para lipídios fossem destacadas em relação ao *layout* da imagem (Figura 11 C). Para o cálculo da área de tecido hepático (excluindo-se os sinusóides), fez-se uso do mesmo canal vermelho, mas com um distinto alcance da ferramenta de seleção de tons de cores (Figura 11 D). Assim como para a análise dos cortes corados com HE, a metodologia empregada para análise dos cortes corados com SB resultou em valores quantitativos mais precisos.

Para as imagens de cortes corados com SB, foi contabilizada a área ocupada pelas gotículas lipídicas (a.SB) e a área ocupada pelo tecido hepático (AH.SB), excluindo-se os sinusóides. Esses dois biomarcadores foram quantificados por área de pixels e convertidos pelo programa em micrômetros quadrados (μm^2). Feita a aquisição, exportou-se os dados para o programa Office Excel® (Microsoft Inc.) e estes foram organizados de acordo com cada tratamento, uma vez que, novamente, as lâminas tiveram suas identificações cobertas durante a aquisição das imagens e dos dados quantitativos. Uma vez com os dados devidamente organizados, fez-se o cálculo da porcentagem da área hepática ocupada por lipídeos (A.SB) por meio da

divisão entre a.SB por AH.SB, multiplicando-se o resultado por 100, de acordo com a seguinte equação:

$$A.SB = (a.SB/AH.SB) \times 100$$

Figura 11. Separação dos canais de cor vermelha (B), para a quantificação da área ocupada pelas gotículas lipídicas (C), e seleção da área de tecido hepático (excluindo os sinusóides). A: corte histológico de fígado (aumento de 1000x, - SB) de um animal controle (não utilizado para a análise de resultados).



Fonte: autoria própria.

5.6.4 ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTAS DE BIOMARCADORES

Como já discorrido no item 4.2.2., os biomarcadores permitem fazer uma ponte entre um xenobiótico e seus possíveis efeitos deletérios a um organismo exposto ao mesmo. Para tanto, faz-se necessário eleger distintos biomarcadores quando a finalidade é avaliar o efeito de um toxicante em um sistema biológico, sobretudo se levarmos em conta as respostas sistêmicas que o composto pode desencadear. Embora o tratamento estatístico estabeleça correlações entre os distintos biomarcadores de um mesmo grupo experimental, metodologias que forneçam uma visão mais integrada destes, representam importantes ferramentas.

Portanto, no presente estudo, também fizemos o Índice integrado de biomarcadores (IBR), como proposto por BELIAEFF e BURGEOT (2002) e modificado por GUERLET *et al.* (2010), uma vez que o mesmo transforma em um único valor as distintas respostas dos diferentes biomarcadores, permitindo analisar comparativamente a sensibilidade dos mesmos a cada tratamento. Os resultados são apresentados em um gráfico de radar, o qual indica o desvio de cada um dos biomarcadores em relação ao grupo controle (0). Valores obtidos acima da linha do zero denotam a estimulação do respectivo biomarcador, enquanto os valores abaixo de zero indicam a inibição daquele biomarcador.

O IBR é calculado pela seguinte forma: os resultados de cada biomarcador para observado para cada grupo exposto é inicialmente dividido pelo valor do grupo controle e, a seguir, tais resultados são logaritimizados (Y_i) e então são calculadas a média (μ) e o desvio padrão (s) de todos os resultados logaritmos. A seguir, faz-se a padronização dos valores de Y_i a partir da seguinte fórmula: $Z_i = (Y_i - \mu) / s$, por fim, a diferença entre Z_i e Z_0 (controle) é calculada para determinar os valores de A , que são os valores atribuídos para cada biomarcador.

5.6.5 Análise Estatística

Para o tratamento estatístico dos dados quantitativos relativos a A.MMC, A.SINUS, A.HP, C.HP e AL.SB, fez-se uso do programa SigmaStat® (Systat Software Inc., versão 4.0). O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi aplicado para os diferentes grupos experimentais de um mesmo biomarcador e então analisada a variância em uma via (ANOVA One-Way), aplicando-se o teste Brown-Forsythe para os dados

paramétricos e Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos, adotando como nível de significância $P < 0,05$. Para os testes de correlação, realizados entre os diferentes biomarcadores de um mesmo grupo experimental, aplicou-se a correlação Pearson para os dados com distribuição normal e o teste de Spearman para os dados não paramétricos. Os resultados das análises estatísticas foram organizados em gráficos e tabelas, apresentados na sessão seguinte.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No decorrer da exposição, apenas um animal do grupo ST morreu, não tendo sido observada mortalidade em nenhum dos outros grupos experimentais. A necrópsia do tecido hepático dos girinos do grupo controle, evidenciou um tecido com coloração, tamanho e consistência normais, na maioria dos animais, sem evidências de hepatomegalia. Além disso, foi observada a presença de células melanomacrofágicas (CMMs) e de hepatócitos com núcleos circulares típicos, sem infiltrações inflamatórias. O mesmo padrão geral foi observado para o fígado dos animais expostos.

Em todos os grupos foi observada a presença de eosinófilos próximos a vacuolização dos hepatócitos, sem uma clara prevalência desses eosinófilos nos grupos expostos com relação ao controle; o que inicialmente associamos à dieta do ranário, uma vez que no trabalho de SEIXAS FILHO *et al.* (2017), que comparou a histopatologia hepática das rãs-touro criadas em cativeiro às de vida livre (espécie invasora), também evidenciando vacuolização dos hepatócitos (Figura 13), o que associaram ao acesso que as rãs livres têm à proteínas de maior valor biológico. Contudo, no decorrer da discussão, vamos propor uma análise mais acurada desse biomarcador, tendo em vista nossos achados.

A seguir, trataremos da análise de cada biomarcador em separado, para depois estabelecermos uma discussão mais aprofundada acerca da histopatologia do órgão como um todo.

6.1 ÁREA OCUPADA PELAS CÉLULAS MELANOMACROGÁFICAS (CMMs - μM^2)

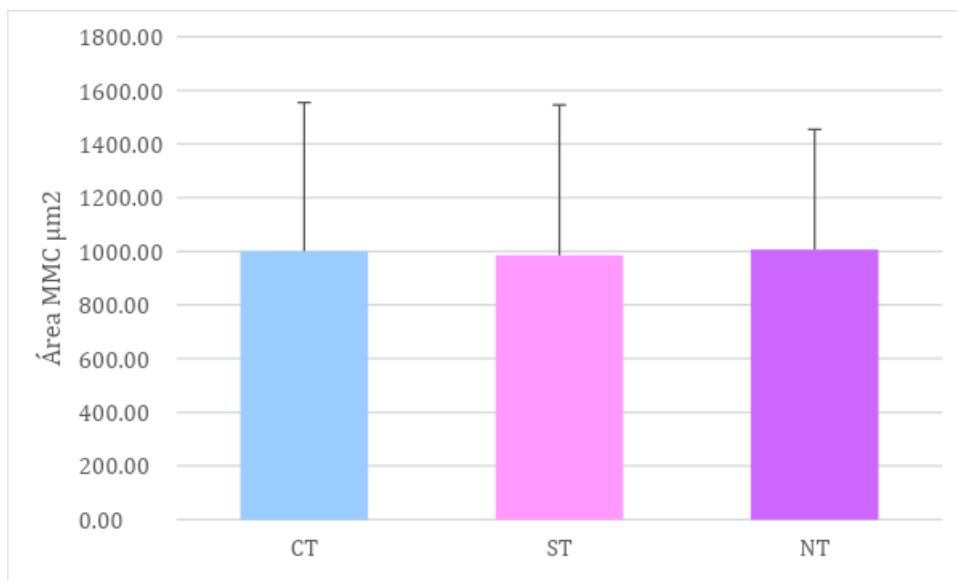
Os resultados relativos à determinação da área ocupada pelas células melanomacrofágicas (CMMs - μm^2) podem ser observados na Tabela 3 (A.MMC), e encontram-se representados graficamente na Figura 12. Uma prancha mostrando uma imagem deste biomarcador nos diferentes grupos experimentais pode ser observada na figura 13. A análise estatística dos resultados obtidos não indicou diferença significativa ($P > 0,05$) entre quaisquer dos grupos experimentais.

Tabela 3. Biomarcadores morfológicos para área de células melanomacróficas (A.MMC), área de sinusóides (A.SINUS) e área de hepatócitos (A.HP) expressos em área (μm^2), com os respectivos N amostrais. Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). O (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) dos grupos expostos em relação ao controle, o (#) indica diferença significativa ($P < 0,05$) do grupo ST em relação ao NT, enquanto NS denota ausência de diferença significativa ($P > 0,05$) entre quaisquer grupos experimentais. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

Biomarcador	Grupo	Média	Desvio Padrão	N amostral	Estatística
A.MMC	CT	987,10	558,05	55	NS
	ST	985,82	560,56	59	NS
	NT	991,40	455,97	49	NS
A.SINUS	CT	17661,04	4470,40	58	*
	ST	14217,61	4743,79	55	* #
	NT	12734,14	3500,39	58	*#
A.HP	CT	53728,11	5584,02	55	NS
	ST	55839,08	5470,74	55	NS
	NT	55912,44	5324,42	55	NS

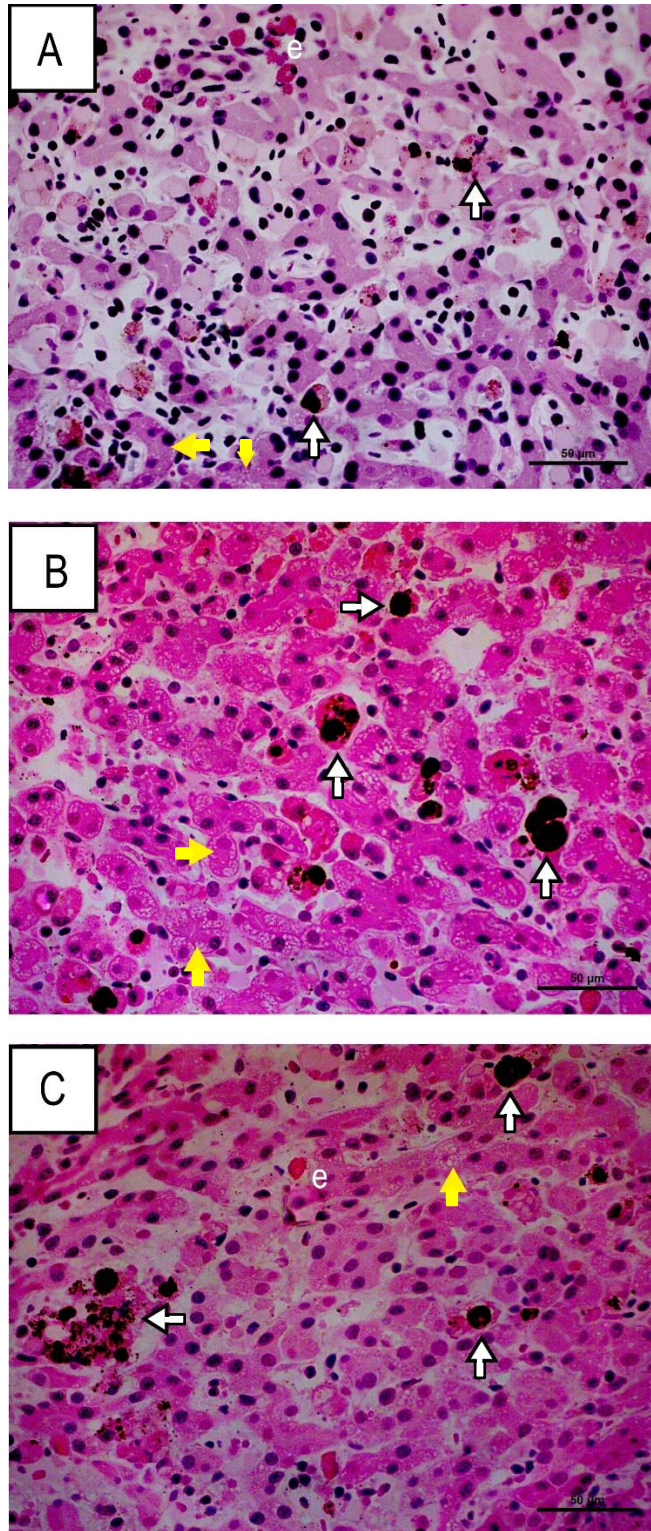
Fonte: autoria própria

Figura 12. Área de células melanomacrofágicas (A.MMC) expressa em μm^2 . Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria

Figura 13. Cortes histológicos dos três grupos experimentais: (A) grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e (C) grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT) evidenciando a presença de células melanomacrofágicas (CMMs) (pontas das setas brancas) e de eosinófilos (e). Notar a presença de hepatócitos vacuolizados (pontas das setas amarelas) em todos os grupos. HE, aumento de 400x, barra: 50 µm.



Fonte: autoria própria

Conforme descrito na Fundamentação Teórica (Cap. 4, item 4.3), as CMMs são importantes para a desintoxicação corpórea em resposta a diferentes agentes, inclusive a xenobióticos (FENOGLIO *et al.*, 2005). As CMMs foram escolhidas como biomarcador, uma vez que já foi demonstrado que as mesmas apresentaram responsividade a outras nanopartículas na espécie estudada, como evidenciado por OLIVEIRA *et al.* (2016; 2019); ademais, há estudos mostrando que a contagem de CMMs é um ótimo indicador histológico da função imune de peixes, anfíbios e répteis (STEINEL; BOLNICK, 2017). Contudo, em relação aos xenobióticos e às concentrações utilizadas, nossos resultados diferiram daqueles descritos pelos autores anteriormente citados, uma vez que não observamos quaisquer alterações na área ocupada pelas MMCs, enquanto tais autores observaram um aumento no número de centros melanomacrofágicos. Nossos resultados também diferem de um estudo utilizando NPs de prata no peixe *Clarias gariepinus*, no qual também houve redução de CMMs (SAYED; YOUNES, 2017). Tais diferenças podem ser atribuídas às distintas metodologias empregadas, apesar de indicarem que os toxicantes aqui utilizados não induziram uma resposta imune hepática.

Outros estudos também já evidenciaram um aumento do número de centros melanomacrofágicos em girinos de rã-touro expostos a outros xenobióticos, como lítio e o selênio (PINTO VIDAL, *et al.*, 2020) e o surfactante LAS (FRANCO-BELUSSI I *et al.*, 2021), bem como em girinos de outras espécies expostos ao cádmio (JU *et al.*, 2020) e ao Triclosan (CHAI *et al.*, 2017). Entretanto, um outro estudo desenvolvido com girinos de diferentes espécies de anfíbios expostos a diferentes concentrações do fungicida clorotalonil indicou que concentrações ambientalmente relevantes deste xenobiótico reduziram o número de melanomacrófagos, enquanto a exposição a concentrações ainda maiores do mesmo aumentou o número de células melanomacrofágicas. Dessa forma, uma depressão ou ativação da resposta imune hepática parece ser concentração-dependente (MCMAHON *et al.*, 2011). Para tanto, outras concentrações dos NTCs devem ser avaliadas a fim de testar se a assertiva anterior também é válida para o xenobiótico e o animal modelo aqui estudados.

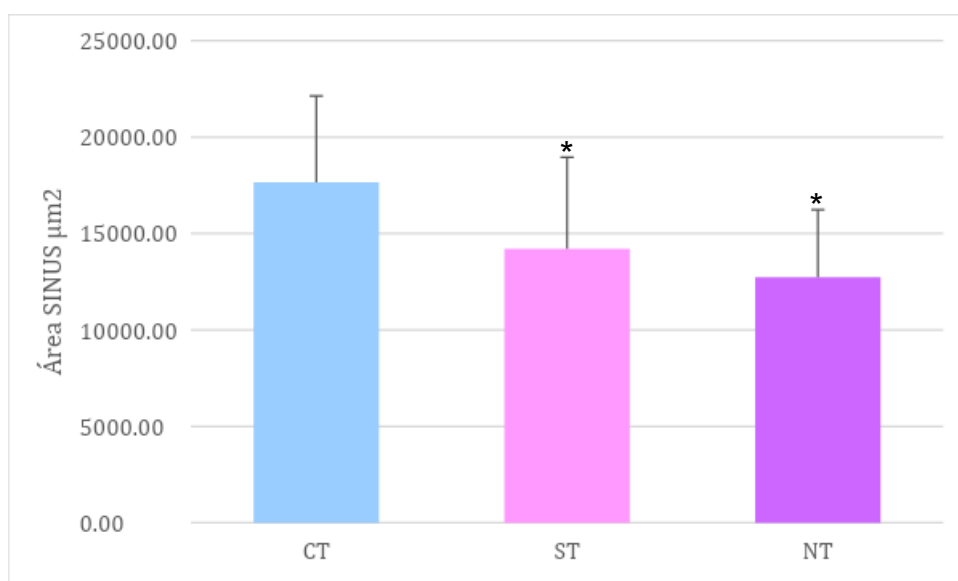
A ausência de resposta imune hepática, observada no nosso estudo por meio da ausência de variação significativa entre a área ocupada pelas MMCs, não deixa de ser vantajosa no sentido de corroborar nossos achados que indicaram para a manutenção da integridade do tecido hepático, uma vez que já foi demonstrado que o

aumento do número de células imunes, por si só, contribui para uma injúria hepática (DE ROSE *et al.*, 1999). Nesse sentido, considerando-se este biomarcador específico, pode-se aventar a hipótese de que os NTs possivelmente não chegaram ao tecido hepático, talvez por uma redução na perfusão do mesmo (vide 6.2) ou, talvez, por algum mecanismo homeostático desencadeado pelas vias de entrada (e.g., pele e/ou brônquias) que impediram ou minimizaram sua entrada na corrente sanguínea do animal.

6.2 ÁREA OCUPADA PELOS SINUSÓIDES (A.SINUS - μm^2)

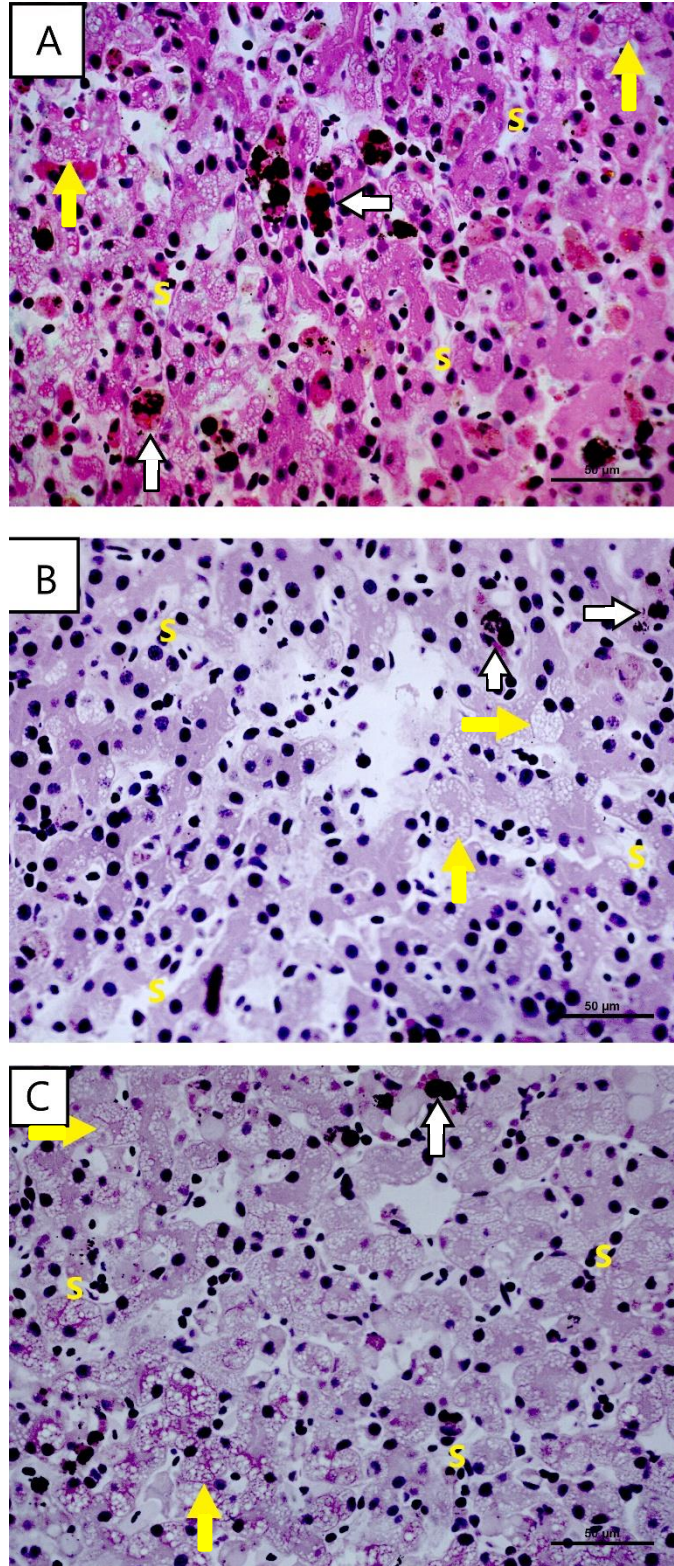
A tabela 3 (A.SINUS) apresenta os resultados relativos à determinação da área ocupada pelos sinusóides (A.SINUS- μm^2), os mesmos encontram-se representados graficamente na Figura 14. As imagens para este biomarcador, nos distintos grupos experimentais, encontram-se na Figura 15. Pode-se observar uma redução significativa entre o grupo controle (CT) e àquele exposto ao surfactante isolado (ST; $P=0,001$), como também entre o CT e àquele exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT; $P<0,001$) sem que, contudo, houvesse diferença entre os grupos ST e NT ($P>0,05$).

Figura 14. Área dos sinusóides (A.SINUS) expressa em μm^2 . Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). O (*) indica diferença estatisticamente relevante ($P<0,05$) dos grupos expostos em relação ao controle. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria

Figura 15. Cortes histológicos dos três grupos experimentais: (A) grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e (C) grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT) evidenciando os sinusóides (S) contendo eritrócitos, além de células melanomacrofágicas (CMMs) (pontas das setas brancas). Notar a presença de hepatócitos vacuolizados (pontas das setas amarelas) em todos os grupos. HE, aumento de 400x, barra: 50µm.



Fonte: autoria própria

Tendo em vista que o fígado é o principal órgão de destoxificação em anfíbios (MCDIARMID; ALTIG, 1999), hipotetizamos que a exposição às nanopartículas causaria um aumento da perfusão hepática, como evidenciado por FRANCO-BELUSSI *et al.* (2020) para o surfactante LAS; contanto que as nanopartículas atingissem a circulação sanguínea. Embora para outros animais já tenha sido demonstrado que a arquitetura vascular endotelial serve como o circuito primário de distribuição de NTCs *in vivo*, tais células não bioacumulam este xenobiótico a concentrações ambientalmente relevantes, somente sob condições não-fisiológicas e por um período prolongado (ALIDORI *et al.*, 2016).

Dessa forma, e corroborado pela ausência de resposta imune hepática, a redução da perfusão do fígado mais uma vez aponta para a hipótese de que outras respostas homeostáticas podem ter sido desencadeadas nas principais vias de entrada dos NTCs (pele e brânquias). Nossos resultados mais uma vez diferiram daqueles observados por FRANCO-BELUSSI *et al.* (2020) para girinos de rãs-touro expostos ao LAS, uma vez que estes autores, além de terem observado um aumento na área ocupada por MMCs, também observaram um aumento da vascularização dos hepatócitos. Outro estudo avaliando o efeito da exposição de girinos de outra espécie (*Physalaemus cuvieri*) a microplásticos também revelou um aumento da perfusão hepática (ARAÚJO; GOMES; MALAFAIA, 2020). Por outro lado, a exposição de trutas arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, às NPs de cobre ocasionou um decréscimo na área ocupada pelos sinusóides, semelhantemente aos nossos resultados, e que indica um redirecionamento do sangue para outros órgãos (AL-BAIRUTY *et al.*, 2013).

Nesse sentido, uma das possibilidades existentes para uma redução da perfusão hepática pode ser justamente um grande aumento da demanda energética da pele (principal via de entrada de toxicantes em anfíbios) e/ou das brânquias a fim de impedir a entrada dos NTCs. Assim, haveria um desvio do fluxo sanguíneo de outros órgãos (como o fígado) para os tecidos supracitados para garantir um maior aporte de sangue aos mesmos. Ademais, já foi demonstrado que modelos mamíferos com esteatose hepática apresentaram um estreitamento dos sinusóides hepáticos e redução da velocidade do fluxo sanguíneo neste órgão (FAN *et al.*, 2019), sugerindo que o próprio estado histopatológico do órgão pode também diminuir sua perfusão. Tal análise histoquímica será discutida mais adiante.

Por outro lado, podemos também sugerir um possível efeito do óxido nítrico (NO) sobre a vascularização do parênquima hepático. O NO é um gás que, no fígado, é produzido principalmente pelas células endoteliais dos sinusóides (CES) e que exerce um papel importante na homeostase hepática, como a redução da resistência vascular, além de inibir condições patológicas, como a fibrose (IWAKIRI; KIM, 2015; GREUTER; SHAH, 2016). Já foi demonstrado que outros poluentes, como os metais chumbo, mercúrio e cádmio, o pesticida organofosforado diazinon e o acaricida organoclorado AFD 25 inibem a produção de NO por um mecanismo mediado pelas citocinas (TIAN; LAWRENCE, 1996; AMAROLI *et al.*, 2010). A possibilidade que as NTs tenham causado o mesmo efeito no tecido hepático dos nossos animais não pode ser excluída, uma vez que são escassas as informações acerca do efeito de nanopartículas sobre a produção de óxido nítrico em diferentes órgãos e animais. Contudo, sabe-se que algumas nanopartículas, como as hipermagnéticas de óxido de ferro, também inibem a produção de NO pelo endotélio (ASTANINA *et al.*, 2014). Em testes do potencial farmacológico das nanopartículas de ouro (Au) e de dióxido de titânio (TiO₂), foi demonstrado que estas aumentam a permeabilidade entre os espaços intracelulares de CES *in vitro*, mais um indício do possível efeito de nanopartículas sobre a permeabilidade dos sinusóides (SETYAWATI, *et al.*, 2013; KAI TEE, *et al.*, 2018). Os únicos estudos encontrados na literatura avaliando o efeito de MWCNTs sobre a produção de óxido nítrico foram desenvolvidos com plantas. Nesse contexto, há estudos indicando que esse NM pode provocar tanto um aumento da produção de NO por sementes de tomate, *Solanum lycopersicum* L. (e.g., CAO *et al.*, 2020), quanto, inversamente, reduzir a produção desse gás em sementes de soja, *Glycine max* (e.g., ZAYTSEVA *et al.*, 2019). Segundo CAO *et al.* (2020), os efeitos desencadeados pelas MWCNTs em um mesmo biomarcador podem variar de acordo com a espécie estudada. Assim, não obstante o mecanismo de transdução de sinal que leva à produção de NO ser bem conservado evolutivamente, sua produção endógena pode variar de acordo com o ser vivo e o tecido analisado (CRISTINO *et al.*, 2008).

6.3 ÁREA DE HEPATÓCITOS (A.HP) E CONTAGEM DE HEPATÓCITOS (C.HP)

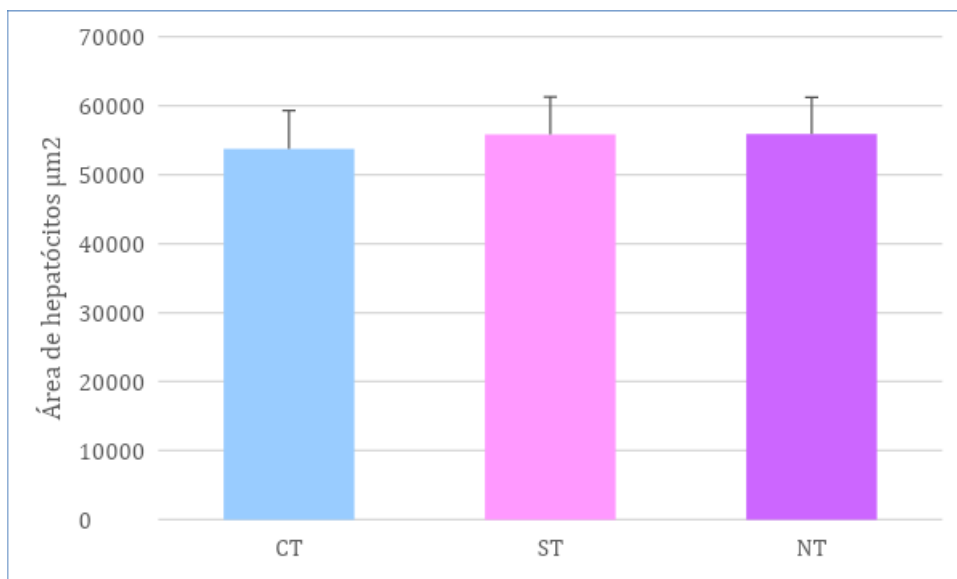
Devido ao fato de que a área ocupada pelos hepatócitos e a contagem de hepatócitos serem biomarcadores relacionados ao mesmo tipo celular, analisaremos e discutiremos conjuntamente neste tópico ambos os biomarcadores. Da mesma forma que para os CMMs, a área ocupada pelos hepatócitos (A.HP - μm^2) não foi diferente ($P > 0,05$) entre os três grupos experimentais, como pode ser observado na Tabela 3 e na Figura 16. Por outro lado, diferentemente da A.HP, o número de hepatócitos (C.HP – número) reduziu-se tanto no grupo ST ($P = 0,008$) quanto no grupo NT ($P < 0,001$). Contudo, diferentemente dos biomarcadores anteriormente descritos, os valores para o grupo NT foram inferiores ($P < 0,001$) àqueles encontrados para o grupo ST (Tabela 4; Figura 17). Na Figura 18 estão as imagens deste biomarcador nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 4. Valores de média e desvio padrão da contagem de hepatócitos, com respectivos n amostrais. Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). O (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos expostos em relação ao controle, o (#) denota diferença significativa ($P < 0,05$) do grupo NT em relação ao grupo ST. NS denota ausência de diferença significativa ($P > 0,05$) entre quaisquer grupos experimentais. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

Grupo	Média	Desvio Padrão	N amostral	Estatísticas
CT	302,26	54,94	55	NS
ST	264,93	57,71	58	*
NT	214,45	50,41	57	*#

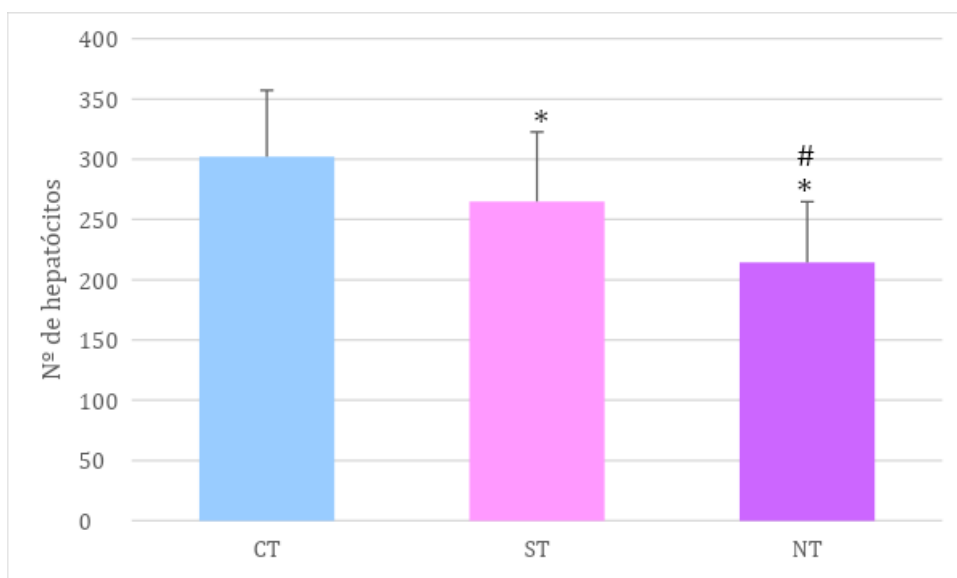
Fonte: autoria própria

Figura 16. Área dos hepatócitos (A.HP) expressa em μm^2 . Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



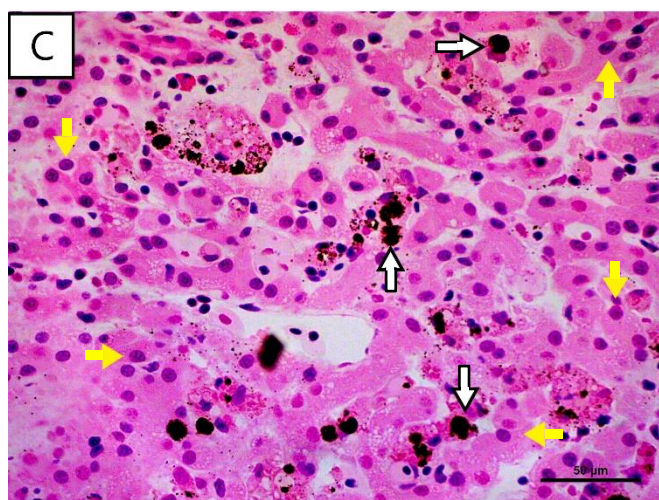
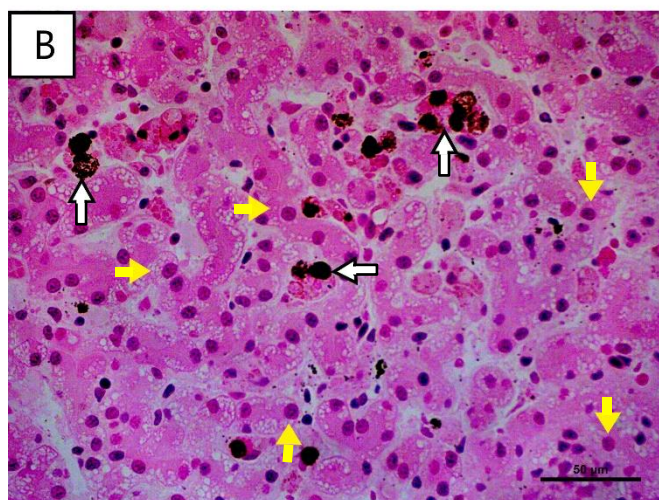
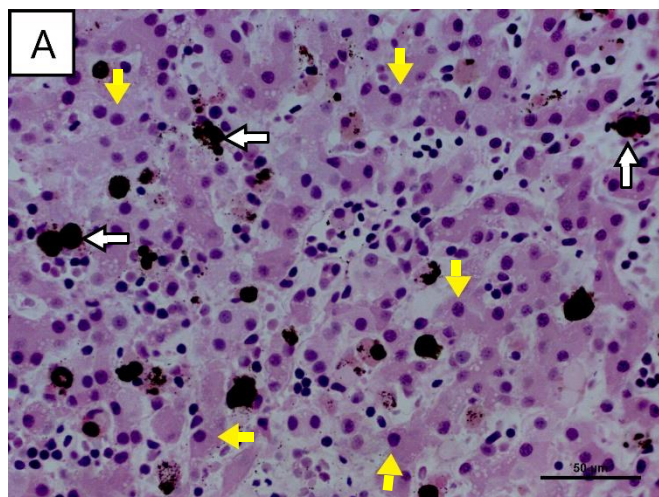
Fonte: autoria própria

Figura 17. Quantificação do número de hepatócitos (C.HP). Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). O (#) indica diferença estatisticamente relevante ($P < 0,05$) entre os grupos expostos, e o (*) indica diferença estatisticamente relevante ($P < 0,05$) destes grupos em relação ao controle. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria

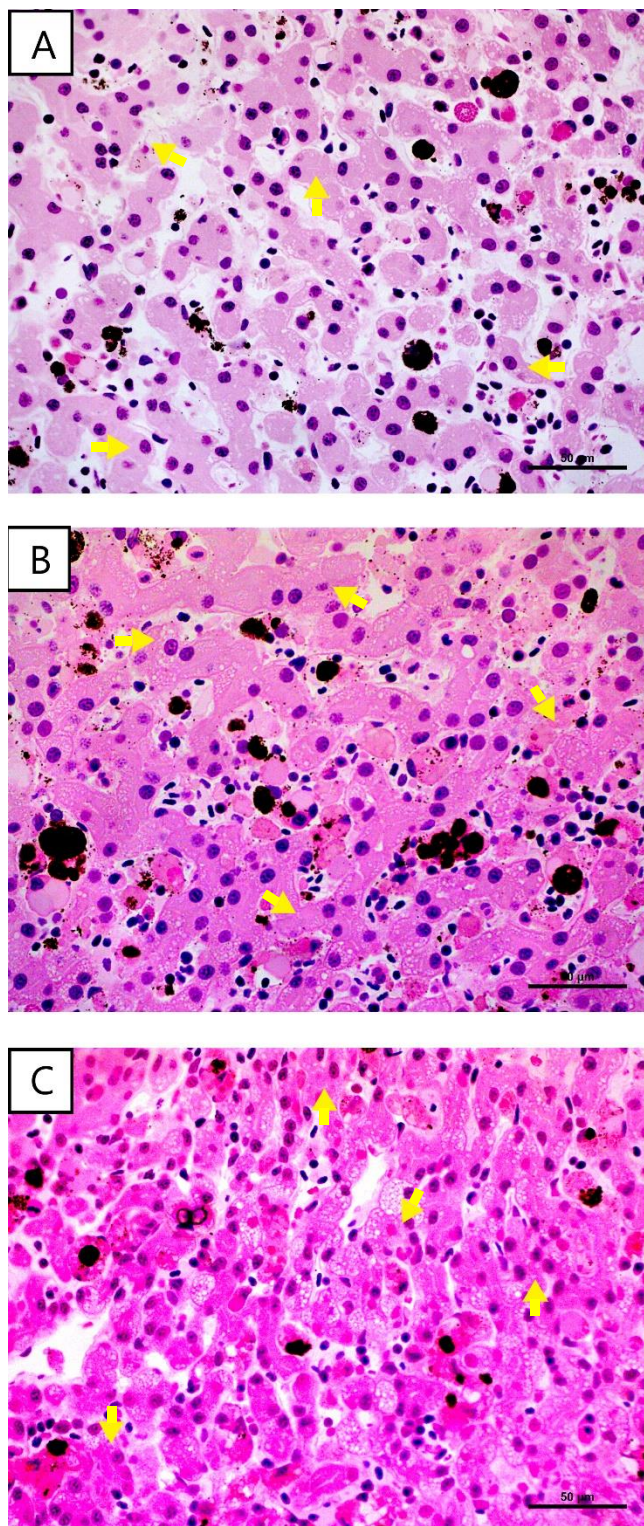
Figura 18. Cortes histológicos dos três grupos experimentais: (A) grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e (C) grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT) evidenciando os hepatócitos (pontas das setas amarelas). Também são visíveis as células melanomacrofágicas (CMMs) (pontas das setas brancas). HE, aumento de 400x, barra: 50 μ m.



Fonte: autoria própria

Uma vez que houve uma redução no número de hepatócitos (hipoplasia hepática), sem uma correspondente redução na área ocupada pelos hepatócitos remanescentes, pode-se pressupor que os mesmos sofreram uma hipertrofia. Enquanto a hipertrofia se caracteriza por um aumento do tamanho médio dos hepatócitos (HALL *et al.*, 2012), a hiperplasia corresponde a um aumento no número de células (MARONGIU *et al.*, 2017). Já está bem descrito na literatura que hepatócitos hipertróficos apresentam um citoplasma mais pálido e/ou aspecto granular e intensivamente eosinofílico (ARAÚJO; GOMES; MALAFAIA, 2020). Ao menos para mamíferos, foi demonstrado que a hipertrofia é um dos mecanismos de regeneração hepática após lesões que tenham resultado numa displasia hepática, como foi o nosso caso (MIYAOKA *et al.*, 2012). Como apenas foi aventada esta hipótese após a revisão bibliográfica para a redação da presente Discussão, retornamos às nossas fotomicrografias e observamos, qualitativamente, um padrão de aumento progressivo da opacidade dos citoplasmas entre os grupos, como assim segue: CT < ST < NT, conforme pode ser observado na Figura 19. Já foi também descrita uma hipertrofia dos hepatócitos de camundongos expostos a nanopartículas de óxido de chumbo sem que, contudo, tenha sido observada alteração na microcirculação hepática (DUMKOVÁ *et al.*, 2017). Ratos expostos a nanopartículas de óxido de ferro também apresentaram um aumento no tamanho dos hepatócitos (PARIVAR *et al.*, 2016). Vale ressaltar que, funcionalmente, a hipertrofia indica um aumento da atividade hepática, sendo assim, uma adaptação do organismo para manter a homeostase quando exposto a um xenobiótico (HALL *et al.*, 2012; YOSHIDA *et al.*, 2015).

Figura 19. Análise qualitativa do tecido hepático, evidenciando alterações morfológicas possivelmente relacionadas à hipertrofia. (A) grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e (C) grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). Notar o citoplasma dos hepatócitos em B e C (pontas das setas amarelas) com progressivo aumento da eosinofilia em relação a A, além de um aparente aumento de volume do citoplasma. HE, aumento de 400x, barra: 50 μ m.



Fonte: autoria própria

Aqui cabe correlacionar mais uma vez uma redução na área ocupada pelos sinusóides com a redução do número de hepatócitos nos grupos expostos. Isso porque a redução da perfusão hepática resulta em uma hipóxia tecidual que pode levar à apoptose dispersa e à necrose local do tecido hepático (ARAB *et al.*, 2013). Como não observamos necrose no nosso estudo, a causa para a redução do número de hepatócitos é provavelmente a apoptose. Dentre as causas de apoptose via hipóxia podem ser elencadas dano mitocondrial, sobrecarga de cálcio, aumento EROs, dentre outras (GUO *et al.*, 2019). Ademais, se de fato houve uma alteração na expressão e secreção de NO pelas CES, a redução do teor deste justificaria os danos mitocôndriais, já que esse gás exerce efeito nas enzimas do Complexo IV terminal da cadeia respiratória (CHWEIZER; RICHTER, 1994; GIUFFRÈS *et al.*, 1996). Um estudo realizado com o peixe *Oryzias latipes*, mostrou que há uma grande variação nas respostas dos biomarcadores (apoptose, no caso) à exposição às MWCNTs de acordo com o tecido analisado. As brânquias apresentaram maior resposta, enquanto o intestino e o fígado se mostraram irresponsivos (LEE *et al.*, 2015).

6.4 PORCENTAGEM DA ÁREA HEPÁTICA OCUPADA POR LIPÍDEOS (A.SB)

A esteatose hepática, ou fígado gorduroso, caracteriza uma condição anormal na qual os hepatócitos acumulam quantidades excessivas de lipídios, principalmente triglicerídeos (TG) (CHALASANI *et al.*, 2017; WALLACE; MEYER, 2010). Os TGs captados pelo fígado, oriundos tanto da dieta quanto da lipólise do tecido adiposo (na forma de ácidos graxos), podem seguir, em condições homeostáticas, três vias: 1) serem secretados na forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL); 2) comporem a via de β -oxidação mitocondrial para a produção de ATP; ou, 3) serem metabolizados em outros derivados (ROTMAN; KAPURIA, 2020). Assim, a esteatose está relacionada ao desequilíbrio entre a captação extra-hepática de TGs e sua a metabolização pelo fígado, resultando no acúmulo destes nos hepatócitos (WALLACE; MEYER, 2010; CHALASANI *et al.*, 2017; ROTMAN; KAPURIA, 2020).

Diversos fatores influenciam no desenvolvimento e na progressão da esteatose hepática (MASARONE *et al.* 2018); contudo, o estresse oxidativo é o mais amplamente citado. Estudos associam possíveis anormalidades mitocondriais e disfunção na cadeia respiratória ao acúmulo de ácidos graxos citoplasmáticos, alterações no retículo endoplasmático e alterações na microbiota intestinal (MASARONE,2018).

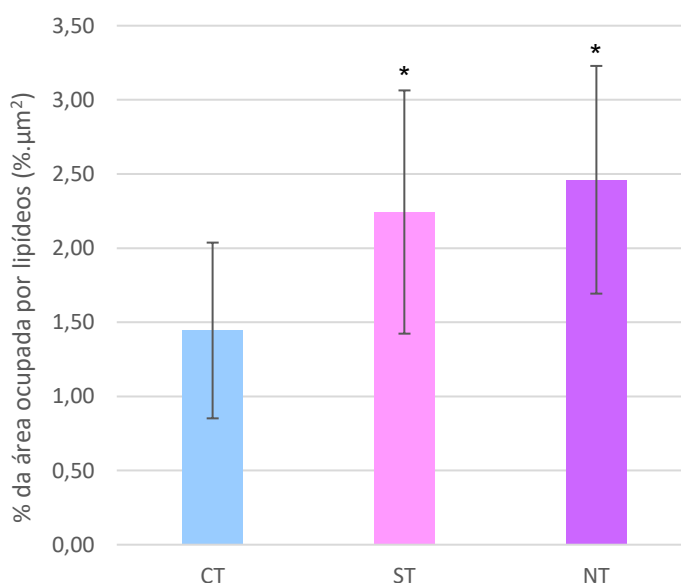
A tabela 5 (A.SB) apresenta os resultados relativos à área de tecido hepático ocupada por lipídeos, os mesmos encontram-se representados graficamente na Figura 20. As imagens para este biomarcador, nos distintos grupos experimentais, encontram-se na Figura 21. Pode-se observar um aumento significativo deste biomarcador nos grupos ST ($P < 0,001$) e NT ($P < 0,001$) em relação ao controle (CT), sem que os dois últimos tenham diferido entre si ($P > 0,05$).

A esteatose hepática é amplamente descrita na literatura em resposta à exposição a xenobióticos tanto em mamíferos quanto em peixes e anfíbios (WALLACE; MEYER, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2016; KLAUNIG; LI; WANG, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Isso inclusive já foi observado para peixes, bem como para anfíbios, em resposta a diferentes materiais nanoestruturados e surfactantes (OLIVEIRA *et al.*, 2016; FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2020; SHAMSI *et al.*, 2020). Esse aumento dos níveis de lipídeos no tecido hepático parece não estar associado a um aumento da lipidogênese, uma vez que não foi relatado um aumento da expressão de

genes responsáveis por esse processo (VESTERDAL *et al.*, 2014). Assim, todos os estudos são unânimes em apontar a morte celular associada ao estresse oxidativo ocasionado por toxicantes, como nos materiais nanoestruturados aqui utilizados (MWCNT), bem como a outros surfactantes isolados (VESTERDAL *et al.*, 2014; FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2020). Isso corrobora nossa sugestão do item 6.3, na qual atribuímos a redução do número de hepatócitos (C.HP), sem correspondente diminuição da área ocupada pelos hepatócitos (A.HP), à produção de EROS e a consequente apoptose.

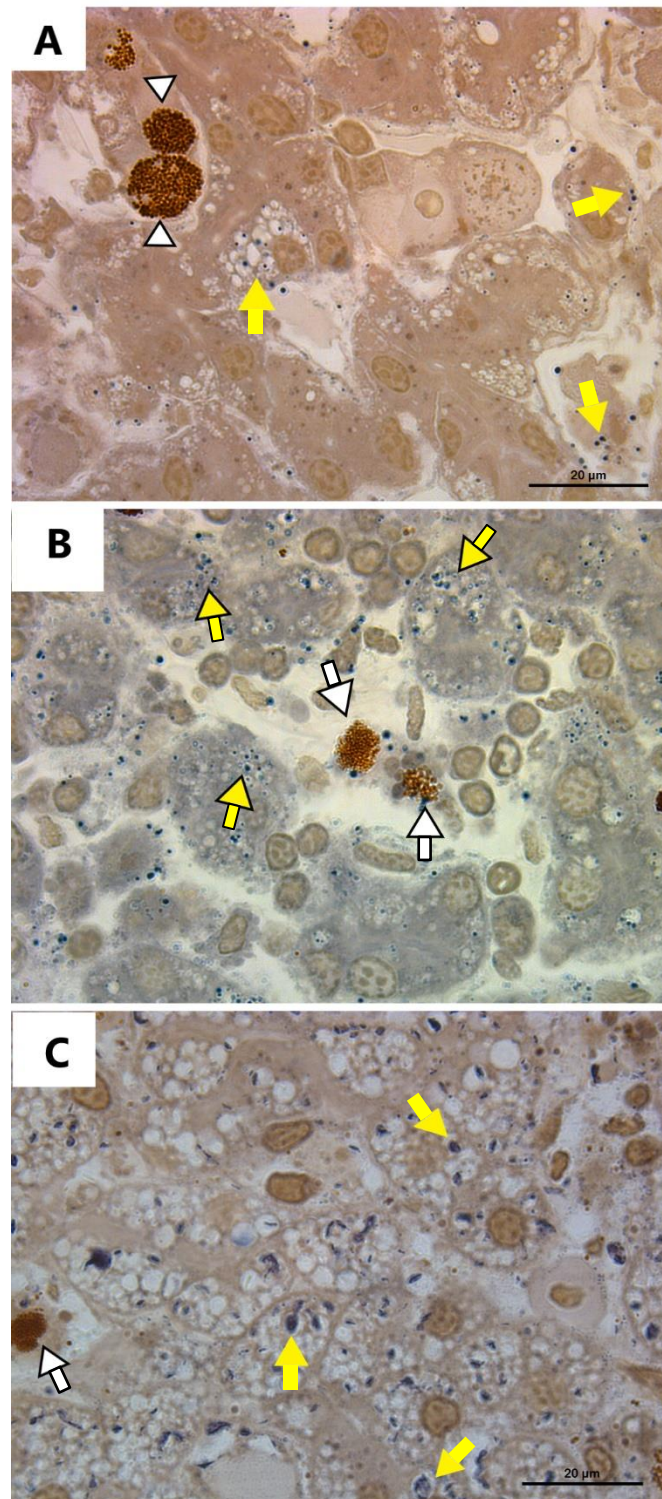
Não obstante, a diminuição da perfusão hepática, observada pela redução da área ocupada pelos sinusóides (item 6.2), pode prejudicar a liberação de substratos lipídicos para a circulação sistêmica, resultando no seu acúmulo no interior dos hepatócitos. Dessa forma, além de ocasionar esteatose hepática, pode prejudicar o fornecimento de substratos energéticos metabolicamente ativos. Também não se pode descartar o observado por MAGNUSSON *et al.* (1986), cuja administração endovenosa do Pluronic F-68 em ratos parece desencadear uma fosfolipidose, o que também poderia explicar nossos achados, dada a natureza similar desse composto com o Pluronic™ F-127, embora esse s autores tenham testado doses mais altas e por períodos mais prolongados (30 dias).

Figura 20. Área ocupada por lipídios (A.SB) expressa em %. Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). O (*) indica diferença estatisticamente relevante ($P < 0,05$) dos grupos expostos em relação ao controle Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria

Figura 21. Análise qualitativa do tecido hepático corado com Sudan Black, evidenciando a marcação positiva para lipídios. (A) Grupo controle (CT), (B) grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e (C) grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). Notar a presença mais proeminente de vacúolos contendo lipídios em B e C (pontas das setas amarelas) em relação a A. Pontas das setas brancas indicam os pigmentos das células melanomacrofágicas (CMMs). Aumento de 1000x, barra: 20 μ m.



Fonte: autoria própria

6.5 CORRELAÇÕES ENTRE OS BIOMARCADORES

Na tabela 5 está apresentada resumidamente a resposta de cada um dos biomarcadores comparando os diferentes grupos experimentais. Assim, os efeitos mais marcantes que tivemos foram a redução de A.SINUS, a redução de C.HP e o aumento de A.HP nos grupos expostos em relação ao CT. Previamente discutimos as possíveis causas e consequências de tais alterações.

Tabela 5. Resumo das respostas apresentadas pelos biomarcadores: área de melanomacrófagos (A.MMC), área de sinusóides (A.SINUS), área de hepatócitos (A.HP), contagem de hepatócitos (C.HP), porcentagem de área ocupada por lipídios (A.SB) entre os grupos expostos, bem como destes em relação ao grupo controle. As setas (↓) e (↑) representam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) de diminuição e aumento do parâmetro, respectivamente; enquanto as setas (↔) indicam que não houve diferença significativa ($P < 0,05$). Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT).

BIOMARCADOR	GRUPOS		
	CTxST	CTxNT	STxNT
A.MMC	↔	↔	↔
A.SINUS	↓	↓	↔
A.HP	↔	↔	↔
C.HP	↓	↓	↓
A.SB	↑	↑	↔

Fonte: autoria própria

Passaremos a analisar agora a possível existência de uma correlação entre os biomarcadores analisados, pois nos permite avaliar se dois biomarcadores se relacionam e, em caso afirmativo, se esta relação é direta ou inversa. O valor obtido de r permite inferir a intensidade da correlação: resultados entre $|0,1 \text{ e } 0,3|$ possuem uma correlação fraca, enquanto resultados entre $|0,4 \text{ e } 0,6|$ indicam uma correlação moderada e, por fim, resultados entre $|0,7 \text{ e } 1,0|$ indicam que os biomarcadores são fortemente dependentes entre si (DANCEY; REIDY, 2005). Aqui somente vamos considerar havendo correlação quando esta tiver se mostrado moderada ou alta (tabela 6).

Tabela 6. Índices de correlação (r) de Pearson e Spearman, obtidos a partir dos dados quantitativos dos biomarcadores hepáticos: área de células melanomacróficas (A.MMC), área de sinusóides (A.SINUS), contagem de hepatócitos (C.HP), área de hepatócitos (A.HP). Grupo controle (CT), grupo exposto ao surfactante isolado (ST) e grupo exposto aos nanotubos de carbono associados ao surfactante (NT). (*) Dados submetidos ao teste de correlação de Pearson. (–) Valores de r não significativos ($P > 0,05$).

CORRELAÇÕES			
	CT	ST	NT
A.MMC vs A.SINUS	–	–	–
A.MMC vs C.HP	–	–	–
A. MMC vs A.HP	–	–	–
A.SINUS vs C.HP	–	+0,4(*)	-0,3
A.SINUS vs A.HP	-0,4(*)	–	-0,6
C.HP vs A.HP	–	–	–
A.SB vs A.MMC	–	–	–
A.SB vs A.SINUS	–	–	–
A.SB vs C.HP	–	–	–
A.SB vs A.HP	–	–	–

Fonte: autoria própria

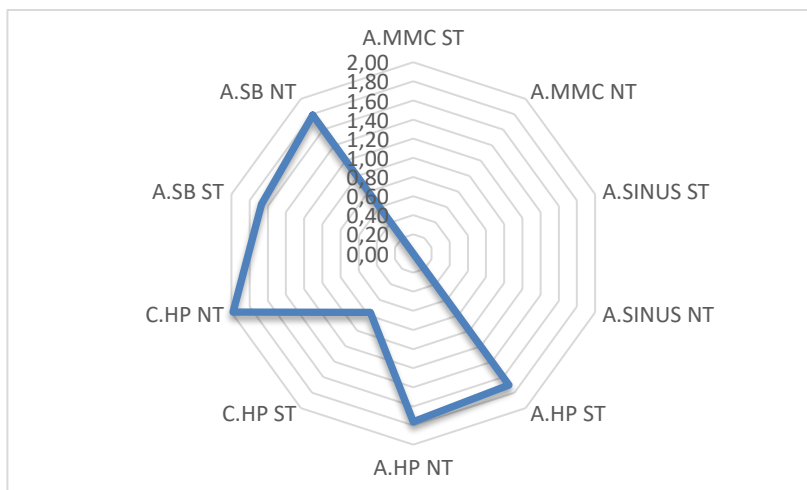
A correlação entre a área de sinusóides e a área ocupada pelos hepatócitos se mostrou negativa ($r = -0,4$) para os animais do grupo CT, ou seja, quanto maior a área ocupada por sinusóides menor a área do tecido parenquimal hepático, enquanto para os animais do grupo NT também foi negativa ($r = -0,6$) mas, neste caso, indicando que quanto menor a perfusão hepática, maior a área ocupada pelos hepatócitos. Por outro lado, a correlação entre a área dos sinusóides e a contagem de hepatócitos foi positiva para o grupo ST ($r = +0,4$), indicando que quanto menor a perfusão hepática, menor a contagem de hepatócitos, o que corrobora a nossa hipótese de ocorrência de apoptose (Tabela 6).

O fato de não ter ocorrido correlação entre A_{HP} e A_{SB}, isto já era esperado, visto que ambos os biomarcadores são, na realidade, consequência do estresse oxidativo; ou seja, A_{HP} e o A_{SB} não interagem diretamente entre si mas, por outra, são devidos a um mesmo fator (produção de EROS). Portanto, sugere-se que estudos posteriores analisem biomarcadores de estresse oxidativo no fígado destes animais, nas mesmas condições aqui utilizadas, pois, presumivelmente, os mesmos apresentarão correlação fortemente positivas ou negativas em relação aos biomarcadores supracitados, uma vez que estes são desencadeados pela mesma fisiopatologia.

6.6 ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTA DE BIOMARCADORES

Uma integração entre a responsividade de todos os biomarcadores aqui utilizados foi calculada pelo índice integrado de respostas dos biomarcadores (IBR), cuja representação gráfica encontra-se na figura 22. De uma forma geral, os biomarcadores que apresentaram maiores valores de IBR para o grupo NT foram: C_{HP} (A=1,98) > A_{SB} (A=1,79) > A_{HP} (A=1,76); enquanto para o grupo ST foram A_{HP} (A=1,70) > A_{SB} (A=1,67). Digno de nota foi o fato de que os girinos expostos ao surfactante isolado tiveram um IBR menor para a A_{HP} (A=1,70) que aqueles expostos aos nanotubos associados ao mesmo (A=1,76) para este biomarcador. Isso parece indicar um possível sinergismo entre ST e NT, quando associados. Isso já seria esperado, uma vez que os surfactantes, como os Pluronicos, não somente são utilizados para a manutenção da solução coloidal, como também aumentam a biodisponibilidade do composto ativo (NTCs), maximizando a sua entrada nos hepatócitos, assim, potencializando seu efeito deletério intracelular (KHALIQ *et al.*, 2019). Vale ressaltar que os seguintes biomarcadores foram, comparativamente, pouco ou nada responsivos para ambos os grupos experimentais: A_{MMC}, A_{SINUS}. Tendo em vista que todos os IBRs mais elevados foram observados para biomarcadores que são consequência de um estresse oxidativo, podemos sugerir como estudos futuros e complementares ao aqui desenvolvido, que sejam analisados biomarcadores de estresse oxidativo. Além disso, os resultados obtidos apontam para que sejam priorizados os biomarcadores com maiores IBRs nesses estudos subsequentes.

Figura 22. Gráfico em radar representando o IBR. Valores mais distantes de zero indicam maior responsividade do biomarcador. Notar que A.HP e A.SB foram os mais responsivos para ambos os grupos expostos, ao passo que C.HP foi responsivo apenas para o grupo NT. Grupo CT representa os valores ZERO.



Fonte: autoria própria

7 DIFICULDADES ENCONTRADAS

Apesar dos resultados obtidos serem elucidativos acerca do efeito dos xenobióticos estudados sobre o fígado de girinos de rãs-touro, o ideal seria correlacionar os mesmos à análise das principais vias de entrada (pele e brânquias) e da via de eliminação (rins) dos mesmos, como proposto no projeto que deu origem a esta dissertação de mestrado. Contudo, devido às medidas de contingenciamento impostas pela atual pandemia da Covid-19 e a consequente restrição de acesso aos laboratórios para a microtomia e para as análises dos diferentes órgãos, isso infelizmente não foi possível. Não obstante, as lâminas de pele já estão devidamente coradas, e as brânquias e os rins devidamente emblocados, o que permitirá que estudos futuros e complementares sejam desenvolvidos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados anteriormente apresentados e discutidos indicam que tanto os NTCs quanto o surfactante utilizado no presente estudo resultaram em uma leve hepatotoxicidade, apesar de inferior àquela já descritas para outras espécies. Contudo, apesar de anteriormente aventado, que os xenobióticos resultaram numa redução da perfusão hepática, possivelmente ocasionando uma hipóxia tecidual e, assim, uma redução do número de hepatócitos, os resultados obtidos mediante a análise histoquímica posterior (Sudan Black), nos atentaram para uma outra hipótese alternativa ou complementar: a exposição a ambos os xenobióticos resultou em uma esteatose hepática. Esse achado, correlacionado à redução do número de hepatócitos podem, em grande parte, ser atribuído a um estresse oxidativo. Essa assertiva pode ser corroborada a partir do IBR, que se mostrou ser uma ferramenta muito útil, capaz de fornecer um parâmetro integrado dos resultados aqui obtidos. Assim, propõe-se para análises complementares, utilizando quaisquer um dos xenobióticos aqui estudados, que seja dada ênfase aos biomarcadores mais sensíveis, e que também sejam acrescentados biomarcadores de estresse oxidativo. Embora sejam inquestionáveis os avanços da nanotecnologia nas mais diferentes áreas, urge que as agências ambientais estabeleçam normativas claras quanto à destinação dos resíduos oriundos de nanomateriais, bem como das concentrações ambientalmente seguras dos mesmos para a biota.

9 CONCLUSÕES

Após avaliarmos as alterações histopatológicas no fígado de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*, SHAW 1802) no estágio 25 de Gosner, após a exposição aguda (96h) a 10 mg.L^{-1} de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) associados ao surfactante Pluronic™ F-127 (0,1%), bem como a este composto isolado, pudemos chegar às seguintes conclusões:

- a) os animais apresentaram alterações histopatológicas em resposta a ambos os xenobióticos;
- b) a redução na perfusão hepática pode levar a uma hipóxia do tecido hepático que, em parte, pode ter provocado a apoptose dos hepatócitos;
- c) a redução da vascularização pode, também, ter prejudicado a liberação de lipídios do parênquima hepático para a circulação sistêmica, resultando numa esteatose hepática;
- d) os hepatócitos remanescentes parecem ter sofrido hipertrofia, provavelmente devido ao aumento da vacuolização do seu citoplasma relacionado à esteatose hepática;
- e) tanto a morte dos hepatócitos quanto a esteatose hepática devem ter tido como principal fator desencadeante o estresse oxidativo.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MISIH, S.R.Z.; BLOOMSTON, M. Liver anatomy. **Surgical Clinics of North America**, v. 90-4, 2010, p. 643-653. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>.

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**, v.274, 2019, p.770-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.060>.

AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of fish diseases**, v.26-9, 2003, p.499-509. DOI: <https://doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>.

AHMADI, M.H.; GHAZVINI, M.; NAZARI, M.A.; AHMADI, M.A.; POURFAYAZ, F. LORENZINI, G.; MING, T. Renewable energy harvesting with the application of nanotechnology: A review. **International Journal of Energy Research**, 43: 4, 1387-1410, 2018. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1002/er.4282>.

AITKEN, R.J.; CHAUDHRY, M.Q.; BOXALL, A.B.A.; HULL, M. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. **Occupational Medicine**, 56:5, 300–6, 2006. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1093/occmed/kql051>

AKIYOSHI, H.; INOUE, A.M. Comparative histological study of hepatic architecture in the three orders amphibian livers. **Comparative Hepatology**, v.11:2, 2012, p.1-8.

AL-BAIRUTY, G.A.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D.; HENRY, T.B. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v.126-15, 2013, p.104-115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.005>.

ALFORD, R.A. Declines and the global status of amphibians. *In*: SPARLING, D.W. *et al.* (ed.). **Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles**, Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 13-45.

ALFORD, R. A.; S.J. RICHARDS. 1999. Global Amphibian Declines: a problem in applied ecology. **Annual Reviews of Ecology and Systematics**, 30, 133–65, 1999. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.30.1.133.

ALIDORI, S. *et al.* Deconvoluting hepatic processing of carbon nanotubes. **Nat Commun**, v.7, 2016. DOI: 10.1038/ncomms12343.

ALLEN, M.J.; TUNG, V.C.; KANER, R.B. Honeycomb Carbon: A Review of Graphene. **Chem. Rev.**, 110,132–145, 2010.

ALROY, J. Current extinction rates of reptiles and amphibians. **PNAS**: 112:42, 2015, p.13003-8. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1073/pnas.1508681112>

AMARAL, D.F.; GUERRA, V.; MOTTA, A.G.C.; MELO e SILVA, D.; ROCHA, T.L. Ecotoxicity of nanomaterials in amphibians: a critical review. **Science of the Total Environment**, 686, 332-44, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.487>.

AMAROLI, A.; TRIELLI, F.; SIFREDI, F.; CHESSA, M.G.; DELMONTE, M.U.D. CORRADO. Nitric oxide production inhibited by xenobiotic compounds in the protozoan *Paramecium primaurelia*. **Ecological Indicators**, v.10-2, 2010, p.212-216. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2009.04.012>.

AMPHIBIAWEB. **Database number of amphibian species**. 2020. Disponível em: <https://amphibiaweb.org/> . Acesso em: 27/07/2020.

AMERICAN SOCIETY TEST MATER (ASTM). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae. 2012. Disponível em: <https://www.astm.org/Standards/E1218.htm> . Acesso em: 27/07/2020.

AMERICAN SOCIETY TEST MATER (ASTM). Standard Terminology Relating to Nanotechnology. 2020. Disponível em: <https://compass-astm.ez31.periodicos.capes.gov.br/download/E2456.3251.pdf>. Acesso em: 29/10/2020.

AMPHIBIAN SURVIVAL ALLIANCE (ASA). **Global Wildlife Conservation**, 2019. Disponível em: <https://www.amphibians.org/who-we-are/why-amphibians/>. Acesso em: 27/07/2020.

ANASTOPOULOS, I.; KYZAS, G.Z. Agricultural peels for dye adsorption: a review of recent literature. **Journal of Molecular Liquids**, v. 200-B, p. 381-389, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.11.006>.

ARAB, H.A. *et al.* A comparison of hepatic ischemia/hypoxia–reperfusion injury models. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.68:3, 2013, p.349-356. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.03.002>.

ARAÚJO, A.P.C; GOMES, A.R.; MALAFAIA, G. Hepatotoxicity of pristine polyethylene microplastics in neotropical *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Fitzinger, 1826). **Journal of Hazardous Materials**, v.386, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121992>.

ARDENTE, A.J.; BARLOW, B.M.; BURNS, P.; GOLDMAN, R.; BAYNES, R.E. Vehicle effects on in vitro transdermal absorption of sevoflurane in the bullfrog, *Rana catesbeiana*: **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.25-3, 2008, p.373-379. Doi.org/10.1016/j.etap.2007.12.001.

ARIAS-ESTÉVEZ, *et al.* The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.123-4, p. 247-260, 2008, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.07.011>.

ARORA, S.; RAJWADE, J.M.; PAKNIKAR, K.M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 258: 2, 151-165, 2011.

ASA. Why Amphibians Are Important? **Amphibian Survival Alliance**, 2019. Disponível em: <https://www.amphibians.org/who-we-are/why-amphibians/>. Acesso em: 18/08/2020.

ASHBY, M.F.; FERREITA, P.J.; SCHODEK, D.L. Nanomaterials, nanotechnologies and design: an introduction for engineers and architects. **Elsevier**, 2009.

ASTANINA, K. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles impair endothelial integrity and inhibit nitric oxide production. **Acta Biomaterialia**, v.10:11, 2014, p.4896-4911. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.07.027>.

AVMA. 2020. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition.

AYAS, Z.; EKMEKCI, G.; OZMENB, M.; YERLI, S.V. Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.23, 2007, p.242–249. DOI: [doi:10.1016/j.etap.2006.11.003](https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.11.003).

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, 4607-18, 2012. DOI: [10.1016/j.carbon.2012.05.047](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.05.047).

BAI, C.; LIU, M. From Chemistry to Nanoscience: Not Just a Matter of Size. **Angewandte Chemie**, 52: 10, 2678-83, 2013.

BAKRY, R.; VALLANT, R.M.; NAJAM-UL-HUQ, M.; RAINER, M.; SZABO, Z.; HUCK, C.W.; BONN, G.K. Medicinal applications of fullerenes. **International Journal of Nanomedicine**, 2:4, 639–49, 2007.

- BARINAGA, M. "Where have all the froggies gone?" **Science**, v. 247:4946, 1990, p. 1033.
- BECKER, C.G.; *et al.* Habitat split and the global decline of amphibians. **Science**, v. 318-5857, p. 1775-1777, 2007. DOI: 10.1126/science.1149374.
- BENN, T.M.; WESTERHOFF, P.; HERCKES, P. Detection of fullerenes (C60 and C70) in commercial cosmetics. **Environmental Pollution**, 159:5, 1334–42, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.01.018>.
- BLAISE, C.; GAGNÉ, F. Bioassays And Biomarkers, Two Pillars Of Ecotoxicology: Past, Present And Prospective Uses. **Fresenius Environ. Bull**, [S.L], v. 18, p. 135–139, jan. 2009.
- BLAUSTEIN, A.R.; HAN, B.A.; RELYEA, R.A.; JOHNSON, P.T.J.; BUCK, J.C.; GERVASI, S.S.; KATS, L.B. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. **Annals of The NY Academy of Sciences**, 1223:1, 108-119, 2011. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05909.x.
- BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B. Declining amphibian populations: A global phenomenon? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 5-7, p. 203-204, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(90\)90129-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(90)90129-2).
- BLEEKER, E.A.J. *et al.* Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 65:1, 119-25, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.11.007>.
- BLOMHOFF, R.; WAKE, K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. **FASEB Journal**, v.5-3, 1991, p. 271-277. DOI: <https://doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1096/fasebj.5.3.2001786>.
- BOURDIOL *et al.* Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. **Carbon**, v.54, 2013, p.175-91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.11.024>.
- BRIGGS, C.J.; KNAPP, R.A.; VREDENBURG, V.T. Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, n.21, p.9695-9700, 2010. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1073/pnas.0912886107>.
- BRODY, H. Graphene. **Nature Outlook**, 483:7389, 2012.
- BROWN, D.D.; CAI, L. Amphibian metamorphosis. **Developmental Biology**, v.306-1, p. 20-33, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.021>.
- BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, 2: 4, 2007. DOI: 10.1116/1.2815690.
- CAIRNS, J., Jr.; VAN DER SCHALIE, W. H. Biological monitoring. Part I. Early Warning Systems. **Water Res**, v.14-9, 1980, p.1179–1196. DOI: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(80\)90175-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90175-X).
- CALLAGHAN, N.I.; MACCORMACK, T.J. Ecophysiological perspectives on engineered nanomaterial toxicity in fish and crustaceans. **Comparative Biochemistry and Physiology (C): Toxicology & Pharmacology**, 193, 30-41, 2017. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.12.007>
- CAO, G. Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications. **Imperial College press**, 2004.
- CAO, Z. *et al.* A Novel Mechanism Underlying Multi-walled Carbon Nanotube-Triggered Tomato Lateral Root Formation: the Involvement of Nitric Oxide. **Nanoscale Research Letters**, v.15, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-020-3276-4>.

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.

CARR, L.W.; FAHRIG, L. effect of road traffic on two amphibian species of differing vagility. **Conservation Biology**, v. 15-4, 2001, p. 1071-1078. DOI:https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1046/j.1523-1739.2001.0150041071.x.

CARROLL, R. The origin of amphibians. *In: The rise of amphibians: 365 million years of evolution.* Baltimore: The John Hopkins University Press, 2009. Cap. 3, p. 38-61.

CECCATO E.; *et al.* Early exposure to ultraviolet-B radiation decreases immune function later in life. **Conservation Physiology**, p. 4-1, 2016. DOI: https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1093/conphys/cow037.

CHAI, L.; CHEN, A.; LUO, P.; ZHAO, H.; WANG, H. Histopathological changes and lipid metabolism in the liver of *Bufo gargarizans* tadpoles exposed to Triclosan. **Chemosphere**, v.182, 2017, p.255-266. DOI: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.040

CHAPMAN, P.M. Ecotoxicology and pollution: key issues. **Marine Pollution Bulletin**, v.31-4-12, 1995, p.167-177. DOI: https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00101-R.

CHAPMAN, P.M.. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, 44:1, 7-15, 2002.

CHALASANI, N. *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v.67:1, 2018, p.328-357. DOI: https://doi.org/10.1002/hep.29367.

CHWEIZER, M.; RICHTER, C. Nitric Oxide Potently and Reversibly Deenergizes Mitochondria at Low Oxygen Tension. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.204:1, 1994, p.169-175. DOI: https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2441.

CLARK, M.D.; SUBRAMANIAN, S.; KRISHNAMOORTI, R. Understanding surfactant aided aqueous dispersion of multi-walled carbon nanotubes: **Journal of Colloid and Interface Science**, v.354-1, 2011, p.144-51. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.10.027.

CHAYEN, J.; BITENSKY, L. Bioassays: overview. **Encyclopedia of Analytical Science** (Second Edition), 2005, p.259-265. DOI: https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00041-8.

COSTA, M.J. *et al.* Effects of the organophosphorus pesticide folisuper 600 (methyl parathion) on the heart function of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Braz. J. Biol.** v.75, n.4-1, 2015. DOI: https://doi.org/10.1590/1519-6984.08314.

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.

COELHO, I.P. *et al.* Anuran road-kills neighboring a peri-urban reserve in the Atlantic Forest, Brazil. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 112, p. 17-26, Dec. 2015. Disponível em:https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.07.004. Acesso em: 04 fev. 2020.

COLLINS, J.P. *et al.* Meeting the challenge of amphibian declines with an interdisciplinary research program. *In: LANNON, M. (ed.). Amphibian Declines: the conservation status of United States Species.* Los Angeles: University of California Press, 2005. p. 46-50.

COLLINS, J.P. Amphibian Decline and Extinction: what we know and what we need to learn. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 92, n. 2, p. 93 - 99, 2010. DOI: 10.3354/dao02307.

COLLINS, J.P.; STORFER, A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. **Diversity and Distributions**, v.9-2, 2003, p.89-98. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1046/j.1472-4642.2003.00012.x>.

CRANE, M.; HANDY, R.D.; GARROD, J.; OWEN, R. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. **Ecotoxicology**, 17: 421, 2008. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10646-008-0215-z>.

CRAWSHAW, G.J.; WEINKLE, T.K. Clinical and Pathological Aspects of the Amphibian Liver. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.9, n.3, 2000, p.165-173.

CRISTINO, L.; GUGLIELMOTTI, V.; COTUGNO, A. MUSIO, C.; SANTILLO, S. Nitric oxide signaling pathways at neural level in invertebrates: Functional implications in cnidarians. **Brain Research**, v.1225, 2008, p.17-25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.04.056>.

CUSHMAN, S.A. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. **Biological Conservation**, v. 128-2, p. 231-240, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.031>

DAHL, A.; GHARIBIB, A.; SWIETLICKIB, E.; GUDMUNDSSONA, A.; BOHGARDA, M.; LJUNGMANC, A.; BLOMQVISTD, G.; GUSTAFSSON, M. Traffic-generated emissions of ultrafine particles from pavement-tire interface. **Atmospheric Environment**, 40, 1314–23, 2006. DOI:10.1016/j.atmosenv.2005.10.029.

DAL-MEDICO, S.E. *et al.* Negative impact of a cadmium concentration considered environmentally safe in Brazil on the cardiac performance of bullfrog tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.104, 2014, p.168-174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.003>.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v.10:2, 2018, pp.17. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057.

DANCEY, C.; REIDY, J. Estatística sem matemática para psicologia: Usando SPSS para Windows. Porto Alegre, Artmed. 2006.

DASZAK, P. *et al.* Emerging infectious diseases and amphibian population declines. **Emerging infectious diseases**, v.6, n.5, p.735-748, 1999,

DAVIDSON, C. *et al.* Effects of chytrid and carbaryl exposure on survival, growth and skin peptide defenses in foothill yellow-legged frogs. **Environ. Sci. Technol**, v.41-5, 2007, p.1771–1776. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1021/es0611947>.

DE ROSE *et al.* Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71:3–4, 1999, p.151-160. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00038-0](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00038-0).

DE SOUZA SANTOS, L.R.; FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; BORGES, R.E.; DE OLIVEIRA, C. Effects of Thermal Stress on Hepatic Melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). **Anatomical Record**, 297(5), 2014, p.864-75. DOI: 10.1002/ar.22884.

DEUTSCH, C.A. *et al.* Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105-18, p. 6668-6672, 2008. DOI: doi10.1073pnas.0709472105.

DE VOLDER, M.F.L.; TAWFICK, S.H.; BAUGHMAN, R.H.; HART, A.J. Carbon Nanotubes: present and future commercial applications. **Science**, 339: 6119, 535–39, 2013. DOI: 10.1126/science.1222453.

DI GIULIO, R.T.; NEWMAN, M.C. Ecotoxicology. In: Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. **McGraw Hill Education**, 9.ed., 2019, p.1433-64.

DOCKERY, D.W. et al. An Association between Air Pollution and Mortality in Six U.S. Cities. **N Engl J Med**; 329:1753-1759, 1993.

DONALDSON, K.; STONE, V.; TRAN, C.L.; KREYLING, W.; BORM, P.J.A. Nanotoxicology: A new frontier in particle toxicology relevant to both the workplace and general environment and to consumer safety. **Occup Environ Med**, 61:727–728, 2004.

DRAGIEVA, I.D.; STOYNOV, Z.B.; KLABUNDE, K.J. Synthesis of nanoparticles by borohydride reduction and their applications. **Scripta Materialia**, v.44-8-9, p. 2187-91, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1359-6462\(01\)00901-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6462(01)00901-0).

DUMKOVÁ, J. et al. Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs. **Particle and Fibre Toxicology**, v.14:55, 2017, p.19. DOI: 10.1186/s12989-017-0236-y.

EGEA-SERRANO, A.; RELYEA, R.A.; TEJEDO, M.; TORRALVA, M. Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. **Ecology and Evolution**, v.2-7, 2012, p.1382-97. DOI: Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C.V. Toxicology of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 64: 2, 129-37, 2012.

FAHRIG, L. et al. Effect of road traffic on amphibian density. **Biological Conservation**, v. 73, p. 177-182, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(94\)00102-V](https://doi.org/10.1016/0006-3207(94)00102-V). Acesso em: 04 fev. 2020.

FAN, J. et al. Hemodynamic changes in hepatic sinusoids of hepatic steatosis mice. **World J Gastroenterol**, v.25-11, 2019, p.1355–65. DOI: 10.3748/wjg.v25.i11.1355.

FARINDE, A. Relações dose-resposta. **Manual MDS**: versão para Profissionais de Saúde, 2019

FENOGLIO, C. et al. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60-3, 2005, p.259-268. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.006>.

FERREIRA, A.P.; SANT'ANNA, L.S. A Nanotecnologia e a Questão da sua Regulação no Brasil: Impactos à Saúde e ao Ambiente. **Revista UNIANDRADE**, p. 16-3, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.18024/1519-5694/revuniandrade.v16n3p119-128>.

FRANCO-BELUSSI, L.; CASTRUCCI, A.M.L.; OLIVEIRA, C. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle_4 , D-Phe7- α -melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. **Zoology**, v.116-5, 2013, p.316-324. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.zool.2013.06.003>.

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 & Photobiology Part B: Biology**, v. 180, p. 109-117, 2018.

FRANCO-BELUSSI, L. et al. Hepatotoxicity of the anionic surfactant linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, v.226, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129014>.

FREIXA, A.; ACUÑA, V.; SANCHÍS, J.; FARRÉ, M.; BARCELÓ, D.; SABATER, S. Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms. **Science of the Total Environment**, 619-620, 328-37, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.095>.

FRIEDMAN, S.L.; ROLL, F.J.; BOYLES, J.; BISSELL, D.M. Hepatic lipocytes: The principal collagen-producing cells of normal rat liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V.82, 1985, p. 8681-8685. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.82.24.8681>.

FROST, D.R. *et al.* The Amphibian Tree of Life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 297, p. 257-291, 2006.

FURLOW, J.D.; NEFF, E.S. A developmental switch induced by thyroid hormone: *Xenopus laevis* metamorphosis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, p. 17-2, p. 40-47, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.01.007>.

GAGNÉ, F. *et al.* Health status of *Mya arenaria* bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive period. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.64:3, 2006, p.348-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.04.007>.

GARDNER, S. C. M.; OBERDÖSTER, E. **Toxicology of Reptiles**. 1ª Ed. CRC Press, 2005. 328 p. ISBN: 9780849327155.

GAVRILESCU, M. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, v.32:1, 2015, p.147-56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.01.001>.

GIGAULT, J.; TER HALLE, A.; BAUDRIMONT, M.; PASCAL, P.Y.; GAUFFRE, F.; PHI, T.L.; HADRI, H.E.; GRASSL, B.; REYNAUD, S. Current opinion: What is a nanoplastic? **Environmental Pollution**, 235, 1030-34, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>.

GIUFFRÈS, A. *et al.* On the Mechanism of Inhibition of Cytochrome *c* Oxidase by Nitric Oxide. **Enzymology**, v.271:52, 1996, p.33404-08. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33404>.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, 16:3, 183-190, 1960.

GRATWICKE, B. *et al.* Is the international frog legs trade a potential vector for deadly amphibian pathogens? **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.8-8, 2009, p.438-442. DOI: <https://doi.org/10.1890/090111>.

GREUTER, T.; SHAH, V.H. Hepatic sinusoids in liver injury, inflammation, and fibrosis: new pathophysiological insights. **J. Gastroenterol**, v.51:6, 2016, p. 511-9. DOI: 10.1007/s00535-016-1190-4.

GRUBER, D. Biological Monitoring and Our Water resources. **Endesavour**. 13(3), 1989.

GUIDA, G; MAIDA, I.; GALLONE, A.; BOFFOLI, D.; CICERO, R. Ultrastructural and functional study of the liver pigment cells from *Rana esculenta* L. **In Vitro Cell. Dev. Biol.- Animal**, v.34, 1998, p.393-400.

GUO, J. *et al.* H₂S inhalation-induced energy metabolism disturbance is involved in LPS mediated hepatocyte apoptosis through mitochondrial pathway. **Science of The Total Environment**, v.663, 2019, p.380-386. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.360>.

GUTIERRE, R.C.; JARED, C.; ANTONIAZZI, M.M. *et al.* Melanomacrophage functions in the liver of the caecilian *Siphonops annulatus*. **J. Anat.**, v.232, 2018, p.497-508. DOI: 10.1111/joa.12757.

HADDAD, C. F. B. Uma análise da lista brasileira de anfíbios ameaçados de extinção: In: MACHADO, A.B.M., DRUMMOND, G.M., PAGLIA, A.P. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. 1 ed. Brasília: Fundação Biodiversitas, 1420 p. 2008. p.287.

HADDAD, C.F.B.; PRADO, C.P.A. reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the atlantic forest of brazil. **BioScience**, v. 55-3, p.207-217, 2005. DOI: 10.1641/0006-3568(2005)055[0207:RMIFAT]2.0.CO;2.

- HALL, A.P. *et al.* Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse and non-adverse) changes--conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. **Toxicologic Pathology**, v.40, 2012, p.971-994. DOI: 10.1177/0192623312448935.
- HAYES, T.B; FALSO, P.; GALLIPEAU, S.; STICE, M. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **Journal of Experimental Biology**, 213, 921–933, 2010. DOI: 10.1242/jeb.040865.
- HANDY, R.D.; AL-BAIRUTY, G.; AL-JUBORY, A.; RAMSDEN, C.S.; BOYLE, D.; SHAW, B.J.; HENRY, T.B. Effects of manufactured nanomaterials on fishes: a target organ and body systems physiology approach. **J. Fish Biology**, 79: 4, 821-53, 2011. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1095-8649.2011.03080.x>.
- HANDY, R.D.; RUNNALLS, T.; RUSSELL, P.M. Histopathologic Biomarkers in Three Spined Sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from Several Rivers in Southern England that Meet the Freshwater Fisheries Directive. **Ecotoxicology**, 11, 467-79, 2002.
- HANLON, S.M.; PARRIS, M.J. The interactive effects of chytrid fungus, pesticides, and exposure timing on gray treefrog (*Hyla versicolor*) larvae. **Environmental Toxicology**, v. 33-1, 2014, p.216-222. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1002/etc.2419>.
- HANSEN, S.F.; JENSEN, K.A.; BAUN, A. NanoRiskCat: a conceptual tool for categorization and communication of exposure potentials and hazards of nanomaterials in consumer products. **Journal of Nanoparticle Research**, 16:2195, 2014. DOI: 10.1007/s11051-013-2195-z.
- HANUS, M.J.; HARRIS, A. Nanotechnology innovations for the construction industry. Progress in Materials **Science**, 58:7, 1056-1102, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2013.04.001>
- HE, X.; AKER, W.G.; LESZCZYNSKI, J.; HWANG, H.M. Using a holistic approach to assess the impact of engineered nanomaterials inducing toxicity in aquatic systems. **J. food and Drug Analysis**, 22, 128-46, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.011>.
- HELMER, P.J.; WHITESIDE, D.P. Amphibian Anatomy and Physiology. In: O'MALLEY, B. **Clinical Anatomy and Physiology of Exotic Species: Structure and function of mammals, birds, reptiles and amphibians**, 1.ed., 2005, p.5-16. DOI: 10.1016/B978-070202782-6.50004-1.
- HERRERRA-HERRERRA, A.V.; GONZÁLEZ-CURBELO, M.A.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRIGUEZ-DELGADO, M.A. Carbon nanotubes applications in separation science: A review. **Analytica Chimica Acta**, 734, 1-30, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.04.035>.
- HESS, J.D. Environmental Reform Organizations and Undone Science in the United States: Exploring the Environmental, Health, and Safety Implications of Nanotechnology. **Science as Culture**, 19:2, 181-214, 2010.
- HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **J Food Sci.**, 75: 1, 50–7, 2010. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01457.x.
- HUDSON, M.F.; SMITH, K.M. Bile pigments. **Chemical Society Reviews**, v.4-3, 1975, p.363-399. DOI: 10.1039/cs9750400363.
- HULLA, J.E.; SAHU, S.C.; HAYES, A.W. Nanotechnology: history and future. Human and Exp. **Toxicology**, 34:12, 1318-21, 2015.
- IMHOF, D.; WEINGARTNER, E.; ORDÓÑEZ, C.; GEHRIG, R.; HILL, M.; BUCHMANN, B. BALTENSBERGER, U. Real-World Emission Factors of Fine and Ultrafine Aerosol Particles for Different Traffic Situations in Switzerland. **Environ. Sci. Technol.**, 39, 8341-50, 2005. DOI: 10.1021/es048925s.

IRAZUSTA, S. P. *et al.* Estresse 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.

ISHIZUYA-OKA, A.; SHI, YB. Molecular mechanisms for thyroid hormone-induced remodeling in the amphibian digestive tract: A model for studying organ regeneration. **Development, growth and differentiation**, v. 47-9, p. 601-607, 2005. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1440-169X.2005.00833.x>

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS). **ISO 22412:2017**, 2.ed., 2017, pp.34.

IUCN (INTERNATIONAL UNION for CONSERVATION of NATURE). The IUCN red list of threatened species. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 30/01/2020.

IWAKIRI, Y.; KIM, M.Y. Nitric oxide in liver diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.36:8, 2015, p.524-536. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.05.001>.

JACKSON, P.; JACOBSEN, N.R.; BAUN, A.; BIRKEDAL, R.; KÜHNEL, D.; JENSEN, K.A.; VOGEL, U.; WALLIN, H. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. **Chemistry Central Journal**, 7:154, 2013.

JAIN, A.; RANJAN, S.; DASGUPTA, N.; RAMALINGAM, C. Nanomaterials in food and agriculture: An overview on their safety concerns and regulatory issues. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 58:2, 297-317, 2018. DOI:10.1080/10408398.2016.1160363

JAMES, T.Y.; TOLEDO, L.F.; RÖDDER, D. *et al.* Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. **Ecology and Evolution**, v.5-18, 4079–4097, 2015. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ece3.1672>.

JARMAN, W.M.; BALLSCHMITER, K. From coal to DDT: the history of the development of the pesticide DDT from synthetic dyes till Silent Spring. **Endeavour**, v.36-4, 2012, p. 131-142. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2012.10.003>.

JONES, A.L.; SCHMUCKER, D.L.; RENSTON, R.H.; MURAKAMI, T. The architecture of bile secretion. **Digestive Diseases and Sciences**, vol. 25-8, 1980, p.609-629. DOI: 10.1007/bf01318875.

JONES-COSTA, M.J. *et al.* 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**, v.151, p.184-190, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.022>.

JORDANOVA, D.; GODDU, S.R.; KOTSEV, T.; JORDANOVA, N. Industrial contamination of alluvial soils near Fe–Pb mining site revealed by magnetic and geochemical studies. **Geoderma**, v. 192, 2013, p. 237-248. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.07.004>.

JU, Z.; YA, J. LI, X.; WANG, H.; ZHAO, H. The effects of chronic cadmium exposure on *Bufo gargarizans* larvae: Histopathological impairment, gene expression alteration and fatty acid metabolism disorder in the liver. **Aquatic Toxicology**, v.222, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105470>.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Pele e anexo. In:____. **Histologia Básica**. 10 ed.: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 359-70, 2004.

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.

KAI TEE, J.; YANG NG, L.; YUN KOH, H.; LEONG, D.T.; KIAT HO, H. Titanium Dioxide Nanoparticles Enhance Leakiness and Drug Permeability in Primary Human Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v.20:1, 2018, pp.18. DOI: 10.3390/ijms20010035.

KALANTARI, H. Nanotoxicology. Jundishapur **J Nat Pharm Prod**, 8:1, 1–2, 2013.

KANE, A.B.; HURT, R.H. Nanotoxicology: the asbestos analogy revisited. **Nat. Nanotechnol.**, 3, 378-9, 2008.

KARDONG, K.V. Integument. In: ___ **Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution**. 8 ed.: McGraw-Hill Education, 212-40, 2019

KHALIQ, N.U. *et al.* Pluronic: Intelligent building units for targeted cancer therapy and molecular imaging. **International Journal of Pharmaceutics**, v.556, 2019, p.30-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.064>.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.

KHARE, R.A.; RUPESH A. KHARE ARUP R. BHATTACHARYYA, A.R.; PANWAR, A.S; BOSE, S.; KULKARNI, A.R. Dispersion of multiwall carbon nanotubes in blends of polypropylene and acrylonitrile butadiene styrene: **Polymer engineering and science** v.51-9, 2011, p.1891-1905. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1002/pen.21985>.

KLAINE, S.J.; ALVAREZ, P.J.J.; BATLEY, G.E.; FERNANDES, T.F.; HANDY, R.D.; LYON, D.Y.; MAHENDRA, S.; MCLAUGHLIN, M.J.; LEAD, J.R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects. SETAC PRESS: **Environmental Toxicology and Chemistry**, 27:9, 1825–51, 2008. DOI: 10.1897/08-090.1.

KENDALL, R.J. *et al.* Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology. In: KLAASSEN, C.D. **Toxicology: the basic science of poisons**. McGraw-Hill, 5 ed. 883-906, 1996.

KIESECKER, J.M.; BLAUSTEIN, A.R.; BELDEN, L.K. Complex causes of amphibian population declines. **Nature**, v. 410, p.681-683, 2001.

KITTELSON, D.B.; WATTS, W.F.; JOHNSON, J.P. Nanoparticle emissions on Minnesota highways. **Atmospheric Environment**, 38, 9–19, 2004. DOI:10.1016/j.atmosenv.2003.09.037.

KOZLOVA, O.; ZWINDERMAN, M.; CHRISTOF, N. A new short-term toxicity assay using *Aspergillus awamori* with recombinant aequorin gene. **BMC Microbiology**, v.5, n.40, 2005.

KRISHNAMOORTI, R. Strategies for Dispersing Nanoparticles in Polymers: **MRS Bulletin**, v.32, 2007, p.341-7.

KUEMPEL, E.D.; JAURAND, M.C.; MØLLER, P.; MORIMOTO, Y; KOBAYASHI, N.; PINKERTON, K.; SARGENT, L.; VERMEULEN, R. C.; FUBINI, B.; KANE, A. B. Evaluating the mechanistic evidence and key data gaps in assessing the potential carcinogenicity of carbon nanotubes and nanofibers in humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 47:1, 1-58, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10408444.2016.1206061>.

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.

LAZZARETTI, L.L.; HUPFFER, H.M. Nanotecnologia e sua regulamentação no Brasil. **Revista Gestão e Desenvolvimento**, v. 16, n. 3, p. 153, 2019. DOI: <https://doi.org/10.25112/rgd.v16i3.1792>.

LAUTT, W.W.; GREENWAY, C.V. Conceptual review of the hepatic vascular bed. **Am. Assoc. for the Study of Liver Diseases**, USA, v. 7, n. 5, p. 952-963, 1987.

LEARY, C.J. *et al.* Assessing the links among environmental contaminants, endocrinology, and parasites to understand amphibian declines in montane regions of Costa Rica. **PlosONE**, v.13-1, 2018.

LEE, J.W.; CHOI, Y.C.; KIM, R.; KYU LEE, S. Multiwall Carbon Nanotube-Induced Apoptosis and Antioxidant Gene Expression in the Gills, Liver, and Intestine of *Oryzias latipes*. **BioMed Research International**, 2015, pp.10. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/485343>.

LINDER, G. *et al.* Physiological ecology of amphibians and reptiles: In: SPARLING, D.W.; *et al.* Ecotoxicology of Amphibians And Reptiles. 2 ed. Florida. USA: **Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)**, 2010. p. 105.

LIU, Y.; FU, S.; LIN, L.; CAO, Y.; XIE, X.; YU, H.; CHEN, M.; LI, H. Redox-sensitive Pluronic F127-tocopherol micelles: synthesis, characterization, and cytotoxicity evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, 2017, p.2635-44. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S122746>.

LU, H.; STRATTON, C.W.; TANG, Y.W. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in wuhan China: the mystery and the miracle. **Journal of Medical Virology**, 92-4, p. 401-402, 2020. DOI: 10.1002/jmv.25678

MAGNUSSON, G.; OLSSON, T.; NYBERG, J.A. Toxicity of pluronic F-68. **Toxicology Letters**, v.30:3, 1986, p.203-7. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(86\)90156-6](https://doi.org/10.1016/0378-4274(86)90156-6).

MANIATIS, G.M.; INGRAM, V.M. Erythropoiesis during amphibian metamorphosis. **The journal of cell biology**, v.49, 1971, p.372-379.

MANKE, A.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. **BioMed Research International**, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/942916>

MARIN, J.J.G. Physiology of bile secretion. **World J. Gastroenterol.**, v.14-37, 2008, 5641-5649. DOI: doi:10.3748/wjg.l4.5641.

MARONGIU, F. *et al.* Hyperplasia vs hypertrophy in tissue regeneration after extensive liver resection. **World J Gastroenterol**, v.23:10, 2017, p.1764–70. DOI: 10.3748/wjg.v23.i10.1764.

MASARONE, M. *et al.* Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2018, pp.14. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/9547613>.

MCCOY, K.A.; PERALTA, A.L. Pesticides could alter amphibian skin microbiomes and the effects of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Front. Microbiol**, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00748>.

MCDIARMID, W.R.; ALTIG, R. The Tadpole Arena: In: MCDIARMID, W.R.; ALTIG, R. **Tadpoles**, The Biology of Anuran Larvae. 1 ed. [S.L.]: University of Chicago Press, 1999, p.458.

MCMAHON, T. *et al.* The fungicide chlorothalonil is nonlinearly associated with corticosterone levels, immunity, and mortality in amphibians. **Environmental Health Perspectives**, v.119:8, 2011, p.1098-103.

MÉHN, D.; FONSECA, A.; BISTER, G.; NAGY, J.B. A comparison of different preparation methods of Fe/Mo/Al₂O₃ sol-gel catalyst for synthesis of single wall carbon nanotubes. **Chemical Physics Letters**, v.393-4/6, 2004, p.378-384. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.06.071>.

MEIER, P.J.; STIEGER, B. Bile salt transporters. **Annu. Rev. Physiol**, n. 64, p. 635–661, 2002. DOI: 10.1146/annurev.physiol.64.082201.100300.

- MENDONZA, R.P.; BROWN, J.M. Engineered nanomaterials and oxidative stress: Current understanding and future challenges. **Current Opinion in Toxicology**, 14, 74-80, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.09.001>
- 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](https://doi.org/10.1002/jbm.a.34040).
- MITCHELL, T.; ALTON, L.A.; WHITE, C.R.; FRANKLIN, C.E. Relations between conspecific density and effects of ultraviolet-b radiation on tadpole size in the striped marsh frog. **Conservation Biology**, v. 26-6, p. 1112-1120, 2012. DOI: <https://doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1523-1739.2012.01906.x>.
- MIYAOKA, Y. *et al.* Hypertrophy and Unconventional Cell Division of Hepatocytes Underlie Liver Regeneration. **Current Biology**, v.22:13, 2012, p.1166-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.016>.
- MO, J. *et al.* A review on agro-industrial waste (AIW) derived adsorbents for water and wastewater treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 227, 2018, p. 395-405. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.069>.
- MONASTERSKY R. 2014. Life: A Status Report. **Nature**, 516:7530, 158-61, 2014. DOI: [10.1038/516158a](https://doi.org/10.1038/516158a).
- MOORE, M.N.; SIMPSON, M.G. Molecular and cellular pathology in environmental impact assessment. **Aquatic Toxicology**, v.22-4, 1992, p.313-22. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90047-Q](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90047-Q).
- MORELL, V. Are Pathogens Felling Frogs? **Science**, v.284-5415, p.728-731, 1999. DOI: [10.1126/science.284.5415.728](https://doi.org/10.1126/science.284.5415.728).
- MORRISON, C.; HERO, JM. Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. **Journal of animal ecology**, v. 72-2, p. 270-279, 2003. DOI: <https://doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1046/j.1365-2656.2003.00696.x>.
- MOUCHET, F.; LANDOIS, P.; FLAHAUT, E.; PINELLI, E.; GAUTHIER, L. Assessment of the potential in vivo ecotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes (DWNTs) in water, using the amphibian *Ambystoma mexicanum*. **Nanotoxicology**, 1, 149-56, 2007. DOI: [10.1080/17435390701556080](https://doi.org/10.1080/17435390701556080).
- 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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.01.011).
- MUDALIGE, T. *et al.* Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. In: RUBIO, A.L.; ROVIRA, M.J.F.; SANZ, M.M.; GÓMEZ-MASCARAQUE. **Nanomaterials for Food Applications**, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1.ed., 2019.
- MURPHY, J.E.; PHILLIPS, C.A.; BEASLEY, V.R. Aspects of Amphibian Ecology. In: _____. **Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles**, SETAC PRESS, Pensacola, Florida, USA, 1st. ed., 141-78, 2000.
- MURR, L.E.; SOTO, K.F. TEM comparison of chrysotile (asbestos) nanotubes and carbon nanotubes. **Journal of Materials Science**, 39:15, 4941-7, 2004. DOI: [doi-
Org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1023/B:JMSC.0000035342.99587.96](https://doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1023/B:JMSC.0000035342.99587.96).

MURTY, B.S.; SHANKAR, P.; RAJ, B.; RATH, B.B.; MURDAY, J. The big world of Nanomaterials. In:____. **Text book of Nanoscience and Nanotechnology**. Springer Universities Press, India, 1-28, 2013.

NAGY, P.; THORGEIRSSON, S.S.; GRISHAM, J.W. Organizational principles of the liver. In: ARIAS, I.M. *et al.* (ed.). **The liver: biology and pathobiology**, UK: John Wiley & Sons Ltd, 6. Ed., p. 3-13, 2020.

NATIONS, S. *et al.* Acute effects of Fe₂O₃, TiO₂, ZnO and CuO nanomaterials on *Xenopus laevis*. **Chemosphere**, v.83-8, 2011, p.1053-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.061>.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS). Principles for Evaluating Chemicals in the Environment. **National Academy Press**: Washington, DC, 1975.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIH). Cancer and Nanotechnology. **National Cancer Institute**: division of Cancer Treatment & Diagnosis, USA.gov, 2015. Disponível em: <https://www.cancer.gov/nano/research/plan>. Acesso em: 19/11/2019.

NOWAKOWSKI, J.A.; *et al.* Tropical amphibians in shifting thermal landscapes under land-use and climate change. **Conservation Biology**, v.31-1, p. 96-105, 2016. DOI: 10.1111/cobi.12769.

NRC. Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. **Environ. Health Perspect**, [S.L], v. 74, p. 3-9, out. 1987.

OBERDÖRSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **J. of Internal Medicine**, 267:1, 89-105, 2009.

OLIVEIRA, C.R. *et al.* Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, p. 149, 2016.

OLIVEIRA, C.R. *et al.* Pyrethrum extract encapsulated in nanoparticles: toxicity studies based on genotoxic and hematological effects in bullfrog tadpoles. **Environmental Pollution**, v. 253, p. 1009-1020, 2019.

OKUI, T. (2013) Quantification and localization of erythropoietin-receptor-expressing cells in the liver of *Xenopus laevis*. **Cell Tissue**, v.353, p.153–164.

OWEN, R.; DEPLEDGE, M. Nanotechnology and the environment: Risks and rewards. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50-6, p. 609-612, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.05.001>.

PAHKALA, M.; LAURILA, A.; MERILÄ, J. Carry-over effects of ultraviolet -B radiation on larval fitness in *Rana temporaria*. **Proceedings of Biological Sciences**, v. 26-1477, p.1699-706, 2001. DOI: 10.1098/rspb.2001.1725.

PAIK, W.K; COHEN, P.P. Biochemical studies on amphibian metamorphosis: I. The effect of thyroxine on protein synthesis in the tadpole, **J. Gen. Physiol.**, v.43, 1960, p. 683-696.

PARIVAR, K.; FARD, F.M.; BAYAT, M.; ALAVIAN, S.M.; MOTAVAF, M. Evaluation of Iron Oxide Nanoparticles Toxicity on Liver Cells of BALB/c Rats. **Iran Red Crescent Med J.**, v.18:1, 2019. DOI: 10.5812/ircmj.28939.

PEAKALL, D.B. The role of biomarkers in environmental assessment (1). **Introduction. Ecotoxicology**. 3, 157-60, 1994.

PEARSE; A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied**. London: Jet. Churchill Ltda, 1960.

PECHMANN, J.H.K. *et al.* Declining amphibian populations: the problem of separating human impacts from natural fluctuations. **Science**, v. 253, 1991, p. 892-895.

PETERSEN, E.J.; ZHANG, L.; Mattison, N.T.; O'Carroll, D.M.; Whelton, A.J.; Uddin N.; NGUYEN, T.; HUANG, Q.; HENRY, T.B.; HOLBROOK, R.D.; CHEN, K.L. Potential release pathways, environmental fate, and ecological risks of carbon nanotubes. **Environmental Science Technology**, 45: 23, 9837-56, 2011. DOI: <https://doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1021/es201579y>.

PIMENTA, B.V.S.; HADDAD, C.F.B.; NASCIMENTO, L.B.; CRUZ, C.A.G.; POMBAL JR., P.B. Comment on "status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide". **Science**, v. 309-5743, 2005, p. 1999. DOI: 10.1126/science.1112996.

PHILIP, J.M.; ARAVIND, U.K.; ARAVINDAKUMARAC, C.T. Emerging contaminants in Indian environmental matrices – A review. **Chemosphere**, v. 190, 2018, p. 307-326. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.120>.

POUNDS, J.A.; FOGDEN, M.P.L.; CAMPBELL, J.H. Biological response to climate change on a tropical mountain. **Nature**, v. 398-6728, p. 611-616, 1999. DOI: 10.1038/19297.

PRASEK, J. *et al.* Methods for carbon nanotubes synthesis—review. **J. Materials Chemistry**, 21, 15872-84, 2011.

PRESTON, B.L. Indirect Effects in Aquatic Ecotoxicology: Implications for Ecological Risk Assessment. **Environmental Management**, v.29, n.3, p.311–323. DOI: 10.1007/s00267-001-0023-1.

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.

QUARANTA, A. *et al.*, Why Amphibians Are More Sensitive than Mammals to Xenobiotics (Pig and Frog Skin Permeability). **PLoS ONE**: v.4:11, 2009, p.7699.

RANI, H.P.; SHEU, T.W.H.; CHANG, T.M.; LIANG, P.C. Numerical investigation of non-Newtonian microcirculatory blood flow in hepatic lobule. **Journal of Biomechanics**, v.39-3, 2006, p.551-563.

RAUSCHER, H; ROEBBEN, G. Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term "nanomaterial" Part 1: Compilation of information concerning the experience with the definition. **European Commission**, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Juan-RiegoSintes/publication/267594322_Towards_a_review_of_the_EC_Recommendation_for_a_definition_of_the_term_nanomaterial_Part_1_Compilation_of_the_information_concerning_the_experience_with_the_definition/links/545778be0cf2bccc490fcc03/Towards-a-review-of-the-EC-Recommendation-for-a-definition-of-the-term-nanomaterial-Part-1-Compilation-of-the-information-concerning-the-experience-with-the-definition.pdf. Acesso em: 27/10/2020.

RAUSCHER, H; RASMUSSEN, K.; SOKULL-KLÜTTGEN, B. Regulatory Aspects of Nanomaterials in the EU. **Workshop on Nanosafety and Nanotoxicology**, Hannover, October 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/cite.201600076>.

REDDY, A.R.N.; KRISHNA, D.R.; REDDY, Y.N.; HIMABINDU, V. Translocation and extra pulmonary toxicities of multi wall carbon nanotubes in rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, 20:5, 267–272, 2010. DOI: 10.3109/15376516.2010.484077.

REHMAN, M.S.U. *et al.* Global risk of pharmaceutical contamination from highly populated developing countries. **Chemosphere**, v. 138, 2015, p. 1045-1055. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.036>.

RESHETNYAK, V.I. Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. **World J. Gastroenterol.**, v.19-42, 2013, p.7341-7360. DOI: 10.3748/wjg.v19.i42.7341.

RIDGE, S.J. A regulatory framework for nanotechnology. Thesis - **Naval Postgraduate School Monterey**, CA, 2018, p.135.

RISSOLI, R. Z.; ABDALLA, F. C.; COSTA, M. J.; RANTIN, F. T.; MCKENZIED. 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.

ROCCO, M.C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, 14:3, 337-46, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00068-5).

ROTH, R.A.; JAESCHKE, H.; LUYENDYK, J.P. Toxic Responses of the Liver. In: KLAASSEN, C. **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**, McGraw-Hill Education, 9.ed., 2018, p.719-66.

ROTHAN, H.A.; BYRAREDDY, S.N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. **Journal of Autoimmunity**, v. 109, p. 102433, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102433>.

ROTMAN, Y.; KAPURIA, D. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Mechanisms and Treatment. In: ARIAS, I.M. *et al.* (ed.). **The liver: biology and pathobiology**, UK: John Wiley & Sons Ltd, 6. Ed., p. 670-681, 2020.

SADIK, O.A. Anthropogenic Nanoparticles in the Environment. **Environmental Science: Processes & Impacts**, 15, 19-20, 2013. DOI: 10.1039/c2em90063g.

SALLA, R. F.; *et al.* Cardiac adaptations of bullfrog tadpoles in response to chytrid infection. **Journal of Experimental Zoology Part A Ecological and Genetics Physiology**, v. 323, p. 487 – 496, 2015.

SALLA, R. F.; *et al.* Novel findings on the impact of chytridiomycosis on the cardiac function of anurans: sensitive vs. tolerant species. **Peer Journal**, v. 6, p. 5891, 2018.

SATYANARAYANA; T.S.V.; RATHIKA, R. Nanotechnology: The future. **Journal of Interdisciplinary Dentistry**, v.1:2, 2011, p.93.

SAXENA, R.; THEISE, N. Canals of heping: recent insights and current knowledge. **Semin. Liver Dis.**, v.24-1, 2004, p.43-48. DOI: 10.1055/s-2004-823100.

SAYED, A.H.; YOUNES, H.A.M. Melanomacrophage centers in *Clarias gariepinus* as an immunological biomarker for toxicity of silver nanoparticles. **J Microsc Ultrastruct**, v.5:2, 2016, P.97–104. DOI: 10.1016/j.jmau.2016.07.003.

SAYES, C.M.; WARHEIT, D.B. Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, 1:6, 660-70, 2009.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, SØRENSEN *et al.*, 2012v.8, n.15, 2014, p.

SCHLAEPFER, M.A.; HOOVER, C.; DODD JR., C.K. Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. **BioScience**, v. 55-3, p.256-264, 2005.

SETERNES, T.; SØRENSEN, K; SMEDSRØD, B. Scavenger endothelial cells of vertebrates: A nonperipheral leukocyte system for high-capacity elimination of waste macromolecules. **PNAS**, v.99-11, 2002, 7594-7597. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1073/pnas.102173299>.

SETYAWATI, M.I. *et al.* Titanium dioxide nanomaterials cause endothelial cell leakiness by disrupting the homophilic interaction of VE-cadherin. **Nature Communications**, v.4, 2013, p.1673. DOI: 10.1038/ncomms2655.

SHAMSI, S.; ALAGAN, A.A.; SARCHIO, S.N.E.; YASIN, F.M. Synthesis, Characterization, and Toxicity Assessment of Pluronic F127-Functionalized Graphene Oxide on the Embryonic Development of Zebrafish (*Danio rerio*): **International Journal of Nanomedicine**, v.15, 2020, p. 8311-8329. DOI <https://doi.org/10.2147/IJN.S271159>.

SKELLY, D.K. microgeographic countergradient variation in the wood frog, *Rana sylvatica*. **Evolution**, v. 58-1, 2004, p. 160–165.

SLABY, S; MARIN, M.; MARCHAND, G.; LEMIERE, S. Exposures to chemical contaminants: what can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? **Environmental Pollution**, 248, 478-95, 2019. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.02.014.

SLITT, A.L. Absorption, distribution, and excretion of toxicants. *In*: KLAASSEN, C.D. **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**, McGraw-Hill Education, 9.ed., 2018, p.159-92.

SMITH, B. How is Nanotechnology Regulated? **AzoNano**, 2018 disponível em: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=4993>. Acesso em: 15/09/2020.

SMITH, K.F.; SAX, D.F.; LAFFERTY, K.D. Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. **Conservation Biology**, v.20-5, 2006, p.1349-1957. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1523-1739.2006.00524.x>.

SØRENSEN, K.K.; MCCOURT, P.; BERG, T. *et al.* The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.303-12, 2012, p.1217-1230. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00686.2011>.

SØRENSEN, K.K.; SMEDSRØD, B. The liver sinusoidal endothelial cell: basic biology and pathobiology. *In*: ARIAS, I.M. *et al.* (ed.). **The liver: biology and pathobiology**, UK: John Wiley & Sons Ltd, 6. Ed., p. 3-13, 2020.

SPARLING, D.W. What is Ecotoxicology? *In*:____. **Basics of Ecotoxicology**. Taylor & Francis, CRC Press, 2017, 1 ed., 3-10.

SPARLING, D.W.; BISHOP, C.A.; LINDER, G. The Current Status of Amphibians and Reptile Ecotoxicological Research. *In*:____. **Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles**, SETAC PRESS, Pensacola, Florida, USA, 1st. ed., 1-13, 2000.

SPEED, D. *et al.* Physical, chemical, and in vitro toxicological characterization of nanoparticles in chemical mechanical planarization suspensions used in the semiconductor industry: towards environmental health and safety assessments. **Environ. Sci.: Nano**, v.2:3, 2015, p.227-244. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1039/C5EN00046G>.

STASINAKIS, S.A. *et al.* Occurrence of endocrine disrupters and selected pharmaceuticals in Aisonas River (Greece) and environmental risk assessment using hazard indexes. **Environmental Science and Pollution Research**, v.19:5, 2012, p.1574-83. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1039/C6EN00575F>.

STEINEL, N.C.; BOLNICK, D.I. Melanomacrophage Centers As a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms. **Front Immunol.**, v.8:827, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00827.

STELLA, G.M. Carbon nanotube and pleural damage: perspectives of nanosafety in light of asbestos experience. **Biointerphases**, 6:2, 1-17, 2011. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1116/1.3582324>.

STUART, S.N. *et al.* Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306-5702, p. 1783–1786, 2004.

TEACHER, A.G.F.; CUNNINGHAM, A. A.; GARNER, T. W. J. Assessing the long-term impact of ranavirus infection in wild common frog populations. **Animal Conservation**, v.13-5, p.514-522, 2010. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1469-1795.2010.00373.x>.

THE ROYAL SOCIETY & THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. **Nanoscience and nanotechnologies**, Clyvedon Press: Cardiff, UK, 2004.

THIRUVENGADAM, M.; RAJAKUMAR, G.; CHUNG, III-MIN. Nanotechnology: current uses and future applications in the food industry, **Biotech**, 8:1, 74, 2018. Doi: 10.1007/s13205-018-1104-7.

THOMAS, L.M. *et al.* Contaminants of emerging concern in tributaries to the Laurentian Great Lakes: II. Biological consequences of exposure. **Plos One**, v.12-9, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0184725.

THOMÉ, A.; REDDY, K.R.; REGINATTO, C.; CECCHIN, I. Review of Nanotechnology for Soil and Groundwater Remediation: Brazilian Perspectives. **Water, Air, & Soil Pollution**, 226:121, 2015, p.1-20. DOI: 10.1007/s11270-014-2243-z.

THOMPSON *et al.* Differential uptake of gold nanoparticles by 2 species of tadpole, the wood frog (*Lithobates sylvaticus*) and the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.36-12, 2018, p.3351-58. DOI: [https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1002/etc.3909](https://doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1002/etc.3909).

TIAN, L.; LAWRENCE, D.A. Metal-Induced Modulation of Nitric Oxide Production in *Vitro* Murine Macrophages: Lead, Nickel, and Cobalt Utilize Different Mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.141:2, 1996, p.540-547. DOI: <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0320>.

TOMA, H.E. Nanotecnologia Molecular: materiais e dispositivos. **Química Conceitual**, Blucher, v.6, 1.ed., 2016.

TRAVIS, D.A.; WATSON, R.P. The spread of pathogens through trade in wildlife. **Revue scientifique et technique**, 30-1, p. 219-239, 2011.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.1-2, 1997, p.151-173. DOI: [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(77\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0147-6513(77)90033-1).

TURRIAGO, J.L.; PARRA, C.A.; BERNAL, M.H. Upper thermal tolerance in anuran embryos and tadpoles at constant and variable peak temperatures. **Canadian Journal of Zoology**, v. 93, 2015, 267-272. DOI: <dx.doi.org/10.1139/cjz-2014-0254>.

VAISMAN, L.; WAGNER, H.D.; MAROM, G. The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes: **Advances in Colloid and Interface Science**, 128-130, 2006, p.37-46. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.007>.

VANCE, M.E.; KUIKEN, T.; VEJERANO, E.P.; MCGINNIS, S.P.; HOCELLA, M.F.; REJESKI, D.; HULL, M.S. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Journal of Nanotechnology**, 6, 1769-80, 2015. DOI: 10.3762/bjnano.6.181.

VENTURINO, A. *et al.* Biomarkers of effect in toads and frogs. **Biomarkers**, [S.L], 8:3, 167-86, 2003.

VESTERDAL, L.K. *et al.* Accumulation of lipids and oxidatively damaged DNA in hepatocytes exposed to particles. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.274:2, 2014, p.350-360. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.10.001>.

VIDAL, F.A.P.; *et al.* Metamorphic acceleration following the exposure to lithium and selenium on American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 207, p. 111101, 2021.

VIERTEL, B.; RICHTER, S. Anatomy: viscera and endocrines. In: McDIARMID, R.W.; ALTIG, R. (Eds.). **Tadpoles: the biology of anuran larvae**. The University of Chicago Press, Chicago, 444, 1999.

VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. Tetrapod Relationships and Evolutionary Systematics. In: **Herpetology: an introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. 4 ed. Elsevier: Academic Press, p.3-34, 2014.

VON DER KAMMER, F. *et al.* Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): general considerations and conceptual case studies. **Environmental Toxicology and Chemistry - Special Issue: Nanomaterials in the Environment**, v.31-1, 2012, p.32-49.

VREDENBURG, V.T.; KNAPP, R.A.; TUNSTALL, T.S.; BRIGGS, C.J. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. **PNAS**, v.107-21, 2010, p.9689-94. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1073/pnas.0914111107>.

WAKE, K. perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin a-storing cells in extrahepatic organs. **Int. Rev. Cytology**, v.66, 1980, p.303-353. DOI: 10.1016/s0074-7696(08)61977-4.

WAKE, D.B.; KOO, M.S. Amphibians. **Primer**, v.28-21, 2018, p.1237-41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.028>.

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 of The USA**, 105:1, 11466-73, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0801921105.

WALLACE, A.D.; MEYER, S.A. Hepatotoxicity. In: HODGSON, E. A textbook of modern toxicology. **John Wiley & Sons inc.**, New Jersey, 4.ed., 2010, p. 277-290.

WALTERS, C.; POOL, E.; SOMERSET, V. Nanotoxicology: A Review In: LARRAMENDY, M.L.; SOLONESKI, S. **Toxicology - New Aspects to This Scientific Conundrum**, InTech: Croatia, 2016, p.45-64.

WANG, J.M. *et al.* IRE1 α prevents hepatic steatosis by processing and promoting the degradation of select microRNAs. **Science Signaling**, v.11:530, 2018. DOI: 10.1126/scisignal.aao4617.

WEIBEL, E.R.; STAUBLI, W.; GNAGI, H.R.; HESS, F.A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. **J Cell Biol**,42, 1969,:68–90.

WEIR, A. *et al.* Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 2242-2250, 2012. DOI: [dx.doi.org/10.1021/es204168d](https://doi.org/10.1021/es204168d).

WEXLER, P.; HAYES, A.N. The evolving journey of toxicology: a historical glimpse. In: KLAASSEN, C.D. **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**, McGraw-Hill Education, 9.ed., 2019, p. 3-24.

WHITFIELD, J. Vital signs. **Nature**, 411, 2001.

WHITMAN, L.; KALIL, T. A Call for Nanotechnology-Inspired Grand Challenges. **Office of Science and Technology Policy**, 2015. Disponível em: <https://obamawhitehouse.archives.gov/blog/2015/06/17/call-nanotechnology-inspired-grand-challenges>. Acesso em: 02/12/2019.

WHO Regional Office for Europe. Guiding principles for the use of biological markers in the assessment of human exposure to environmental factors: an integrative approach of epidemiology and toxicology. **Toxicology**. 101, 1-10, 1995.

YOSHIDA *et al.* Basic principles of interpretation of hepatocellular hypertrophy in risk assessment in Japan. **Food Hygiene and Safety Science**, v.56:2, 2015, p.42-48. DOI: 10.3358/shokueishi.56.42.

ZAYTSEVA, O.; WANG, Z.; NEUMANN, G. Phytotoxicity of carbon nanotubes in soybean as determined by interactions with micronutrients. **Journal of Nanoparticle Research**, v.19:29, 2017. DOI: 10.1007/s11051-016-3722-5.

ZUIN, S.; POJANA, G.; MARCOMINI, A. Effect-Oriented Physicochemical Characterization of Nanomaterials. In: MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; TRAN, C.L. **Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects**, Informa Healthcare USA, NY, 1.ed., 2007.