

**EFEITOS DE NANOPÁRÍCULAS COMERCIAIS DE ÓXIDO DE FERRO (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO****Tatiane Balbo Batista-Gallep<sup>a</sup>, Tatiane Pasquoto-Stigliani<sup>b</sup>, Mariana Guilger<sup>b</sup>, Diogo Torres Rheder<sup>a</sup>, Tais Germano-Costa<sup>b</sup>, Natalia Bilesky-José<sup>b</sup>, Leonardo Fernandes Fraceto<sup>c</sup>, Cleoni dos Santos Carvalho<sup>a</sup> e Renata de Lima<sup>a,b,\*</sup>**<sup>a</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, 18052-780 Sorocaba – SP, Brasil<sup>b</sup>Departamento de Biotecnologia, Universidade de Sorocaba, 18023-000 Sorocaba – SP, Brasil<sup>c</sup>Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Estadual de São Paulo, 18087-180 Sorocaba – SP, Brasil

Recebido em 18/03/2018; aceito em 11/07/2018; publicado na web em 14/08/2018

EFFECTS OF COMMERCIAL NANOPARTICLES OF IRON OXIDE (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): CYTOTOXICITY, GENOTOXICITY AND OXIDATIVE STRESS. This study presents the toxicological effects of iron nanoparticles (NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) using in vitro and in vivo tests. Initially nanoparticles were characterized physic-chemically followed by evaluation of cell viability using different cell lines. *Allium cepa* test and comet assay (cell lines and *Danio rerio*) were used for evaluation of genotoxicity. Oxidative stress analyses were performed using *D. rerio* exposed to NP-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and the enzymatic activity of the enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST) were evaluated. The results showed that initially nanoparticles had 65.55 nm, 0.24 of polydispersity of and 11.4 mV of zeta potential. Regarding cell viability, it was observed that this did not reach the IC<sub>50</sub> up to the concentration 1 x 10<sup>10</sup> NP mL<sup>-1</sup>. The in vitro comet assay showed that in concentrations 1.96 x 10<sup>8</sup> and 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup> these presented toxicity, for *Allium cepa* evaluation in concentrations 19.6 and 39.0 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup> presented significant damages when compared to the control. Oxidative stress showed that the liver was the most affected organ when compared to the control. Although studies show that iron nanoparticles do not lead to changes, further studies are needed to make sure they do not lead to environmental changes.

**Keywords:** iron oxide nanoparticles; zebrafish; viability; in vitro analysis; in vivo analysis.**INTRODUÇÃO**

Com o avanço da nanotecnologia foi possível produzir nanopartículas de ferro as quais apresentam características físico-químicas diferenciadas quando comparadas às características apresentadas em micro/macroescala. Além disso, o átomo de ferro pode originar outros compostos a partir de diferentes combinações, como por exemplo os óxidos de ferro.<sup>1,2</sup> Dentre as nanopartículas (NPs) metálicas, as de óxido de ferro se destacam no mercado devido às suas características físico-químicas, como sua grande capacidade cinética, grande área de superfície em relação ao volume, alta reatividade, possíveis propriedades magnéticas, além de permitirem o recobrimento com diversos tipos de ligantes específicos.<sup>3-7</sup>

Atualmente a maioria dos estudos de NPs de óxidos de ferro (NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) na área ambiental está direcionada à remediação (nanoremediação), que consiste na utilização das nanopartículas para a descontaminação da água e solo.<sup>5,8</sup> Em relação a área médica, sua utilização ocorre principalmente como meio de contraste em imagens por ressonância magnética, carreadores de fármacos, em pesquisas gênicas, proteômica e tratamentos anticâncer.<sup>2,6,7,9-12</sup> As NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> também são utilizadas como constituintes de diferentes tipos de materiais comercializados: tintas, revestimentos, plásticos, cosméticos,<sup>13</sup> nutrientes<sup>2</sup> e semicondutores.<sup>8</sup> Assim, devido à ampla comercialização de produtos que apresentam NPs em sua composição, é observado como consequência um aumento do descarte das mesmas nos ambientes aquático e terrestre.<sup>14-16</sup>

No ambiente, as NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tendem a se agregar ou aglomerar com outros diferentes compostos dispersos no meio, podendo levar à alteração de suas características físico-químicas, as quais anteriormente eram consideradas estáveis devido a sua produção em meio controlado.<sup>14,17</sup> Desta forma, quando descartadas no ambiente, podem

tornar-se instáveis e sofrer degradação, oferecendo risco para os seres vivos.<sup>5,18</sup> Diante de tais fatores, os possíveis efeitos adversos e riscos para a saúde causados por estas nanopartículas por mecanismos relacionados à citotoxicidade e à genotoxicidade precisam ser melhor compreendidos, pois podem ser potencialmente tóxicas aos organismos, assim como apresentar novas características e se tornar carreadoras de outros compostos tóxicos.<sup>19-21</sup>

Após a introdução de NPs no ambiente, estas podem sofrer alterações que envolvem processos biológicos, físicos e químicos, os quais dificultam sua avaliação e quantificação no ambiente, sendo difícil verificar o grau de toxicidade. Até o momento, os estudos com as NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mostram diferentes efeitos toxicológicos, tais como alteração no ciclo celular, dano no DNA, alterações de proteínas e dano mitocondrial,<sup>22</sup> entretanto, o conhecimento atual sobre seus efeitos ainda é restrito. É sugerido que o mecanismo que desencadeia o estresse oxidativo pode ocasionar reações inflamatórias, as quais resultam na toxicidade destas NPs.<sup>22</sup>

Estudos sobre os efeitos ecotoxicológicos de nanopartículas em meio aquático vêm sendo realizados, como o estudo de Hao *et al.*,<sup>23</sup> no qual foram verificados danos nas membranas lipídicas de células e de organelas celulares e consequentemente disfunção celular por formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em carpas (*Cyprinus carpio*) expostas a NPs de titânio. Outro estudo mostra que embriões de zebrafish (*Danio rerio*) expostos a 10 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apresentaram malformação,<sup>24</sup> enquanto embriões de medaka (*Oryzias latipes*) expostos a NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nas concentrações 0,5; 5,0 e 50 µg mL<sup>-1</sup> apresentaram inibição da enzima superóxido dismutase (SOD) e indução de peroxidação lipídica por formação de malondialdeído (MDA), neste estudo foi mostrado que houve a indução de EROs apenas nas maiores concentrações de NPs, no entanto, nos adultos expostos às mesmas concentrações de NPs não foram observados danos celulares, mostrando que as defesas antioxidantes foram eficientes.<sup>25</sup>

\*e-mail: renata.lima@prof.uniso.br

Alguns estudos toxicológicos utilizando plantas demonstraram os possíveis efeitos das NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sobre as mesmas. Em estudo realizado com rabanete (*Raphanus sativus*) foi observada uma redução no desenvolvimento da cultura devido à adsorção das NPs na semente e à liberação de íons livres de ferro.<sup>26</sup> Já em estudos realizados com tomates (*Solanum lycopersicum*), expostos a 100 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, foi observado estresse hídrico e também processo de oxidação com formação de EROs, devido à agregação das NPs nas raízes.<sup>27</sup>

Embora existam estudos que avaliem a toxicidade de NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ainda se faz necessária a padronização de testes e a compreensão da ação destas NPs nos sistemas biológicos. Nesse estudo foi realizada a caracterização de uma nanopartícula de óxido de ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) comercial (Sigma Aldrich), em dois diferentes meios (água e meio de cultura DMEM), em seguida foi avaliada a citotoxicidade e a genotoxicidade *in vitro*, além do potencial genotóxico *in vivo* e alterações bioquímicas em indivíduos adultos da espécie *Danio rerio* (zebrafish). Tais estudos apresentam grande relevância devido à necessidade da ampliação dos conhecimentos sobre as ações nocivas das nanopartículas de óxido de ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), podendo contribuir assim para o conhecimento científico na área da nanotecnologia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Nanopartículas

Neste estudo foram utilizadas nanopartículas de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> comercial (Sigma-Aldrich Chemistry - ≤ 100 nm; dispersão entre 15 a 25% wt; densidade 1,07 - 1,27 g mL<sup>-1</sup>; pH entre 3,4 - 4,0; 20 wt % em água).

### Linhagens celulares

Para realização dos testes de viabilidade celular, cometa e caracterização em diferentes meios de dispersão foram utilizadas linhagens celulares padrão (*American Type Collection Culture-ATCC*) provenientes do Banco de células do Rio de Janeiro (A549, V79, 3T3 e HeLa). As células foram mantidas em garrafas com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa, com atmosfera úmida, a 5% de CO<sub>2</sub> e em temperatura de 37 °C.

### Animais

Peixes da espécie *Danio rerio* (massa corpórea: 0,4 ± 0,06 mg, comprimento total: 2,9 ± 0,3 cm), obtidos na World Fish SA, Brasil, foram aclimatados durante 10 dias em aquários de 40 L em sistema semi-estático e aeração constante. Os animais foram alimentados "ad libitum" com ração comercial para peixes (TetraMin Tropical Flakes). As variáveis físicas e químicas da água (temperatura: 23-25 °C, oxigênio dissolvido: 6,19-7,82 mg L<sup>-1</sup>, pH: 6-7, condutividade: 40-58 µS cm<sup>-3</sup>, alcalinidade: 35-43 mg L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub> e dureza total: 39-50 mg L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>) foram monitoradas e se mantiveram constantes durante o período de aclimação e os ensaios de exposição.

Após o período de aclimação foi realizada a exposição dos peixes às nanopartículas, visando o estudo da ecotoxicidade das mesmas por meio de análise cometa e ensaios bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo. Os peixes foram expostos a controle, 1,96 x 10<sup>7</sup> NPs mL<sup>-1</sup>, 3,90 x 10<sup>8</sup> NPs mL<sup>-1</sup> e 19,6 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup>, durante 72 horas. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro aquários, em duplicata de aquários (n=15 peixes/aquário 2 L) em sistema semi-estático. Durante o período de exposição os animais não foram alimentados.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade de Sorocaba (protocolo 004/2012). Todos os procedimentos seguiram a

resolução nº 1000 de 11 de março de 2012 que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências.

### Caracterização das nanopartículas

A caracterização das nanopartículas foi realizada visando à obtenção dos parâmetros físico-químicos diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (PDI), através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), e potencial zeta, por mobilidade eletroforética. Para essas análises as nanopartículas foram diluídas a 500 µg mL<sup>-1</sup> e os resultados analíticos foram obtidos a partir da média de 3 leituras realizadas a um ângulo de 90°, a temperatura de 25 °C, utilizando o equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments). A distribuição de tamanho e a concentração das nanopartículas (NPs mL<sup>-1</sup>) foram obtidas pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA). A amostra foi diluída 20.000 vezes em água ultrapura e as leituras realizadas utilizando o equipamento NanoSight LM14 e o software NanoSight v. 2.3.

A caracterização das NPs foi realizada no início do estudo em dispersão em água ultrapura e também em meio de cultura DMEM. Para fins de verificação de alterações nos parâmetros físico-químicos, a caracterização também foi realizada após a exposição dos peixes.

### Avaliações da citotoxicidade e genotoxicidade das NPs

#### Viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade celular, diferentes linhagens celulares foram expostas às NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em concentrações entre 1,96 x 10<sup>1</sup> e 1,96 x 10<sup>11</sup> NPs mL<sup>-1</sup>. Para a análise foi utilizado o kit *Tali Apoptosis - Annexin V AlexaFluor® 488 and Propidium Iodide*, conforme instruções do fabricante, seguida de leitura em citômetro de imagem *Tali Image-Based (Invitrogen)*.

#### Ensaio Cometa

Para a análise cometa *in vitro* utilizando linhagens celulares, a exposição às nanopartículas de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi realizada nas concentrações de 1,96 x 10<sup>7</sup>, 1,96 x 10<sup>8</sup> e 1,96 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup>. Para as análises cometa *in vivo* com *D. rerio*, após o período de aclimação e exposição, os peixes foram anestesiados com 250 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína e o sangue (10 µL) foi coletado por punção da veia dorsal da nadadeira anal. Em seguida, os animais ainda anestesiados foram eutanasiados por secção medular indolor. As brânquias foram retiradas e mantidas em soro fetal bovino a 8 °C.

O ensaio cometa foi realizado segundo metodologia adaptada de Azqueta *et al.*<sup>28</sup> e Collins, Dusinka e Horska.<sup>29</sup> Logo após a exposição, no caso do ensaio *in vitro*, ou a coleta, no caso do ensaio *in vivo*, as células foram homogeneizadas em agarose *low melting* 0,8% e espalhadas em lâminas preparadas anteriormente com agarose 1,5%. Após montagem, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise por 1 h, seguida de neutralização. Posteriormente, as lâminas foram mantidas em tampão de eletroforese a 4 °C por 20 minutos seguido de corrida por 20 minutos, 1,6 V cm<sup>-1</sup>. Ao final da eletroforese, as lâminas foram secas, fixadas e coradas com solução de prata. As análises foram realizadas em microscópio ótico (40x) sendo consideradas aproximadamente 150 células por lâmina seguindo critério de *score visual* proposto por Collins, Fleming, Gedik.<sup>30</sup> O Índice de danos (ID) de cada tratamento foi calculado dividindo-se o *score* de cada lâmina pelo número de células analisadas.

#### Ensaio *Allium cepa*

A avaliação por *Allium cepa* foi realizada após exposição das raízes às nanopartículas de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 24 h nas concentrações 1,9 x 10<sup>9</sup>; 3,9 x 10<sup>9</sup>; 19,6 x 10<sup>9</sup> e 39 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup>. Após o tempo de contato as raízes foram fixadas em *Carnoy* (Ácido acético e etanol 1:3) por 24 h,

seguida por hidrólise ácida (Ácido Clorídrico 1 mol/L) a 60 °C. Após a hidrólise, as raízes foram coradas em reativo de *Schiff* por 2 h. As lâminas foram montadas por esmagamento da região meristemática banhada em uma gota de Carmin Acético 2%.

Foi então realizada análise microscópica por meio da contagem de 1000 células por lâmina (triplicata). O índice de alterações (IA) foi calculado, sendo  $IA = \frac{\text{Número de células com alterações cromossômicas}}{\text{Total de células em divisão}}$ .

### Análises bioquímicas

Após a exposição dos peixes, foi realizada a coleta dos órgãos cérebro, coração, fígado, pele e músculo, os quais foram dissociados em PBS 7,2 (1:10 w/v) e centrifugados por 20 min a 10.500 rpm, -4 °C. Após este procedimento o sobrenadante foi imediatamente acondicionado em freezer -80 °C.

A determinação da concentração de proteína nas amostras dos órgãos foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford.<sup>31</sup>

A atividade da Catalase (CAT) foi avaliada pelo decaimento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acordo com o método descrito por Beutler.<sup>32</sup> A atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) foi determinada pela oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) em presença de t-butyl de acordo com o método descrito por Beutler.<sup>33</sup> A atividade da Glutathione-S-Transferase (GST) foi realizada utilizando como substrato o reagente 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) de acordo com o método descrito por Keen *et al.*<sup>34</sup> A atividade específica de cada enzima foi expressa em unidades internacionais por micrograma (µg) de proteína (UI/mg de proteína).

### Análise Estatística dos resultados

A estatística foi realizada utilizando a análise de variância (One-way, ANOVA com teste posterior de Tukey-Kramer), o programa utilizado foi o *GraphPadPrism 7.0*, significância definida como  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização físico-química das nanopartículas de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dispersas em diferentes meios

A caracterização físico-química das NPs de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dispersas em

água ultra pura e meio de cultura DMEM foi realizada 24 horas após a dispersão. A concentração das NPs para a análise foi de 500 µg mL<sup>-1</sup>, concentração correspondente a  $1,96 \times 10^{11}$  NPs mL<sup>-1</sup> (Figura 1)

As NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dispersas em meio DMEM apresentaram maior diâmetro quando comparadas às NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dispersas em água (Figura 1A). Provavelmente este resultado é devido à formação de corona que ocorre quando as NPs são dispersas em meio contendo proteínas, podendo ocorrer o processo de adsorção das mesmas pela superfície metálica, e a consequente alteração no diâmetro das NPs pode alterar suas características físico-químicas.<sup>35-37</sup>

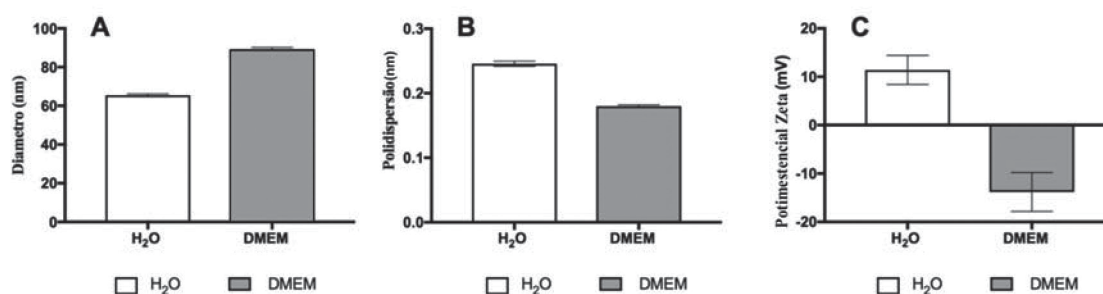
Os resultados de PDI (Figura 1B) indicam a homogeneidade das NPs tanto em água como em meio de cultura, já o potencial zeta (Figura 1C) apresentou variações nos diferentes meios, sendo que a dispersão em meio de cultura alterou o valor de positivo para negativo. Isso se deve, provavelmente, à carga negativa das proteínas presentes na corona.<sup>38</sup>

### Caracterização físico-química das nanopartículas Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na água após exposição dos peixes

Para avaliar a possibilidade de alteração nos parâmetros físico-químicos, as nanopartículas dispersas em água foram avaliadas após a exposição dos peixes por 72 h, isto foi realizado uma vez que, a literatura mostra que estas podem interagir com substâncias do ambiente e alterar suas características e consequentemente sua toxicidade. As análises mostraram alterações das características das nanopartículas quando comparadas aos parâmetros obtidos anteriormente à exposição, sendo possível observar maior tamanho, consequência de possível agregação, maior polidispersão, resultado da perda de homogeneidade, e aumento do potencial zeta, provavelmente em consequência da formação de corona proteica através da interação com o ambiente (Tabela 1).

Os dados referentes a diâmetro, polidispersão e potencial zeta das nanopartículas após a exposição em culturas celulares mostrou que estas apresentam pequena alteração após exposição, mostrando maior estabilidade quando comparadas à exposição em água com peixes, porém é necessário considerar que o ambiente foi controlado, existindo apenas metabólitos resultantes das células em exposição. Situação diferente da exposição em água com peixes, as quais estavam expostas a dejetos, os quais podem ter colaborado para a agregação.

Resultados apresentados em estudos referentes à agregação de



**Figura 1.** Diâmetro médio (A), índice de polidispersão (B) e potencial zeta (C) ± desvio padrão das nanopartículas de óxido de ferro na concentração de  $1,96 \times 10^{11}$  NPs mL<sup>-1</sup> nos seguintes meios dispersantes: água ultra pura, meio de cultura DMEM

**Tabela 1.** Características físico-químicas das Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pela técnica de DLS na água de exposição de *D. rerio*

Tipo de meio	Concentrações (NPs mL <sup>-1</sup> )	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
Água/peixes	$1,96 \times 10^9$	$797,5 \pm 261,5$	$1 \pm 0$	$-21,0 \pm 1,55$
	$3,90 \times 10^9$	$1629 \pm 260,7$	$1 \pm 0$	$-21,8 \pm 0,360$
	$19,6 \times 10^9$	$1181 \pm 140,38$	$0,787 \pm 0,36$	$-15,4 \pm 2,34$
Meio com células	$1,96 \times 10^{10}$	$105,0 \pm 1,3$	$0,263 \pm 0,026$	$-11,5 \pm 1,21$

nanopartículas de ferro mostram que estas podem ocasionar efeitos tóxicos em organismos aquáticos. Amde *et al.*,<sup>39</sup> em revisão realizada sobre NPs de óxidos metálicos relatam que devido as características físico-químicas das NPs pode ocorrer agregação/aglomeração, o que pode induzir à deposição deste material no sedimento, com consequente diminuição da concentração de NPs metálicas em suspensão ao longo do tempo, em contraponto ao aumento ocorrido nos sedimentos. Outro fator a ser considerado é que no ambiente as NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> podem sofrer dissociação levando à liberação de íons, fato que pode interferir na toxicidade nos sistemas biológicos.

Em estudo realizado com embriões de *D. rerio*, Zhu *et al.*<sup>24</sup> demonstraram que agregados resultantes da sedimentação de NPs Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> causaram adiantamento na eclosão dos ovos quando em concentrações maiores que 10 mg L<sup>-1</sup>. Foi observado também o aparecimento de malformações como ulcerações na pele, edemas, assim como danos articulares. Em concentrações de 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> ocorreu a morte dos peixes, fato que contribui para a compreensão do potencial tóxico das NPs liberadas no ambiente. Em outro estudo com mexilhões expostos a NPs de óxido ferro foi verificado que a toxicidade é induzida nas concentrações de 10 e 50 mg mL<sup>-1</sup>, sendo estas internalizadas nos hemócitos levando ao aumento de EROs e aumento de danos no DNA.<sup>40</sup>

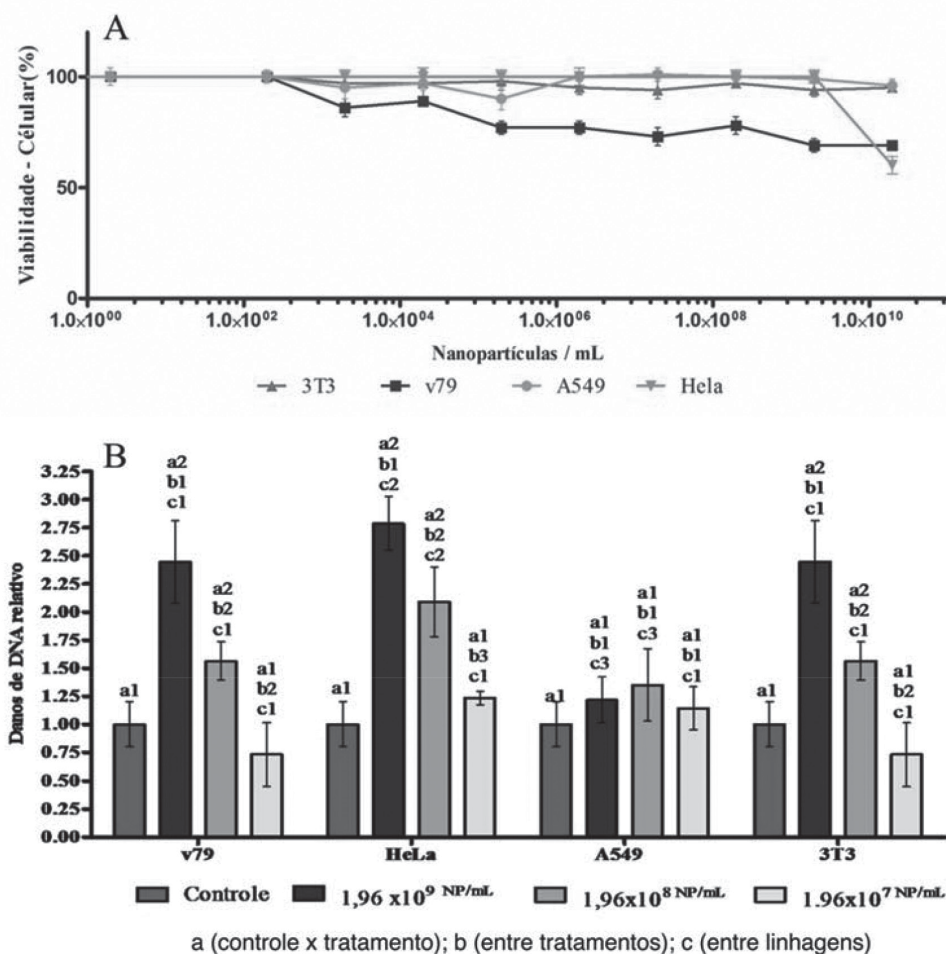
#### Avaliação da toxicidade utilizando ensaios *in vitro*

A avaliação da viabilidade celular mostrou que as linhagens V79 e HeLa foram mais sensíveis à exposição das nanopartículas, atingindo,

respectivamente, 69 e 60% de viabilidade celular na maior concentração testada 1,96 x 10<sup>10</sup>. Como já mostrado em diversos estudos a linhagem V79 apresenta alta sensibilidade, o que provavelmente resultou em maior morte celular. Em relação à linhagem HeLa, por se tratar de uma linhagem tumoral provavelmente não obteve sucesso no reparo de danos que ocorreram no DNA devido à exposição às nanopartículas. Entretanto, as linhagens A549 e 3T3, na mesma concentração, apresentaram viabilidade acima de 90% (Figura 2A). O fato da linhagem A549 não apresentar morte celular, mesmo se tratando de uma linhagem tumoral, pode ser explicada devido ao fato desta não ter sofrido tantos danos como a linhagem HeLa, como mostrado na Figura 2B.

As análises de genotoxicidade (ensaio cometa) com as linhagens celulares A549, V79, 3T3 e HeLa expostas às NPs de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por uma hora em diferentes concentrações mostraram que em maiores concentrações ocorreram os menores índices de danos no DNA, o que pode ser explicado pela provável agregação das NPs em altas concentrações (Figura 2B).

Variações na resposta de linhagens celulares em relação à toxicidade de NPs de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> são encontradas na literatura,<sup>2</sup> sendo estes resultados explicados pela diversidade metabólica apresentada pelas diferentes linhagens. Chusei *et al.*<sup>41</sup> verificaram aproximadamente 100% de viabilidade da linhagem celular A549 pelo ensaio de MTT (*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil Tetrazolium]*) nas concentrações de 0-100 µg mL<sup>-1</sup> de NPs Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Rajiv *et al.*<sup>12</sup> em estudos realizados com linfócitos humanos mostraram que estes foram



**Figura 2.** Avaliação da toxicidade - ensaio *in vitro* - em linhagens celulares: A549, V79, 3T3 e HeLa expostas às concentrações de 0,0 NP mL<sup>-1</sup>, 1,96 x 10<sup>7</sup>; 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup>. a) viabilidade celular por citometria de imagem; b) Danos de DNA pelo ensaio cometa. Números iguais não apresentam significância estatística ( $p > 0,05$ ) e números diferentes apresentam significância estatística ( $p < 0,05$ ). Indicações a (controle x tratamento); b (entre tratamentos) e c (entre linhagens)

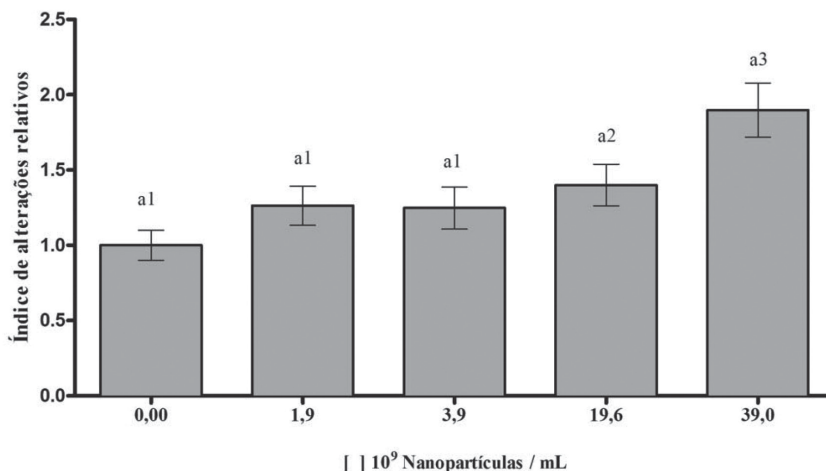


sensíveis às NPs  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , apresentando viabilidade em torno de 50% em exposição a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

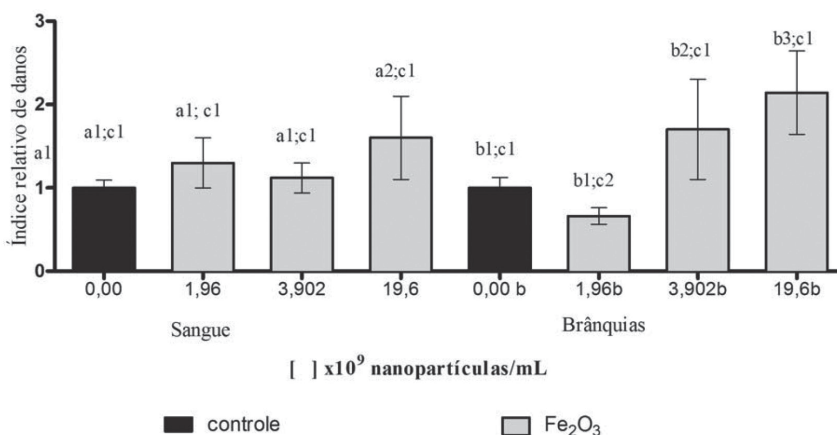
Embora os resultados mostrem a presença de danos de DNA (análise cometa) quando as células foram expostas às NPs, em análise de viabilidade celular as mesmas não apresentaram morte celular, logo existe a sugestão de que o meio intracelular pode apresentar respostas de reparo do material genético, o que faz com que a célula seja tolerante a este tipo de NPs.<sup>42,43</sup> Estudos mostram que o mecanismo de ação das NP  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  está ligado à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) podendo resultar em processos inflamatórios nas células e consequente ruptura na membrana das mitocôndrias, danos no DNA e morte celular programada por apoptose.<sup>2,7,42-44</sup> Entretanto, as reações causadas pelos íons de ferro gerados pela dissociação das NPs no citoplasma celular são controladas por um complexo de proteínas que podem fazer o transporte ou armazenamento deste nanocomposto, justificando a tolerância celular às NPs de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .<sup>7,42,43</sup>

### Análises de Genotoxicidade em *Allium cepa*

No ensaio *Allium cepa* foram observados maiores índices de alterações (IA) nas maiores concentrações testadas ( $19,6$  e  $39 \times 10^9$  NPs  $\text{mL}^{-1}$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Resultados das análises de genotoxicidade em teste de *Allium cepa* por índices de alterações (IA) após exposição a diferentes concentrações de NP  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ : 0,00; 1,96; 3,9; 19,6 e  $39 \times 10^9$  NPs  $\text{mL}^{-1}$ . Números iguais não apresentam significância estatística ( $p > 0,05$ ) e números diferentes apresentam significância estatística ( $p < 0,05$ )



a (controle x tratamento; sangue); b (controle x tratamento; brânquias); c (sangue x brânquias)

**Figura 4.** Resultados da genotoxicidade em células sanguíneas e branquiais de *D. rerio* indicados por índice de relativos de danos após exposição a diferentes concentrações de NPs de óxido de ferro: 0,0 (controle); 1,96; 3,90; 19,6  $\times 10^9$  NPs  $\text{mL}^{-1}$ . Números iguais não apresentam significância estatística e números diferentes apresentam significância estatística

Saquib *et al.*<sup>45</sup> ao utilizarem modelo vegetal *Raphanus sativus* demonstraram que o potencial genotóxico das NPs de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  está relacionado à concentração. Os autores relatam que as NPs agem no interior da célula, liberando íons tóxicos e ocasionando o estresse oxidativo, levando à alteração do funcionamento mitocondrial e danos ao DNA. Estes danos no material genético comprovam a necessidade de aprofundamento nos estudos sobre a toxicidade destas NPs.<sup>26,45,46</sup> Desta forma, é importante a investigação e diversificação dos estudos com plantas e o conhecimento dos mecanismos intracelulares das NPs no metabolismo celular.

### Avaliação da toxicidade em zebrafish (*Danio rerio*)

#### Ensaio cometa em células sanguíneas e branquiais de *D. rerio*

Os resultados das análises de genotoxicidade em células sanguíneas e branquiais mostraram diferença significativa em concentrações mais elevadas quando comparadas ao controle. As células branquiais apresentaram maior sensibilidade ( $3,902$ ;  $19,6 \times 10^9$  NPs  $\text{mL}^{-1}$ ) que as células sanguíneas quando em concentração  $19,6 \times 10^9$  NPs  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 4).

Esses resultados são condizentes com a literatura, visto que em estudos realizados com peixes foram observados maiores índices de

danos no DNA de células branquiais. Os autores justificam que estes órgãos podem adsorver as NPs de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, pois estão em contato direto com as NPs presentes no ambiente.<sup>21,47,48</sup>

Diversos estudos realizados em peixes demonstram o potencial genotóxico de diferentes nanocompostos e a sensibilidade do ensaio cometa, lembrando que este é considerado um pré-teste. Em estudo realizado com *D. rerio* expostos por 96 h a 200 mg L<sup>-1</sup> a NPs de vermiculite esfoliada magnética e NPs vermiculite esfoliada com tamanho médio de 150 nm, foi possível observar, pelo ensaio cometa com eritrócitos, que estes apresentaram índice de danos significativo em relação ao controle.<sup>49</sup> Em outro estudo realizado com fêmeas de *Poedilia reticulata* expostas a NPs  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com tamanho médio de 4 nm (0,3 mg/L) foi observada genotoxicidade nas exposições entre 3 e 7 dias, e genotoxicidade e mutagenicidade (teste de micronúcleo) em exposições por mais 14 e 21 dias.<sup>50</sup>

### Avaliação bioquímica dos efeitos das nanopartículas de óxido de ferro nos diferentes tecidos de *D. rerio*

A análise das enzimas ligadas ao mecanismo antioxidante, CAT e GPx, e ao processo de biotransformação de xenobióticos, GST, nos diferentes tecidos de *D. rerio* expostos às NPs de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nas concentrações de 1,96; 3,902 e 19,6 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup> durante 72 horas são apresentadas na Figura 5. Os resultados das análises bioquímicas mostraram que a CAT aumentou no cérebro e no músculo, em todas as concentrações utilizadas, no coração (em 1,96 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup>) e no fígado (em 3,902 e 19,6 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup>) quando comparadas com o controle (Figura 5A). Entretanto, a atividade da CAT foi mais elevada no fígado em relação aos outros órgãos. A maior atividade da CAT no fígado confirma o papel deste órgão nos processos de desintoxicação e que este órgão é capaz de eliminar o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Além da desintoxicação, o fígado também está envolvido no processo de filtração como o baço e o rim e, neste sentido, é um órgão alvo em peixes expostos a NPs.<sup>51</sup> Ademais, a atividade aumentada da CAT demonstra também uma resposta adaptativa dos diferentes órgãos às NPs, na tentativa de neutralizar as EROs. De acordo com Hermes-Lima,<sup>52</sup> maiores atividades da CAT são observadas quando há elevação da peroxidação lipídica.

O mecanismo de defesa antioxidante funciona de forma complexa a partir da ação de diversas enzimas no combate à produção de EROS. As enzimas CAT e SOD são as primeiras a agir na inativação de EROS,<sup>53,54</sup> a SOD desmota os radicais superóxidos (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que poderão ser decompostos pela CAT e GPx. A CAT decompõe o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio. Este sistema irá realizar a desintoxicação do organismo evitando os danos celulares.<sup>42,55</sup>

A atividade da GPx (Figura 5B) diminuiu significativamente no cérebro nas concentrações 1,96; 3,902 x 10<sup>9</sup>, porém aumenta na maior concentração 19,6 x 10<sup>9</sup>, no coração é observado aumento da atividade de acordo com o aumento da concentração, na pele (em 19,6 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup>) ocorreu uma queda na atividade quando esta é comparada com o controle. É possível também observar que a atividade da GPx aumentou significativamente em relação ao controle no coração (em 19,6 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup>), no fígado, em todas as concentrações testadas, no músculo (em 3,902 e 19,6 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup>), assim como na pele (em 1,96 e 3,902 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup>). O aumento da GPx pode indicar que esta enzima está compensando a atividade diminuída da CAT<sup>56</sup> e mostra também maior susceptibilidade dos peixes às NPs, evidenciando que as mudanças no ambiente podem resultar em alterações bioquímicas no interior das células, o que por sua vez, modulam a atividade destas enzimas. A diminuição da atividade na pele na concentração mais alta pode indicar a agregação da nanopartícula no meio e por consequência não resposta da pele.

Embora não tenha sido avaliado o acúmulo das NPs nos tecidos, o ferro liberado das NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pode ser tóxico quando se acumula em um nível inadequado. Como descrito por Halliwell e Gutteridge<sup>53</sup> e Jeong e Connolly<sup>57</sup> o ferro livre, incluindo Fe (II) e Fe (III), pode participar da reação de Fenton e gerar radicais hidroxílicos citotóxicos. Neste sentido, a produção de EROs ativa os sistemas de defesa antioxidantes que protegem as células dos danos oxidativos. Por outro lado, a diminuição na atividade da GPx em *D. rerio* pode estar relacionada à produção de O<sub>2</sub>, à ação direta das NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sobre a síntese desta enzima e também pode ser um sinal de toxicidade associada à produção de EROs induzida pela presença das NPs. A GPx catalisa a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peróxidos orgânicos a seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH (glutathione reduzida) a GSSG (glutathione oxidada). Portanto, a diminuição da atividade da GPx pode estar relacionada também à escassez de GSH nos tecidos. Os níveis de GSH dependem, principalmente, do equilíbrio entre a taxa de síntese de GSH, a taxa de conjugação (por GSTs), taxa de oxidação (não enzimática ou por GPx), e redução da GSSG para GSH (via glutathione reductase, GR).<sup>58,59</sup> A GSH é a molécula redox mais abundante nas células e, portanto, desempenha um papel importante na desintoxicação de eletrófilos e na prevenção do estresse oxidativo celular (Hermes-Lima, 2004, Latha e Pari, 2004). Outra via metabólica possível para a homeostase de metais na célula se faz por meio da quelatação de íons metálicos, que poderá formar complexos protéicos nas mitocôndrias, diminuindo ou até mesmo inibindo o estresse oxidativo.<sup>55</sup>

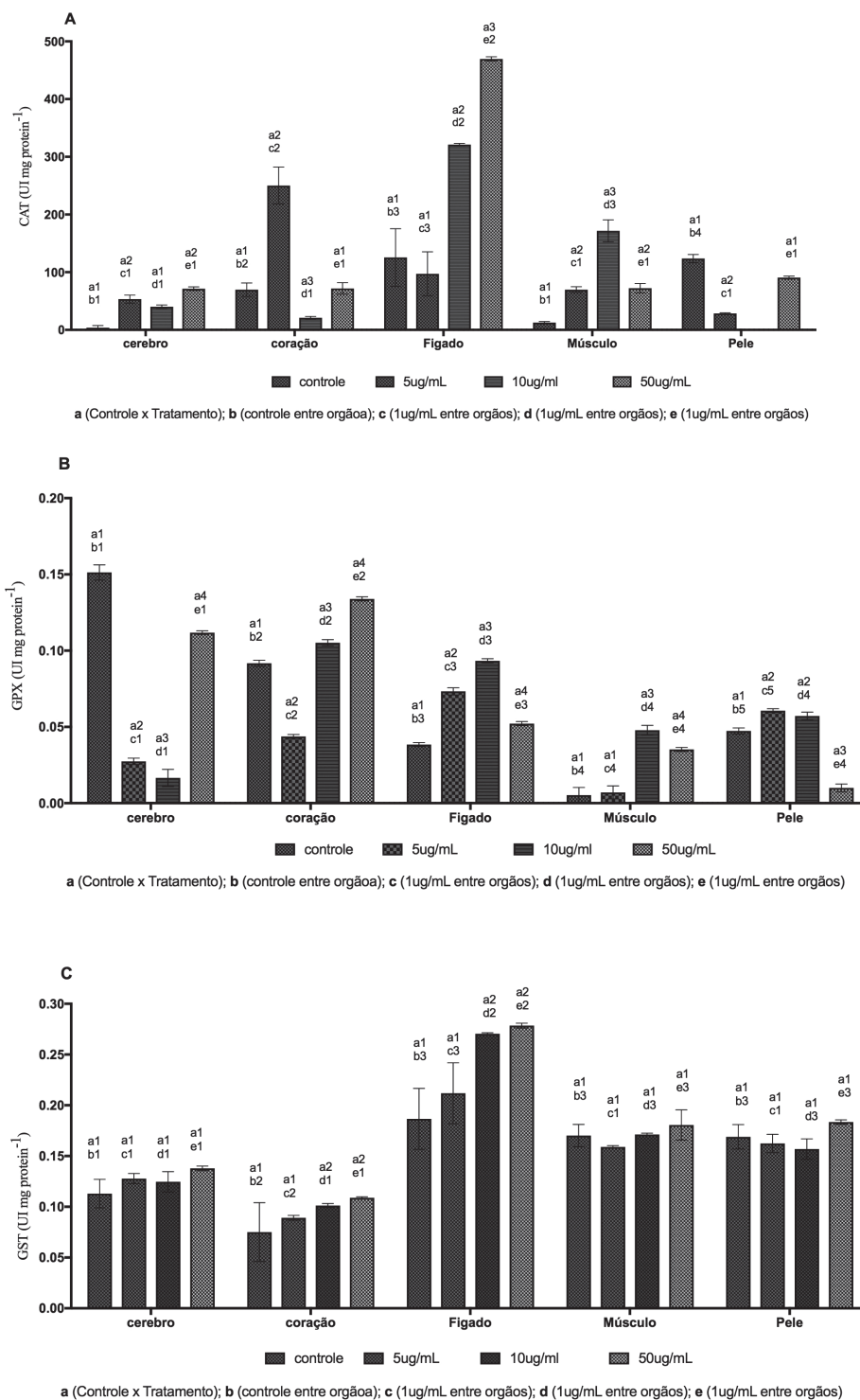
A atividade da GST aumentou significativamente no coração e no fígado nas concentrações de 3,902 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup> e 19,6 x 10<sup>9</sup> NPs mL<sup>-1</sup>, quando comparados com seus respectivos controles. Entretanto, quando comparada com os órgãos estudados, a atividade da GST foi menor no coração e cérebro. Por outro lado, a atividade da GST no cérebro, músculo e pele, em todas as concentrações estudadas, apresentou semelhança à apresentada pelos controles (Figura 5B). O aumento da atividade da GST indica que o organismo está passando por um processo de desintoxicação.<sup>59</sup> A GST juntamente com a GPx tem a função de reduzir os peróxidos evitando danos no DNA.<sup>60</sup>

Estudos realizados com NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em peixes demonstram que em adultos a defesa antioxidante e a eliminação das NPs são mais eficientes do que em embriões.<sup>21</sup> Contudo, em medaka adultos, *Oryzias latipes*, expostos por 14 dias a 50 µg/mL de NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (30 nm) houve indução do estresse oxidativo no fígado e cérebro, no início da exposição, sendo o equilíbrio fisiológico restaurado com o tempo.<sup>25</sup> O mesmo comportamento foi observado em *D. rerio* expostos a 4 e 10 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (140-160nm) por 28 dias, com sangramento e mudança na cor da pele, acúmulo de NPs nos animais nos primeiros dias de exposição por adsorção e ingestão e eliminação das NPs após 24 dias.<sup>21</sup> Zhang *et al.*<sup>21</sup> sugeriram em seu estudo que houve retenção de uma parte destas NPs no sistema gastrointestinal e nas brânquias, e que os íons de ferro induziram o estresse oxidativo nos primeiros dias de exposição.

Em nosso estudo as alterações nas atividades enzimáticas indicam a mudança do funcionamento dos órgãos e indução de estresse oxidativo pelas NPs de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Ademais, cada órgão respondeu de maneira distinta às diferentes concentrações de NPs devido às suas capacidades metabólicas. Esta variação de resposta nos diferentes tecidos também foi observada em tilápias, *Oreochromis niloticus*, expostas às NPs de óxido de ferro, onde foi verificado acúmulo, distribuição fisiológica e eliminação das NPs.<sup>51</sup>

### CONCLUSÃO

As NPs Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tiveram suas características físico-químicas alteradas dependendo do meio dispersante; o potencial genotóxico



**Figura 5.** Atividade das enzimas catalase (CAT) (A), glutatona peroxidase (GPx) (B) e glutatona S-transferase (GST) (C) em *Danio rerio* expostos às nanopartículas  $Fe_2O_3$  pelo período de 72 h, nas concentrações de 1,96; 3,90 e 19,6 x  $10^9$  NPs mL<sup>-1</sup>. Números iguais não apresentam significância estatística ( $p > 0,05$ ) e números diferentes apresentam significância estatística ( $p < 0,05$ )

foi dose dependente nos estudos *in vitro* e nos estudos *in vivo* os resultados mostraram que estas apresentaram genotoxicidade também em células branquiais e sanguíneas de *Danio rerio*. Em relação as análises bioquímicas foram observadas alteração nas atividades das enzimas CAT, GPx e GST nos tecidos de *Danio rerio* e estas podem ser utilizadas como biomarcadores de estresse oxidativo e para monitoramento ambiental. Análises de toxicidade de nanomateriais devem ser melhor investigadas, pois mesmo em baixas concentrações, em

caso de nanopartículas metálicas, a exposição pode ser por períodos longos de tempo, fator que pode resultar em efeitos semelhantes aos de exposição a concentrações elevadas por um curto período de tempo. Desta forma é necessário ter cautela no uso das NPs de  $Fe_2O_3$ , principalmente devido à possibilidade da modificação de suas propriedades físico-químicas dependente do meio em que estão dispersas, fato que pode influenciar sua toxicidade em diferentes ambientes

## REFERÊNCIAS

1. Braunschweig, J.; Bosch, J.; Meckenstock, R. U.; *New Biotechnol.* **2013**, *30*, 793.
2. Dissanayake, N. M.; Current, K. M.; Obare, S. O.; *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 23482.
3. Gupta, A. K.; Gupta, M.; *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995.
4. Auffan, M.; Rose, J.; Wiesner, M. R.; Bottero, J.; *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 1127.
5. Tang, S. C. N.; Lo, I. M. C.; *Water Res.* **2013**, *47*, 2613.
6. Sarkar, A.; Sil, P. C.; *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *71*, 106.
7. Valdíglesias, V.; Kiliç, G.; Fernández-Bertólez, N.; Pásaro, E.; Teixeira, J. P.; Laffon, B.; *Environ. Mol. Mutagen.* **2015**, *56*, 125.
8. Otero-González, L.; Garcia-Saucedo, C.; Field, A. J.; Sierra-Ivarez, R.; *Chemosphere* **2013**, *93*, 1201.
9. Bhattachary, K.; Gogoi, B.; Buragohain, A. K.; Deb, P.; *Mater. Sci. Eng.* **2014**, *42*, 595.
10. Couto, D.; Sousa, R.; Andrade, L.; Leander, M.; Lopez-Quintela, M. A.; Rivas, J.; Freitas, P.; Lima, M.; Porto, G.; Porto, B.; Carvalho, F.; Fernandes, E.; *Toxicol. Lett.* **2015**, *234*, 67.
11. Kilianová, M.; Pucek, R.; Filip, J.; Kolarik, J.; Kvítek, L.; Panáček, A.; Tucek, J.; Zboril, R.; *Chemosphere* **2013**, *93*, 2690.
12. Rajiv, S.; Jerobin, J.; Saranya, V.; Nainawat, M.; Sharma, A.; Makwana, P.; Gayathri, C.; Bharath, L.; Singh, M.; Kumar, M.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N.; *Human an Experimental Toxicology* **2016**, *35*, 170.
13. Yun, J. W.; Kim, S. H.; You, J. R.; Kim, W. H.; Jang, J. J.; Min, S. K.; Kim, H. C.; Chung, D. H.; Jeong, J.; Kang, B. C.; Che, J. H.; *J. Appl. Toxicol.* **2015**, *35*, 681.
14. Barena, R.; Casals, E.; Colón, J.; Font, X.; Sánchez, A.; Puentes, V.; *Chemosphere.* **2009**, *75*, 850.
15. Wang, C.; Lu, G.; Cui, J.; Wang, P.; *Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *28*, 414.
16. Li, J.; Hu, J.; Xiao, L.; Wang, Y.; Wang, X.; *Sci. Total Environ.* **2018**, *625*, 677.
17. Pan, B.; Xing, B.; *Eur. J. Soil Sci.* **2012**, *63*, 437.
18. Ben-Moshe, T.; Frenk, S.; Dror, I.; Minz, D.; Berkowitz, B.; *Chemosphere* **2013**, *90*, 640.
19. Alarifi, S.; Ali, D.; Alkahtani, S.; *Biol. Trace Elem. Res.* **2014**, *159*, 416.
20. Gonzalez, L.; Kirsch-Volders, M.; *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* **2016**, *768*, 14.
21. Zhang, Y.; Zhu, L.; Zhou, Y.; Chen, J.; *J. Environ. Sci.* **2015**, *30*, 223.
22. Ghasempour, S.; Shokrgozar, M. A.; Ghasempour, R.; Alipour, M.; *Exp. Toxicol. Pathol.* **2015**, *67*, 509.
23. Hao, L.; Wang, Z.; Xing, B.; *J. Environ. Sci.* **2009**, *21*, 1459.
24. Zhu, X.; Tian, S.; Cai, Z.; *PLoS One* **2012**, *7*, e46286.
25. Li, H.; Zhou, Q.; Wu, Y.; Fu, J.; Wang, T.; Jiang, G.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2009**, *72*, 684.
26. Zuverza-Mena, N.; Martínez-Fernández, D.; Du, W.; Hernandez-Viezas, J. A.; Bonilla-Bird, N.; López-Moreno, M. L.; Komárek, M.; Peralta-Videa, J. R.; Gardea-Torresdey, J. L.; *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *110*, 236.
27. Martínez-Fernández, D.; Komárek, M.; *Environ. Exp. Bot.* **2016**, *131*, 128.
28. Azqueta, A.; Gutzkow, K.; Brunborg, G.; Collins, A. R.; *Mutat. Res.* **2011**, *724*, 41.
29. Collins, A. R.; Dusinská, M.; Horská, A.; *Acta Biochim. Pol.* **2001**, *48*, 611.
30. Collins, A. R.; Fleming, I. M.; Gedik, C. M.; *Biochim Biophys. Acta* **1994**, *1219*, 724.
31. Bradford, M. A.; *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 24.
32. Beutler, E.; *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*, Grune & Stratton: New York, 1975.
33. Beutler, E.; *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*, 3<sup>rd</sup> ed., Grune & Stratton: New York, 1984.
34. Keen, J. H.; Habig, W. H.; Jakoby, W. B.; *Biol. Chem.* **1976**, *251*, 6183.
35. Safi, M.; Courtois, J.; Seigneuret, M.; Conjeaud, H.; Berret, J. F.; *Biomaterials* **2011**, *32*, 9353.
36. Walkey, C. D.; Chan, W. C. W.; *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2780.
37. Forozandeh, P.; Aziz, A. A.; *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10*, 221.
38. Mohanraj, V. J.; Chen, Y.; *Tropical J. Pharm. Res.* **2006**, *5*, 561.
39. Amde, M.; Liu, J. F.; Tan, Z. Q.; Bekana, D.; *Environ. Pollut.* **2017**, *230*, 250.
40. Taze, C.; Panetas, I.; Kalogiannis, S.; Feidantsis, K.; Gallios, G. P.; Kastrinaki, G.; Konstandopoulos, A. G.; Václavíková, M.; Ivanicova, L.; Kaloyianni, M.; *Aquat. Toxicol.* **2016**, *172*, 9.
41. Chusei, C. C.; Wu, C. H.; Mallavarapu, S.; Hou, F. Y.; Hsu, C. M.; Winar, J. G.; Aronstam, R. S.; Huang, Y. W.; *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *206*, 319.
42. Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 113.
43. Valdíglesias, V.; Fernández-Bertólez, N.; Kiliç, G.; Costa, C.; Costa, S.; Fraga, S.; Bessa, M. J.; Pásaro, E.; Teixeira, J. P.; Laffon, B.; *Med. Biol.* **2016**, *38*, 53.
44. Sadeghi, L.; Tanwir, F.; Babade, V. Y. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2015**, *67*, 197.
45. Saqib, Q.; Faisal, M.; Alatar, A. A.; Al-Khedhairi, A. A.; Ahmed, M.; Ansari, S. M.; Alwathnani, H. A.; Okla, M. K.; Dwivedi, S.; Musarrat, J.; Praveen, S.; Khan, S. T.; Wahab, R.; Siddiqui, M. A.; Ahmad, J.; *J. Environ. Sci.* **2016**, *47*, 49.
46. Rizwan, M.; Ali, S.; Qayyum, M. F.; Ok, Y. S.; Adrees, M.; Ibrahim, M.; Zia-Ur-Rehman, M.; Farid, M.; Abbas, F.; *J. Hazard. Mater.* **2017**, *322*, 2.
47. Handy, R. D.; Owen, R.; Valsami-Jones, E.; *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 287.
48. Osborne, O. J.; Lin, S.; Chang, C. H.; Ji, Z.; Yu, X.; Wang, X.; Lin, S.; Xia, T.; Nel, A. E.; *ACS Nano* **2015**, *10*, 9573.
49. Cáceres - Vélez, P. R.; Fascineli, M. L.; Grisolia, C. K.; Lima, E. C. O.; Sousa, M. H.; Morais, P. C.; Azevedo, R. B.; *Sci. Total Environ.* **2016**, *551*, 228.
50. Qualhato, G.; Rocha, T. L.; Lima, E. C. O.; Silva, D. M.; Cardoso, J. R.; Grisolia, C. K.; Sabóia-Morais, S. M. T.; *Chemosphere* **2017**, *183*, 305.
51. Ates, M.; Demir, V.; Arslan, Z.; Kaya, H.; Yılmaz, S.; Camas, M.; *Aquat. Toxicol.* **2016**, *177*, 22.
52. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *FEBS Lett.* **1992**, *307*, 108.
53. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5<sup>th</sup> ed, Oxford: United Kingdom, 2007.
54. Carvalho, C. S.; Bernusso, V. A.; Araújo, H. S.; Espíndola, E. L.; Fernandes, M. N.; *Chemosphere* **2012**, *89*, 60.
55. Avhandling, A.; *Oxidative Damage in Fish Used as Biomarkers in Field and Laboratory Studies*, University of Gothenburg: Gothenburg, 2008.
56. Valavanidis, A.; Vlahogianni, T.; Dassenakis, M.; Scoullou, M.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2009**, *64*, 178.
57. Jeong, J.; Connolly, E. L.; *Plant Sci.* **2009**, *176*, 709.
58. Peña-Llopis, S.; Ferrando, M. D.; Peña, J. B.; *Aquat. Toxicol.* **2003**, *65*, 337.
59. Wang, C.; Lu, G.; Cui, J.; Wang, P.; *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *28*, 414.
60. Radu, M.; Munteanu, M. C.; Petrache, S.; Serban, A. I.; Dinu, D.; Hermenean, A.; Sima, C.; Dinischiotu, A.; *Acta Biochim. Pol.* **2010**, *57*, 355.