

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



GIOVANI VALENTIN CIMBALUK

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS EM *Danio rerio* E *Astyanax altiparanae*

CURITIBA
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética
Laboratório de Citogenética Animal e
Mutagênese Ambiental



GIOVANI VALENTIN CIMBALUK

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO DE
PAREDES MÚLTIPLAS EM *Danio rerio* E *Astyanax altiparanae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná como requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Marta Margarete Cestari
Coorientadora: Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf

CURITIBA
2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Cimbaluk, Giovani Valentin

Avaliação da genotoxicidade de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em *Danio rerio* e *Astyanax altiparanae*./ Giovani Valentin
Cimbaluk. – Curitiba, 2016.

71 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Marta Margarete Cestari

Co-orientadora: Wanessa Algarte Ramsdorf

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Nanotubos de carbono. 2. Genotoxicidade. 3. Peixe. I. Título II. Cestari, Marta Margarete. III. Ramsdorf, Wanessa Algarte. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
CENTRO POLITÉCNICO - JARDIM DAS AMÉRICAS - CAIXA
POSTAL 19071 - CEP 81531-990 - CTBA, BRASIL 41 3361 1587
PPG-GEN@UFPR.BR



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de mestrado de GIOVANI VALENTIN CIMBALUK, intitulada: "Avaliação da genotoxicidade de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em *Danio rerio* e *Astyanax altiparanae*", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação.

Curitiba, 20 de dezembro de 2016

Doutor Laercio Dante Stein Piancini
Membro Titular

Doutora Daniela Morais Leme
Membro Titular

Doutora Marta Margarete Cestari
Presidente

À memória dos meus avós, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra. Marta Margarete Cestari pela oportunidade concedida e pela confiança em mim depositada.

À Prof^a Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf pela paciência e dedicação ao compartilhar comigo a sua experiência e seu conhecimento.

À minha companheira Rafaela Larissa Rodrigues, pelo apoio e motivação incansáveis, mesmo quando isso significaria abdicar da companhia um do outro.

Aos meus pais e irmão, que sempre depositaram muita confiança em mim e em minha carreira.

À Secretaria de Estado da Educação do Paraná pelo apoio imprescindível.

Ao setor de Recursos Humanos do Núcleo Regional de Educação de União Vitória, em especial à Marieli Meira, cuja dedicação e competência com que cumpre sua missão em prol da educação viabilizou a realização desse trabalho.

À todos os pesquisadores do laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental da Universidade Federal do Paraná, em especial à Juliana Roratto pelas importantes contribuições.

À todos os pesquisadores do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial à Regiane Reque, cuja mão-amiga contribuiu muito para a realização dos experimentos aqui descritos.

Aos membros da Banca Daniela Morais Leme e Laercio Dante Stein Piacini por seus apontamentos que enriqueceram muito esse trabalho.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus não sou o que era antes." (Martin Luther King)

RESUMO

Como resultado do crescimento da população humana e da mudança nos padrões de vida, produção, consumo e eliminação de resíduos, os contaminantes ambientais estão aumentando em quantidade e espécie. Os nanomateriais, considerados contaminantes emergentes, se destacam nesse contexto. Suas propriedades físicas e químicas distintas podem diminuir os custos de produção e melhorar a eficiência de uma gama enorme de produtos que vão de cosméticos a eletroeletrônicos. Os nanotubos de carbono (NTCs) são, desde a década de 90, um dos tipos de nanomateriais mais estudados em função de suas propriedades intrínsecas que lhes asseguram protagonismo nos mais variados setores da indústria do século 21. Tendo em vista que a genotoxicidade dos nanotubos de carbono é um assunto ainda muito controverso, nós realizamos testes de exposição aguda e subcrônica por via hídrica a uma amostra comercial de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em diferentes concentrações em duas espécies de peixes; um modelo exótico (*Danio rerio*), e uma espécie nativa (*Astyanax altiparanae*). Através do ensaio cometa em eritrócitos e do teste do micronúcleo písceo, também em eritrócitos, foi constatado que a amostra de nanotubos de carbono testada não produziu genotoxicidade aparente por meio de quebras de simples/dupla fita no DNA ou efeitos castogênicos e/ou aneugênicos em nenhuma das espécies, independentemente do tempo de exposição. Todavia, os resultados obtidos indicam a possibilidade de ocorrência de crosslinks DNA-NTCs.

Palavras-Chave: Nanotubos de carbono; Genotoxicidade; *Astyanax altiparanae*; *Danio rerio*; Ensaio Cometa; Teste do Micronúcleo Písceo.

ABSTRACT

As a result of the human population growth and changing life styles, production, consumption, and man-made disposal, the environmental contaminants are increasing in quantity and type. The nanomaterials, considered emerging contaminants, stand out in this context. Their unique fiscal and chemical proprieties may decrease the production costs and improve the efficiency of a large range of products, from cosmetics to eletro-eletronics. The carbon nanotubes (CNTs) are, since the 90's, one of the most studied nanomaterials because of its intrinsic proprieties that assure them important roles in several industrial sectors of the 21st century. Since the carbon nanotubes genotoxicity is still a controversial issue, we performed tests of acute and subchronical hydric exposal to a commercial sample of multi-walled carbon nanotubes in two fish spices, an exotic model (*Danio rerio*) and a native one (*Astyanax altiparanae*). Making use of the alkaline comet assay on erythrocytes and the piscine micronucleous also performed on erythrocytes, was found that the tested carbon nanotubes sample did not generate apparent genotoxicity by means of single/double DNA strand break or clastogenic/aneugenic effects over any of the species, independently of the exposure time. However, our findings indicates the possibility of occurrence of DNA-CNTs crosslinks.

Key Words: Carbon Nanotubes; Genotoxicity; *Astyanax altiparanae*; *Danio rerio*; Comet Assay; Piscine Micronucleous Test.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Nanotubos de Carbono	15
2.2 Bioensaios e Bioindicadores	18
2.3 Peixes como modelo para estudo de toxicidade	19
2.3.1 <i>Danio rerio</i>	20
2.3.2 <i>Astyanax altiparanae</i>	21
2.4 Biomarcadores de Genotoxicidade	23
2.4.1 Eletroforese de células isoladas (ensaio cometa)	25
2.4.2 Teste do micronúcleo píceo.....	28
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Nanotubos de Carbono	33
4.2 Aquisição e Aclimação dos Modelos	34
4.3 Ensaios de Exposição Aguda	36
4.4 Ensaios de Exposição Subcrônica	37
4.5 Coleta e Processamento do Material Biológico	38
4.6 Ensaio Cometa	38
4.7 Teste do Micronúcleo Píceo	39
4.8 Análise Estatística	40
5. RESULTADOS	41

5.1	Caracterização dos Nanotubos de Carbono	41
5.2	Ensaio de Exposição aguda com <i>Danio rerio</i>	43
5.3	Ensaio de Exposição aguda com <i>Astyanax altiparanae</i>	45
5.4	Ensaio de Exposição subcrônica com <i>Danio rerio</i>	46
5.5	Ensaio de Exposição subcrônica com <i>Astyanax altiparanae</i>	47
6.	DISCUSSÃO	49
7.	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXOS	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01.	Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas	16
FIGURA 02.	<i>Danio rerio</i>	21
FIGURA 03.	<i>Astyanax altiparanae</i>	23
FIGURA 04.	Nucleóides (ensaio cometa em eritrócitos)	26
FIGURA 05.	Anormalidades Morfológicas Nucleares	30
FIGURA 06.	Tanque de Aclimação	35
FIGURA 07.	Aquários	35
FIGURA 08.	Difratograma de Raios X de amostras de Nanotubos	41
FIGURA 09.	Espectro Raman de amostras de Nanotubos	42
FIGURA 10.	Análise Termogravimétrica de amostras de Nanotubos	43
FIGURA 11.	Danos ao DNA de eritrócitos de <i>Danio rerio</i> após exposição aguda aos nanotubos de carbono	44
FIGURA 12.	Danos ao DNA de eritrócitos de <i>Astyanax altiparanae</i> após exposição aguda aos nanotubos de carbono	45
FIGURA 13.	Danos ao DNA de eritrócitos de <i>Danio rerio</i> após exposição subcrônica aos nanotubos de carbono	46
FIGURA 14.	Danos ao DNA de eritrócitos de <i>Astyanax altiparanae</i> após exposição subcrônica aos nanotubos de carbono	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 01.	Frequência de MNs e AMN em eritrócitos de <i>Danio rerio</i> após exposição aguda aos nanotubos de carbono	44
TABELA 02.	Frequência de MNs e AMN em eritrócitos de <i>Astyanax altiparanae</i> após exposição aguda aos nanotubos de carbono	46
TABELA 03.	Frequência de MNs e AMN em eritrócitos de <i>Danio rerio</i> após exposição subcrônica aos nanotubos de carbono	47
TABELA 04.	Frequência de MNs e AMN em eritrócitos de <i>Astyanax altiparanae</i> após exposição subcrônica aos nanotubos de carbono	48
TABELA 05.	Toxicidade dos Nanotubos de Carbono em peixes.....	53

1. INTRODUÇÃO

As nanociências e nanotecnologia referem-se, respectivamente, ao estudo de estruturas que se apresentam em escala nanométrica e da aplicação tecnológica destas para produção de novos materiais. Essa notável tecnologia contempla, a dimensão física representada por uma unidade equivalente a um bilionésimo do metro, o nanômetro. Sendo, portanto, resultado da crescente capacidade de manipulação de átomos e de moléculas, cuja observação requer microscópios especiais (NOVO, 2013).

A ideia de nanotecnologia como uma ciência de manipulação molecular ou de escala nanométrica é desde os anos 1950 um fascínio para muitos pesquisadores. Com os avanços da microscopia e de outras técnicas, a nanotecnologia se tornou, nos últimos 10 anos, uma das áreas mais importantes da ciência e da inovação tecnológica, com estimativa de investimento da ordem dos 3,3 trilhões de dólares em 2018 (FRANCHI *et al.*, 2012; TNS, 2015).

As aplicações da nanociência e da nanotecnologia têm impacto marcadamente positivo em muitos aspectos do cotidiano, por exemplo, provendo meios de produção de energia limpa e água potável. Centenas de bens de consumo contendo nanomateriais em sua composição estão no mercado, e já existe uma série de aplicações para eles na medicina (SAVOLAINEN *et al.*, 2010).

Diferentes tipos de nanomateriais estão sendo descobertos e, por viabilizarem produtos finais mais eficientes, leves, adequados e principalmente de baixo custo, muitos destes se encontram em fase de comercialização em cosméticos, eletrodomésticos, vestimentas e em diversos utensílios e equipamentos (PASCHOALINO; MARCONI; JARDIM, 2010).

Dentre os nanomateriais mais promissores destacam-se os nanotubos de carbono, descritos pela primeira vez por Sumio Iijima em 1991. Algumas de suas propriedades físico-químicas são muito particulares, abrindo um grande leque de oportunidades para o emprego dessas estruturas na indústria, na biotecnologia e na medicina (THOSTENSON; REN; CHOU, 2001). De fato, os nanomateriais de carbono têm sido protótipos para o desenvolvimento da nanociência e

nanotecnologia devido, sobretudo, à riqueza de suas variadas propriedades estruturais e eletrônicas (INTC, 2016).

Não obstante, as mesmas propriedades que tornam os nanomateriais tão atrativos, como pequeno tamanho de partícula, forma variada e elevada área superficial, podem também ser responsáveis por efeitos nocivos aos organismos vivos, conforme indícios reportados por estudos toxicológicos com microorganismos, algas, peixes, roedores e células humanas *in vitro* (PASCHOALINO, MARCONI e JARDIM, 2010).

A síntese e o uso de nanotubos podem levar à sua liberação no meio ambiente, particularmente no meio aquático. Isto pode ser resultante da sua presença em efluentes ou do escoamento de resíduos dos aterros e lixões. Dessa forma, dados sobre o destino e o comportamento dos nanotubos em diferentes tipos de sistemas hídricos naturais, assim como sua ecotoxicidade, são essenciais para a avaliação quantitativa de risco ambiental. O desenvolvimento, produção, uso e descarte de novas tecnologias têm sido apontados frequentemente como causa de impacto significativo no ambiente (LUKHELE *et al.*, 2015).

À despeito disso, existe relativa falta de informação acerca dos impactos causados por nanotubos para a saúde humana e para o ambiente. São poucos os estudos que abordam seus efeitos tóxicos e, frequentemente, os resultados são divergentes (PATLOLLA, KNIGHTEN e TCHOUNWOU, 2010). Dados de exposição e de efeito são necessários para a compreensão dos riscos apresentados por estes novos materiais. Alguns trabalhos recentes avaliaram as fontes, o comportamento, o destino, e os mecanismos de toxicidade dos nanomateriais de carbono. A maioria destes trabalhos comumente conclui que são necessárias investigações adicionais no campo da nanoecotoxicologia e que futuros estudos devam incluir uma melhor caracterização dos materiais testados e dos mecanismos de exposição. Além disso, dada a grande diversidade nas propriedades físico-químicas dos materiais nanoestruturados de carbono, é com frequência que se conclui que uma avaliação de risco será significativa somente quando efetuada caso a caso (JACKSON *et al.*, 2013).

Sob o escopo da ecotoxicologia, o entendimento sobre a toxicidade dos nanotubos representa um grande desafio não somente devido às inúmeras variáveis

envolvidas, mas também, devido ao foco reduzido que esse segmento tem recebido dentro da nanotoxicologia. Para Jackson *et al.* (2013) a avaliação acerca dos riscos que os nanotubos de carbono podem representar para a saúde humana está em estágio avançado, entretanto, muitas lacunas ainda existem sobre a identificação dos perigos ambientais e avaliação de exposição e efeito. De fato, na declaração de Parma sobre meio Ambiente e Saúde em 2010, ministros representantes dessas áreas dos 53 Estados-Membros do Escritório Regional da Organização Mundial da Saúde para a Europa listaram as implicações da nanotecnologia e nanopartículas para a saúde entre os principais desafios ambientais da atualidade (WHO, 2013).

A avaliação toxicológica de partículas e fibras em escala manométrica contribui para uma série de questões ligadas à utilização de nanomateriais em produtos comerciais. Sendo assim, o entendimento dos mecanismos de cito e genotoxicidade de um dado nanomaterial são fundamentais para a definição de seu impacto ambiental e de estratégias de proteção aos trabalhadores e consumidores (FRANCHI *et al.*, 2012). A investigação proativa do impacto dos Nanotubos de Carbono no ambiente aquático merece atenção urgente. Isso porque a sustentabilidade de uma dada tecnologia, desde o aspecto econômico, social, ambiental e governamental, é dependente do entendimento de seus impactos para os seres humanos e outras formas de vida no ambiente (LUKHELE *et al.*, 2015).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nanotubos de Carbono

Nanotubos são alótropos de carbono constituídos de folhas de átomos arranjados em uma disposição hexagonal (grafeno) enroladas, formando um cilindro oco com diâmetro de 2,2 a 30 nanômetros e comprimento muito variável, podendo chegar a mais de 1 micrômetro. Sua síntese é possível a partir da utilização de métodos físico-químicos similares àqueles utilizados na produção de C₆₀ ou fulereno, outra forma alotrópica do carbono, porém com formato esférico (IJIMA, 1991).

Segundo Larrudé (2007), na última década três métodos principais foram utilizados para a obtenção de nanotubos de carbono, dois métodos de altas temperaturas, o método de descarga por arco e o de ablação por laser, e um método de baixa temperatura, o método de deposição química por vapor (CVD do inglês, *Chemical Vapor Deposition*). Os primeiros são baseados na condensação de átomos de carbono gerados pela evaporação (sublimação) de carbono a partir de um precursor sólido, geralmente, grafite de alta pureza. O segundo se baseia na decomposição de gases (ou vapores) precursores contendo átomos de carbono, geralmente, um hidrocarboneto, sobre um metal de transição (como Fe, Ni, Co e Mo) que atua como catalisador. Essa técnica é a mais popular e amplamente usada devido a facilidade de seu emprego, ao baixo custo e a alta produtividade em larga escala (KUMAR; ANDO, 2010).

Os nanotubos de carbono (NTCs) podem ser classificados em dois tipos principais: I - os nanotubos de paredes únicas ou SWNT (Single-Wall carbon Nanotubes), que consistem em apenas um único cilindro de grafeno, e II - os nanotubos de paredes múltiplas ou MWNT (Multi-Wall carbon Nanotubes), que são formados por vários cilindros de grafeno concêntricos (IJIMA, 2002) (Figura 01).

Suas propriedades eletrônicas são verdadeiramente impressionantes e têm recebido muita atenção, pois, embora os nanotubos de carbono sejam constituídos puramente de átomos de carbono, suas propriedades físicas podem variar significativamente dependendo sensivelmente da estrutura microscópica do tubo. O mais proeminente é seu caráter metálico ou semicondutor, aproximadamente 2/3

das possíveis estruturas de nanotubos são semicondutoras e 1/3 são metálicas (KUMAR; ANDO, 2010).

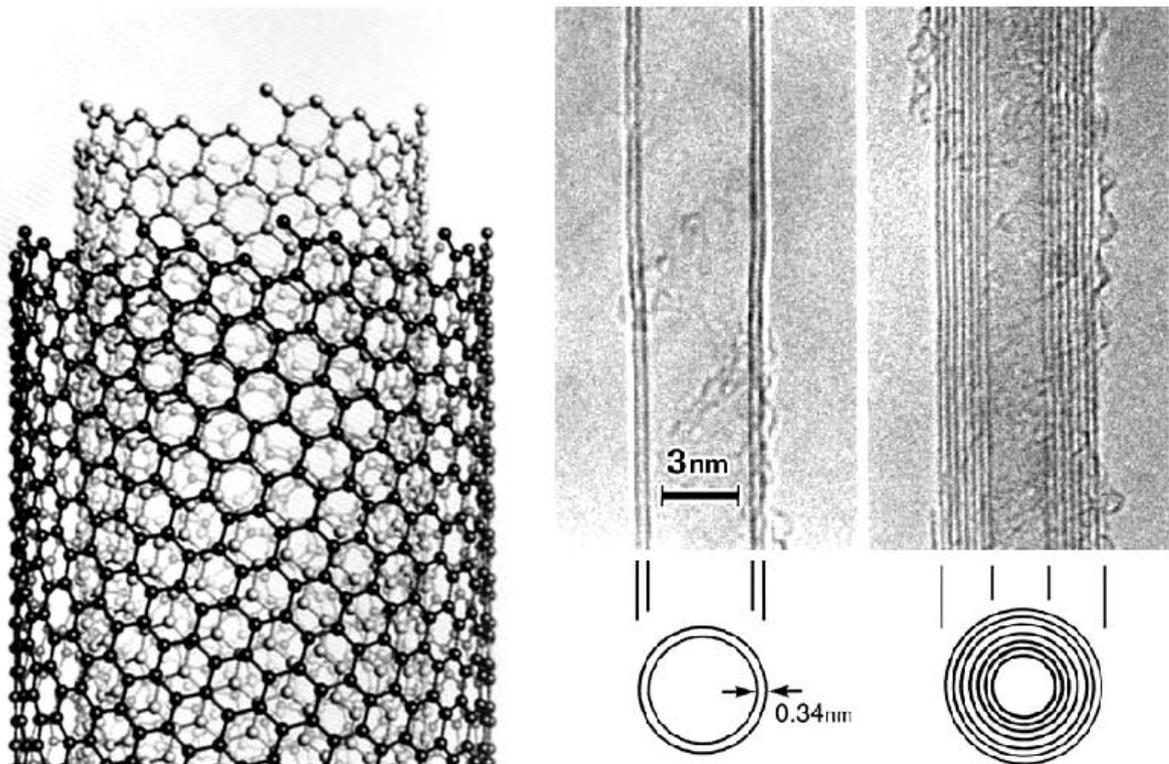


Figura 01: Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas identificados em 1991. À esquerda: esquema evidenciando o arranjo dos átomos de carbono na composição NTCs de paredes múltiplas. À direita: micrografia eletrônica evidenciando a ultraestrutura e o diâmetro aproximado do Lúmen dos NTCs de paredes múltiplas. Fonte: Ijima, 2002.

Devido às forças de van Der Waals, os nanotubos tendem a se dispor de forma linear levando à formação de longos feixes de fios dispostos em paralelo (DRESSELHAUS; DRESSELHAUS; EKLUND, 1996). Essas características são responsáveis por algumas propriedades químicas e mecânicas não encontradas em outros materiais. Dentro da mesma fração de massa, são de 10 a 100 vezes mais fortes do que o aço, fundem a uma temperatura de 2800°C no vácuo, sua condutibilidade elétrica é 1000 vezes maior do que a dos fios de cobre, sua condutibilidade térmica é duas vezes maior do que a do diamante e apresentam relativa elasticidade quando comparados a outros materiais extremamente resistentes (THOSTENSON, REN; CHOU, 2001).

Em função dessas propriedades, os NTCs podem ser utilizados no enriquecimento de plásticos, como protetores contra a radiação eletromagnética de

celulares e *laptops*, supercapacitores, baterias de lítio, células combustíveis de hidrogênio, células fotovoltaicas, displays de diversos dispositivos, lâmpadas de longa duração, sensores de gás, sensores térmicos, microcircuitos elétricos e até em aparelhos de raios-X (BAUGHMAN; ZAKHIDOV; HEER, 2002). Existe uma grande possibilidade de que os nanotubos passem a ser utilizados na medicina para produção ou melhoria de materiais biocompatíveis ou como carreadores de drogas para o meio intracelular no tratamento de doenças, inclusive do câncer (KUSHWAHA *et al.*, 2013). Há também propostas de utilização de nanotubos para a remoção de íons de metais pesados em efluentes (FU; WANG, 2011).

Assim como para outros nanomateriais, a reatividade biológica e toxicidade dos NTC têm se mostrado dependente de inúmeros fatores físico-químicos, como o seu comprimento, diâmetro, área de superfície, presença e natureza de resíduos de catalisadores, bem como sua funcionalização química através da adição de grupos covalentes em sua superfície ou extremidades (LANONE *et al.*, 2013).

Lindberg *et al.* (2009), demonstraram diminuição da viabilidade celular e genotoxicidade em células brônquio-epiteliais humanas em contato com NTCs. Sargent *et al.* (2009), apontaram os NTCs como causa de anormalidades no fuso mitótico, formação de cromossomos aberrantes e aneuploidias em células epiteliais das vias respiratórias humanas. Indução de micronúcleos, resposta inflamatória, efeitos clastogênicos e aneugênicos foram atribuídos aos nanotubos por Muller *et al.* (2008). Sharma *et al.* (2007) verificaram que os NTCs foram responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigênio e, conseqüente estresse oxidativo em células epitélio-pulmonares de camundongos. Como evidência do potencial carcinogênico dessa classe de nanopartículas, Takagi *et al.* (2008) demonstraram a indução de mesotelioma em ratos a partir da injeção intraperitoneal de nanotubos de paredes múltiplas, esse fato, segundo Toyokuni (2013), torna o efeito carcinogênico dos MWCT sobre as células pulmonares comparável ao dos asbestos.

Contudo, avaliar os possíveis efeitos tóxicos dos NTCs para a saúde e para o meio ambiente ainda parece ser uma tarefa desafiadora. Os dados existentes sobre sua toxicidade são ainda limitados e conflitantes e muitos esforços ainda devem ser direcionados a este campo. O que se pode adiantar é que não há efeitos tóxicos generalizados para os NTCs, mas o que se observa é a existência de diversos graus

de risco para as diferentes amostras, sendo que esses dependem das condições de síntese e processamento das mesmas (FRANCHI *et al.*, 2012).

2.2 Bioensaios e Bioindicadores.

A utilização de bioensaios em pesquisas no campo da toxicologia é vantajosa no sentido de possibilitar o estudo dos efeitos tóxicos de contaminantes específicos em organismos seja de forma isolada ou associada (caso seja mais de uma substância a ser estudada), reduzindo a influência de variáveis ambientais. Desta forma, é possível fazer um estudo da especificidade relativa de alguns efeitos e com os xenobiontes utilizados (AKAISHI, 2003; JHA, 2008).

Segundo Magalhães e Ferrão-Filho (2008), quando xenobiontes são lançados no meio ambiente, as análises químicas e físicas por si só não retratam o real impacto causado por esses agentes aos ecossistemas naturais e à saúde humana, de forma que, somente sistemas biológicos (organismos ou partes deles) podem detectar os efeitos tóxicos desses agentes. A aplicação dos testes de toxicidade é bastante abrangente e sua importância aumenta à medida em que cresce a complexidade das transformações químicas no meio ambiente.

Os sistemas-teste se constituem de organismos indicadores que, devido às suas características de pequeno limite de tolerância a determinados xenobióticos, apresentam alguma alteração, seja ela fisiológica, morfológica ou comportamental. As exposições de organismos teste são feitas em diferentes concentrações de substâncias e compostos químicos, amostras de efluentes ou água bruta, por um determinado período de tempo. A exposição a um agente tóxico pode ser aguda, quando a concentração letal do agente é liberada em um único evento e rapidamente absorvida, ou crônica, quando o agente é liberado em eventos periodicamente repetidos em concentrações subletais, durante um longo período de tempo (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Os bioindicadores ideais para bioensaios devem, preferivelmente, ser organismos nativos como sentinelas ambientais, apresentando capacidade de sobreviver tanto em ambientes com ausência de contaminantes, quanto na presença

deles, além de ser abundantes no ambiente e adaptar-se bem em condições experimentais (PANDRANGI *et al.*, 1995).

2.3 Peixes como modelo para estudo de toxicidade

Um indicador biológico ideal em estudos de toxicologia deve ser taxonomicamente bem definido, apresentar distribuição geográfica ampla, ser abundante e de fácil coleta, ter baixa variabilidade genética e ecológica, preferencialmente possuir tamanho grande, apresentar baixa mobilidade e longo ciclo de vida, dispor de características ecológicas bem conhecidas e ser de fácil manejo em laboratório (AL-SABTI, 1991; GRABARKIEWICZ; DAVIS, 2008).

A utilização de animais em experimentos permite a administração da substância em estudos por diversas vias, através do alimento, da água ou por injeções. Além disso, há possibilidade de avaliar efeitos em tecidos específicos, em células somáticas ou germinativas e comparar contaminações agudas e crônicas, bem como, de certa forma, extrapolar os efeitos observados nos organismos utilizados em experimento, para condições de exposição de compostos químicos em seres humanos (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

Peixes são organismos apropriados como bioindicadores de toxicidade no ambiente, primeiro, pela função que desempenham nas cadeias tróficas e segundo, por conta de sua sensibilidade a baixas concentrações de agentes tóxicos, típicas dos ambientes aquáticos poluídos (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). Sobretudo, é um grande e diverso grupo de vertebrados, os quais atuam em múltiplos níveis tróficos, requerem grande volume de água para respiração intensificando sua exposição via hídrica aos contaminantes presentes no ambiente aquático (AL-SABTI, 1991).

Muitos peixes podem metabolizar xenobióticos orgânicos por sistemas enzimáticos eficientes produzindo resíduos que podem se associar a macromoléculas críticas como proteínas e/ou DNA (BOLOGNESI *et al.*, 2006). Devido ao fato de responderem aos agentes tóxicos de maneira similar aos grandes vertebrados, os peixes, podem assim, atuar como sentinelas para indicar o potencial

de exposição das populações humanas a esses agentes quando presentes na água (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

2.3.1 *Danio rerio*

O *Danio rerio* (Figura 02), peixe-zebra ou zebra-fish (também chamado de paulistinha no Brasil) é um dos mais importantes organismos modelo de vertebrados em genética, biologia do desenvolvimento, neurofisiologia e na ecotoxicologia. Essa espécie apresenta uma série de atributos que a tornam particularmente interessante para manipulação experimental. É um peixe pequeno, robusto, e um grande número de exemplares pode ser mantido de forma fácil e barata em laboratório, onde podem se reproduzir durante todo o ano. A sua força como um organismo modelo se justifica pelo fato de que, como sendo um vertebrado, é mais comparável aos seres humanos do que os modelos de invertebrados, tais como *Drosophila melanogaster*, e por outro lado, é mais aprazível à manipulação genética e embrionária do que espécies-modelo de mamíferos, em que tais procedimentos são tanto mais complicados e dispendiosos (SPENCE *et al.*, 2008).

O peixe-zebra pertence à família de peixes de água doce Cyprinidae, a família de vertebrados mais rica em espécies. Atualmente existem 44 espécies no gênero distribuídos em todo o sul e sudeste da Ásia, com maior diversidade no nordeste da Índia, Bangladesh e Birmânia. O nome *Danio* deriva do nome Bengali "dhani", que significa "do campo de arroz". Eles são caracterizados pelo pequeno tamanho (<120 mm de comprimento total), e por um padrão distinto de coloração alternando listras horizontais escuras e claras. Sua dieta natural consiste principalmente de zooplâncton e insetos, embora fitoplâncton, algas filamentosas e material vegetal vascular, esporos e ovos de invertebrados, escamas de peixe, aracnídeos, detritos, areia e lama já tenham sido relatados a partir da análise de conteúdo do intestino (SPENCE *et al.*, 2008).

Danio rerio já é um modelo bem estabelecido para estudo de genotoxicidade *in vitro*. Suas células em cultura têm sido utilizadas para determinar genotoxicidade, citotoxicidade, teratogenicidade e embriotoxicidade em resposta a diversos tipos de agentes, como antibióticos, endotoxinas, metais e radiação. Essa espécie tem se

mostrado um substituto eficiente para os estudos de toxicidade em células de mamíferos *in vivo*. As células de suas brânquias, fígado, sangue e gônadas são corriqueiramente empregadas em ensaios como cometa e micronúcleo para a avaliação de toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de uma ampla gama de compostos (CHAKRAVARTHY *et al.*, 2014).



Figura 02: *Danio rerio* (paulistinha ou zebrafish). Fonte: Andy Rapson, disponível em <http://www.fishtanksandponds.co.uk/galleries/photo-pages-fw-tropical/cypriniformes/danio-rerio-zebra-danio.html>. Acesso em 08/08/2016.

2.3.2 *Astyanax altiparanae*

Astyanax é considerado o gênero mais representativo da subfamília Tetragonopterinae, sendo um dos gêneros dominantes na América do Sul. Sua distribuição geográfica é ampla na região Neotropical e o gênero possui aproximadamente uma centena de espécies e subespécies nominais (GARUTTI & BRITSKI, 2000).

A revisão taxonômica dos *Astyanax* das bacias do Paraná, do São Francisco e Amazônica feita por Garutti (1995) resultou na reestruturação da nomenclatura das espécies deste gênero, passando-se à denominação de *Astyanax altiparanae* para o lambari-do-rabo-amarelo ou tambuí que ocorre na bacia do Rio Tietê e seus afluentes.

O lambari-do-rabo-amarelo (Figura 03) é uma espécie de pequeno porte, que quando adulto, atinge de 7 a 15 cm de comprimento, podendo chegar a 60 gramas de peso. Possui hábito alimentar onívoro e seu crescimento é rápido, chegando à maturidade sexual com cerca de quatro meses de idade em condições de cultivo, normalmente com 7 a 9 cm de comprimento para os machos e 12 a 15 cm de comprimento para as fêmeas (ALMEIDA, 2007). Apresentam o corpo prateado, com a região ventral esbranquiçada e dorsal cinzenta, as nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando o lobo superior do inferior. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (GARUTTI; BRITSKI, 2000). Contudo, como esta espécie ocorre numa grande diversidade de microambientes, as populações desse lambari não são homogêneas quanto à morfologia.

A elevada plasticidade alimentar de *Astyanax altiparanae*, bem como sua capacidade de se reproduzir em diversos ambientes, explicam o sucesso desta espécie no processo de colonização de novos habitats. Entretanto, observa-se uma preferência pela permanência em águas mais lânticas (RAMSDORF, 2007).

Embora o emprego de espécies desse gênero em bioensaios de toxicidade ainda não seja tão amplamente observado, Lemos *et al.* (2008), Silva *et al.* (2010), Erbe *et al.* (2011), Ramsdorf (2007), Ramsdorf *et al.* (2012), Delmond (2013) e Freire *et al.* (2015), demonstraram que essa pode ser uma opção interessante quando se pretende avaliar as respostas toxicológicas em espécies nativas do sul do Brasil.



Figura 03: Exemplos da espécie *Astyanax altiparane*. Fonte: o autor.

2.4 Biomarcadores de Genotoxicidade

Diversas definições tem sido adotadas para o termo “biomarcador”, que é geralmente usado em um sentido amplo para incluir quase qualquer medida que reflita uma interação entre um sistema biológico e um potencial risco, podendo este ser de origem química, física ou biológica. Um biomarcador pode ser definido como uma mudança em uma resposta biológica (molecular, celular, fisiológica ou comportamental) a qual pode estar relacionada à exposição a efeitos tóxicos de contaminantes ambientais (VAN DER OOST, BEYER e VERMEULEN, 2003).

Substâncias tóxicas podem desafiar sistemas biológicos de diversas formas. Considerando as limitações inerentes na avaliação da sucesso reprodutivo na biota natural por demandar recursos intensivos, é sensato avaliar outras respostas compensatórias sub-letais nos compartimentos somáticos e se viável, nos germinativos dos organismos. Na verdade, estas respostas compensatórias sub-letais (por exemplo; baixa taxa de rotatividade de proteínas, danos no DNA, etc.) têm sido o foco principal de estudos ecotoxicológicos nas duas últimas décadas, elas

influenciam o metabolismo energético, o fitness e sucesso reprodutivo. Isto traz consequências em nível de população. Com efeito, é sugerido que o aumento da instabilidade genômica desempenha um papel importante na redução da adaptabilidade de populações não só em estudos de laboratório, mas também no campo (JHA, 2008).

Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA produzindo alterações em sua estrutura ou função e quando essas alterações se fixam de forma capaz de serem transmitidas, denominam-se mutações (CETESB, 1992). Para Alberts *et al.*, (2002) em curto prazo e do ponto de vista de um único organismo, a alteração genética é quase sempre prejudicial, especialmente em organismos multicelulares, nos quais a mutação está mais inclinada a perturbar o desenvolvimento e a fisiologia extremamente complexos e sintonizados de um organismo.

Dano genético é um fenômeno natural que ocorre endogenamente nas células, como resultado da respiração e do metabolismo oxidativo, mas este dano é continuamente reparado por uma variedade de processos presentes em todas as células. No entanto, quando o dano genético supera a capacidade da maquinaria celular em lidar com essas lesões, elas passam a se acumular, o que pode conduzir a uma ampla variedade de resultados adversos, incluindo a apoptose, falhas no ciclo celular e mutagênese, que pode desencadear o processo de carcinogênese (BEEDANAGARI *et al.*, 2014).

Um número considerável de contaminantes listados em diversos estudos têm sido apontados como sendo genotóxicos. Essa genotoxicidade tem sido estabelecida usando uma ampla gama de testes *in vivo* e *in vitro* como o teste de identificação de mutações em *Salmonella* (Ames), adutos de DNA, erros de replicação, atividade da enzima P-450 monooxigenase, quebras de DNA, aberrações cromossômicas, indução de micronúcleos, e trocas entre cromátides-irmãs (PANDRANGI *et al.*, 1995). Os modelos de teste para avaliação de genotoxicidade são divididos em grupos de acordo com o sistema biológico empregado e seus parâmetros genéticos detectáveis. Ensaios com procariotos possibilitam a detecção de agentes que induzem mutação de ponto, por outro lado, análises em eucariotos

possibilitam a detecção de desvios maiores, variando de mutações gênicas a aberrações cromossômicas (MARIN MORALES e LEME, 2009).

2.4.1 Eletroforese de Células Isoladas (ensaio cometa)

O ensaio cometa ou eletroforese de células isoladas (*single cell gel electrophoresis*) é uma técnica simples e sensível utilizada mais frequentemente para medir o nível de dano causado por um determinado agente ao DNA quando células isoladas são lisadas e submetidas à eletroforese em microgel de agarose (SPEIT; HARTMANN, 2006).

Foi descrito pela primeira vez por Östling e Johanson (1984) como uma ferramenta para o estudo de danos induzidos por radiação no DNA de células isoladas de mamíferos. Entretanto, originalmente o protocolo permitia apenas a identificação de danos oriundos de quebras de dupla-fita. Pouco tempo depois, Singh *et al.* (1988) estudando os efeitos da radiação e do peróxido de hidrogênio em linfócitos humanos isolados modificaram o protocolo original realizando a corrida eletroforética em condição de PH alcalino, o que permitiu a identificação de sítios álcali-lábeis, sítios de reparação tardia e danos oriundos de quebras de fita simples. Mais tarde, Speit e Hartmann (1999) apresentaram um protocolo contemplando os mais importantes aprimoramentos que a técnica recebeu ao longo de seus primeiros anos de emprego como o uso de lâminas pré-revestidas com agarose em combinação com a secagem de géis e a fixação dos cometas. Tais aprimoramentos tornaram o ensaio mais sensível, mais versátil e menos dispendioso.

Com essas modificações no protocolo original, o ensaio cometa se tornou o método mais popular para diagnóstico de danos causados ao DNA oriundos das mais diversas fontes (radiação, oxidação, etc.) e aplicável em vários contextos como estudos de genotoxicidade em organismos diversos, monitoramento da saúde humana, ecotoxicologia e estudos dos mecanismos básicos de reparo genético (COLLINS *et al.*, 2013).

Na prática, o que sustenta uma interpretação positiva de dano ao DNA na aplicação do ensaio cometa é a premissa de que possíveis agentes genotóxicos que possam provocar quebras de fita simples ou de dupla fita no DNA irão gerar variável

número de fragmentos que podem ser analisados por separação eletroforética em microgel de agarose (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009). Ao migrarem em direção ao polo positivo, os nucleóides cujo DNA não apresenta quebras migram intactos, aparecendo como esferas, enquanto os nucleóides com DNA danificado se apresentam na forma de um cometa, pois os fragmentos gerados pelas quebras migram mais rápido dando origem a uma cauda, e deixando para trás o DNA não danificado que corresponde a cabeça (SINGH *et al.*, 1988).

De acordo com Collins (2004), o nível de dano pode ser classificado em 5 categorias (Figura 04) com base no comprimento e densidade da cauda em relação ao diâmetro da cabeça, onde 0 é ausência de dano e 4 corresponde ao dano máximo. Segundo Tice (2000), tanto no método neutro quanto no método alcalino é possível ainda encontrar “*hedgehogs*” - cometas com cabeças muito reduzidas e caudas extensas e densas que correspondem a apoptoses (Figura 04). A análise desses parâmetros pode ser visual ou automatizada (COLLINS *et al.*, 2013).

A técnica pode ser aplicada virtualmente em qualquer tipo de célula que contenha núcleo e que seja de fácil obtenção, dando-se preferência àquelas provenientes de tecidos desagregados, para minimizar o uso de técnicas mecânicas ou enzimáticas de isolamento (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009). Os tipos mais comuns são: leveduras, células da homolinfa de moluscos e artrópodes, eritrócitos de peixes, núcleos extraídos de tecidos vegetais e linfócitos de mamíferos (JHA, 2008). Nos testes de genotoxicidade em humanos utiliza-se preferencialmente células da mucosa bucal, epitélio nasal, espermatozoides e principalmente linfócitos periféricos (COLLINS *et al.*, 2013).

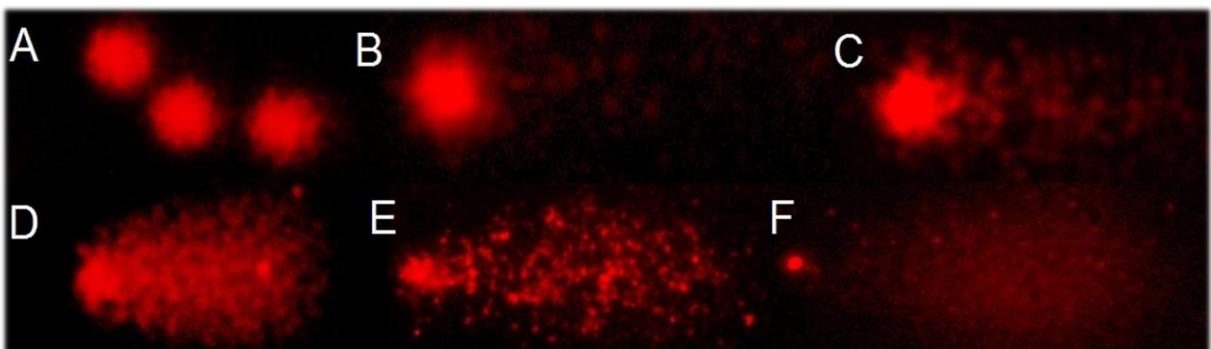


Figura 04: Nucleóides com magnificação de 640X; Dano 0 (A), Dano 1 (B), Dano 2 (C), Dano 3 (D), Dano 4 (E) e Apoptose (F). Fonte: O autor.

Em peixes, o ensaio cometa é mais frequentemente aplicado em eritrócitos e linfócitos do sangue periférico pelo fato de que esses tipos celulares podem ser mais facilmente obtidos e armazenados, sem necessidade de desagregação celular (BELPAEME *et al.*, 1998). O sangue também apresenta a vantagem de apresentar em sua composição aproximadamente 97% de eritrócitos nucleados e apenas cerca de 3% de leucócitos, o que confere alta homogeneidade ao tecido (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998).

Uma das maiores críticas da técnica é que a ocorrência de quebras no DNA não pode ser atribuída a uma exposição específica (BELPAEME *et al.*, 1998). As quebras no material genético podem ocorrer através de um grande número de mecanismos como radiação ionizante nos locais álcali-lábeis, entre outros. Dessa forma, é importante reconhecer que as quebras podem ocorrer por vias não relacionadas diretamente com a genotoxicidade de um químico. A ativação de enzimas como as endonucleases e as topoisomerases podem resultar em um elevado número de quebras bem como elevados níveis de compostos reativos endógenos, como radicais super-óxidos e óxido nítrico. Assim, quebras podem refletir efeitos diretos de substâncias xenobióticas bem como variações nos níveis de compostos celulares endógenos reativos, como radicais superóxidos ou óxido nítrico, por exemplo (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998).

Ademais, de acordo com Speit e Hartmann (1999), os crosslinks (DNA-DNA ou DNA-proteína), como aqueles induzidos pela mostarda de azoto, cisplatina, ciclofosfamida ou formaldeído, podem causar problemas no protocolo padrão do teste. Isso por que sua ocorrência pode estabilizar o DNA cromossômico e inibir a sua migração.

Há críticas também quanto ao uso do ensaio cometa no campo da ecotoxicologia sob o argumento de que o teste por si só talvez não seja uma ferramenta robusta para gerar dados ecogenotóxicológicos relevantes, a menos que os resultados possam ser correlacionados com outros biomarcadores. Apesar disso, por ser um teste de baixa especificidade, sensível, rápido e econômico, este vem sendo aplicado nos últimos anos com essa finalidade em vários táxons filogeneticamente distintos, como plantas inferiores e plantas superiores, oligoquetos, poliquetas, planárias, crustáceos, insetos, bivalves, gastrópodes,

equinodermos, peixes (em diferentes níveis tróficos), anfíbios e mamíferos (JHA, 2008).

O emprego da técnica já tem mais de 20 anos e é seguramente a mais usada para a avaliação de genotoxicidade. Para Collins *et al.* (2013), a grande popularidade do ensaio cometa é merecida pelo baixo custo de sua aplicação, por dispensar o emprego de equipamentos mais sofisticados, pela grande sensibilidade do teste, e pela possibilidade do emprego de incrementos que possibilitam adaptá-lo para atender a finalidades mais específicas no estudo da genotoxicidade e do reparo no DNA.

2.4.2 Teste do Micronúcleo Písceo

A possibilidade de ocorrência de micronúcleos após o término da divisão celular é há bastante tempo conhecida pelos citologistas, mas sua primeira descrição como um biomarcador de danos ao DNA foi apresentada na década de 70 a partir de uma série de estudos com medula óssea de hamster chinês e outros roedores tratados com compostos genotóxicos, a princípio, como uma alternativa aos métodos clássicos de citogenética (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1975).

Micronúcleo (MN) pode ser definido como um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose. Sua formação se deve a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores exógenos ou, ainda, a falhas no fuso mitótico, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase (SCHMID, 1973). Para Tolbert, Shy e Allen (1992), os micronúcleos são distinguíveis por cinco características: a) estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ou mais fraca que a do núcleo principal; b) borda evidente, sugerindo membrana nuclear; c) ter formato arredondado; d) localização intracitoplasmática; e) diâmetro menor do que 1/5 e maior do que 1/10 do núcleo principal.

Os cromossomos presentes nos MNs são primeiramente oriundos de falhas no fuso mitótico, cinetócoro, ou outra parte do aparato mitótico; por dano nas subestruturas cromossômicas ou por alterações na fisiologia celular. Assim, um

aumento da frequência de células micronucleadas é um biomarcador de efeitos genotóxicos, que pode refletir a exposição a agentes clastogênicos (provocam quebras cromossômicas) ou aneugênicos (provocam desvios numéricos no cariótipo) (ALBERTINI *et al.*, 2000).

Embora tenha sido desenvolvido originalmente para estudos em células de mamíferos, o teste do micronúcleo foi adaptado com sucesso por Hoofman e Raat (1982) para ser empregado em eritrócitos de peixes. A versão do protocolo adaptada para peixes passou a ser conhecida como Teste do Micronúcleo Písceo (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990). Para Al-Sabti e Metcalfe (1995) o teste do micronúcleo em peixes apresenta a vantagem de permitir predizer a presença de substâncias clastogênicas no meio aquático e, de acordo com esses autores, vários estudos demonstraram que os eritrócitos periféricos dos teleósteos tem uma grande incidência de micronúcleos após exposição a diferentes poluentes no ambiente ou em condições de laboratório.

Em eritrócitos de peixes, além dos MNs outras anormalidades morfológicas nucleares (AMNs) podem ser encontradas. Carrasco, Tylbury e Myers (1990) descreveram e fotografaram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes (Figura 05). Essas lesões foram basicamente classificadas em:

- a) **Blebbbed**: pequena evaginação da membrana nuclear. O tamanho destas evaginações varia desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, porém ainda ligadas ao núcleo.
- b) **Lobed**: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os blebbed. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.
- c) **Vacuolated**: núcleos que apresentam uma região que lembra vacúolos no seu interior. Estes vacúolos apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.
- d) **Notched**: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

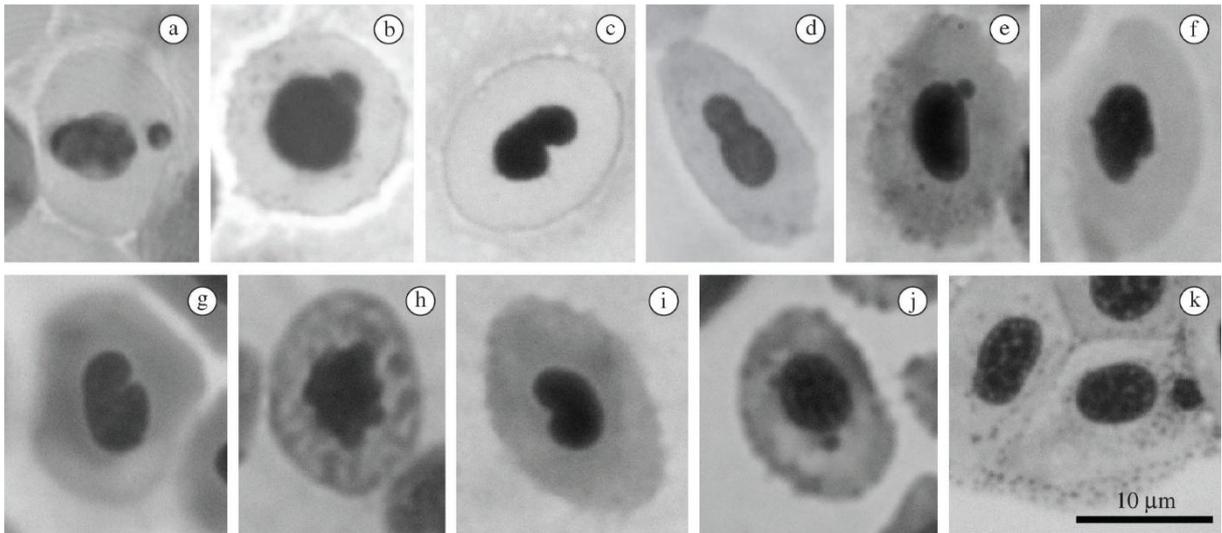


Figura 05: Anormalidades morfológicas nucleares: Micronúcleo (a, e, j e k); Blebbed (b); Notched (c, g e i); Lobbed (d, f e h). Fonte: FURNUS *et al.* (2014).

Segundo Ayllón e Garcia-Vazquez (2001), a origem das anormalidades morfológicas nucleares é desconhecida, no entanto, sugerem que elas devem ser incluídas nas análises de genotoxicidade em peixes baseadas na contagem de micronúcleo, por apresentar resultados mais confiáveis e mais completos. Esses mesmo autores demonstram em um trabalho publicado anteriormente (AYLLÓN e GARCIA-VASZQUEZ, 2000) que o contato de duas espécies de peixes diferentes com substâncias conhecidamente clastogênicas como mitomicina C e ciclofosfamida, provocou um aumento significativo na ocorrência de anormalidades nucleares.

De acordo com Al-Sabti e Metcalfe (1995), o teste do micronúcleo com eritrócitos de peixes apresenta, no entanto, alguns inconvenientes, como baixa sensibilidade e a possibilidade de se interpretar danos nucleares causados por necrose eritrocítica viral como uma resposta clastogênica. Para Metcalfe (1989), este ensaio não é capaz de detectar as não disjunções mitóticas se estas não levarem a perda de cromossomos na anáfase, bem como também não é possível detectar aberrações cromossômicas causadas por rearranjos, tais como translocações ou inversões, se estas não originarem fragmentos acêntricos. Desta forma, o teste nestes casos apresenta-se subestimativo e com baixa sensibilidade.

Por outro lado, técnica é considerada uma das mais vantajosas para o estudo de agentes clastogênicos e aneugênicos, pois pode ser usada em qualquer população celular em proliferação, sem que seja necessário o conhecimento prévio do cariótipo do animal, é de baixo custo e não exige materiais mais sofisticados (RIVIERO, 2007; GALINDO e MOREIRA, 2009). Esse teste, medindo dano cromossômico estrutural ou numérico, tem sido usado para avaliar genotoxicidade, sendo, dessa forma, um indicador recomendado para estudos ambientais, tanto em condições laboratoriais como no campo (BELPAEME, COOREMAN e KIRSCH-VOLDERS, 1998).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se nanotubos de carbono de paredes múltiplas apresentam ação genotóxica em eritrócitos de peixes via exposição hídrica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a genotoxicidade de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em diferentes concentrações nos peixes *Astyanax altiparanae* e *Danio rerio* após exposição aguda (96 horas) por meio do ensaio Cometa (versão alcalina) e teste do Micronúcleo písceo;
- Avaliar a genotoxicidade de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em diferentes concentrações nos peixes *Astyanax altiparanae* e *Danio rerio* após exposição subcrônica (21 dias) por meio das técnicas acima mencionadas;
- Comparar as respostas de avaliação do potencial genotóxico de nanotubos de carbono, em ambos os bioensaios realizados (agudo e subcrônico) entre as espécies de peixe nativa (*Astyanax altiparanae*) e a modelo (*Danio rerio*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Nanotubos de Carbono

Os nanotubos de carbono utilizados nos ensaios foram sintetizados pela Sigma-Aldrich® e adquiridos comercialmente. De acordo com o fabricante, a síntese se deu por deposição química de vapor utilizando cobalto e molibdênio como catalizadores, passando posteriormente por um tratamento ácido para a remoção desses metais. O fabricante informou ainda que a mostra apresenta 95% de pureza e as medidas informadas são 6,6 nm de diâmetro em média, 6-9 nm de absorbância e 5 µm de comprimento. Para a sua caracterização foram utilizadas quatro técnicas: Difração de raios X, Espectroscopia Raman, Análise termogravimétrica e Potencial Zeta.

As medidas de difração de raios X foram realizadas em um difratômetro Shimadzu XRD 6000, usando radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) com 40 kV e 40mA e resolução de 0,02° em 2 θ . Os espectros Raman foram obtidos em um Espectrofotômetro Renishaw, acoplado a um microscópio ótico com resolução espacial de 1 µm, usando laser de 514 nm com fonte de excitação e 20 mW de potência. Os espectros foram obtidos com 30 varreduras na região de 3500-200 cm⁻¹, com tempo de contagem de 10 segundos.

Potencial Zeta é a magnitude da repulsão ou atração eletrostática ou das cargas entre as partículas presentes em uma dispersão, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a sua estabilidade. Sendo assim, quanto maiores os valores de potencial provavelmente a suspensão seja mais estável, o que quer dizer que as partículas carregadas se repelem umas às outras, superando as interações de Van der Waals presentes na amostra e que propiciam a sua agregação.

As medidas de potencial Zeta foram obtidas a partir de uma suspensão de nanotubos de carbono em 2 mL de água Milli-Q, da qual foi retirada uma alíquota de 500 µL e diluída para 15 mL com água Milli-Q. Em seguida, a dispersão foi colocada em um banho ultrassônico por 15 minutos. Foram realizadas cinco medidas.

A análise térmica foi realizada com 4 mg da amostra obtida comercialmente aquecendo-se com taxa de 10°C/min até a temperatura de 900 °C.

A caracterização foi realizada pelos pesquisadores: Mariane Cristina Schnitzler e Lucas William Leite Silva, ambos da Universidade Federal de São João Del-Rei (MG).

4.2 Aquisição e Aclimação dos Modelos

Foram adquiridos comercialmente cento e oitenta exemplares juvenis de lambaris (*Astyanax altiparane*) os quais foram submetidos a aclimação em tanques de 250L (Figura 06), com água filtrada e declorada, durante um período de 30 dias. A temperatura dos tanques foi mantida por termostato em 25 °C, tendo havido fotoperíodo diário de aproximadamente 12h. A iluminação foi promovida por sistema composto por temporizador e lâmpada fluorescente 20 W de intensidade luminosa 1200 lx. O oxigênio dissolvido, através de sistema aerador, foi mantido em ~ 8 mg/L e o pH da água na faixa de 6,5 a 8. Oxigênio dissolvido e pH foram mensurados diariamente por meio de oxímetro e pHmetro, respectivamente. A limpeza dos tanques e alimentação foram realizadas diariamente utilizando ração comercial contendo 28% de proteína bruta (PB) e 3.100 kcal de energia digestível (ED) por quilo.

Foram adquiridos também comercialmente cem exemplares de *Danio rerio*, os quais foram submetidos a aclimação em aquários de 30 litros (Figura 07) com água filtrada, declorada, durante um período de 30 dias. Para o controle da iluminação, temperatura, oxigenação e alimentação foram mantidos os mesmos procedimentos descritos para *Astyanax altiparane*.

A aclimação dos exemplares de ambas as espécies, assim como todos os ensaios de genotoxicidade, foram realizados nas dependências do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Campus Ecovile, em Curitiba.

As técnicas utilizadas para o manejo dos animais durante esse período bem como os procedimentos adotados para a realização dos ensaios e coleta de tecidos e órgãos descritas a seguir foram analisadas e aprovadas pela comissão de ética no uso de animais dessa mesma instituição sob parecer técnico de número 2016/019.



Figura 06: O tanque da direita, com capacidade de 250L foi utilizado para aclimatar os exemplares de *Astyanax altiparanae* por um período de 30 dias. Fonte: O autor.



Figura 07: Aquários com capacidade para 30L utilizados para aclimatar os exemplares de *Danio rerio* durante 30 dias. Fonte: O autor.

4.3 Ensaio de Exposição Aguda

Para o ensaio de exposição aguda com a espécie *Astyanax altiparanae* 60 indivíduos com comprimento médio de 4,839 cm ($\sigma= 0,7367$) e massa corporal média de 1,5819 g ($\sigma= 0,7153$) foram distribuídos em 4 grupos de 15 animais em aquários de 30 L preenchidos parcialmente com 21L de água filtrada e declorada sob aeração constante. Os peixes foram mantidos por 5 dias antes de iniciar o experimento.

A exposição se deu por via hídrica, onde uma solução estoque com concentração de 1g/L de Nanotubos de Carbono em água destilada foi preparada com o auxílio de um agitador magnético e a partir dela foram feitas as diluições para três tratamentos: 0,5; 5,0 e 50 mg/L. Um quarto grupo foi reservado ao controle negativo, tendo contato apenas com água filtrada.

No intuito de otimizar o espaço físico do laboratório de bioensaios, adaptamos o ensaio de exposição aguda com *Danio rerio* para beckers de 2 litros conforme a NBR 15088/2011 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes (ABNT, 2011). Dessa forma, 40 exemplares com comprimento médio de 3,4184 cm ($\sigma=0,3336$) e massa corporal média de 0,3234 g ($\sigma=0,082$) foram distribuídos em 8 beckers (5 animais em cada) preenchidos parcialmente com 1,5 litro de água filtrada e declorada sob aeração constante, onde foram mantidos por 5 dias antes de iniciar o experimento. A exposição seguiu os mesmos parâmetros descritos para o ensaio com *Astyanax altiparanae*, sendo 1 controle negativo com dois beckeres e três tratamentos com concentrações de 0,5; 5,0; e 50 mg/L, respectivamente (2 beckeres cada). Realizamos os testes com esse modelo em duplicada dada a necessidade de um N amostral razoável sem comprometer a relação volume de água/animal.

Não se procedeu à utilização de quaisquer solvente ou surfactante que pudesse exercer influência sobre a dispersão dos nanotubos na água, bem como não houve renovação total ou parcial do contaminante. Os ensaios tiveram duração de 96 horas e durante esse período os animais foram privados de alimentação. As condições de temperatura, pH e oxigenação da água foram monitoradas e controladas durante todo o experimento dentro dos mesmos parâmetros descritos para a aclimatação (ABNT, 2011).

4.4 Ensaios de Exposição Subcrônica

Para o ensaio de exposição subcrônica com *Astyanax altiparanae*, 60 exemplares com comprimento médio de 5,3508 cm ($\sigma= 0,6385$) e massa corporal média de 1,9297 g ($\sigma= 0,8476$) foram divididos em 4 aquários de 30 L (15 peixes em cada) preenchidos parcialmente com 21 litros de água filtrada e decolorada sob aeração constante, onde foram mantidos por 5 dias até o início do experimento.

Uma solução estoque de nanotubos de carbono na concentração de 1g/L em água destilada foi preparada com auxílio de um agitador magnético e partir dela foram feitas as diluições para três tratamentos nas concentrações de: 0,1; 1,0 e 10 mg/L, respectivamente. O quarto grupo foi reservado ao controle negativo, tendo contato apenas com água filtrada.

Para o ensaio com *Danio rerio*, 48 exemplares com comprimento médio de 3,3911 cm ($\sigma=0,2976$) e massa corporal média de 0,3462 g ($\sigma=0,0991$). foram distribuídos em 8 beckeres (6 peixes em cada) de 2 litros preenchidos parcialmente com 1,5 litro de água filtrada e decolorada sob aeração constante, onde foram mantidos por 5 dias até o início do experimento. A exposição seguiu os mesmos parâmetros descritos para o ensaio de exposição subcrônica com *Astyanax altiparanae*, sendo 1 controle negativo com dois beckeres e três tratamentos com concentrações de 0,1; 1,0; e 10 mg/L, respectivamente (2 beckeres cada).

A exposição se deu por via hídrica durante um período de 21 dias com renovação parcial do contaminante (1/3) a cada 72 horas. Os animais foram alimentados a cada 72 horas, porém, sempre 24 horas antes de cada renovação do contaminante. A ração utilizada para alimentar os peixes durante o experimento foi a mesma utilizada durante o período de aclimatação. A limpeza dos aquários e Beckers foi realizada a cada 72 horas, pouco antes da renovação do contaminante.

Não foram utilizados quaisquer solventes ou surfactantes que pudessem influenciar na dispersão dos nanotubos na água e durante todo o experimento as condições de temperatura, oxigenação e pH da água foram monitoradas e mantidas dentro da normalidade (ABNT, 2011).

A escolha das concentrações utilizadas nesses testes se deu com base em experimentos que já haviam sido previamente descritos na literatura sobre

toxicidade e letalidade em peixes como *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Poecilia reticulata* e *Oncorhynchus mykiss* expostos a NTCs (FILHO et al., 2014; LUKHELE et al., 2015; SOHN et al., 2015; NYEMBE et al., 2016).

4.5 Coleta e Processamento do Material Biológico

Após o término dos ensaios com a espécie nativa *Astyanax altiparanae*, os exemplares foram anestesiados em uma solução de benzocaína 20% em álcool etílico (GONTIJO *et al.*, 2003) para em seguida serem medidos, pesados e por fim, eutanasiados. O sangue periférico de cada indivíduo foi coletado por meio de um capilar heparinizado em seguida transferido para um tubo do tipo eppendorf contendo 1ml de soro fetal bovino e armazenado a 4°C por 24 horas para o emprego dos biomarcadores de genotoxicidade. Segundo Ramsdorf *et al.* (2009), o soro fetal bovino é a solução mais adequada para manter a viabilidade celular por até 48 horas.

Terminados os ensaios com *Danio rerio*, os animais foram anestesiados em solução de benzocaína a 20%, pesados, medidos e eutanasiados por meio de decapitação. Através de uma micropipeta, uma amostra de sangue periférico de aproximadamente 100 µL foi coletada de cada indivíduo em seguida transferida para um tubo do tipo eppendorf contendo 500 µL de soro fetal bovino e armazenada a 4°C por 24 horas para o emprego dos marcadores de genotoxicidade.

4.6 Ensaio Cometa

A técnica utilizada para o Ensaio Cometa (versão alcalina) foi descrita por Speit e Hartmann (1999) com ajustes segundo Ferraro *et al.* (2004) e Cestari *et al.* (2004) para células eritrocitárias.

Para cada uma das amostras, 10 µL da suspensão celular (sangue + soro fetal bovino) foram misturados a 120 µL de agarose LMP e depositados sobre lâmina previamente coberta de agarose convencional e por fim coberto com uma lamínula. Após 15 minutos sob refrigeração, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram

mergulhadas em uma solução de lise onde foram mantidas no escuro sob temperatura de 4°C por 24 horas.

Transcorrido o tempo de refrigeração, as lâminas foram depositadas na cuba de eletroforese sob temperatura de 4°C e sobre elas foi adicionado um tampão com pH >13 que as cobriu por 30 minutos antes da corrida eletroforética. A eletroforese ocorreu a 25 V e 300 mA com duração de 25 minutos.

Terminada a eletroforese, as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e neutralizadas com 5 ml de tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos; processo que se repetiu por três vezes. Após secagem na vertical, as lâminas foram fixadas com etanol também por 5 minutos

A coloração, foi realizada com 20 µL de brometo de etídeo (20 mg. L⁻¹) em cada lâmina para análise imediata, realizada em microscópio de epifluorescência Leica do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental (UFPR). Foram analisados visualmente 100 nucleóides por lâmina sendo classificados entre 0 (nenhum dano) e 4 (dano máximo) (Figura 04). O escore foi determinado de acordo com a fórmula $\text{Escore} = (n_0 \times 0) + (n_1 \times 1) + (n_2 \times 2) + (n_3 \times 3) + (n_4 \times 4)$, onde n1, n2, n3 e n4 correspondem ao número de achados para dano 0, 1, 2, 3 e 4, respectivamente (COLLINS *et al.*, 1997).

4.7 Teste do Micronúcleo Písceo

Para realização do teste de micronúcleos (MN) e anormalidades morfológicas nucleares foi empregada a técnica descrita por Heddle (1973) e Schmid (1975) com algumas modificações segundo Hoofman e Raat (1982).

A suspensão celular (eritrócitos + soro fetal bovino) foi centrifugada durante 4 minutos a uma velocidade de 5000 rpm e em seguida foi removido o sobrenadante. Da alíquota restante em cada suspensão, 15 µl foram retirados com uma micropipeta e depositados sobre uma lâmina limpa para então se proceder com o esfregaço. Após secarem ao ar, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 30 minutos e por fim coradas em uma solução de Giemsa (10%) diluída em tampão fosfato (pH 7,6) por 12 minutos.

As análises foram realizadas em um microscópio Opton modelo Tim 2008 com magnificação de 1000x. Para a identificação dos eritrócitos micronucleados foram observados os seguintes parâmetros: a) O micronúcleo não pode ultrapassar um quinto do tamanho do núcleo principal; b) O micronúcleo deve estar claramente separado do núcleo principal; c) O micronúcleo deve estar no mesmo plano de foco e ter a mesma cor e refringência do núcleo principal (HOOFTMAN E RAAT, 1982; HOSE *et al.*, 1987)

As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, também foram analisadas, sendo descritas como alterações morfológicas nucleares (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

Para o teste do micronúcleo e AMNs em eritrócitos de *Astyanax altiparanae*, foram analisadas 2000 células por lâmina, enquanto para *Danio rerio* foram analisadas apenas 1000 células por lâmina em função da menor quantidade de sangue obtida dos exemplares desse modelo. Apenas eritrócitos com citoplasma e membrana celular intactos foram contabilizados.

4.8 Análise Estatística

Os dados obtidos a partir da análise dos biomarcadores de genotoxicidade foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilks que os apontou como sendo não paramétricos. Para a análise da variância entre controle e grupos de exposição foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Student-Newman-Keuls com nível de significância de $p < 0,05$. As análises foram realizadas com o pacote estatístico Biostat 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos Nanotubos de Carbono

A difração de raios X demonstrou um pico intenso em 25,89 em 2θ (Figura 08), referente aos planos 002 do grafite em $d=0,34$ nm, o que indica a presença dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas na amostra. Observa-se ainda a presença de outros picos de menor intensidade, provavelmente remanescentes do processo de síntese ou ainda da purificação a que a amostra é submetida antes de sua comercialização.

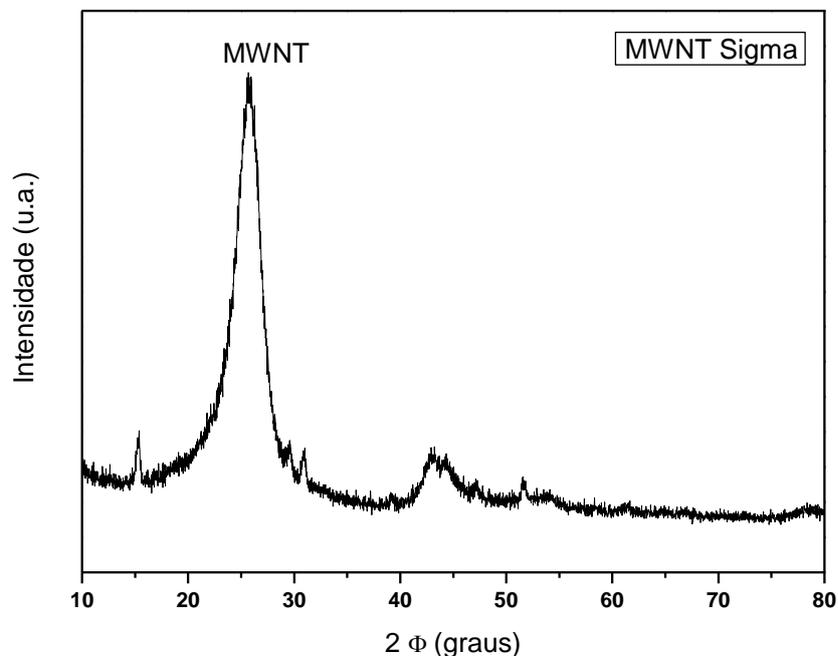


Figura 08: Difratoograma de raios X da amostras de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNT) Sigma-Aldrich

Através de Espectroscopia Raman, foi observado a presença de duas bandas principais: a banda D ($1349,1$ cm^{-1}) e a banda G ($1588,2$ cm^{-1}), além de bandas em $2702,3$ e $2934,2$ cm^{-1} , (Figura 09).

A banda D é originária dos modos de desordem induzida do grafite, e sua segunda harmônica, a banda G', aparece devido a um processo de dupla ressonância, surgindo em aproximadamente $2\omega_D$, ou seja, em aproximadamente

2700 cm^{-1} . Dessa forma, de acordo com Thomsen e Reich (2000), é possível atribuir a banda presente em 2702,3 cm^{-1} à banda G'.

De acordo com Tuinstra e Koenig (1970), a banda G é atribuída ao modo E_{2g} do grafite. Deve-se ressaltar que as bandas D e G estão presentes em vários materiais de carbono contendo ligações sp^2 , e a frequência, intensidade e largura de linha destas bandas são dependentes do grau de desordem estrutural (Cuesta *et al*, 1998). Deslocamentos para menor frequência, bem como diminuição da razão entre as bandas, são associadas ao aumento do grau de grafitação do material.

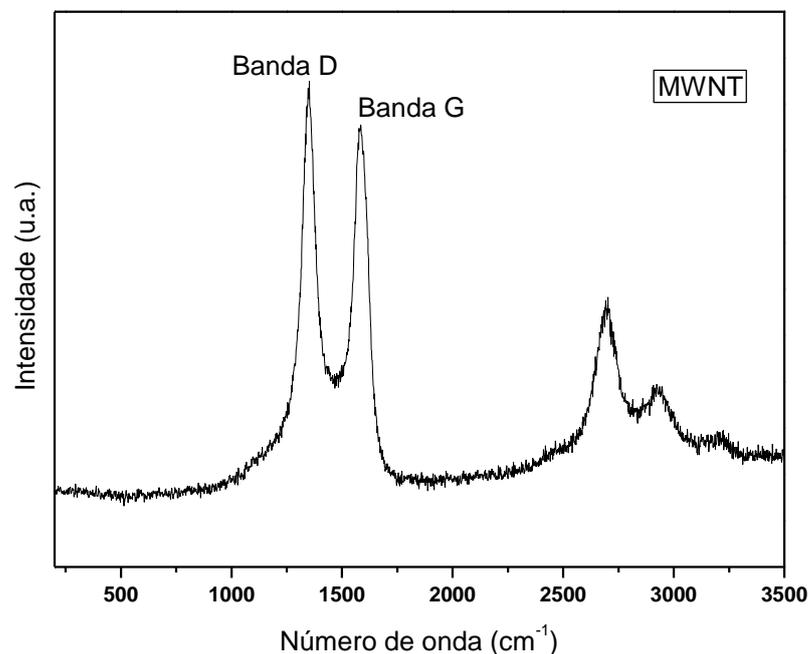


Figura 09: Espectro Raman da amostra de nanotubos de carbono de paredes múltiplas Sigma-Aldrich

O valor médio obtido para o potencial zeta foi de -32.65 mV. Valores negativos de potencial zeta indicam que existe a predominância de cargas negativas na superfície dos nanotubos de carbono. Este valor pode ser interpretado como sendo relativo à presença de grupamentos contendo oxigênio na superfície dos nanotubos, sendo que estes grupos poderiam ser remanescentes dos processos de purificação aos quais os nanotubos são submetidos antes de sua comercialização. Vale ressaltar que portanto, em pH neutro, as espécies que contenham cargas positivas em sua superfície poderão ser aderidas aos nanotubos de carbono através de atração eletrostática.

Observando-se o termograma (Figura 10), nota-se que ocorre uma perda de massa acentuada em aproximadamente 600 °C, característico dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Esta perda de massa é estendida até aproximadamente 650 °C. Esta larga faixa de perda de massa deve-se ao fato de que a queima de nanotubos mais defeituosos ocorre antes da queima dos NTCs com paredes em melhores condições.

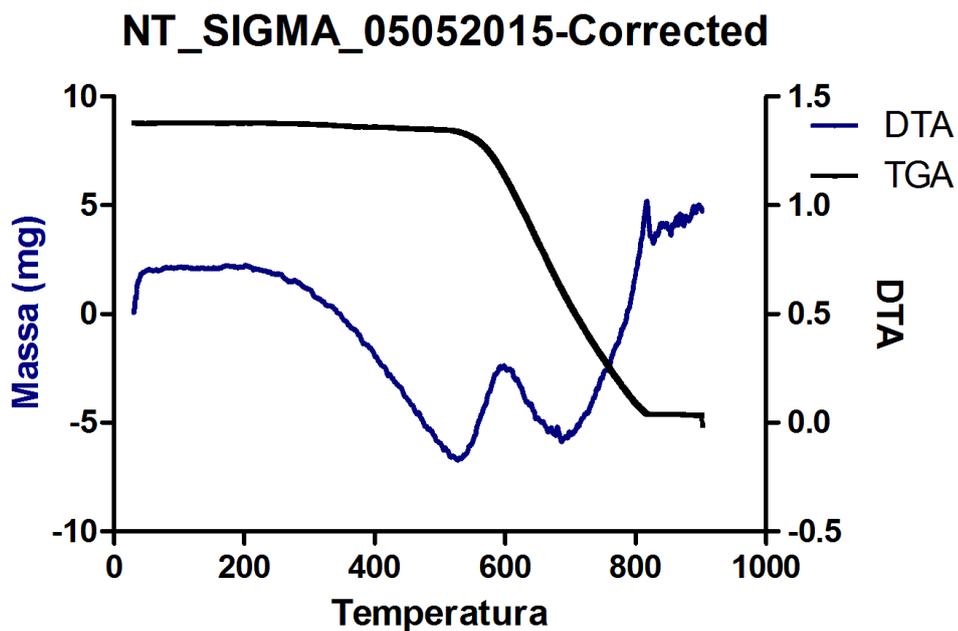


Figura 10: A análise termogravimétrica indica o grau de pureza da fração de nanotubos analisada

5.2 Ensaio de Exposição Aguda com *Danio rerio*

A exposição por via hídrica não provocou alterações aparentes no comportamento dos indivíduos ao longo das 96 horas em que transcorreu o teste.

Os escores obtidos por meio do ensaio cometa em eritrócitos revelaram que nenhum dos grupos de exposição apresentou incidência de danos ao DNA maior do que o grupo controle (Figura 11). Houve, no entanto, diferença estatística significativa entre os grupos de exposição nas concentrações de 0,5 e 50 mg/L com relação ao grupo controle.

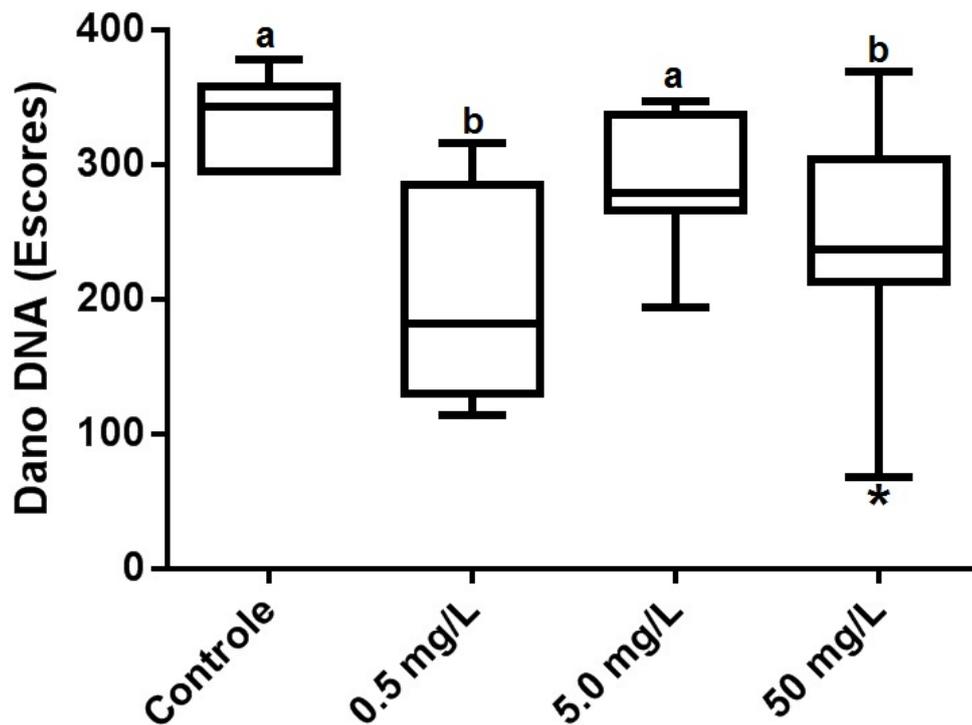


Figura 11: Danos observados no DNA de eritrócitos de *Danio rerio* após exposição aguda. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (Kruskal-Wallis com nível de significância $p < 0,05$). (* indicam os outliers em cada grupo, não inclusos na análise da variância)

O teste do micronúcleo písceo e de anormalidades morfológicas nucleares não revelou diferença significativa entre os grupos de exposição e o controle para nenhuma das anormalidades analisadas individualmente ou mesmo para o total de anormalidades em cada tratamento (Tabela 01).

Tabela 01: Frequência absoluta de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Danio rerio* após exposição aguda aos NTC de paredes múltiplas. Os valores estão expressos em mediana e quartis (25%; 75%). Não se observa diferença significativa na comparação entre grupos de exposição e controle (Kruskal-Wallis com nível de significância $p < 0,05$).

Frequência de Micronúcleos e AMN em Ertirócitos				
Anormalidades	Controle	0.5 mg/L	5.0 mg/L	50 mg/L
MN	0	0,5 (0; 1)	1 (0; 1)	0
Blebbled	0 (0; 1)	0,5 (0; 2,25)	0	0 (0; 3)
Lobbed	1 (0; 1)	0 (0; 1,5)	0 (0; 0,5)	0 (0; 2)
Notched	0	0 (0; 1)	0 (0; 1)	0
Binúcleo	0	0,5 (0; 1,5)	0 (0; 1)	0
Vacuolated	0 (0; 3)	0 (0; 5,5)	0 (0; 2)	0 (0; 1)
Total de AMN	3 (2; 4)	5 (0; 18)	0,3 (0,5; 6)	2 (0; 5)

5.3 Ensaio de Exposição Aguda com *Astyanax altiparanae*

A exposição por via hídrica aos NTCs não gerou grandes alterações comportamentais nos indivíduos ao longo das 96 horas em que transcorreu o experimento.

Os escores obtidos por meio do ensaio cometa em eritrócitos revelaram que apenas o grupo de exposição com concentração de 5 mg/L apresentou incidência de danos ao DNA maior do que o grupo controle, porém a diferença não é significativa (Figura 12). Houve, no entanto, diferença estatística significativa entre o grupo de exposição na concentração e 50 mg/L com relação ao grupo controle.

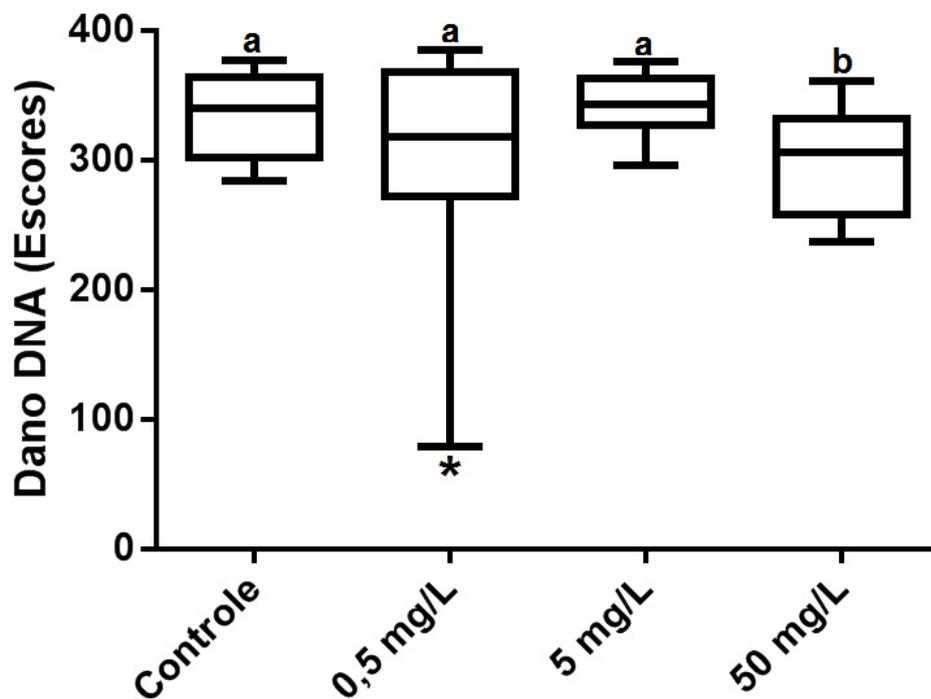


Figura 12: Danos no DNA observados em eritrócitos de *Astyanax altiparanae* após exposição aguda. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (Kruskal-Wallis com nível de significância $p < 0,05$). (*) indicam os outliers em cada grupo, não inclusos na análise da variância)

O teste do micronúcleo písceo e de anormalidades morfológicas nucleares não revelou diferença significativa entre os grupos de exposição e o controle para nenhuma das anormalidades analisadas individualmente ou mesmo para o total de anormalidades em cada tratamento (Tabela 02).

Tabela 02: Frequência absoluta de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Astyanax altiparanae* após exposição aguda aos NTC de paredes múltiplas. Os valores estão expressos em mediana e quartis (25%; 75%). Não se observa diferença significativa na comparação entre grupos de exposição e controle (Kruskal-Wallis com nível de significância $p < 0,05$).

Frequência de Micronúcleos e AMN em Eritrócitos				
Anormalidades	Controle	0.5 mg/L	5.0 mg/L	50 mg/L
MN	0	0	0 (0; 0,75)	0
Blebbbed	0 (0; 0,75)	0 (0; 0,5)	0 (0; 0,75)	0 (0; 1)
Lobbed	2,5 (1; 11,25)	4 (0,5; 11)	1 (0; 3,5)	1 (0,25; 2)
Notched	1 (0; 1,75)	0 (0; 0,5)	0 (0; 1)	0
Binúcleo	0 (0; 1)	0 (0; 0,5)	0	0
Vacuolated	0	0	0 (0; 0,75)	0
Total de AMN	4,5 (3; 15,75)	5 (1,5; 12,5)	3 (1,5; 5,5)	1,5 (1; 2)

5.4 Ensaio de Exposição Subcrônica com *Danio rerio*

A exposição por via hídrica não provocou alterações aparentes no comportamento dos indivíduos após nenhum dos ciclos de contaminação.

Os escores obtidos por meio do ensaio cometa em eritrócitos revelaram que nenhum dos grupos de exposição apresentou incidência de danos ao DNA maior do que o grupo controle (Figura 13). Houve, no entanto, diferença estatística significativa entre os grupos de exposição nas concentrações de 1 e 10 mg/L com relação ao grupo controle.

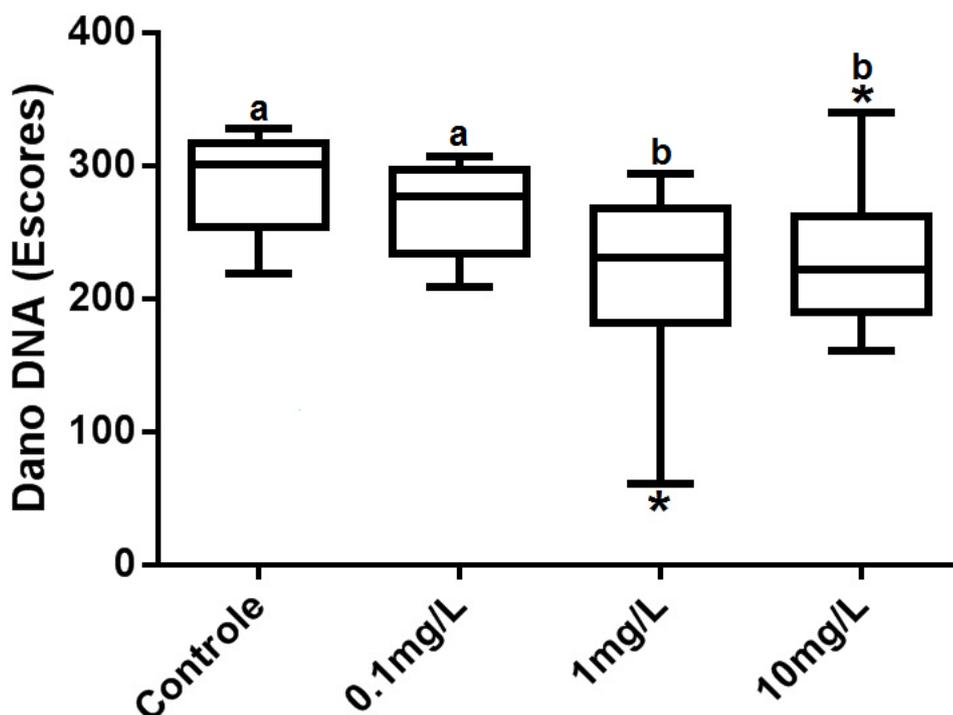


Figura 13: Danos observados no DNA de eritrócitos de *Danio rerio* após exposição subcrônica. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (Kruskal-Wallis com nível de significância $p < 0,05$). (* indicam os outliers em cada grupo, não inclusos na análise da variância)

O teste do micronúcleo písceo e de anormalidades morfológicas nucleares não revelou diferença significativa entre os grupos de exposição e o controle para nenhuma das anormalidades analisadas individualmente ou mesmo para o total de anormalidades em cada tratamento (Tabela 03).

Tabela 03: Frequência absoluta de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Danio rerio* após exposição subcrônica aos NTC de paredes múltiplas. Os valores estão expressos em mediana e quartis (25%; 75%). Não se observa diferença significativa na comparação entre grupos de exposição e controle (Kruskal-Wallis com nível de significância $p < 0,05$).

Frequência de Micronúcleos e AMN em Ertirócitos				
Anormalidades	Controle	0.1 mg/L	1.0 mg/L	10 mg/L
MN	0	0 (0; 0,25)	0	0
Blebbbed	0	0	0	0
Lobbed	0 (0; 1,25)	0 (0; 0,25)	1,5 (0; 2,25)	0
Notched	0	0	0 (0; 1,25)	0
Binúcleo	0	0	0	0
Vacuolated	0 (0; 0,25)	0 (0; 0,25)	0 (0; 5)	0 (0; 2)
Total de AMN	1 (0; 1,5)	1,5 (0; 2)	3 (1,5; 4)	2 (0; 5)

5.5 Ensaio de Exposição Subcrônica com *Astyanax altiparanae*

A exposição por via hídrica aos NTCs não gerou grandes alterações no comportamento dos indivíduos após nenhum dos ciclos de contaminação.

Os escores obtidos por meio do ensaio cometa em eritrócitos revelaram que apenas os grupos de exposição com concentração de 0,1 e 1mg/L apresentaram incidência de danos ao DNA maior do que o grupo controle, porém a diferença não é significativa (Figura 14). Houve, no entanto, diferença estatística significativa entre o grupo de exposição na concentração e 10 mg/L com relação ao grupo controle.

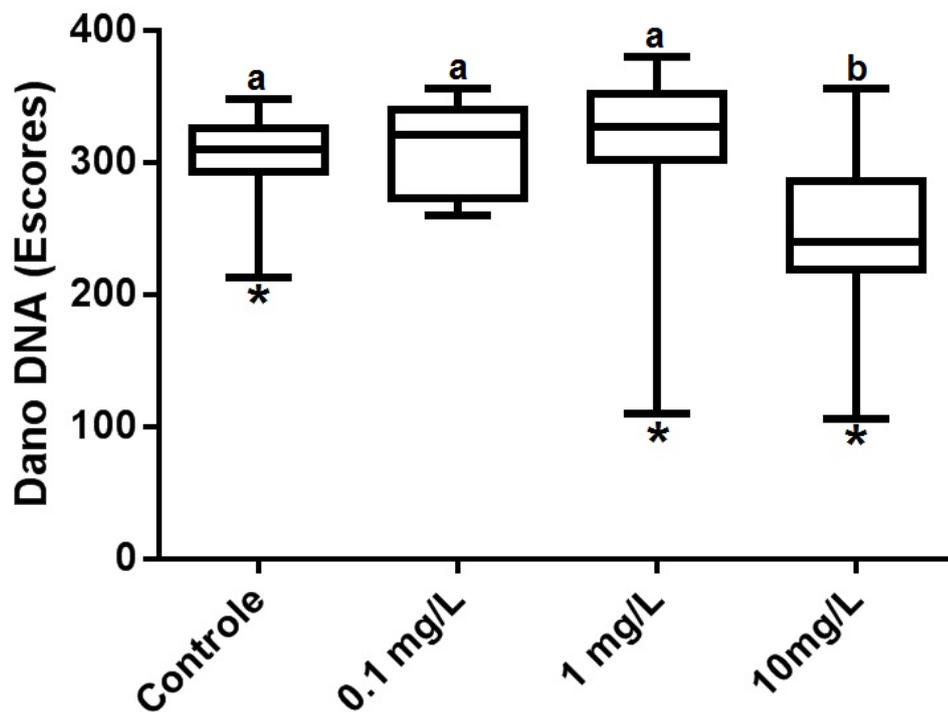


Figura 14: Danos observados no DNA de eritrócitos de *Astyanax altiparanae* após exposição subcrônica. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (Kruskal-Wallis com nível de significância $p < 0,05$). (* indicam os outliers em cada grupo, não inclusos na análise da variância)

O teste do micronúcleo písceo e de anormalidades morfológicas nucleares não revelou diferença significativa entre os grupos de exposição e o controle para nenhuma das anormalidades analisadas individualmente ou mesmo para o total de anormalidades em cada tratamento (Tabela 04).

Tabela 04: Frequência absoluta de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Astyanax altiparanae* após exposição subcrônica aos NTC de paredes múltiplas. Os valores estão expressos em mediana e quartis (25%; 75%). Não se observa diferença significativa na comparação entre grupos de exposição e controle (Kruskal-Wallis com nível de significância $p < 0,05$).

Frequência de Micronúcleos e AMN em Ertirócitos				
Anormalidades	Controle	0.1 mg/L	1.0 mg/L	10 mg/L
MN	0	0	0 (0; 0,75)	0
Blebbbed	0	0	0 (0; 0,75)	0
Lobbed	0 (0; 3)	0	0	0
Notched	0	0	0	0
Binúcleo	0	0	0	0 (0; 1,5)
Vacuolated	0	0	0 (0; 0,75)	0
Total de AMN	2 (0; 4)	0 (0; 2)	0,5 (0; 2)	2 (0; 3,5)

6. DISCUSSÃO

Até o presente momento, não há relatos na literatura de avaliação da gonotoxicidade de amostras comerciais de nanotubos de carbono de paredes múltiplas nas espécies *Danio rerio* e *Astyanax altiparanae* em estágio juvenil via exposição hídrica. Outro diferencial dessa pesquisa é o uso de uma espécie nativa e uma espécie exótica como bioindicadores de genotoxicidade para os NTCs. Usamos o modelo *Danio rerio* por se tratar de uma referência internacional na perspectiva da ecotoxicologia, o que nos provêm parâmetros para comparação de resultados entre diferentes laboratórios. Contudo, se trata de uma espécie exótica, e suas respostas podem não refletir a real situação de uma eventual contaminação da fauna endêmica. De fato, vários estudos com outros contaminantes demonstraram que as respostas entre espécies nativas e exóticas podem ser diferentes (ELONEN *et al.*, 1998; CAMPAGNA *et al.*, 2008; MURUSSI *et al.*, 2014; PIANCINI *et al.*, 2015). Dessa forma, utilizamos também *Astyanax altiparanae*, uma espécie nativa e muito comum nos rios do sul e do sudeste do Brasil.

Os nanotubos de carbono são de difícil dispersão em água e matrizes polares, devido à isso, vários agentes dispersantes podem ser adicionados ao meio de ensaio para reduzir a sua aglomeração (JACKSON *et al.*, 2013; LANONE *et al.*, 2013). Contudo, é fato que o uso de dispersantes para estudo da toxicidade de NTCs pode gerar falso positivo. Wang *et al.* (2013) observaram em testes *in vitro* que amostras de surfactantes com ou sem a presença de NTCs apresentaram toxicidade sob certas condições. Resultados parecidos foram obtidos por Filho *et al.* (2014) em um trabalho com nanotubos de paredes múltiplas dispersados com o surfactante Pluronic® em ensaios *in vivo* com *Danio rerio*. Em face disso, nós optamos por conduzir nossos experimentos sem fazer uso de agentes dispersantes no intuito de evitar o surgimento de outras variáveis e até mesmo para simular um efeito mais realístico de um eventual descarte desse material em corpos d'água.

Dada a baixa capacidade de dispersão dos NTCs. Muitas amostras disponíveis comercialmente são funcionalizadas antes da utilização final. Tipicamente, a superfície hidrofóbica do tubo é oxidada ou modificada covalentemente para sua melhor dispersão em solventes polares (incluindo a água)

(JACKSON *et al.*, 2013; LANONE *et al.*, 2013). Os NTCs que utilizamos não apresentavam funcionalização em sua superfície ou extremidades uma vez que é conhecido o fato de que grupamentos funcionais podem exercer influência nos resultados acerca da toxicidade dos NTCs. Nayak *et al.* (2010) compararam a viabilidade celular após exposição à NTCs com elevado grau de pureza e também após exposição à NTCs cujas superfícies foram funcionalizadas com diversos grupamentos diferentes. Eles observaram que todos os NTCs com grupamentos funcionais se mostraram tóxicos, em maior ou menor grau, à despeito dos NTCs com maior pureza, os quais não provocaram alterações na viabilidade das células.

Nós utilizamos dois biomarcadores genéticos; o ensaio cometa alcalino em eritrócitos e o teste do micronúcleo píficeo, também em eritrócitos, no intuito de avaliar o potencial genotóxico dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Os resultados obtidos através do teste do micronúcleo e anormalidades morfológicas nucleares não revelou genotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas independentemente da espécie e do tempo de exposição. Para Metcalfe (1988) o teste do micronúcleo píficeo como marcador de genotoxicidade e mutagenicidade tem como desvantagem o fato de apresentar baixa sensibilidade. Isso se deve, segundo Tavares-Dias e Moraes (2004) ao fato de que peixes em geral apresentam baixo índice hematopoiético sendo que seus eritrócitos podem permanecer em circulação por até 160 dias dependendo da espécie utilizada nos bioensaios. Considerando que o maior tempo de exposição praticado em nosso trabalho foi de 21 dias, aproximadamente 13% do período máximo de circulação dos eritrócitos, é possível que não tenha havido renovação celular em quantidade suficiente para o aparecimento de micronúcleos ou outras anormalidades morfológicas nucleares. De fato, resultados negativos assim como os nossos para o teste do micronúcleo em avaliações de toxicidade de NTCs já foram observados anteriormente por Filho *et al.* (2014) no modelo *Danio rerio*. Nesse trabalho a exposição se deu também por via hídrica por um período de 72 horas.

Resultados negativos no teste do micronúcleo em ensaios com amostras de NTCs foram observados também *in vivo* no anfíbio *Xenopus laevis* (MOUCHET *et al.*, 2010) bem como em estudos *in vitro* com linfócitos humanos (SZENDI; VARGA, 2008), em células pulmonares de Hamster chinês (ASAKURA *et al.*, 2010) e com fibroblastos imortalizados de ratos (PONTI *et al.*, 2013).

Os escores obtidos com o ensaio cometa em eritrócitos demonstraram que, quando os grupos de exposição são comparados ao controle negativo, nenhuma das concentrações de NTCs testadas provocou elevado índice de danos como quebras de dupla ou simples fita ao DNA dos peixes, independentemente da espécie ou do tempo de exposição. No entanto, nossos achados apontam para a possibilidade de ocorrência de crosslinks. É possível observar que em todos os ensaios realizados há pelo menos um grupo de exposição cuja migração do DNA foi significativamente menor quando comparada ao controle negativo, e isso se deu preferencialmente nas maiores concentrações testadas. Verifica-se ainda que os escores obtidos no ensaio de exposição subcrônica com o modelo *Danio rerio* demonstram uma relação de dose-resposta.

Já é bem conhecido o fato de que agentes causadores de crosslinks reduzem a migração do DNA no ensaio cometa. Pfhuler & Wolf (1996) e Merk & Speit (1999) testaram substâncias conhecidamente indutoras de crosslinks combinadas com outros agentes tipicamente indutores de quebras no DNA e observaram redução no tamanho das caudas dos cometas em uma relação de dose-resposta. Com efeito, Ghosh *et al.* (2011) observaram através do ensaio cometa alcalino uma redução na migração do DNA de linfócitos humanos submetidos ao contato com nanotubos de carbono de paredes múltiplas nas concentrações de 5 e 10 µg/ml. Esses autores atribuíram esse achado à ocorrência de crosslinks NTCs-DNA.

A ocorrência de crosslinks NTCs-DNA explicaria a baixa migração do DNA observado nas maiores concentrações testadas no presente trabalho, uma vez que aderência dos nanotubos à dupla-hélice poderia dificultar a migração do DNA através do microgel. Essa possibilidade poderia também ser uma possível causa do não aparecimento de micronúcleos nos eritrócitos analisados, pois segundo Noll *et al.* (2006) e Huang e Li (2013), os crosslinks impedem a separação das duas fitas de DNA comprometendo o processo de replicação e interrompendo o andamento normal do ciclo celular.

De todo modo, a toxicidade dos nanotubos de carbono ainda permanece um assunto controverso. Diversos autores observaram em testes *in vitro* que os NTCs apresentam efeitos citotóxicos, genotóxicos e carcinogênicos (SHARMA *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2007; JCOBSEN *et al.*, 2008; ZENI *et al.*, 2008; SARGENT *et al.*, 2009;

PATLOLLA *et al.*, 2010; KATO *et al.*, 2013; SIEGRIST *et al.*, 2014;). Esses efeitos também foram observados em testes *in vivo* com roedores (MULLER *et al.*, 2008; TAKAGI *et al.*, 2008; KATO *et al.*, 2013). Por outro lado, é crescente o número de trabalhos que apresentam resultados aparentemente negativos para a toxicidade dos NTCs. Franchi *et al.*, (2012), Toyokuni (2013) e Martinez *et al.* (2013) revisaram uma extensa lista de trabalhos contendo ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelos já bem estabelecidos e apresentaram resultados conflitantes. Esses autores concluem que os dados acerca da toxicidade dos nanotubos de carbono ainda se mostram bastante controversos e que serão necessários ainda muitos esforços no meio científico para garantir a correta regulamentação no uso desses materiais.

No que diz respeito aos testes em peixes, os resultados sobre a toxicidade dos nanotubos também não são concordantes se analisados em amplo espectro (Tabela 05). Isso se deve possivelmente às diferenças físico-químicas apresentadas pelos nanotubos, que sofrem muita variação de acordo com o processo de síntese (NYEMBE *et al.*, 2016) ou devido ao uso ou não de agentes dispersantes (FILHO *et al.*, 2014).

As duas espécies de peixes que utilizamos nesse trabalho responderam de forma similar quanto aos biomarcadores empregados, já que em nenhuma delas, independentemente do tempo de exposição, foram encontrados micronúcleos ou anormalidades morfológicas nucleares em quantidade significativamente diferente quando grupos de exposição foram comparados ao controle. Ademais, para ambas as espécies os resultados obtidos com o ensaio cometa alcalino sugerem a ocorrência de crosslinks, tanto após exposição aguda quanto subcrônica.

Outrossim, parece haver consenso de que a toxicidade dos nanotubos de carbono é dependente de muitas variáveis, como as propriedades físico químicas da amostra, o tempo de exposição, o uso ou não de dispersantes, a presença ou não de grupos funcionais, o biomarcador empregado e a espécie utilizada como modelo. Diante disso, é necessário que estudos adicionais sejam conduzidos no intuito de verificar a influência isolada de cada uma dessas variáveis.

Tabela 05: Toxicidade dos Nanotubos de Carbono em peixes.

Modelo	Tipo de NTC	Dispersante	Tempo de Exposição	Biomarcador	Toxicidade	Referência
		Dodecil Sulfato de				
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	SWCNT	Sódio	10 Dias	Histopatologia	Positiva	Smith et al. (2007)
<i>Danio rerio</i>	MWCNT	Pluronic®	72 Horas	Cometa e MN	Negativa	Filho et al. (2014)
		Albumina de				
<i>Oryzias latipes</i>	SWCNT	SoroBovino	96 Horas	Letalidade	Negativa	Sohn et al. (2015)
<i>Poecilia reticulata</i>	DWCNT	Ácido Húmico	96 Horas	Letalidade	Positiva	Lukhele et al. (2015)
						Campos-Garcia et al.
<i>Oreochromis niloticus</i>	MWCNT*	Sem dispersantes	96 Horas	Letalidade	Negativa	(2015)
<i>Poecilia reticulata</i>	MWCNT	Ácido Húmico	96 Horas	Histopatologia	Positiva	Nyembe et al. (2016)

* Nanotubos funcionalizados através de tratamento com ácido nítrico.

7. CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos com o ensaio cometa e com o teste do micronúcleo písceo em eritrócitos, conclui-se que amostras comerciais de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com propriedades similares ou idênticas às que que testamos não produzem, por si só, genotoxicidade devido a quebras de simples/dupla fita do DNA ou por efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos nos cromossomos das espécies *Danio rerio* e *Astyanax altiparane* quando a contaminação se dá por via hídrica. Todavia, nossos achados sugerem a ocorrência de crosslinks DNA-NTCs.

Observadas as condições dos testes realizados, *Danio rerio* e *Astyanax altiparanae* apresentaram respostas aparentemente semelhantes aos biomarcadores empregados, não tendo sido verificadas diferenças na susceptibilidade à exposição por via hídrica aos nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

REFERÊNCIAS

ABNT NBR 15088/2011 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes.

AKAISHI, F.M. **Aplicação de Biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Curitiba, 2003.

ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E.; TICE, R.; WATERS, M. D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, Aug;463 (2):111-72, 2000.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P.. **Biologia molecular da célula.** 4ª. Ed. Porto Alegre: Artmed 757p, 2002.

ALMEIDA, R. B. de C. ***Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação.** Botucatu, Tese de Doutorado, Instituto de Biociências de Botucatu, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, 119p, 2007.

AL-SABTI, K. **Handbook of genotoxic effects and fish chromosomes.** *J. Stefan Institute*, P.O.Box 100, Jamova 39. Ljubljana, 1991.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research.** 343: 121-135, 1995.

ASAKURA, M.; SASAKI, T.; SUGIYAMA, T.; TAKAYA, M.; KODA, S.; NAGANO, K.; ARITO, H.; FUKUSHIMA, S. Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers. *J Occup Health* 52(3):9–20, 2010.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*:

an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, v. 467, p. 177-186, 2000.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 221-225, 2001.

BAUGHMAN, R. H., ZAKHIDOV, A. A., HEER DE, W.A. Carbon Nanotubes - the Route Toward Applications. **Science**, 297, 787-792, 2002.

BEEDANAGARI, S.; VULIMIRI, S. V.; BHATIA, S.; MAHADEVAN, B. Genotoxicity biomarkers: molecular basis of genetic variability and susceptibility, in: R.C. Gupta (Ed.), **Biomarkers in Toxicology, Elsevier Inc.**, USA, pp. 706–719, 2014.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v. 415 (3), p. 167-184, 1998.

BISESI, J. H.; MERTEN, J.; LIU, K.; PARKS, A.N.; AFROOZ, A.R.; GLENN, J.B.; KLAINE, S.J.; KANE, A.S.; SALEH, N.B.; FERGUSON, P.L.; et al. Tracking and quantification of single-walled carbon nanotubes in fish using near infrared fluorescence. **Environ. Sci. Technol.** 48, 1973–1983, 2014.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquat Toxicol**, 78:93-98, 2006.

BRIANEZI, G. S.; CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e Validação de Técnica quantitativa de Análise de Imagem para Avaliação do Teste do Cometa Corado pela Prata. **J Bras Patol Med Lab.** v. 45, n. 4. p. 325-334, 2009.

CAMPAGNA, A. F.; FRACÁCIO, R.; RODRIGUES, B. K.; ELER, M.; FENERICH-VERANI, N.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Analyses of the sediment toxicity of Monjolinho River, São Carlos, São Paulo State, Brazil, using survey, growth and gil morphology of two fish species (*Danio rerio* and *Poecilia reticulata*). **Braz. arch. biol. technol.**, 51, 193-201, 2008.

CAMPOS-GARCIA, J.; MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, O. L.; LEONARDO, A. F.; BARBIERI, E. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidised multiwalled carbonnanotubes on the freshwaterfish Nile tilapia: nanotubes enhance pesticideecotoxicity. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 111, 131 e 137, 2015.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 47: 2123-2136, 1990.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aq. Toxicol.**, 74: 264-271, 2005.

CESTARI, M.M. ; LEMOS, P.M.M.; RIBEIRO, C.A.O.; COSTA, J.R.M.A.; PELETIER, E.; FERRARO, M.V.; MANTOVANI, M.S.; FENOCCHIO, A.S. Genetic damage induced by trophic doses of lead evaluated by means of the comet assay and chromosomal aberrations in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n.2, p. 270-274, 2004.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Bioensaios Microbianos Aplicados No Controle De Contaminantes Tóxicos Ambientais**. São Paulo: PROCOP, p.1-17, 1992.

COLLINS, A.; KOPPEN ,G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; MOLLER P.; ROJAS, E.; DHAWAN A.; BENZIE, I.; COSKUN, E.; MORETT,I M.; SPEIT, G. BONASSI, S. The Comet Assay as a Tool for Human Biomonitoring Studies: The ComNet Project. **Mutation Research**. 759, p.27–39, 2013.

COLLINS, A. Measuring Oxidative Damage to DNA and its Repair with the Comet Assay. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1840, p. 794–800, 2014.

COLLINS, A. R.; AZQUETA, A. Single-Cell Gel Electrophoresis Combined With Lesion-Specific Enzymes to Measure Oxidative Damage to DNA. **Meth. Cell Biol.** 112, p.69–92, 2012.

COLLINS, A., et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 30 (2): 139-146, 1997.

COLLINS, A.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The Comet Assay: Topical Issues. **Mutagenesis**, vol. 23, no.3 p.143–151, 2008.

CUESTA, A.; DHAMELINCOURT, P.; LAUREYNS, J.; MARTINEZ-ALONSO, A.; TASCÓN, J. M. D. Comparative performance of X-ray diffraction and Raman microprobe techniques for the study of carbon materials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 8, p. 2875-2879, 1998.

DELMOND, K. A. **Genotoxicidade e estresse oxidativo em *Astyanax serratus* (characidae) expostos ao chumbo inorgânico (Pb II) e nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) isolados e em associação**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2013.

DRESSELHAUS, M.S., DRESSELHAUS, G., EKLUND, P.C. Science of fullerenes and carbon nanotubes: their properties and applications. **Academic press**, chapter 19, 1996.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. **Mem. Mus. Comp. Zool.**, v. 43, p 227-310, 1921.

ELONEN, G. E.; SPEHAR, R. L.; HOLCOMBE, G. W.; JOHNSON, R. D.; FERNANDEZ, J. D.; ERICKSON, R. J.; TIETGE, J. E.; COOK, P. M. Comparative toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to seven freshwater fish species during early life-stage development. **Environ. Toxicol. Chem.** 17, 472–483, 1998.

ERBE, M.C.; RAMSDORF, W.A; VICARI, T.; CESTARI, M. M. Toxicity evaluation of water samples collected near a hospital waste landfill through bioassays of genotoxicity piscine micronucleus test and comet assay in fish *Astyanax* and ecotoxicity *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, 20, pp. 320–328, 2011.

FENOGLIO, I.; ALDIERI. E.; GAZZANO, E.; CESANO, F.; COLONNA, M.; SCARANO, D.; MAZZUCCO, G.; ATTANASIO, A.; YAKOUB, Y.; LISON, D.; FUBINI, B. Thickness of multiwalled carbon nanotubes affects their lung toxicity. **Chem Res Toxicol**, 25(1):74–82, 2012.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. O.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FILHO, J. D. S.; MATSUBARA, E. Y.; FRANCHI, L. P.; MARTINS, I. P.; RIVERA, L. M. R.; ROSOLEN, J. M.; GRISOLIA, C. K. Evaluation of carbon nanotubes network toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) model. **Environ. Res.** 134, 9–16, 2014.

FRANCHI, L. P., SANTOS, R. A., MATSUBARA, E. Y., LIMA de, C., ROSOLEN, J. M., TAKAHASHI, C. S. Citotoxicidade e genotoxicidade de Nanotubos de Carbono. **Quim. Nova**, Vol. 35, Nº. 3, p. 571-580, 2012.

FREIRE, C. A.; SOUZA-BASTOS, L. R.; CHIESSE, J.; TINCANI, F. H.; PIANCINI, L. D. S.; RANDI, M. A. F.; PRODOCIMO, V.; CESTARI, M. M.; SILVA-DE-ASSIS, H. C.; ABILHOA, V.; VITULE, J. R. S.; BASTOS, L. P.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A. A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research** 22: 13263–13277, 2015.

FU, F. WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. **J Environ Manage** 92: 407-418, 2011.

FURNUS, G. N. A.; CAFFETTI, J. D.; GARCÍA, E. M.; BENÍTEZ, M. F.; PASTORI, M. C.; FENOCCHIO, A. S. Baseline micronuclei and nuclear abnormalities frequencies in native fishes from the Paraná River (Argentina). **Brazilian Journal of Biology**, 74(1), 217-221, 2014.

GRABARKIEWICZ, J.; DAVIS, W. An introduction to freshwater fishes as biological indicators. EPA -260-R-08-016. U.S. **Environmental Protection Agency, Office of Environmental Information, Washington DC**, 2008.

GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos Astyanax (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se a extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica.** São Jose do Rio Preto, Tese de Livre-Docência, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, 286p, 1995.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum Mus Ciênc Tecnol PUCRS Sér Zool**, n. 13, p. 65-88, 2000.

GILIANO, T. P.; MOREIRA, L. M. Evaluation of Genotoxicity Using the Micronucleus Assay Abnormalities in the Tropical sea Fish *Bathygobius soporator* Erythrocytes. **Genetics and Molecular Biology**, 32, 2, p.394-398, 2009.

GONTIJO, Á.M.M.C., BARRETO, R.E., SPEIT, G., REYES, V.A.V., VOLPATO, G.L., SALVADORI, D.M.F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental**, v. 534, p. 165-172, 2003.

GHOSH, M.; CHAKRABORTY, A.; BANDYOPADHYAY, M. ET AL. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT): induction of DNA damage in plant and mammalian cells. **J Hazard Mater** 197: 327–336, 2011.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, 18: 187-192, 1973.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, p.147–152, 1982.

HOSE, J.E., CROSS, J., SMITH, S.G., DICHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. **Mar. Environ. Res.** v. 22. p. 167–176, 1987.

HUANG, Y.; LI, L. DNA crosslinking damage and cancer - a tale of friend and foe. **Translational Cancer Research**, 2(3), 144–154, 2013

IJIMA, S. Carbon nanotubes: past, present, and future. **Physica B: Condensed Matter** 323 (1), 1-5, 2002.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, 354,56–58, 1991.

JACKSON, P.; JACOBSEN, N. R.; BAUN, A.; BIRKEDAL, R.; KUHNEL, D.; JENSEN, K. A.; VOGEL, U.; WALLIN, H. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. **Chem. Cent. Journal**, 2013.

JACOBSEN, N. R.; POJANA, G.; WHITE, P.; MOLLER, P.; COHN, C. A.; KORSHOLM, K. S.; et al. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutatrade mark-Mouse lung epithelial cells. **Environ Mol Mutagen** 49:476–87, 2008.

JHA, A. N. Ecotoxicological Applications and Significance of the Comet Assay. **Mutagenesis**, vol. 23, no.3 p.207–221, 2008.

JIA, G.; WANG, H.; YAN, L.; WANG, X.; PEI, R.; YAN, T.; ZHAO, Y.; GUO, X. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. **Environ Sci Technol.** 39 (5), 1378-83. 2005.

KATO, T.; TOTSUKA, Y.; ISHINO, K.; MATSUMOTO, Y.; TADA, Y.; NAKAE, D.; GOTO, S.; MASUDA, S.; OGO, S.; KAWANISHI, M.; et al.: Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. **Nanotoxicology** 7:452–461, 2013.

KUMAR, M.; ANDO; Y. Chemical Vapor Deposition of Carbon Nanotubes: A Review on Growth Mechanism and Mass Production. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** 10(6):3739-58, 2010.

KUSHWAHA, S. K. S., GHOSHAL, S., RAI, A.K., SINGH, S. Carbon nanotubes as a novel drug delivery system for anticancer therapy: a review. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** 49 (4), 629-643, 2013.

LANONE, S., ANDUJAR, P., KERMANIZADEH, A., BOCZKOWSKI, J. Determinants of carbon nanotube toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol 65, no. 15, pp. 2063-9, 2013.

LARRUDÉ, D; R; G. Nanotubos De Carbono Decorados Com Partículas De Cobalto. **Rio de Janeiro-RJ: PUC-Rio, 2007.** 103f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Física, PUC-rio, 2007.

LEMOS, C. T.; IRANÇO, F. A.; OLIVEIRA DE, N. C. D.; SOUZA DE, G. D.; FACHEL, J. M. G. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. **Science of the total environment**, 406, 337-343, 2008.

LINDBERG, H. K., FALCK, G. C. M., SUHONEN, S., VIPPOLA, M., VANHALA, E., CATALÁN, J., SAVOLAINEN, K., NORPPA, H. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon-nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. **Toxicology Letters** - Vol. 186 - Issue 3 - pp. 166-173, 2009.

LUKHELE, L. P.; MAMBA, B. B.; MUSEE, N.; WEPENER, V. Acute toxicity of double-walled carbon nanotubes to three aquatic organisms. **Journal of Nanomaterials**, pp: 1-19, 2015.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. Ecotoxicologia Como Ferramenta No Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. **Oecol. Bras.**, 12(3): p.355-381, 2008.

MARIN-MORALES, A. P.; LEME, D. M. Allium cepa test in Environmental Monitoring: A Review on its Application. **Mutation Research**, 682, p.71–81, 2009.

MARTINEZ, D. S. T.; FRANCHI, L. P.; FRERIA, C. M.; FERREIRA, O. P.; SOUZA-FILHO, A. G.; ALVES, O. L. Carbon nanotubes: from synthesis to genotoxicity. **Nanotoxicology Materials, Methodologies, and Assessments**. Springer, New York, pp. 125–152, 2013.

MERK, O.; SPEIT, G. Detection of Crosslinks with the Comet Assay in Relationship to Genotoxicity and Cytotoxicity. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 33:167–172, 1999.

METCALFE, C.D. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*), Bull. **Environ. Contam. Toxicol**, 40, 489-495, 1988.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v. 399, p. 135-147, 1998.

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.

MULLER, J., DECORDER, I., HOET, P. H., LOMBAERT, N., THOMASSEN, L., HUAUX, F., LISON, D., KIRSCH-VOLDERS, M. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. **Carcinogenesis** - vol.29 no.2 pp.427–433, 2008.

MURUSSI, C. R.; THORSTENBERG, M. L.; LEITEMPERGER, J.; COSTA, M.; CLASEN, B.; SANTI, A.; et al. Toxic effects of penoxsulam herbicide in two fish species reared in southern Brazil. **Bull Environ Contam Toxicol** 92:81–84, 2014.

MWANGI, J. N.; WANG, N.; INGERSOLL, C. G.; HARDESTY, D. K.; BRUNSON, E. L.; LI, H.; et al. Toxicity of carbon nanotubes to freshwater aquatic invertebrates. **Environ Toxicol Chem.** 31 (8): 1823-1830, 2012.

NAYAK, T. R.; LEOW, P. C.; EE, P. L. R.; AROCKIADOSS, T.; RAMAPRABHU, S.; PASTORIN, G. Crucial parameters responsible for carbon nanotubes toxicity. **Current Nanoscience**, Vol.6, No.2, (April 2010), pp. 141-154, 2010.

NOLL, D. M.; MASON, T. M.; MILLER, P. S. Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. **Chemical Reviews**, 106(2), 277–301, 2006.

NOVO, M. S. **Nanociências e Nanotecnologia: uma visão desde seu nascimento até apresentação das temáticas a sociedade**. Tese de doutorado. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande, 2013.

NYEMBE, D. W.; WEPENER, V.; MAMBA, B. B.; MUSEE, N. Effects of ingested Multi-Walled Carbon Nanotubes in *Poecilia reticulata*: Localization and Physiological Responses. **J Environ Anal Toxicol** 6: 368, 2016.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 123, p.291–298, 1984.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline Single Cell Gel (Comet) Assay and genotoxicity monitoring using Bullheads and Carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 345-356, 1995.

PASCHOALINO, P. M., MARCONE, S. P. G., JARDIM, F. W. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Quím.nova**, 33(2):421-430, 2010.

PATLOLLA A., KNIGHTEN B., TCHOUNWOU P. Multiwalled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. **Ethnicity and Disease**, 20: S1:65-71, 2010.

PIANCINI, L. D. S.; GUILOSKI, I. C.; SILVA, DE ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M. Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. **Toxicol. Rep.** 2, 1157–1163, 2015.

POLAND, C. A.; DUFFIN, R.; KINLOCH, I.; MAYNARD, A.; WALLACE, W. A. H.; SEATON, A.; STONE, V.; BROWN, S.; MACNEE, W.; DONALDSON, K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **Nat.Nanotechnol**, 3. 423–428, 2008.

PFUHLER, S.; WOLF, HANS. U. Detection of DNA-Crosslinking Agents with the Alkaline Comet Assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 27: 196-201, 1996.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: **Revista Brasileira de Genética**, 1991.

RAMSDORF, W. A.; VICARI, T.; ALMEIDA, M, I. M.; ARTONI, R. F.; CESTARI, M. M. Handling of *Astyanax* sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.184, p. 5841-5849, 2012.

RAMSDORF, W. **UTILIZAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) COMO BIOINDICADORES DE REGIÃO CONTAMINADA POR AGROTÓXICO (FAZENDA CANGÜIRI – UFPR)**. Curitiba, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 127p, 2007.

RAMSDORF, W.; GUIMARAES, F.; FERRARO, M.; GABARDO, J.; TRINDADE, E.; CESTARI, M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, p. 78-81, 2009.

RIVERO, C. L. G. **Perfil da Frequência de Micronúcelos e de Danos no DNA de Diferentes Espécies de Peixes do Lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil**. Brasília-DF: UnB, 2007. 113p. Dissertação. Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2007.

SARGENT, L. M., HUBBS, A. F., SHVEDOVA, A. A., SALISBURY, J. L., BENKOVIC, S. A., KASHON, M. L. Induction of aneuploidy by single-walled carbon nanotubes. **Environ. Mol. Mutagen**, Vol 50 (708-717), 2009.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutatation Research**. Amsterdam, v. 31, No. 1, p. 9-15, 1975.

SHARMA, C. S., SARKAR, S., PERIYAKARUPPAN, A., BARR, J., WISE, K., THOMAS, R., WILSON, B. L., RAMESN, G. T. Single-Walled Carbon Nanotubes Induces Oxidative Stress in Rat Lung Epithelial Cells. **J Nanosci Nanotechnol**; 7(7): 2466–2472, 2007.

SIEGRIST, K. J.; REYNOLDS, S. H.; KASHON, M. L.; LOWRY, D. T.; DONG, C.; HUBBS, A. F.; YOUNG, S. H.; SALISBURY, J. L.; PORTER, D. W.; BENKOVIC, S. A.; MCCAWLEY, M.; KEANE, M. L.; MASTOVICH, J. T.; BUNKER, K. L.; CENA, L. G.; SPARROW, M. C.; STURGEON, J. L.; DINU, C. Z.; SARGENT, L. M. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at occupationally relevant doses. **Particle Fibre Toxicology**, 11(6); 2014.

SILVA DA, R. R. P.; PIRES JUNIOR, O. R.; GRISOLIA, C. K. Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp. **Genetics and Molecular Biology**, 33, 4, 750-755, 2010.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA damage in Individual Cells. **Exp. Cell Res.** 175, p.184–191, 1988.

SMITH, C. J.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. **Aquat. Toxicol.** 82,94 e 109, 2007.

SOHN, E. K.; CHUNG, Y. S.; JOHARI, S. A.; KIM, T. G.; KIM, J. K.; LEE, J. H.; LEE, Y. H.; KANG, S. W.; YU, I. J. Acute toxicity comparison of single-walled carbon nanotubes in various freshwater organisms. **BioMed Res.Int.** 1, 7, 2015.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (Single-cell gel test), A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson, D.S. (Ed.), **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols – Eukaryotic Systems**, vol. 113, Human Press, Totowa, p. 203-211, 1999.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. **Methods Mol Biol.** 291:85–95, 2006.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.** 83, 13–34 2008.

SZENDI, K.; VARGA, C. Lack of Genotoxicity of Carbon Nanotubes in a Pilot Study. **Anticancer Research** 28: 349-352, 2008.

TAKAGI A., HIROSE, A., NISHIMURA, T. FUKUMORI, N., OGATA, A., OHASHI, N., KITAJIMA, S., KANNO, J. - Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. **The Journal of Toxicological Sciences** - Vol. 33 - Issue 1 - pp. 105-116, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 144 p. il.; 2004

THOMSEM, C.; REICH, S. Double Resonant Raman Scattering in Graphite. **Physical Review Letters**, v. 85, p. 5214, 2000.

THOSTENSON, E. T., REN, Z. F., CHOU T-W. Advances in the Science and Technology of Carbon Nanotubes and their Composites: A Review. **Composites Science and Technology**, 61(13): 1899-1912 (2001).

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. The single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen**, 35, 206–221, 2000.

TNS. <http://tnsolution.com.br/2015/11/25/os-avancos-da-nanotecnologia-no-brasil/>. Acesso em 16/11/2016.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and Other Nuclear Anomalies in Buccal Smears: Methods Development. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 271, No. 1, p. 69-77, 1992.

TOYOKUNI, S. Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65 – 2098 – 2110, 2013.

TRIGUEIRO, J. P. C.; SILVA, G. G. ; LAVALL, R. L. ; FURTADO, C. A. ; OLIVEIRA, S. ; FERLAUTO, A. S. ; LACERDA, R. G. ; LADEIRA, L. O. ; FROST, R. ; GEORGE, G. Purity evaluation of carbon nanotube materials by thermogravimetric, TEM, and SEM methods. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, p. 3487-3494, 2007.

TUINSTRAN, F.; KOENIG, L.L. Raman Spectrum of Graphite. **Journal of Chemical Physics**, v. 53, p. 1126-1130, 1970

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 13: 57-149, 2003.

VICARI, T. **Avaliação do efeito mutagênico de duas concentrações (0,075µg/g E 0,75µg/g) do metilmercúrio em Hoplias malabaricus (PISCES) através dos ensaios cometa e micronúcleo**. *Dissertação (Mestrado)*. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Curitiba, 2009.

WANG, R.; HUGHES, T.; BECK, S.; VAKIL, S.; LI, S.; PANTANO, P.; DRAPER, R. K. Generation of toxic degradation products by sonication of Pluronic(R) dispersants: implications for nanotoxicity testing. **Nanotoxicology**, 7(7), 1272–81, 2013.

WHO. Nanotechnology and human health: Scientific evidence and risk governance. **Report of the WHO expert meeting 10–11 December 2012**, Bonn, Germany, 2013.

ZENI, O.; PALUMBO, R.; BERNINI, R.; ZENI, L.; SARTI, M.; SCARFI, M. R. Cytotoxicity investigation on cultured human blood cells treated with single-wall carbon nanotubes. **Sensors** 8:488–99, 2008.

ZHU, L.; CHANG, D. W.; DAI, L.; HONG, Y. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. **Nano Letters**; 7:3592–3597, 2007.

ANEXOS



PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

Título:	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS EM <i>Danio reio</i> E <i>Astyanax altiparanae</i>
Área Temática:	2.10.07.00-4 – Toxicologia
Pesquisador / Professor:	WANESSA ALGARTE RAMSDORF
Instituição:	UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – CAMPUS CURITIBA
Financiamento:	CAPES-CNPQ
Versão:	01

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA

Protocolo nº 2016-019

Apresentação do Projeto: Trata-se de projeto no qual os pesquisadores buscam avaliar *in vivo* a genotoxicidade de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Serão utilizados como organismos experimentais duas espécies de peixes, uma nativa (*Astyanax paranae*) e outra exótica (*Danio rerio*). Os pesquisadores se comprometem a seguir a NBR 15.088/2011 que trata sobre testes de ecotoxicidade usando peixes. Segundo o formulário apresentado serão utilizados 240 animais, 120 de cada espécie. Os peixes serão mantidos por 20 dias para aclimação em tanques de 250 litros para *Astyanax paranae* e aquários de 20 litros para *Danio rerio*, com água filtrada e decolorada e serão controlados os parâmetros de temperatura, pH e oxigenação da água. Para a realização dos experimentos os animais serão mantidos em aquários de 20 litros para 15 peixes de *Astyanax paranae* e aquários de 20 litros para 60 peixes de *Danio rerio*. Serão realizados dois testes. O primeiro será um teste agudo (96 horas de exposição) e servirá para determinação da concentração letal para 50% dos animais (LC₅₀). O segundo será um teste de exposição subcrônica (21 dias de exposição) a doses pré-determinadas e servirá para coleta de amostras biológicas (sangue). No ensaio agudo serão utilizadas concentrações de nanotubos de parede dupla de 0, 0,5, 5 e 50 mg/L, com grupos de 15 animais para cada tratamento para cada espécie. No ensaio subcrônico serão utilizadas concentrações de nanotubos de parede dupla de 0, 0,1, 1 e 10 mg/L de nanotubos de parede dupla, com grupos de 15 animais para cada tratamento para cada espécie. Após os testes, os peixes serão anestesiados com benzocaína dissolvida na água e mortos por secção medular seguida de exsanguinação e retirada dos órgãos.

Objetivo: Segundo o formulário unificado apresentado o estudo tem como objetivo “Verificar se nanotubos de carbono de paredes múltiplas, quando diluídos em água de cultivo podem produzir toxicidade e genotoxicidade em células de peixes nativos (*Astyanax altiparanae*) e exóticos (*Danio rerio*)”.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: O projeto apresenta como potenciais benefícios a determinação da genotoxicidade de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em peixes, a partir do que se pode inferir sobre os efeitos ambientais dos nanotubos de carbono. Por outro lado, a execução do projeto contaminará um volume considerável de água que se não for corretamente descartada poderá causar contaminação ambiental.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O objetivo da pesquisa apresenta mérito científico. Existem algumas inadequações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Foram apresentados: 1) Requerimento preenchido completamente e assinado pelo pesquisador responsável. 2) Formulário unificado para submissão de projeto.



3) Projeto de pesquisa. 4) Declaração de não início do projeto. 5) Declaração de anuência da diretoria competente. 6) Declaração assinada e contendo nº do CRMV de um médico veterinário que se responsabilize pelo bem estar dos animais durante o desenvolvimento do projeto.
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há.
Situação do Parecer: APROVADO
Considerações Finais a Critério da CEUA: Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS EM *Danio reio* E *Astyanax altiparanae*", protocolo nº 2016/019, sob a responsabilidade de WANESSA ALGARTE RAMSDORF - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 13/09/2016.

Vigência do projeto:	14/09/2016 a 30/04/2017
Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Espécie/linhagem:	<i>Astyanax altiparanae</i> e <i>Danio rerio</i>
Número de animais:	240
Peso/Idade:	Animais juvenis com peso médio de 4,5 g para <i>Astyanax</i> e 2,5 g para <i>Danio</i>
Sexo:	Machos e fêmeas
Origem:	Piscicultura e lojas especializadas

Dois Vizinhos, 13 de setembro de 2016.

Assinado por:

Nédia de Castilhos Ghisi

Nédia de Castilhos Ghisi
Presidente do CEUA - UTFPR
Comissão de Ética no
uso de Animais

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná