

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**USO DE BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE E HISTOPATOLÓGICOS
PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE VERMICULITA EXPANDIDA
MAGNÉTICA E VERMICULITA EXPANDIDA EM PEIXES *Danio rerio***

PAOLIN ROCIO CÁCERES VÉLEZ

Brasília – DF

2013

PAOLIN ROCIO CÁCERES VÉLEZ

**USO DE BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE E HISTOPATOLÓGICOS
PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE VERMICULITA EXPANDIDA
MAGNÉTICA E VERMICULITA EXPANDIDA EM PEIXES *Danio rerio***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO BENTES AZEVEDO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. CESAR KOPPE GRISOLIA

Brasília – DF

2013

*Dedico esta dissertação à minha
família e todos que, de alguma forma,
me apoiaram neste processo e
acreditaram em mim.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe amada, o motor e motivação da minha vida, por seus conselhos e carinho que me orientam para o caminho certo. Ao meu pai, por seu amor e conselhos sábios. Ao meu irmão José, pelas palavras de ânimo e pelas brincadeiras. À minha irmã Camila, pelas suas palavras de inocência e amor. À minha avó, que é uma mulher maravilhosa, por seu amor e confiança em mim.

Ao Luis, meu parceiro, o amor da minha vida, por todo apoio, paciência e carinho que me oferece todos os dias e pelas brincadeiras que me ajudaram muito para que meu estresse não chegasse ao limite.

À minha família pelo apoio, em particular à Deicy, Efrén, Jeimmy, Genny, Sofía, Anyela, por acreditarem em mim sempre e pela torcida para o sucesso deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo pelo acolhimento, por confiar e acreditar em minhas capacidades.

Ao Professor Dr. Cesar Koppe Grisolia pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por acreditar em meu potencial.

À Dra. Maria Luiza Fascineli pelos conselhos, ensinamentos, paciência e amizade ao longo deste tempo e por estar sempre disposta a me ajudar.

À minha amiga e colega Mariana Roll pela disponibilidade e paciência que teve para me transmitir seus conhecimentos e pela amizade.

À Professora Dra. Sônia Bão por abrir as portas de seu laboratório para a realização de etapas deste estudo e aos alunos que fazem parte da equipe de trabalho do Laboratório de Microscopia pelo auxílio, ensinamentos e amizade.

À Professora Dra. Emilia Celma de Oliveira Lima por fornecer os materiais testados neste trabalho. E também por esclarecer as minhas dúvidas.

À Dona Zélia por sua simplicidade, organização e por contribuir para que tudo corra bem no laboratório.

À minha querida amiga Dra. Patricia Escobar, pelas palavras de animo e por seu carinho.

Aos meus amigos e colegas que fazem parte do Laboratório de Genética Toxicológica, do Laboratório de Nanobiotecnologia, do Departamento de Genética e Morfologia e da pós-graduação em Biologia Animal pelo apoio durante o mestrado.

À Wânia Guimarães pela amizade, por ajudar na organização e cuidado do laboratório.

À minha querida amiga Isbelia Maria Caicedo e Diego Quilindo pelos momentos felizes que passamos, pela amizade sincera que tivemos e por acreditar e apoiar-me apesar da distância. Vocês sempre estão no meu coração.

À minhas queridas amigas Tania, Rosa, Viviana, Lorena pelos conselhos e pelos momentos de diversão.

À Universidade de Brasília pelo fornecimento da estrutura para a realização deste estudo.

À CAPES, ao CNPq e ao INCT de Nanobiotecnologia pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que me apoiaram, auxiliaram e torceram por mim, contribuindo direta ou indireta no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

“O preferível não é o desejo de acreditar, mas o desejo de descobrir, que é exatamente o oposto.”

Bertrand Russell

RESUMO

Alguns materiais, entre os quais o mineral vermiculita, estão sendo usados como absorventes de compostos orgânicos na água; entretanto, pouco é conhecido sobre a toxicidade atribuída a sua exposição. No presente trabalho, utilizou-se o peixe *Danio rerio* para avaliar os possíveis efeitos toxicológicos advindos da exposição aguda ao mineral Vermiculita Expandida (VE) e ao nanocompósito Vermiculita Expandida Magnética (VEM). Para tanto, utilizou-se biomarcadores histopatológicos e de genotoxicidade (fragmentação de DNA detectada por meio do teste do cometa, ensaio de micronúcleos e anormalidades nucleares). Foi realizada ainda, a caracterização morfológica da VE e da VEM por meio de Microscopia Eletrônica Transmissão e Varredura, cuja composição química foi determinada por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X (EDS). Para a avaliação toxicológica, peixes adultos foram expostos a concentrações crescentes (0, 25, 50, 100, 150 e 200 mg/L) por 96 horas, constituindo os grupos experimentais VE (VE₀, VE₂₅, VE₅₀, VE₁₀₀, VE₁₅₀, VE₂₀₀) ou VEM (VEM₀, VEM₂₅, VEM₅₀, VEM₁₀₀, VEM₁₅₀, VEM₂₀₀). Cada subgrupo foi constituído por oito peixes, com posterior realização de duplicatas nas mesmas condições experimentais. Os peixes foram observados quanto à ocorrência de alterações clínicas e comportamentais, morbidade e mortalidade durante o período de exposição. Posteriormente, os peixes foram eutanasiados, o sangue foi coletado para a avaliação da genotoxicidade e os órgãos foram coletados para avaliação histopatológica. Após avaliação pela EDS e das micrografias, constatou-se que a VE apresentou principalmente em sua composição oxigênio, magnésio e alumínio e que a VEM apresentou como elementos principais tais constituintes e sobretudo o ferro. Por meio da Microscopia Eletrônica Transmissão verificou-se que as nanopartículas de ferro estavam adsorvidas sobre a superfície da VE, apresentando diâmetro médio de $10,00 \pm 2,76$ nm. O teste de cometa indicou um aumento significativo da fragmentação apenas para o grupo exposto a maior concentração da VE em relação ao controle ($p \leq 0,05$). Por outro lado, em todos os grupos tratados com VEM observou-se um aumento significativo de fragmentação de DNA quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$). Quanto à ocorrência de anormalidades nucleares ou de micronúcleos não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais, assim como, não foram observadas alterações histológicas significativas. Entretanto, no lúmen intestinal, nos enterócitos e células caliciformes foram observadas a presença da VE e da VEM nos grupos expostos quando comparados com os grupos controles. Os resultados da fragmentação do DNA sugerem que a

VE causa fragmentação do DNA na maior concentração (VE₂₀₀), entretanto, esse efeito genotóxico foi observado em todos os grupos expostos à VEM, sendo um indicativo de que a presença de nanopartículas de ferro teria a capacidade de influir na toxicidade observada. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para comprovação destes resultados.

Palavras-chave: nanoecotoxicologia, bioindicadores, biomarcadores, vermiculita expandida, nanopartículas de óxidos de ferro.

ABSTRACT

Some materials, including the mineral vermiculite, are used as absorbents of organic compounds in water; however, little is known about the toxicity assigned to its exposure. In this study, we use *Danio rerio* to assess the toxicological effects by acute exposure to the mineral expanded vermiculite (EV) and the nanocomposite magnetic expanded vermiculite (MEV). For that, we used histopathological and genotoxicological (DNA fragmentation by comet assay, micronucleus test and nuclear abnormalities) biomarkers. Transmission and Scanning Electron Microscopy was used to characterize the EV and MEV, and Spectrometry Energy Dispersive X-ray (EDS) was employed to determine their chemical composition. Adult fishes were exposed independently to EV and MEV at increasing concentrations (0, 25, 50, 100, 150 e 200 mg/L) during 96 hours for toxicological evaluation. At each concentration, eight fishes were used and duplicates were performed under the same experimental conditions. The occurrence of clinical and behavioral alterations, morbidity and mortality during the exposure were observed. Subsequently, fishes were euthanized and blood was collected for genotoxicological evaluation and organs were collected for histopathological evaluation. EDS revealed mostly the presence of oxygen, magnesium and aluminum in EV and MEV respectively. Nonetheless, more iron was observed in MEV than EV. The iron nanoparticles (10.00 ± 2.76 nm) were adsorbed onto the surface of EV. Comet assay revealed statistically significant differences between the highest concentration of EV and control group ($p \leq 0.05$), however, all groups exposed to MEV showed statistically significant differences in relation to the control group ($p < 0.001$). Both micronucleus and nuclear abnormalities tests showed no significant differences between the control group and the exposed groups for both EV and MEV. Significant histological changes in gills, liver or gut were not observed among the experimental groups. However, fishes of exposed groups showed that enterocytes and goblet cells contained EV and MEV. These results suggest that EV (EV₂₀₀) promoted DNA fragmentation, as observed by the comet assay. Genotoxicological effects were observed in all groups exposed to MEV, indicating that the presence of nanoparticles would be able to influence the toxicity observed, although further studies should be performed to corroborate these results.

Keywords: ecotoxicology; bioindicators; biomarkers; magnetic expanded vermiculite; iron nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura da vermiculita.....	18
Figura 2.	Fotografias de diferentes tipos de danos em eritrócitos de <i>Danio rerio</i> obtidas após realização do teste do cometa.	31
Figura 3.	Fotografias de micronúcleo e diferentes tipos de anormalidades nucleares em eritrócitos de <i>Danio rerio</i>	32
Figura 4.	Micrografias de vermiculita expandida e vermiculita expandida magnética obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	37
Figura 5.	Espectro dos elementos presentes na vermiculita expandida obtidos por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X (EDS).	38
Figura 6.	Espectro dos elementos presentes na vermiculita expandida magnética obtidos por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X (EDS).	38
Figura 7.	Mapeamento da vermiculita expandida magnética obtido por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X (EDS)..	39
Figura 8.	Micrografias eletrônicas de transmissão da vermiculita expandida magnética.. ...	40
Figura 9.	Histograma dos diâmetros das nanopartículas magnéticas presentes na vermiculita expandida magnética.	40
Figura 10.	Curva de histerese magnética das nanopartículas de óxidos de ferro da vermiculita expandida magnética obtidas por saturação magnética.	41
Figura 11.	Amostras da vermiculita expandida magnética em meio aquoso após 96 horas..	42
Figura 12.	Microscopia de fluorescência de eritrócitos de <i>Danio rerio</i> com diferentes tipos de dano.....	44
Figura 13.	Porcentagens de dano total, dano moderado e dano elevado após exposição a diferentes concentrações de vermiculita expandida magnética.	45
Figura 14.	Porcentagens de dano total, dano moderado e dano elevado após exposição a diferentes concentrações de vermiculita expandida	46
Figura 15.	Fotografias de diferentes tipos de anormalidades nucleares em eritrócitos de <i>Danio rerio</i> de diferentes grupos experimentais..	46
Figura 16.	Fotografia e micrografias de brânquias de <i>Danio rerio</i> do subgrupo controle.....	48

Figura 17. Fotografias de brânquias de <i>Danio rerio</i> de diferentes grupos experimentais	49
Figura 18. Alterações histológicas de brânquia de <i>Danio rerio</i> expostos a 200 mg/L de vermiculita expandida ou vermiculita expandida magnética.....	51
Figura 19. Fotografia e micrografia de fígado de <i>Danio rerio</i> de diferentes grupos experimentais.	52
Figura 20. Fotografias de intestino de <i>Danio rerio</i> de diferentes grupos experimentais.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estadiamento e alterações histológicas em brânquias, fígado e intestino.	34
Tabela 2.	Parâmetros físico-químicos das amostras de vermiculita expandida magnética em meio aquoso.	42
Tabela 3.	Parâmetros físico-químicos da água antes e após 96 horas da exposição à vermiculita expandida magnética e vermiculita expandida.	43
Tabela 4.	Micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de sangue periférico de <i>Danio rerio</i> exposto à vermiculita expandida magnética.....	47
Tabela 5.	Micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de sangue periférico de <i>Danio rerio</i> exposto à vermiculita expandida.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Alterações Nucleares
AVMA	“American Veterinary Medical Association”- Associação médica americana de veterinária
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
DE	Dano Elevado
D _H	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	“Dynamic Light Scattering”- Espalhamento dinâmico de luz
DM	Dano Moderado
DNA	“Deoxyribonucleic acid”- Ácido desoxirribonucleico
DT	Dano Total
E	Estádio
EDS	“Energy Dispersive x-ray”- Energia dispersiva de raios x
EPA	“Environmental Protection Agency”- Agência de proteção ambiental
FT	Fator de Importância
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MN	Micronúcleos
VE	Vermiculita Expandida
VEM	Vermiculita Expandida Magnética

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA	16
1.2. VERMICULITA	18
1.3. ORGANISMOS BIOINDICADORES	20
1.4. BIOMARCADORES	22
1.4.1. Biomarcadores de genotoxicidade	23
1.4.2. Biomarcadores histopatológicos	23
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. OBJETIVO GERAL	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS TESTE.....	27
4.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	27
4.1.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	28
4.1.3. Saturação magnética	28
4.1.4. Espalhamento dinâmico de luz “Dynamic Light Scattering- DLS”	28
4.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA	29
4.3. BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE	30
4.3.1. Teste do Cometa	30
4.3.2. Teste do Micronúcleos e Anormalidades Nucleares	32
4.4. BIOMARCADOR HISTOPATOLÓGICO.....	33
4.4.1. Microscopia de Luz	33
4.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35

5. RESULTADOS	36
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS TESTE.....	36
5.2. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA.....	43
5.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA	44
5.4. BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE	44
5.4.1. Teste do Cometa	44
5.4.2. Teste do Micronúcleo e Anormalidades Nucleares	46
5.5. BIOMARCADOR HISTOPATOLÓGICO.....	48
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÕES.....	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
9. APÊNDICES	69
APÊNDICE A – Protocolo do Teste do Cometa	69
APÊNDICE B – Protocolo para Microscopia de Luz.....	71
APÊNDICE C – Protocolo para Microscopia Eletrônica de Varredura	72
10. ANEXOS.....	73
ANEXO A – PATENTE (PI0513014-0A)	73
ANEXO B – DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	83

1

I NTRODUÇÃO

1.1. NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA

Nanociência é definida pela “Royal Society” e “Royal Academy of Engineering” – Reino Unido, 2004 – como o estudo da manipulação de materiais em níveis atômico, molecular ou macromolecular, onde as propriedades destas partículas diferem significativamente dos materiais de origem. Segundo a EPA “Environmental Protection Agency”, nanotecnologia é a manipulação da matéria por meio de processos físicos e químicos para obtenção de materiais em nanoescala (U.S. EPA, 2007).

Segundo a “Environmental Protection Agency”, os nanomateriais atualmente utilizados podem ser agrupados em quatro tipos principais, os quais incluem nanomateriais baseados em carbono, nanomateriais baseados em metais, dendrímeros e compósitos (U.S. EPA, 2007).

Devido à alteração no tamanho a uma escala nanométrica, as características fundamentais da matéria, tais como condutividade, cor, dureza, ponto de fusão, podem sofrer mudanças totais, por exemplo: o ouro normalmente é amarelo, o "*nano*" ouro é vermelho; materiais frágeis e maleáveis na escala macro podem ser mais duros que o aço quando em escala nanométrica (carbonato de cálcio-giz); um grama de um catalisador feito de partículas de 10 nm de diâmetro é 100 vezes mais reativo que o mesmo material em partículas de 1 μ m de diâmetro; o carbono puro na escala nano pode ser condutor ou semi-condutor de eletricidade enquanto o carbono puro em escala macrométrica (diamante) não tem tais características (CARLOS et al., 2007).

Consequentemente, torna-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas e equipamentos para conhecer as características dos nanomateriais, tais como formato, tamanho, composição química, carga, agregação, capacidade de conjugação, propriedades catalíticas, biodistribuição e eliminação para ter uma ideia de sua possível interação com os organismos (SIMÓN-VÁZQUEZ et al., 2012). É importante destacar que as nanopartículas utilizadas nos diferentes setores industriais (cosméticos, alimentos, energia, eletrônicos,

construção, automotores) podem causar efeitos positivos ou negativos dependendo de suas propriedades físico-químicas e dos organismos que interagem com elas (SIMÓN-VÁZQUEZ et al., 2012).

O impacto dos produtos nanotecnológicos é ainda desconhecido e às vezes é subestimado pelo fato de que as consequências biológicas e/ou adversas advindas da exposição a esses novos materiais ainda não são totalmente compreendidas pela ciência. Neste contexto, a nanotoxicologia é uma disciplina científica emergente que estuda o impacto dos nanomateriais na saúde humana e no meio ambiente (SOMASUNDARAN; MEHTA; RHEIN, 2007; BEHRA; KRUG, 2008).

Um dos principais problemas ambientais a serem resolvidos é o tratamento de águas residuais, as quais têm em grande parte gorduras, lubrificantes, hidrocarbonetos pesados, como alcatrões, óleos brutos de petróleo, óleo diesel e hidrocarbonetos leves tais como querosene, combustível de aviação e gasolina produzida pelas indústrias, lixo doméstico, entre outros (OLIVEIRA, 2008; SILVA et al., 2010). Muitos produtos estão sendo desenvolvidos para o tratamento de águas, tais como, carvão ativado, bentonita, areia, fibra de vidro, amberlite, argila organofílica, atapulgita e vermiculita, os quais atuam como absorvedores de compostos orgânicos (ZUNAN; YI; YUQIAO, 1995; MYSORE; VIRARAGHAVAN; JIN, 2005; OLIVEIRA, 2008; SILVA et al., 2010).

Outros estudos demonstram que o emprego de algumas nanopartículas, como, CeO_2 , TiO_2 e Fe_3O_4 , apresentam rápida capacidade de adsorção de metais – Cádmiu, Cromo, Níquel, Chumbo e Cobre – de águas residuais (ZHANG et al., 2007; DOMINGOS; TUFENKJI; WILKINSON, 2009; SHEN et al., 2009; RECILLAS et al., 2011).

Na atualidade, os nanomateriais comercialmente mais importantes incluem óxidos metálicos, como o óxido de titânio (TiO_2), óxido de alumínio (Al_2O_3), óxido de zinco (ZnO) óxido de cério (CeO_2), zircônia (ZrO_2) e óxido de ferro (Fe_2O_3 e Fe_3O_4). Estas nanopartículas metálicas oxidadas são amplamente empregadas em catálises, como sensores ou materiais eletrônicos e nas remediações ambientais, devido às suas diversas propriedades ópticas, magnéticas, elétricas, mecânicas, morfológicas e de adsorção (FENG; WANG; ZHAO, 2009).

As nanopartículas de óxido de ferro apresentam ampla aplicação na indústria, no ambiente e na biomedicina, devido ao superparamagnetismo dependente do tamanho e das habilidades catalíticas (FENG; WANG; ZHAO, 2009). As partículas superparamagnéticas apresentam ausência de histerese na curva de magnetização e o campo coercivo é nulo, portanto, as partículas com esta propriedade apresentam magnetização apenas na presença de

um campo magnético externo (KNOBEL, 2000; PACI, 2009). Estas nanopartículas compõem diversos materiais, entre os quais, um nanocompósito à base de vermiculita e ferritas, o qual foi desenvolvido principalmente para remover o petróleo da água (OLIVEIRA, 2008).

1.2. VERMICULITA

A vermiculita é um silicato hidratado de formato lamelar, contendo quantidades variáveis de ferro, magnésio, potássio e alumínio. Suas características físicas são as mesmas das micas, no que se refere à clivagem típica, separando-se em finas lamelas flexíveis, porém sem elasticidade. Suas cores variam do bronze ao amarelo-amarronzado, com brilho perolado típico. A dureza do mineral pode variar de 2,1 a 2,8 na escala Mohs, com massa específica de $2,5 \text{ g/cm}^3$ (UGARTE; CRISTINA; FRANÇA, 2008).

Vermiculita é um termo genérico que se refere a minerais contendo até 26% de amianto (também conhecido como asbesto) e formados por duas folhas de tetraedros de sílica ligadas a uma folha central de magnésio octaédrico (minerais argilosos trioctaédricos). Estes minerais compartilham algumas características tais como carga, capacidade de troca catiônica, comportamento de hidratação, além de conter vários tipos de fibras de asbesto, incluindo as variedades de tremolita, asbesto anfíbolio (silicatos de ferro e de magnésio), actinolita, minerais fibrosos asbestiformes, ferro-edenite e ricterita (ATKINSON; ROSE; THOMAS; JONES; GOING, 1982; POTTER, 2001; MOOREA et al., 2005; OLIVEIRA, 2008; PACI, 2009). A representação da composição da vermiculita pode ser dada por $(\text{Mg, Fe})_3[(\text{Si, Al})_4\text{O}_4](\text{OH})_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e sua estrutura é representada na Figura 1 (UGARTE; CRISTINA; FRANÇA, 2008; PACI, 2009).

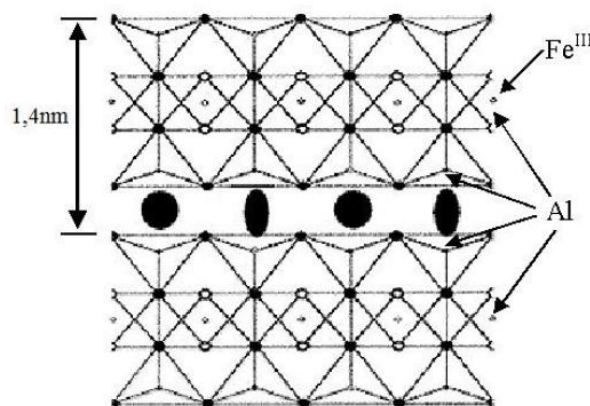


Figura 1. Estrutura da vermiculita (PACI, 2009).

A vermiculita, quando aquecida lentamente, desidrata-se ocasionando a contração da sua estrutura. Entretanto, estudos mostram que ela possui uma particularidade: quando aquecida de forma rápida, entre 800-1000°C, a água presente entre as palhetas se transforma rapidamente em vapor e a pressão gerada faz com que as placas se expandam em ângulos retos, proporcionando um aprisionamento de ar entre as palhetas e um aumento no volume em cerca de 10 a 20 vezes, podendo atingir 30 vezes (UGARTE; MONTE, 2005, 2006). Esse fenômeno é chamado de esfoliação ou expansão, fazendo com que a vermiculita aquecida tenha baixa densidade, maior área superficial, porosidade, carga superficial (negativa) e elevada capacidade de troca catiônica (UGARTE; MONTE, 2005, 2006). Assim, a vermiculita nessas condições passa a se chamar vermiculita expandida.

A composição deste mineral é variável e depende da composição da mica de origem, da variação química durante o intemperismo e da troca iônica durante o processo de formação. No Brasil, há depósitos e jazidas de vermiculita nos Estados da Paraíba, Goiás e Piauí (FRANÇA; UGARTE, 2005). Os minérios brasileiros não contêm asbestos, o que confere aos concentrados de vermiculita maior valor agregado, além de favorecer o melhor aproveitamento econômico do mineral (FRANÇA; UGARTE, 2005; PINTO; NETO, 2007).

Uma aplicação atrativa para a vermiculita atribuída às suas propriedades de troca iônica seria sua utilização como material adsorvente/absorvente, semelhante a algumas argilas e zeólitas, podendo ser utilizada em processos de remoção de contaminantes orgânicos e na purificação de águas residuais contendo sais dissolvidos (FRANÇA; UGARTE, 2005; PINTO; NETO, 2007).

A forma “esfolida” ou expandida da vermiculita representa sua principal aplicação na construção civil, na agricultura, nas indústrias químicas, de tintas e outras, sendo muito usada como isolante térmico e acústico em paredes, para fabricação de óleos de baixa condutividade térmica e pequena propagação sonora, impermeabilizantes, fertilizantes, formação de solos para horticultura, condicionador de solos ácidos e argilosos, produção de pneus e pastilhas de freio, tijolos refratários, blocos e placas resistentes a altas temperaturas, embalagens à prova de choque e fogo; além disso, é capaz de aumentar a viscosidade de óleos lubrificantes, absorver óleos, pesticidas e metais pesados (UGARTE; MONTE, 2005; UGARTE; CRISTINA; FRANÇA, 2008).

Devido às propriedades de troca iônica que a vermiculita possui, é possível torná-la mais hidrofóbica ou mais hidrofílica e produzir nanocompósitos magnéticos por meio da adsorção de nanopartículas de óxidos de ferro na matriz da vermiculita expandida (OLIVEIRA, 2008).

A vermiculita expandida contendo nanopartículas magnéticas (maghemita - $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, magnetita - Fe_3O_4 e/ou ferritas MFe_2O_4 - $\text{M} = \text{Mn, Co, Ni, Ba}$), chamada vermiculita expandida magnética, apresenta maior capacidade absorvedora que a vermiculita natural (OLIVEIRA, 2008; PACI, 2009; DA SILVA et al., 2010).

O controle da quantidade de nanopartículas adsorvidas possibilita modular a propriedade magnética deste material, promovendo a separação de substâncias nocivas como metais tóxicos, compostos orgânicos aromáticos, pesticidas, herbicidas e óleos dispersos em ambientes aquáticos (OLIVEIRA, 2008; PACI, 2009; DA SILVA et al., 2010).

1.3. ORGANISMOS BIOINDICADORES

Os bioindicadores são espécies, grupos de espécies, ou comunidades biológicas cuja presença, quantidade e distribuição indicam a magnitude de impactos ambientais nos ecossistemas. Também, são definidos como organismos ou comunidades que respondem à poluição ambiental alterando suas funções vitais ou acumulando substâncias químicas nocivas (CHOVANEC et al., 2003; FRÄNZLE, 2003).

Estes organismos são habitualmente divididos em dois grupos: os indicadores de efeito (ou reação) e os de acumulação; de tal modo que, quando submetidos a um estresse indicam tanto qualitativa como quantitativamente a qualidade ambiental (FRÄNZLE, 2003).

Os organismos comumente utilizados na avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos são os macroinvertebrados bentônicos (representantes das ordens de insetos aquáticos Ephemeroptera, Trichoptera e Plecoptera; moluscos, bivalves, algumas famílias de Diptera; ordens Heteroptera, Odonata e Coleoptera; larvas de Chironomidae, Diptera e Oligochaeta), os produtores primários, consumidores primários e secundários, e decompositores (FRÄNZLE, 2003; GOULART; CALLISTO, 2003).

Os peixes estão no último nível trófico da cadeia alimentar e são organismos sensíveis ao impacto de produtos químicos em ecossistemas aquáticos, metabolizando e acumulando xenobióticos ao longo do tempo e espaço (AL-SABTI; METCALFE, 1995; DOMINGUES et al., 2010). A saúde dos peixes depende do ambiente no qual estão localizados (DAUTREMEPUITS et al., 2004) e podem ser utilizados como bioindicadores de estresse (TORRES DE LEMOS et al., 2007), na triagem de produtos químicos para averiguação do potencial efeito genotóxico (AL-SABTI; METCALFE, 1995; DOMINGUES et al., 2010), teratogênico e/ou carcinogênico (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

As principais formas de entrada de poluentes nos organismos aquáticos são a ingestão ou a difusão através de barreiras epiteliais como brânquias (GOVINDASAMY; RAHUMAN, 2012), sistema digestório, órgãos olfativos e pele. Tais organismos apresentam processos altamente desenvolvidos de internalização celular de nanopartículas menores que 100 nm e micropartículas (0,1-100 μm), por meio de endocitose e fagocitose, respectivamente (MOORE, 2006). Estes processos são essenciais para as funções fisiológicas fundamentais, tais como digestão intracelular e imunidade celular (BAUN et al., 2008).

Neste contexto, os peixes desempenham um papel importante na realização de testes agudo, subcrônico e crônico para avaliação de determinadas substâncias (FRÄNZLE, 2003). Portanto, torna-se necessário o conhecimento da espécie escolhida, como reprodução, hábitos alimentares, fisiologia e comportamento, tanto para o cultivo e a manutenção, quanto para a realização dos testes, conhecidos como organismos-teste (ABNT, 2004; DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006).

As espécies de peixes frequentemente utilizadas para realização desses testes são: *Abramis brama*, *Alburnus alburnus*, *Ameiurus melas*, *A. nebulosus*, *Carassius auratus*, *C. carassius*, *Clupea herengus*, *Cyprinodon variegatus*, *Cyprinus carpio*, *Esox lucius*, *Gadus morrhua*, *G. pollachius*, *Lepomis humilis*, *L. macrochirus*, *Leuciscus leuciscus*, *L. idus*, *Micropterus salmoides*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oryzias latipes*, *Perca fluviatilis*, *Phoxinus phoxinus*, *Pimephales promelas*, *Poecilia reticulata*, *Rutilus rutilus*, *Salmo trutta*, *Salvelinus salvelinus* (FRÄNZLE, 2003; KNIE; LOPES, 2004) e o *Danio rerio* (KNIE; LOPES, 2004), vulgarmente conhecido como peixe paulistinha.

O peixe paulistinha é um ciprinídeo nativo do sudeste da Ásia, muito utilizado em aquários ornamentais, assim como em investigações científicas. Apresentam homologia genética com os homens em quase 80% o que permite que os resultados de diferentes estudos sejam extrapolados para o homem (KELLER; MURTHA, 2004; YU et al., 2006; ULLMANN et al., 2010). Outra vantagem da utilização deste peixe é a sua alta capacidade de se reproduzir, cada fêmea produz centenas de ovos transparentes facilitando o acompanhamento de todo o desenvolvimento embrionário; podem-se realizar vários experimentos geracionais; investigar a evolução de doenças e identificar as causas de doenças associadas (LAMMER et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009). Em estudos ecotoxicológicos apresenta-se como um modelo rápido, barato e fácil para avaliar os efeitos de diversos contaminantes (FAKO; FURGESON, 2009).

1.4. BIOMARCADORES

Os biomarcadores são alterações qualitativas e quantitativas decorrentes da exposição a um xenobiótico, obtidos por meio de medidas de fluidos corporais, células, tecidos ou do organismo, que indicam, em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, comportamentais ou energéticos, a presença de substâncias contaminantes, a magnitude da resposta do organismo alvo (LAM; GRAY, 2003) ou do grau de contaminação (WALKER et al., 1996).

Existem biomarcadores moleculares, celulares e macroscópicos, onde as duas características mais importantes são: a) identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos, e b) mensurar os efeitos sub-letais (ARIAS et al., 2007). Estas características proporcionam a implementação de ações remediadoras ou preventivas, indicando a importância da utilização de biomarcadores em programas de avaliação da contaminação ambiental (ARIAS et al., 2007).

Os biomarcadores podem ser classificados em diferentes classes:

1. *Biomarcadores de exposição*: indicam a quantidade de substâncias químicas absorvidas pelo organismo como resultado da exposição, mas não proveem informação sobre o grau do efeito que esta incorporação provoca (WALKER; HOPKIN; SIBLY, 2001). A capacidade de medir com precisão biomarcadores de exposição depende de uma adequada compreensão da química e toxicologia da substância (KAKKAR; JAFFERY, 2005). Entre estes biomarcadores estão:

- i. presença de agentes exógenos metabolizados: fenol (benzeno), cotinina (nicotina), o retinol (β -caroteno), benzo(a)pireno dihydrodiolepoxide (benzo(a)pireno);
- ii. presença de agentes exógenos inalterados como: fibras de amianto, aflatoxinas, alguns solventes e metais pesados (KAKKAR; JAFFERY, 2005).

2. *Biomarcadores de susceptibilidade*: indicam a capacidade inerente ou adquirida de um organismo para responder à exposição de um determinado xenobiótico, incluindo fatores genéticos e alterações nos receptores que influem na suscetibilidade de um organismo a uma determinada exposição (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

3. *Biomarcadores de efeito*: são alterações bioquímicas, fisiológicas e/ou outras alterações mensuráveis nos tecidos ou fluidos corporais de um organismo que estão associadas a um comprometimento da saúde ou a uma possível doença (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Estes biomarcadores demonstram o efeito adverso de um

químico em particular ou um grupo de químicos, sobre o organismo. Segundo Kakkar e Jaffery (2005) estes biomarcadores podem ser:

- i. lesões moleculares: adutos no DNA, fragmentação de DNA, hemoglobina glicosilada, adutos de proteínas e aminoácidos conjugados, aberrações cromossômicas e indução de micronúcleos;
- ii. biomoléculas produzidas endogenamente (proteínas): acetil-colinesterase, gama-glutamil transferase, porfirina, alfa-fetoproteína, e creatinina quinase;
- iii. mudanças celulares /teciduais: hipertrofia, atrofia, motilidade e numero de espermatozoides, atividade dos macrófagos, entre outras.

1.4.1. Biomarcadores de genotoxicidade

Para a avaliação do efeito genotóxico em animais aquáticos vários testes têm sido desenvolvidos, baseados na detecção de lesões potencialmente pré-mutagênicas tais como formação de adutos de DNA, modificações de bases, ligação cruzada de DNA-DNA ou DNA-proteína e quebra de fita do DNA (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009). Entre estes testes podemos citar o ensaio do cometa que é amplamente utilizado em células de mamíferos (SINGH et al., 2009, 1988) e peixes (GRISOLIA; CORDEIRO, 2000) e o teste do micronúcleo (HEDDLE et al., 1983; VIGANÒ et al., 2002; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

A associação dos testes do cometa e do micronúcleo melhora significativamente a capacidade para a detecção da possível genotoxicidade sem a necessidade de utilização de animais adicionais, desde que sejam adequados o delineamento experimental, a seleção das concentrações e a análise e interpretação dos resultados (VASQUEZ, 2010).

1.4.2. Biomarcadores histopatológicos

As alterações histopatológicas em tecidos de organismos aquáticos, como os peixes, são biomarcadores do efeito da exposição aos estressores do meio ambiente. A determinação desses efeitos pode ser realizada por meio de avaliações de lesões, alterações ou formação de tumores (neoplasmas) em órgãos alvo que resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo (TEH, 1997; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Desta maneira, é recomendado o uso de diferentes biomarcadores que permitam avaliar interdisciplinarmente qualquer tipo de dano causado nos indivíduos expostos a xenobióticos (POOMAN, K; FARHAT, 2004), ajudando a identificar de uma maneira mais precisa a relação entre a exposição dos agentes tóxicos, o risco e os possíveis efeitos causados nos organismos e no meio ambiente (RABITTO et al., 2005; ELAHEE; BHAGWANT, 2007; RALDÚA et al., 2007).

2

J

USTIFICATIVA

Mundialmente, variadas discussões nos meios científico e governamentais estão sendo realizadas sobre a melhor maneira de identificar e caracterizar o potencial efeito toxicológico dos nanomateriais. Estas discussões referem-se à identificação de metodologias e parâmetros para identificar o perigo e caracterizar o risco decorrente da exposição, e às necessidades de desenvolvimento de metodologias alternativas de avaliação (YOON et al., 2009), visando garantir a saúde pública e ambiental.

A água limpa é imprescindível para a saúde humana e é uma matéria prima essencial em uma variedade de indústrias, incluindo as de eletrônicos, produtos farmacêuticos e alimentícios (SAVAGE; DIALLO, 2005; PRADEEP, 2009). Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a recuperação da água, muitas delas fundamentadas no uso de nanomateriais, tais como nanopartículas de óxidos metálicos, nanomateriais de carbono, dendrímeros e zeólitos (SAVAGE; DIALLO, 2005; BAUN et al., 2008; SINGH et al., 2009; KIM; VAN DER BRUGGEN, 2010), cujos efeitos adversos não são totalmente conhecidos.

Dentre esses materiais desenvolvidos na tentativa de detoxificação da água encontra-se a vermiculita expandida magnética, cuja finalidade principal é a remoção de agentes poluentes, tais como, metais tóxicos, compostos orgânicos aromáticos, pesticidas, herbicidas e óleos (OLIVEIRA, 2008).

Para testar a segurança da utilização destes materiais, como vermiculita expandida e vermiculita expandida magnética, há a necessidade de realização de estudos toxicológicos para detectar os possíveis efeitos decorrentes da exposição.

3

O

BJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos toxicológicos em peixes *Danio rerio* após da exposição ao mineral vermiculita expandida e ao nanocompósito vermiculita expandida magnética.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o formato, estrutura, composição elementar da vermiculita expandida e da vermiculita expandida magnética; determinar o tamanho, a saturação magnética, o diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta da vermiculita expandida magnética;
- Avaliar as alterações físico-químicas da água na presença da vermiculita expandida e da vermiculita expandida magnética;
- Estabelecer a CL_{50} (Concentração Letal 50%) decorrente da exposição à vermiculita expandida e à vermiculita expandida magnética, além de determinar os possíveis efeitos tóxicos provenientes da exposição;
- Avaliar a fragmentação do DNA em eritrócitos dos peixes após exposição à vermiculita expandida e à vermiculita expandida magnética;
- Determinar a frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos dos peixes após exposição à vermiculita expandida e à vermiculita expandida magnética;
- Realizar avaliações histopatológicas em brânquias, fígado e intestino dos peixes após exposição à vermiculita expandida e à vermiculita expandida magnética.

4

MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS TESTE

Os materiais teste utilizados foram cedidos pela Professora Dra. Emilia Celia de Oliveira Lima do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás – UFG, cuja metodologia de obtenção está descrita na patente PI0513014-0 A (OLIVEIRA, 2008). (ANEXO A).

A vermiculita expandida e a vermiculita expandida magnética foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS). Para análise do tamanho médio e morfologia das nanopartículas da vermiculita expandida magnética foi utilizada Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e por meio do ensaio de saturação magnética foram realizados estudos de magnetização das nanopartículas de óxidos de ferro. Os parâmetros físico-químicos (potencial zeta, D_H , pH) da vermiculita expandida magnética foram obtidos por espalhamento dinâmico de luz (“Dynamic Light Scattering” – DLS).

4.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras da vermiculita expandida e da vermiculita expandida magnética foram dispostas sobre os suportes (stubs) para microscopia eletrônica de varredura. A metalização foi realizada na sequência no equipamento Balzers (SCD 050). Posteriormente foi feita a observação, a análise e a captura de imagens no microscópio de varredura JEOL (JSM-700 1F).

Para realizar a Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), as amostras foram analisadas durante 1 minuto para conhecer a sua composição elementar, utilizando o programa “Spectral Imaging System” (NNS 2.1) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura. Além disso, para conhecer a distribuição (mapeio) das nanopartículas de óxidos

de ferro na vermiculita expandida magnética foi realizada uma análise durante 16 horas, utilizando o mesmo programa (KEHAL; REINERT; DUCLAUX, 2010).

4.1.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a análise por MET, 300 mg da vermiculita expandida magnética foram adicionadas em 25 mL de água destilada. Na sequência, a amostra foi sonicada (Branson Sonifier 450) durante 3 minutos e 1,5 mL da suspensão formada foi centrifugada à 2000 rpm, por 1 minuto. Uma gota do sobrenadante foi disposta em telinha (recoberta com Formvar) para microscopia eletrônica. Após a secagem deste material, as telas foram levadas para análise e micrografadas no microscópio eletrônico JEOL (JEM-1011). Os diâmetros das partículas magnéticas (697 partículas) foram medidos no programa computacional Motic Images Plus 2.0. A distribuição de diâmetros das partículas foi obtida utilizando-se o melhor ajuste de distribuição normal (MORAIS et al., 2001).

4.1.3. Saturação magnética

As medidas de magnetização das nanopartículas (óxidos de ferro) secas foram realizadas a temperatura ambiente em um campo de 18 kOe utilizando um magnetômetro de amostra vibrante (VSM) da GMW Magnet Systems 3472-70. As medidas foram realizadas pelo aluno de Química Dhiogo Mendes (IQ-UFG) no laboratório do IF-UFG, coordenado pelo professor Andris Bkuzis.

4.1.4. Espalhamento dinâmico de luz “Dynamic Light Scattering- DLS”

Três béqueres, cada um com 10 mg da vermiculita expandida magnética foram colocados em 50 mL de água proveniente da rede de abastecimento (previamente passadas em um sistema de filtros de carvão ativado e nitrocelulose) e posteriormente foram submetidos a condições diferentes da seguinte forma:

- Amostra **A**: amostra agitada durante 96 horas.
- Amostra **B**: amostra sonicada no primeiro dia no aparelho Branson Sonifier 450, por 3 minutos. Esta amostra foi deixada em repouso durante o resto do experimento.
- Amostra **C**: amostra em repouso (sem agitar nem sonicar).

Todas as amostras foram mantidas a temperatura ambiente (25°C) e fotoperíodo de 14 horas claro/10 horas escuro. Após 24, 48, 72 e 92 horas, para todas as amostras foram medidos o pH, o potencial zeta e o diâmetro hidrodinâmico (D_H). Para o potencial zeta e o D_H , 1 mL da amostra foi filtrada com um filtro 0,22 μm para posterior análise no equipamento Zetasizer (Malvern Nano-ZS90).

4.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Todos os procedimentos seguiram os princípios éticos de experimentação animal, visando evitar ou minimizar o estresse, a angústia, a dor e o desconforto. Os procedimentos seguiram as normas para experimentação estabelecidas na Lei Arouca (nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) e os procedimentos preconizados na literatura: Usos de Animais de Laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996) e “American Veterinary Medical Association” (AVMA, 2007). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnBDOC no. 99145/2011, ANEXO B).

Foram usados peixes adultos da espécie *Danio rerio* foram obtidos da “Piscicultura Tropical Maeda – Brasília/DF” e mantidos em aquários apropriados. A água utilizada foi proveniente da rede de abastecimento, previamente passada em um sistema de filtros de carvão ativado para a retirada do cloro. Após, as demais impurezas da água foram removidas pela utilização de filtro de nitrocelulose. A temperatura foi mantida em torno de 25°C com aeração constante, pH = 6,8 e fotoperíodo de 14 horas claro/10 horas escuro. Antes, durante e ao finalizar as exposições, foram medidos os parâmetros físico-químicos como: condutividade (PHTEK CD203), nitritos, amônia e dureza da água, utilizando os kits comerciais de Labcon®. Os animais receberam ração comercial para peixes, pelo menos duas vezes ao dia.

Peixes com aproximadamente seis meses de idade (2 ± 1 cm) foram utilizados para avaliar a exposição à vermiculita expandida (0, 25, 50, 100, 150 e 200 mg/L), correspondentes aos subgrupos VE_0 , VE_{25} , VE_{50} , VE_{100} , VE_{150} e VE_{200} , respectivamente; e a exposição à vermiculita expandida magnética (0, 25, 50, 100, 150 e 200 mg/L), correspondentes aos subgrupos VEM_0 , VEM_{25} , VEM_{50} , VEM_{100} , VEM_{150} e VEM_{200} , respectivamente. Para cada subgrupo experimental foram realizadas duplicatas, as quais foram compostas de 8 animais cada, respeitando-se o limite de 1g peixe/litro de água, baseando-se no guia 203 da OECD (OECD, 1992). A exposição ocorreu por 96 horas em sistema estático, os materiais testes não

foram submetidos a nenhum tratamento para solubilização. Durante o período experimental os animais foram observados às 24, 48, 72 e 96 horas quanto à ocorrência de mortalidade, morbidade; alterações macroscópicas, como, mudanças na cor da pele; alterações comportamentais, como, alterações natatórias, de flutuação e de orientação; e outras alterações clínicas, como, alterações respiratórias.

4.3. BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE

Ao final da exposição, os peixes foram eutanasiados pela secção da medula, seguido de mielotomia. Prontamente foi realizada a coleta sanguínea com auxílio de pipeta heparinizada. O sangue coletado foi armazenado em microtubos de centrífuga do tipo “ependorf” contendo 500 μL de soro bovino fetal (SBF). Com 40 μL da mistura (SBF-sangue) foi feito o teste do cometa (MONROY; CORTÉS; SICARD, 2005; NOGUEIRA et al., 2006; KOSMEHL et al., 2008) e cerca de 50 μL foi utilizado para esfregaço em lâminas histológicas para o teste do micronúcleo (HOOFTMAN; RAAT, 1982; VIGANÒ et al., 2002; TSANGARIS et al., 2011) e o teste de anormalidades nucleares (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

4.3.1. Teste do Cometa

O protocolo utilizado foi o descrito por Kosmehl e colaboradores (2008), com algumas modificações. Cento e vinte microlitros de agarose “low melting point agarose” (LMP) a 7% foram rapidamente misturados com 40 μL da solução SBF-sangue e aplicadas em lâminas forradas com agarose normal. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas na solução de lise e após duas horas foi realizada a eletroforese (25 Volts, 300 mA). Seguidamente, as lâminas foram mergulhadas em solução tampão de neutralização e secas a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto e guardadas na geladeira. O teste foi realizado no escuro e os procedimentos estão descritos no APÊNDICE A.

Centos e cinquenta células foram contadas e analisadas por indivíduo (teste cego) em Microscópio de Fluorescência (ZEISS Axioskop 2 - HAL 100), coradas com brometo de etídio (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As células observadas foram classificadas de acordo com o tipo de dano (0, 1, 2, 3 e 4), os quais correspondem ao tamanho e a proporção do nucleóide-cauda. A Figura 2 representa as classificações dos diferentes tipos de danos em eritrócitos observados nos diferentes subgrupos experimentais, cuja classificação baseou-se nos autores Miranda e Tice (2003) e Collins e colaboradores (2008).

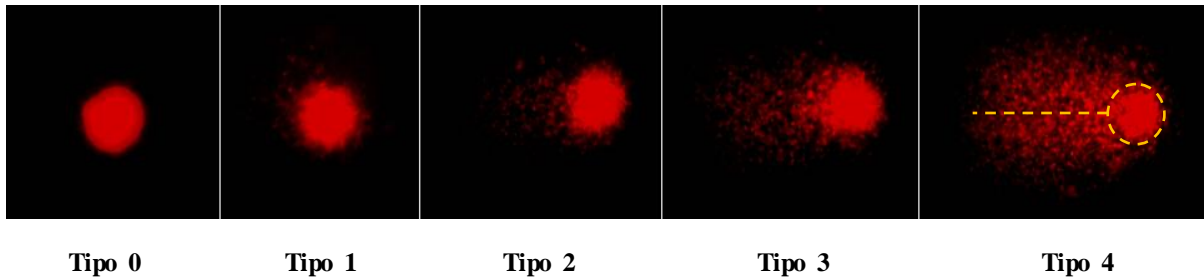


Figura 2. Fotografias de diferentes tipos de danos em eritrócitos de *Danio rerio* marcados com brometo de etídeo, obtidas após realização do teste do cometa no presente trabalho. A linha pontilhada no dano Tipo 4 corresponde à cauda e o círculo ao nucleóide.

Com os resultados do teste do cometa foram calculados o índice de dano (ID) e as porcentagens de dano total, dano moderado e dano elevado (JALOSZYNSKI et al., 1997), cujas fórmulas estão representadas a seguir:

$$ID = \frac{(N_1 + 2N_2 + 3N_3 + 4N_4)}{\frac{S}{100}}$$

$$\%Dano\ total = \frac{ID * 100}{400}$$

$$\%Dano\ moderado = \frac{(100 * (N_1 + N_2))}{400}$$

$$\%Dano\ elevado = \frac{(100 * (N_3 + N_4))}{400}$$

Onde,

ID: índice de dano no DNA

N_1 a N_4 : correspondem a cometas nas classes 1 a 4,

S: número total de cometas analisados, incluindo os de classe 0.

4.3.2. Teste do Micronúcleos e Anormalidades Nucleares

O protocolo descrito foi baseado no protocolo proposto por Fenech e colaboradores (2003) e Barsiene e colaboradores (2006), com algumas modificações.

Com a suspensão SBF-sangue foi realizado o esfregaço sanguíneo; posteriormente, as lâminas foram secas, fixadas com metanol e coradas com Giemsa 20%, as quais foram analisadas no microscópio de luz (ZEISS Axioskop 2 - HAL 100) em lente objetiva de 100x. Três mil células foram contadas e analisadas por indivíduo (teste cego), cujas seguintes características, propostas por Fenech (2003), foram adotadas para a identificação dos micronúcleos (Figura 3):

- figuras com formas redondas ou ovaladas com diâmetro variando entre 1/3 a 1/16 em relação ao núcleo principal;
- figuras sem refringência e com mesma coloração e intensidade do núcleo principal;
- figuras sem conexões ao núcleo principal.

Paralelamente, estas lâminas foram analisadas e contabilizadas quanto à ocorrência de anormalidades nucleares (AN). As AN representadas na Figura 3 foram avaliadas atendendo as seguintes características descritas por Carrasco e colaboradores (1990) e por Fenech (2003):

- células binucleadas, caracterizadas por apresentarem tamanho e intensidade de cores iguais;
- núcleos “blebbed”, caracterizados por apresentarem evaginação pequena do envelope;
- núcleos “lobed”, caracterizados por apresentarem evaginações maiores do que os núcleos “blebbed”;
- os núcleos “notched”, caracterizados por apresentarem um entalhe notável contendo material nuclear.

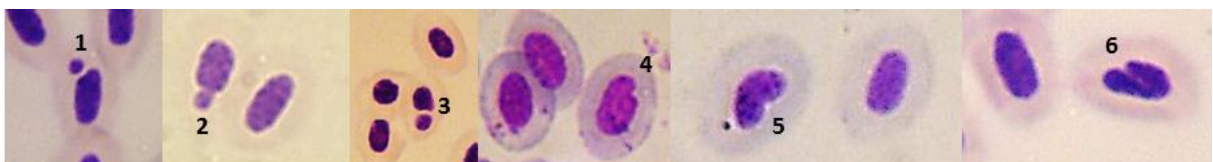


Figura 3. Fotografias de micronúcleo e diferentes tipos de anormalidades nucleares em eritrócitos de *Danio rerio* no presente trabalho: micronúcleo (1), broto (2), célula binucleada (3), “blebbed” (4), “lobed” (5) e “notched” (6).

4.4. BIOMARCADOR HISTOPATOLÓGICO

As brânquias, o fígado e o intestino foram coletados para posterior processamento para a realização das técnicas de Microscopia de luz (corados com Hematoxilina-Eosina) e Microscopia Eletrônica de Varredura.

4.4.1. Microscopia de Luz

O material coletado foi fixado com fixador Davidson durante 12 horas; posteriormente, as amostras foram processadas no histotécnico (ONA DM-40), emblocadas em parafina, cortadas em micrótomo (LEICA RM2235) e coradas com H-E. Os procedimentos estão descritos no APÊNDICE B.

Para a classificação das alterações histológicas foram utilizadas as nomenclaturas dos trabalhos de Bernet e colaboradores (1999), Nero e colaboradores (2006), Camargo e Martinez (2007), Cáceres-Vélez e colaboradores (2010) e Flores-Lopes e Thomaz (2011). As alterações foram classificadas de acordo com seu Estadiamento (E) e o Fator de Importância (FI) em relação ao impacto sobre a saúde dos peixes (BERNET et al., 1999; FLORES-LOPES; THOMAZ, 2011), representado na Tabela 1.

Para a gradação das lesões foram atribuídos valores de acordo com o proposto por Bernet e colaboradores (1999) e por Flores-Lopes e Thomaz (2011), o qual foi realizado com algumas modificações:

- 0 = sem alteração;
- 1 = alteração leve: facilmente reversíveis, dependendo da gravidade e da extensão da lesão;
- 2 = alteração moderada: refletem danos nos tecidos, podem ser reversíveis ou irreversíveis;
- 3 = alteração grave: geralmente irreversível e a sua persistência e progressão pode levar a uma perda parcial ou total da função do órgão.

Cada órgão foi avaliado separadamente, calculando três índices (1, 2 e 3). O primeiro índice (E_A) foi calculado separadamente para cada estágio (I, II e III) apresentado em cada peixe. O segundo índice (T_P -dano total por peixe) foi a somatória dos resultados de cada $E_{A(I,II, e III)}$. E o terceiro índice (T_G -dano total por grupo) foi a soma dos T_P dividido pelo número de indivíduos.

$$E_A = \sum (Y \times FI) \quad (1)$$

$$T_P = E_I + E_{II} + E_{III} \quad (2)$$

$$T_G = \sum T_P / n \quad (3)$$

Onde,

E: Estágio

A: estágio I, II ou III

Y: ausência de alteração (0) ou presença (1),

FI: fator de importância,

n: número total de indivíduos analisados por grupo (8)

T_P: índice patológico total do peixe,

T_G: índice patológico total do grupo experimental.

Tabela 1. Estadiamento e alterações histológicas em brânquias, fígado e intestino.

ESTÁDIO (E)	ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DAS BRÂNQUIAS
I	Hipertrofia* e hiperplasia* epitélio lamelar
	Atrofia*
	Congestão sanguínea
	Descolamento do epitélio lamelar
	Fusão lamelar
	Hiperplasia da cartilagem
II	Infiltração de leucócitos*
	Hemorragia e ruptura do epitélio lamelar
	Hipertrofia e hiperplasia de células mucosas
	Edema*
III	Hipertrofia e hiperplasia de células de cloreto
	Aneurisma lamelar
	Vacuolização*
	Necrose (picnose, cariólise e cariorréxis)*
	Degeneração celular *
	Telangiectasia lamelar

*Alterações para o fígado e o intestino.

4.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras de brânquias, fígado e intestino (n=3) foram fixadas usando o fixador Karnovsky (0,1 M; pH=7,4) e após 5 horas foram armazenadas no tampão CaCO₃ (0,1 M; pH=7,4). O material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio (4%) durante 1 hora e imediatamente foram realizadas desidratações graduais utilizando acetona e desidratações com o secador ao ponto crítico de CO₂ (Balzers CPD 030). As amostras foram metalizadas no equipamento Balzers (SCD 050). Os procedimentos estão descritos no APÊNDICE C.

A análise e a captura de imagens foi realizada no microscópio de varredura JEOL (JSM-700 1F) e, para saber se a vermiculita expandida e a vermiculita expandida magnética estavam presentes nas amostras, foram realizadas análises por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), que proporciona informação sob a composição elementar correspondente ao material teste. Esta análise foi realizada após a obtenção das micrografias por meio do programa “Spectral Imaging System” (NNS 2.1).

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram avaliados por meio de estatística paramétrica ou não paramétrica, de acordo com a distribuição de normalidade utilizando o teste Kolmogorov Smirnov. Para os dados paramétricos foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste Tukey-Kramer e os dados não paramétricos foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis. O programa estatístico utilizado foi GraphPad InStat 3.02, cujo nível de significância foi estabelecido em 5%.

R

RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS TESTE

Os resultados da forma, estrutura, superfície e composição elementar da vermiculita expandida e da vermiculita expandida magnética obtidos por microscopia eletrônica de varredura estão representados nas Figuras 4, 5, 6 e 7.

Na Figura 4 observa-se que as amostras apresentaram tamanho variável entre 1 a 5 mm, constituídas de placas empilhadas dispostas de maneira irregular. A presença das nanopartículas na vermiculita expandida magnética foi constatada por meio da observação de aglomerados de nanopartículas de óxidos de ferro adsorvidos na vermiculita expandida, como observado na Figura 4d (seta) e por meio da identificação de ferro por EDS representado na Figura 6.

O EDS permitiu distinguir a presença e a proporção de cada elemento na vermiculita expandida (Figura 5), e na vermiculita expandida magnética (Figura 6), e possibilitou a obtenção do mapeamento dos elementos químicos na vermiculita expandida magnética (Figura 7). Na Figura 5 e 6 foram observados que os principais constituintes da vermiculita expandida e da vermiculita expandida magnética foram ferro, oxigênio, magnésio, alumínio, silício, cálcio, carbono, níquel, zinco e cobre, cuja principal diferença entre estas amostras foi o aumento da proporção de ferro presente na vermiculita expandida magnética. Na Figura 7 a intensidade da cor de cada elemento indicou sua presença e localização na amostra, notando-se que o ferro apresentou distribuição uniforme, sendo este elemento parte da composição química dos óxidos de ferro (nanopartículas).

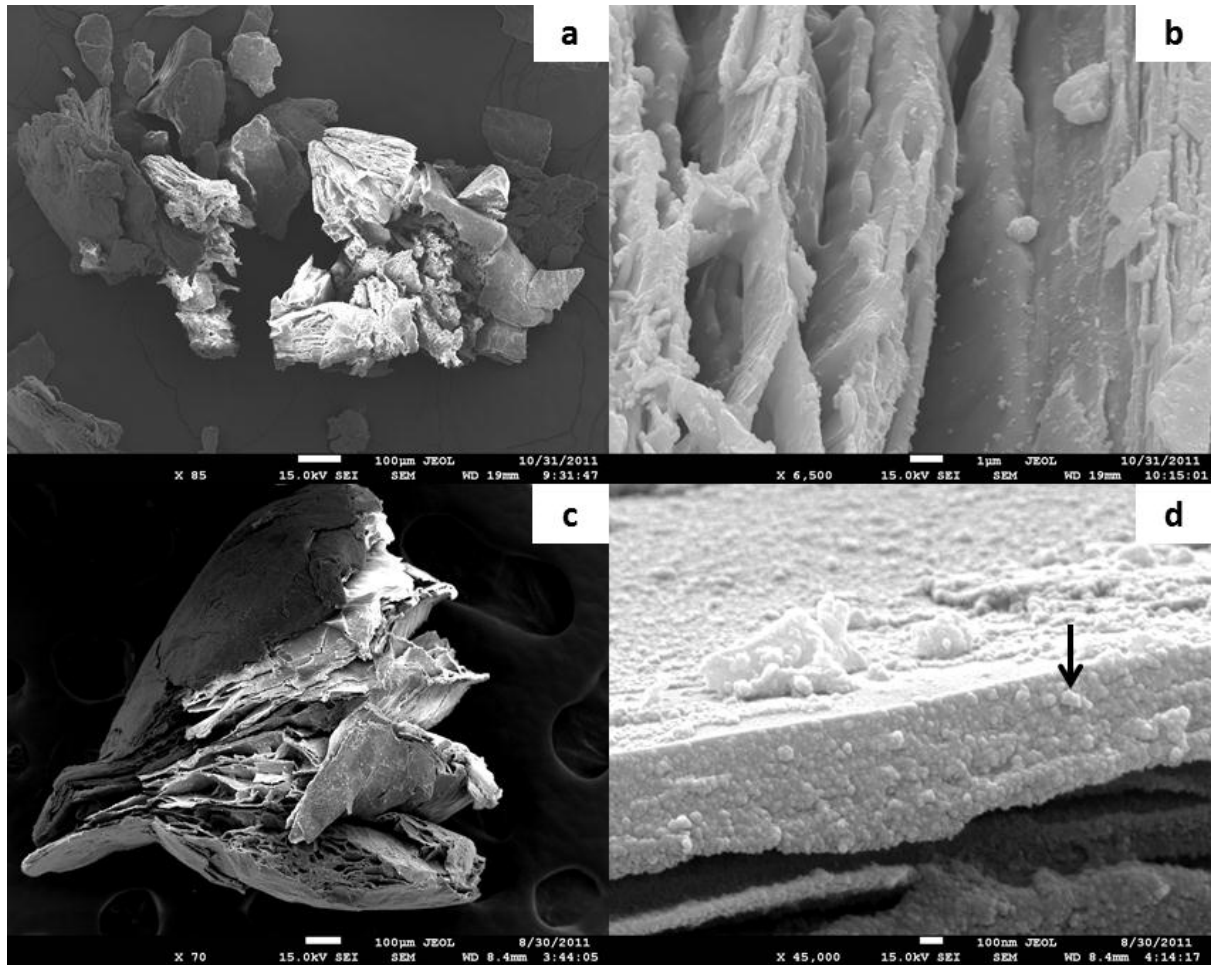


Figura 4. Micrografias de vermiculita expandida (a e b) e vermiculita expandida magnética (c e d) obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. As placas empilhadas e separadas por espaços foram observadas tanto na vermiculita expandida como na vermiculita expandida magnética. Na figura d a seta indica aglomerados de nanopartículas de óxidos ferro.

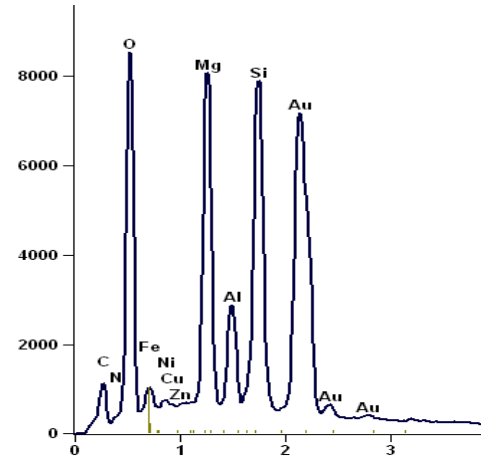
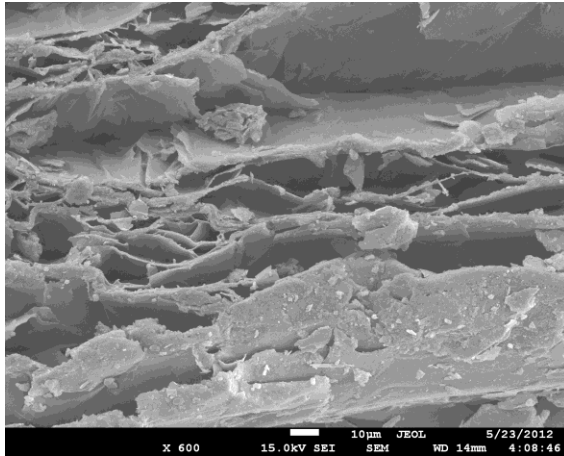


Figura 5. Espectro dos elementos presentes na vermiculita expandida obtidos por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X (EDS).

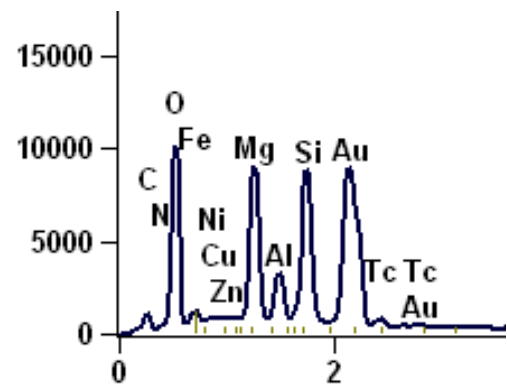
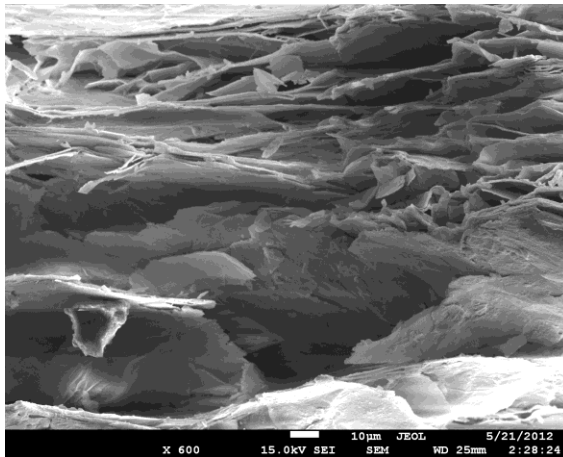


Figura 6. Espectro dos elementos presentes na vermiculita expandida magnética obtidos por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X (EDS).

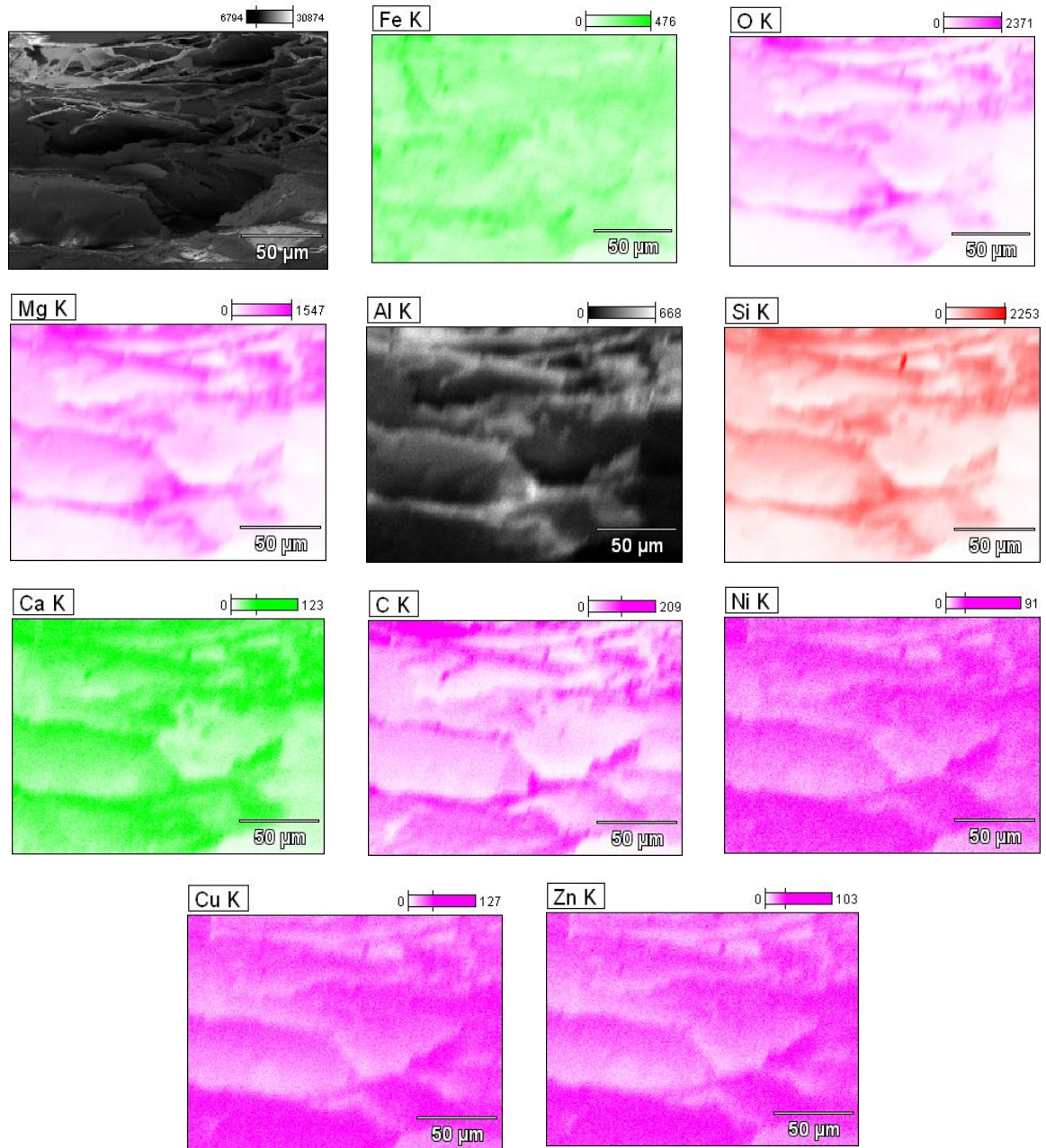


Figura 7. Mapeamento do ferro (Fe), oxigênio (O), magnésio (Mg), alumínio (Al), silício (Si), cálcio (Ca), carbono (C), níquel (Ni), cobre (Cu) e zinco (Zn) na vermiculita expandida magnética obtido por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X (EDS) em tempo prolongado (16h). A intensidade da cor de cada elemento indica sua presença e localização na amostra.

Na Figura 8 (a e b) estão representadas micrografias eletrônicas de transmissão da vermiculita expandida magnética, observa-se que nanopartículas magnéticas de ferro (seta) foram adsorvidas sobre a superfície da matriz de vermiculita expandida (asterisco). Na Figura 9 estão representadas as distribuições dos diâmetros de maghemitas (Fe_2O_3), magnetitas (Fe_3O_4) e/ou ferritas (MFe_2O_4), cujo diâmetro médio foi de $10,0 \pm 2,8$ nm em 697 nanopartículas magnéticas avaliadas.

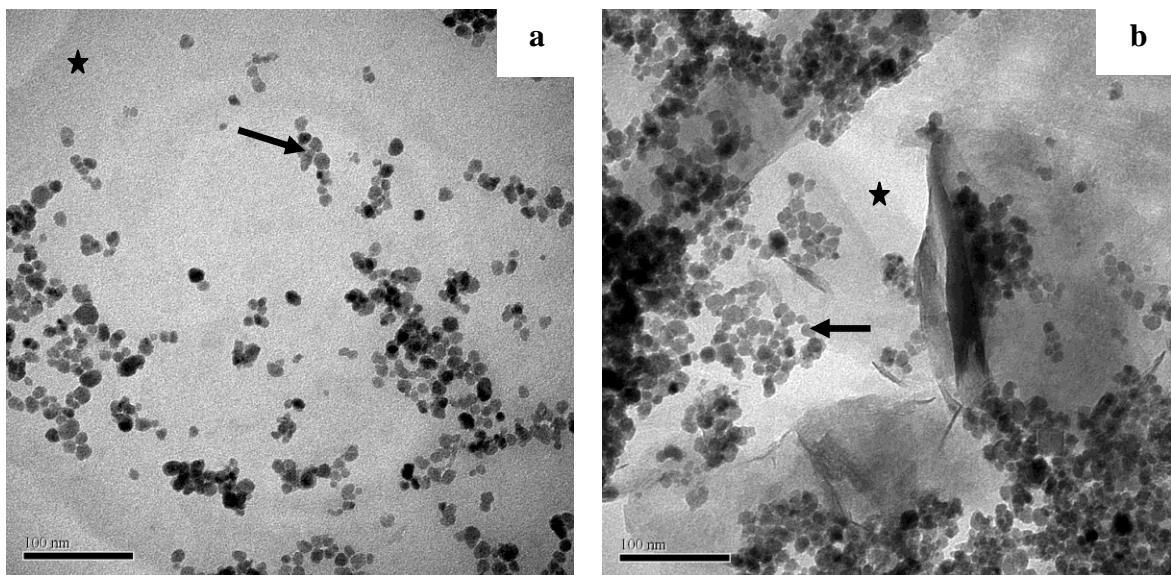


Figura 8. Micrografias eletrônicas de transmissão da vermiculita expandida magnética. As setas indicam às nanopartículas de óxidos de ferro e o asterisco a matriz da vermiculita expandida.

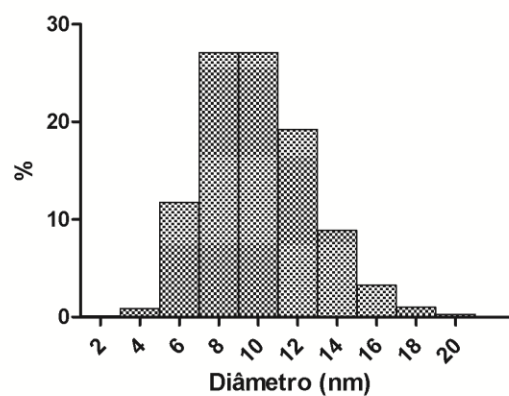


Figura 9. Histograma dos diâmetros das nanopartículas magnéticas presentes na vermiculita expandida magnética.

A curva de histerese magnética da vermiculita expandida magnética obtida à temperatura ambiente está apresentada na Figura 10. Observou-se ausência de campo coercitivo, indicando que as nanopartículas presentes na vermiculita expandida magnética são superparamagnéticas. A magnetização e saturação da vermiculita expandida magnética foram calculadas, obtendo-se o valor de 1,69 emu/g.

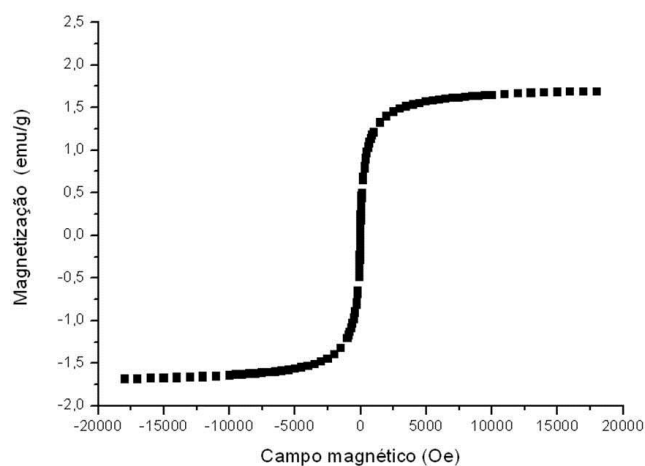


Figura 10. Curva de histerese magnética das nanopartículas de óxidos de ferro da vermiculita expandida magnética obtidas por saturação magnética.

Na figura 11 está representado o grau de agregação após 96 horas do adição das amostras da vermiculita expandida magnética em água após os procedimentos de agitação (A), sonicação (B) ou repouso (C), cujo grau de agregação entre os diferentes procedimentos relacionam-se com o potencial zeta e tamanho hidrodinâmico representados na Tabela 2.

O valor médio mais alto do potencial zeta foi o apresentado na amostra B ($-27,48 \pm 0,41$ mV), seguido pela amostra A ($-25,55 \pm 2,42$ mV) e amostra C ($-13,57 \pm 1,20$ mV). O valor médio do diâmetro hidrodinâmico maior foi apresentado na amostra C e o menor na amostra A. O pH se manteve perto de 7 (neutro) durante as 96 horas de experimento em todas as amostras.

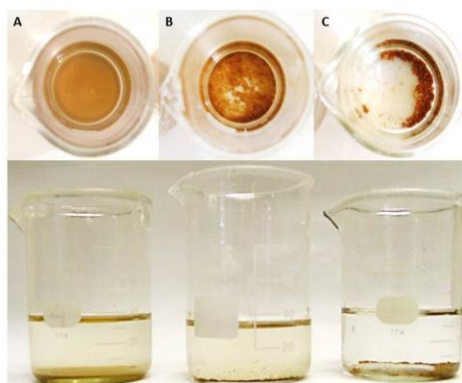


Figura 11. Amostras da vermiculita expandida magnética em meio aquoso após 96 horas. (A) Amostra agitada, (B) amostra sonicada, (C) amostra em repouso.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos das amostras de vermiculita expandida magnética em meio aquoso.

		TEMPO (horas)				MÉDIA ± EP	
		24	48	72	96		
AMOSTRA	A	POTENCIAL ZETA (mV)	-16.60	-26.20	-24.90	-27.20	-25.55±2.42
		D_H(nm)	120.50	141.60	130.10	133.40	131.75±4.36
		pH	6.60	6.70	6.70	6.80	6.70±0.04
		POTENCIAL ZETA (mV)	-28.50	-28.00	-26.80	-26.95	-27.48±0.41
		D_H(nm)	146.85	155.75	155.00	146.15	150.93±2.57
		pH	6.50	6.60	6.60	6.70	6.60±0.04
		POTENCIAL ZETA (mV)	-18.15	-13.00	-13.38	-13.75	-13.57±1.20
		D_H(nm)	126.00	282.60	634.30	584.90	433.75±121.71
		pH	6.6	6.6	6.5	6.7	6.60±0.04

(D_H) Diâmetro Hidrodinâmico, (A) Amostra agitada, (B) Amostra sonicada, (C) Amostra em repouso.

5.2. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

Na Tabela 3 estão representadas as médias dos parâmetros físico-químicos da água, nos tempos zero (anteriormente à exposição) e após 96 horas da exposição à vermiculita expandida magnética e à vermiculita expandida. Não foram observadas alterações estatisticamente significativas na concentração de nitrito (ppm), de amônia (ppm), da dureza, no pH, na condutividade ou na temperatura entre os subgrupos experimentais expostos à vermiculita expandida magnética (VEM₀, VEM₂₅, VEM₅₀, VEM₁₀₀, VEM₁₅₀, VEM₂₀₀) e entre os subgrupos expostos à vermiculita expandida (VE₀, VE₂₅, VE₅₀, VE₁₀₀, VE₁₅₀, VE₂₀₀). As variações nos níveis de nitritos e amônia observadas no tempo zero e após 96 horas da exposição à vermiculita expandida encontram-se na faixa de variação estabelecidas pela OECD (1992).

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água antes e após 96 horas da exposição à vermiculita expandida magnética e vermiculita expandida.

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS							
Grupo Experimental	Tempo	NITRITOS (ppm)	AMONIA (ppm)	DUREZA KH (ppm)	pH	COND. (μScm^{-1})	TEMP. (°C)
Vermiculita Expandida Magnética	0h	0	0	17.9	6.8	0.25	25
	96h	0	0	17.9	6.8	0.25	25
Vermiculita Expandida	0h	0	0	17.9	6.6	0.24	24
	96h	0.25	1	17.9	6.6	0.24	24

COND.: condutividade, DUREZA KH: dureza de carbonatos, TEMP: temperatura.

5.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

O peso médio dos peixes no tempo zero (anteriormente à exposição) foi de $0,771 \pm 0,169$ g, os quais foram distribuídos aleatoriamente entre os subgrupos experimentais tratados com vermiculita expandida ou vermiculita expandida magnética. Após 96 horas da exposição não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais [vermiculita expandida ($0,726 \pm 0,159$ g) e vermiculita expandida magnética ($0,752 \pm 0,120$ g)], assim como, entre os subgrupos de cada experimento em relação ao subgrupo controle.

Entre os subgrupos experimentais não foram observadas ocorrência de mortalidade, morbidade, alterações macroscópicas, alterações comportamentais e outras alterações clínicas. Exceto a ocorrência de uma morte na concentração de 150 mg/L de vermiculita expandida magnética (VEM₁₅₀) após 24 horas da exposição.

5.4. BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE

5.4.1. Teste do Cometa

As figuras 12a e 12b representam os tipos de danos encontrados nas células de peixes expostos a diferentes concentrações da vermiculita expandida magnética e da vermiculita expandida, após a realização do teste do cometa. Nesta figura, podemos ver células classificadas com dano tipo 0 e tipo 1 (Figura 12a) comumente encontrados nas concentrações mais baixas e no grupo controle. Na Figura 12b são observados os danos tipo 2, 3 e 4, os quais foram observados principalmente nos grupos de peixes expostos tanto à vermiculita expandida como à vermiculita expandida magnética.

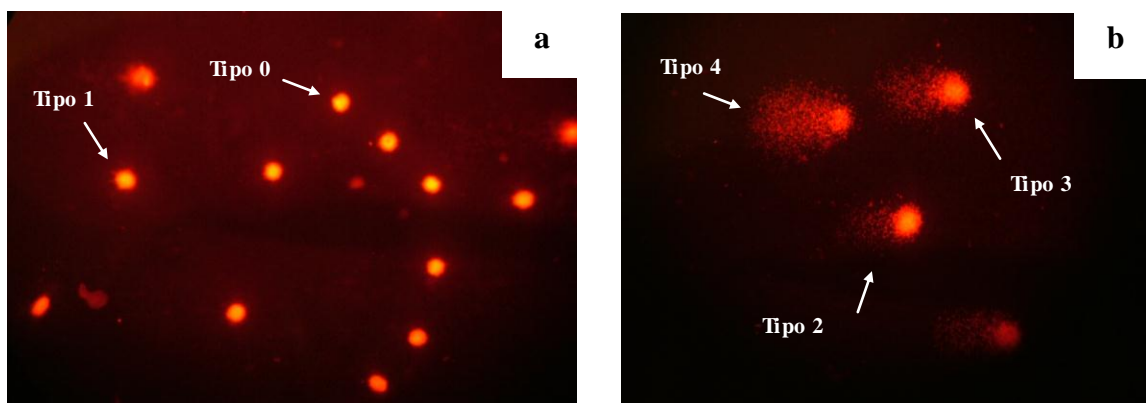


Figura 12. Microscopia de fluorescência de eritrócitos de *Danio rerio* com diferentes tipos de dano. (a) Células com dano tipo 0 e 1; (b) células com dano tipo 2, 3 e 4 (setas).

Nas figuras 13 e 14 estão representadas as incidências de danos no DNA após a exposição à vermiculita expandida magnética ou à vermiculita expandida, respectivamente. Como podemos observar na Figura 13 a exposição à vermiculita expandida magnética aumentou significativamente a incidência de dano total (DT) e de dano elevado (DE) em todos os subgrupos tratados (VEM₂₅, VEM₅₀, VEM₁₀₀, VEM₁₅₀ e VEM₂₀₀) quando comparados ao subgrupo controle (VEM₀). Na figura 14 observamos um aumento estatisticamente significativo de DT no grupo exposto a 200 mg/L (VE₂₀₀) de vermiculita expandida em relação ao subgrupo controle (VE₀). Entretanto, diferenças significativas não foram observadas entre os subgrupos de cada material-teste utilizados neste delineamento experimental, não estabelecendo uma relação concentração-resposta.

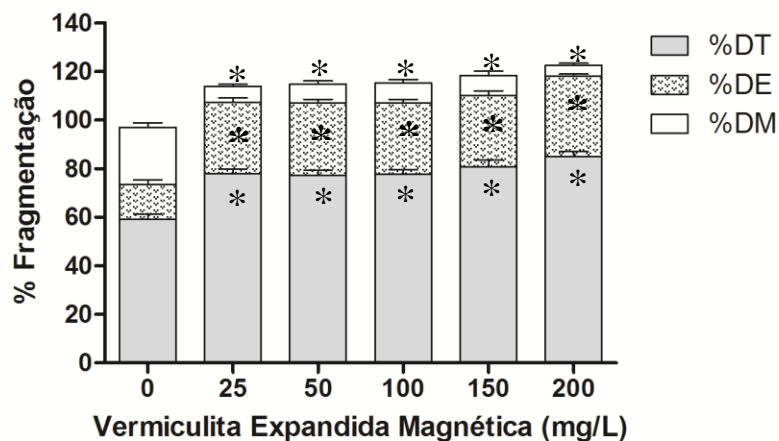


Figura 13. Porcentagens de dano total (DT), dano moderado (DM) e dano elevado (DE) após exposição a diferentes concentrações de vermiculita expandida magnética. Os dados representam a média da % \pm Erro Padrão, n=16/concentração. Diferenças significativas (ANOVA) foram observadas para todos os subgrupos expostos (VEM₂₅, VEM₅₀, VEM₁₀₀, VEM₁₅₀ e VEM₂₀₀) em relação ao subgrupo controle (VEM₀). $p \leq 0,001^*$

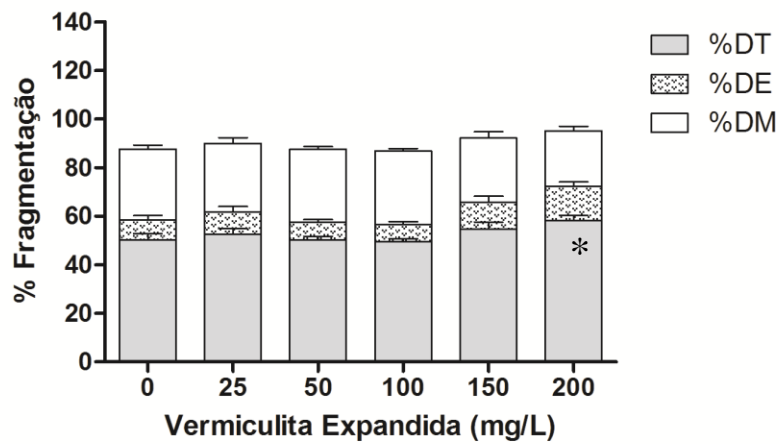


Figura 14. Porcentagens de dano total (DT), dano moderado (DM) e dano elevado (DE) após exposição a diferentes concentrações de vermiculita expandida. Os dados representam a média da % \pm Erro Padrão (n=16/grupo). Diferenças significativas (ANOVA) foram observadas para o subgrupo exposto a maior concentração (VE₂₀₀) em relação ao subgrupo controle (VE₀) para o DT. $p \leq 0,05^*$

5.4.2. Teste do Micronúcleo e Anormalidades Nucleares

A Figura 15 representa anormalidades nucleares e células com micronúcleos que foram observadas em eritrócitos de peixes dos subgrupos controle ou tratados. Entretanto, diferenças significativas não foram observadas após a exposição a vermiculita expandida magnética ou a vermiculita expandida, cujas médias estão representadas respectivamente nas Tabelas 4 e 5.

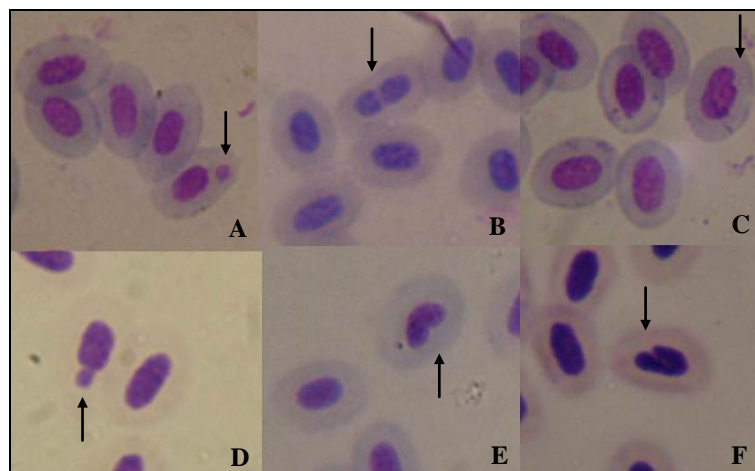


Figura 15. Fotografias de diferentes tipos de anormalidades nucleares em eritrócitos de *Danio rerio* de diferentes grupos experimentais. As setas indicam a presença de células micronucleadas (A), binucleadas (B), broto nuclear (D), células com núcleo "blebbed" (C), "lobed" (E) e "notched" (F).

Tabela 4. Micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de sangue periférico de *Danio rerio* exposto à vermiculita expandida magnética.

Subgrupos Experimentais Vermiculita Expandida Magnética						
	0 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L	200 mg/L
MN	0,13±0,50	0,19±0,40	0,25±0,58	0,38±0,81	0,47±1,06	0,06±0,25
BR	1,69±2,47	1,44±2,06	2,00±2,07	2,44±3,78	1,13±0,92	1,44±1,09
BN	0,13±0,34	0,81±1,38	0,94±1,73	0,19±0,40	0,67±1,35	0,13±0,34
BB	0,44±0,63	0,13±0,34	0,56±0,73	0,06±0,25	0,53±1,06	0,06±0,25
LB	0,63±0,96	0,94±1,24	0,38±0,62	0,25±0,58	0,40±0,83	0,31±0,48
NT	0,19±0,40	0,13±0,50	0,31±0,87	0,06±0,25	0,47±0,99	0,13±0,34

Células com micronúcleos (MN), células com broto (BR), células binucleadas (BN), células com núcleo “blebbed” (BB), células com núcleo “lobed” (LB) e células com núcleo “notched” (NT). Os dados representam a Média ± Desvio Padrão. Não foram observadas diferenças significativas (Kruskal-Wallis/ ANOVA). $p > 0,05$

Tabela 5. Micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de sangue periférico de *Danio rerio* exposto à vermiculita expandida.

Subgrupos Experimentais da Vermiculita Expandida						
	0 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L	200 mg/L
MN	0,19±0,54	0,13±0,34	0,13±0,34	0,25±0,58	0,13±0,50	0,25±0,58
BR	4,63±5,58	3,88±3,90	5,88±4,56	2,31±1,58	2,56±2,87	3,13±2,39
BN	0,44±0,89	0,94±0,77	1,00±1,10	0,63±1,02	0,13±0,34	0,63±0,72
BB	0,69±0,87	0,38±0,72	0,63±0,89	0,38±0,81	0,63±1,15	0,25±0,58
LB	1,06±1,39	1,06±1,77	0,81±0,98	1,19±1,64	1,00±1,21	0,88±0,81
NT	1,44±1,63	1,94±1,65	1,38±1,93	1,94±1,91	1,25±2,86	1,81±2,17

Células com micronúcleos (MN), células com broto (BR), células binucleadas (BN), células com núcleo “blebbed” (BB), células com núcleo “lobed” (LB) e células com núcleo “notched” (NT). Os dados representam a Média ± Desvio Padrão. Não foram observadas diferenças significativas (Kruskal-Wallis/ ANOVA). $p > 0,05$

5.5. BIOMARCADOR HISTOPATOLÓGICO

Na Figura 16 podemos observar a histologia normal das brânquias de peixes paulistinha, do subgrupo controle obtidos por microscopia óptica (Figura 16a) e microscopia eletrônica de varredura (Figura 16b-d). Na Figura 16a observamos um corte longitudinal de um filamento no qual estão dispostas perpendicularmente lamelas; onde observamos eritrócitos (Er), células pilares (CP) e células de cloreto (seta vermelha), entre outras estruturas identificadas nas brânquias.

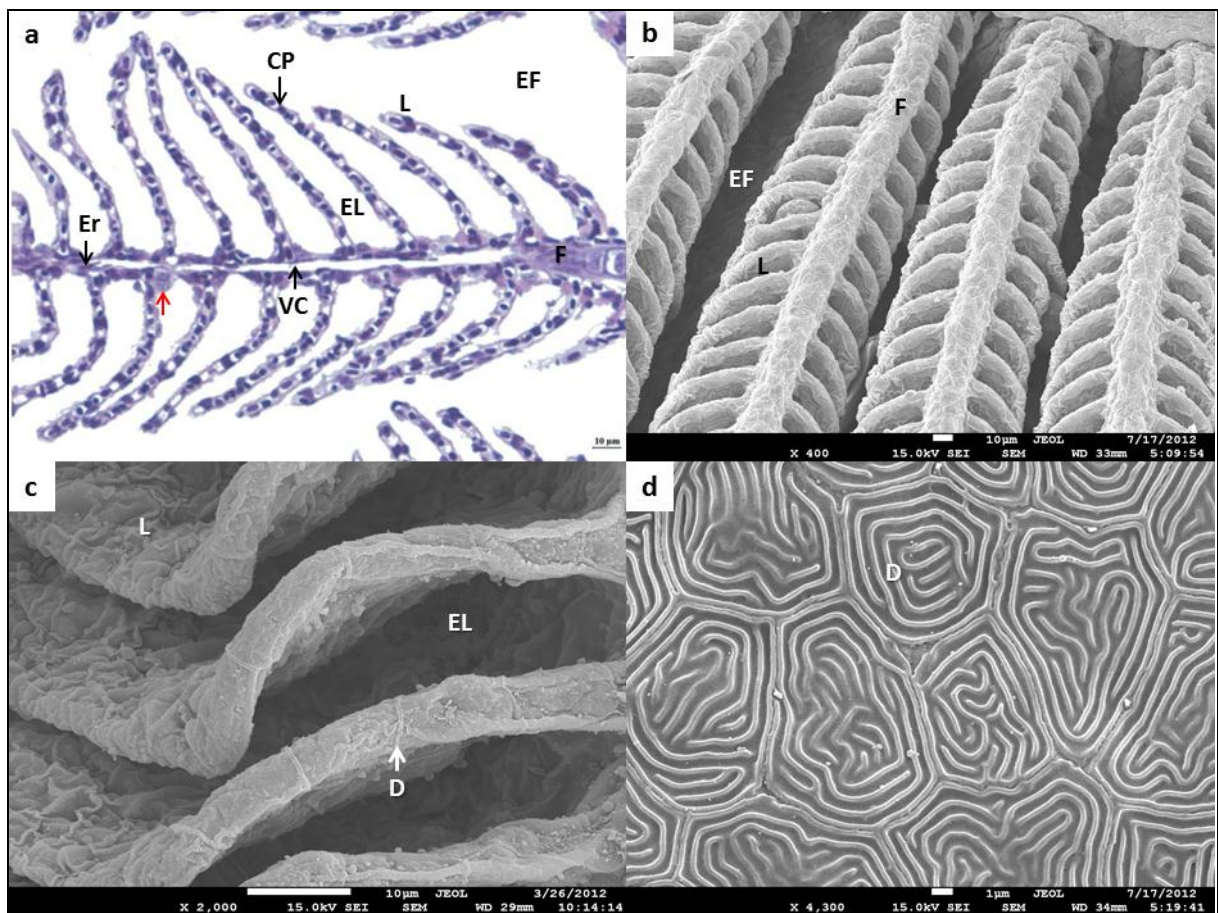


Figura 16. Fotografia e micrografias de brânquias de *Danio rerio* do subgrupo controle. (a) Corte longitudinal de brânquia onde observamos: lamela (L), filamento (F), espaço interlamelar (EL), espaço interfilamentar (EF), vaso sanguíneo central (VC), eritrócitos (Er), células pilares (CP), células de cloreto (seta vermelha), H-E. As figuras **b**, **c** e **d** são micrografias eletrônicas de varredura, nas quais observamos um arco branquial (**b**), lamelas (**c**) e digitais (D) do arco branquial (**d**).

Foram encontradas alterações (Figura 17) pertencentes ao estágio I (Tabela 1) como: descolamento do epitélio, hipertrofia de células epiteliais, hipertrofia de células de cloreto e hiperplasia das células da mucosa, correspondente a 50% dos organismos do subgrupo VE₀ e VEM₀, 25% do subgrupo VE₂₀₀ e 37,5% do subgrupo VEM₂₀₀.

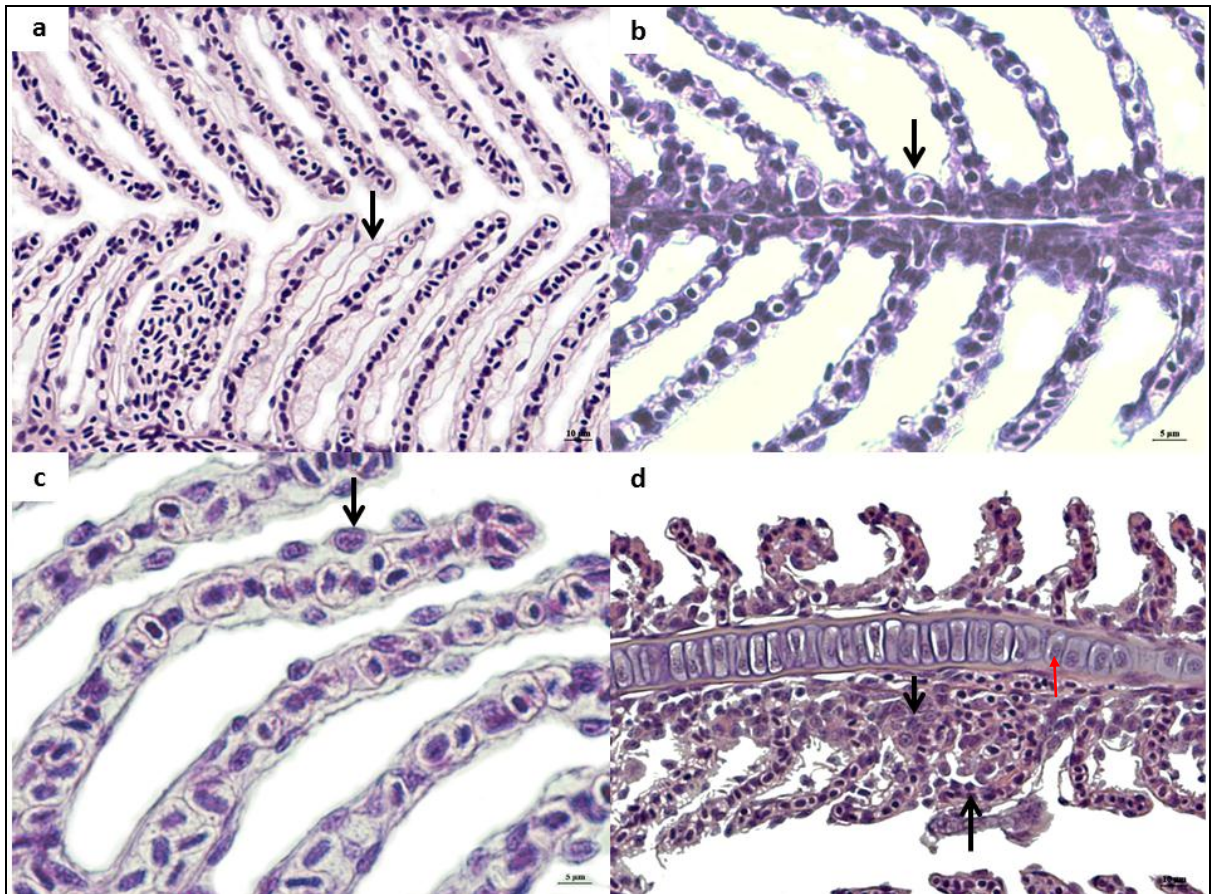


Figura 17. Fotografias de brânquias de *Danio rerio* de diferentes grupos experimentais. Alterações histopatológicas são representadas pelas setas nas figuras: (a) descolamento do epitélio lamelar, (b) hipertrofia de células de cloreto, (c) hipertrofia de células do epitélio lamelar, (d) hiperplasia das células mucosas e fusão lamelar. A seta vermelha indica a cartilagem presente no filamento (d). Coloração H-E.

Aneurismas (Figura 18a) foram observados em 12,5% e 37,5% dos peixes expostos à maior concentração de vermiculita expandida (VE₂₀₀) e vermiculita expandida magnética (VEM₂₀₀), respectivamente. A hiperplasia da cartilagem do filamento (Figura 18c) foi encontrada em 12,5% dos peixes expostos à vermiculita expandida (VE₂₀₀). O índice total de alterações (T_G) do subgrupo exposto à vermiculita expandida magnética (VEM₂₀₀) foi de 1,13±1,64, para vermiculita expandida (VE₂₀₀) foi de 1,00±2,14 e para o subgrupo controle foi de 0,69±0,87. Contudo, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as alterações e índices histológicos em relação ao subgrupo controle.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar e distinguir algumas das alterações identificadas pela microscopia óptica como a hiperplasia (da cartilagem ou das células mucosas), mostrada na Figura 19d, e aneurismas, como se observam na Figura 19b.

O fígado (Figura 19) e o intestino (Figura 20) dos peixes paulistinha tratados com a vermiculita expandida magnética e a vermiculita expandida não apresentaram alterações histológicas, portanto, não foi realizado o cálculo de T_G para esses órgãos. Apesar disso, em todas as concentrações testadas foi observada a presença da vermiculita expandida e da vermiculita expandida magnética no lúmen intestinal, no interior de enterócitos (Figura 20d) e células caliciformes (Figura 20c) indicando a absorção pelo órgão.

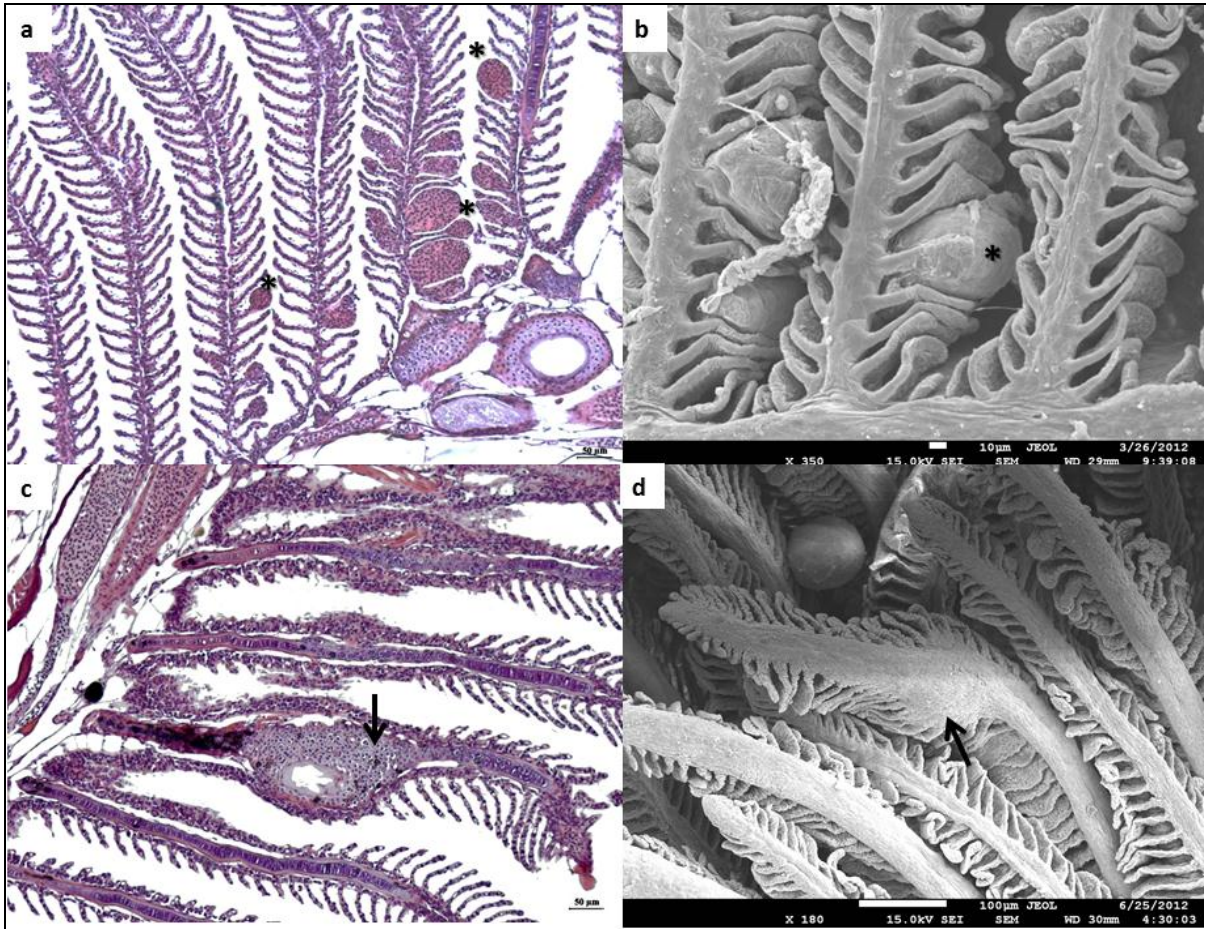


Figura 18. Alterações histológicas de brânquia de *Danio rerio* expostos a 200 mg/L de vermiculita expandida ou vermiculita expandida magnética. Nas figuras a e b os asteriscos indicam a presença de aneurismas. Na figura c a seta indica hiperplasia da cartilagem de um peixe tratado com vermiculita expandida. Na figura d a seta indica hiperplasia da cartilagem e/ou das células da mucosa. Coloração H-E (a e c), micrografias de Microscopia Eletrônica de Varredura (b e d).

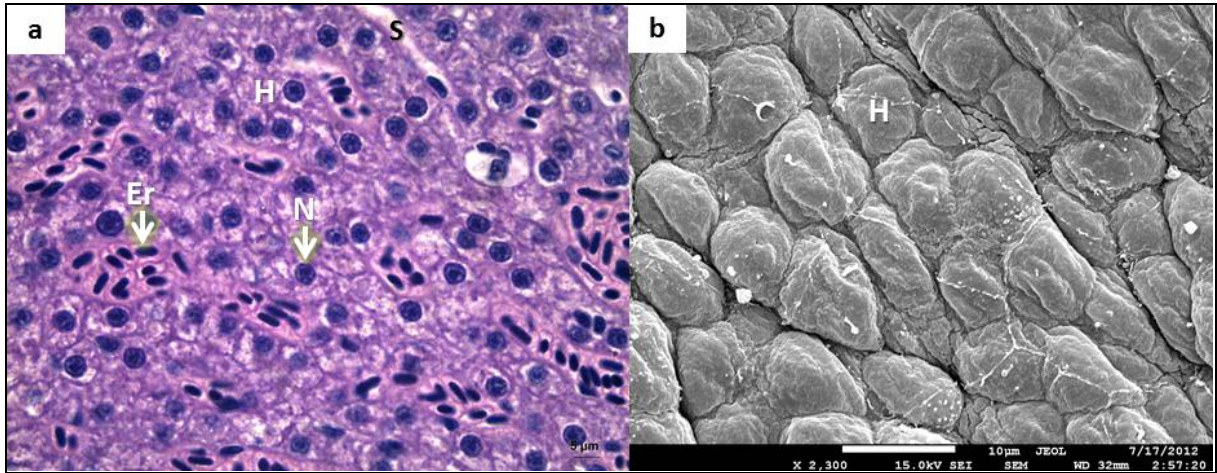


Figura 19. Fotografia e micrografia de fígado de *Danio rerio* de diferentes grupos experimentais. Na figura **a** observam-se hepatócitos (H), sinusóide (S), eritrócitos (Er) e núcleo (N) com nucléolo bem definido no centro. Coloração H-E (**a**) e micrografia eletrônica de varredura (**b**).

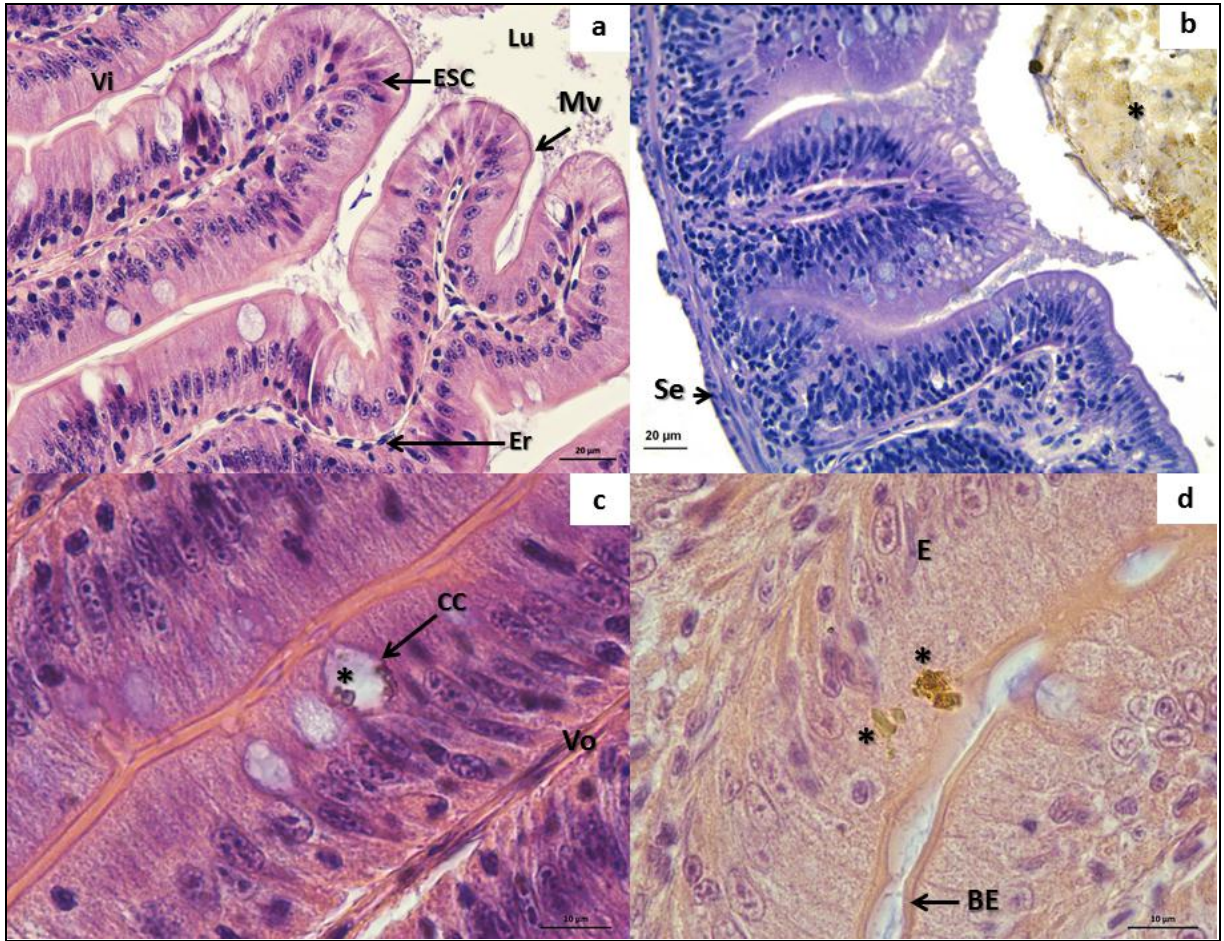


Figura 20. Fotografias de intestino de *Danio rerio* de diferentes grupos experimentais. Na figura **a** observam-se vilosidades (Vi), microvilosidades (Mv), epitélio colunar simples (ESC), eritrócitos (Er) e lúmen (L). Observam-se a camada serosa (Se) na figura **b**, células caliciformes (CC) e vilo (Vo) na figura **c**, enterócitos (E) e borda em escova (BE) na figura **d**. Asteriscos indicam os materiais teste. Coloração H-E.

6

D

ISCUSSÃO

Historicamente, a avaliação de impacto ambiental tem se concentrado nos efeitos de substâncias tóxicas emitidas por fontes pontuais sobre a saúde humana (KARR; CHU, 1997). Substâncias provenientes de efluentes industriais, processos de drenagem agrícola, derrames acidentais de lixos químicos e esgotos domésticos contribuem para a contaminação dos ecossistemas aquáticos (RASHED, 2001; CALLISTO; GONÇALVES; MORENO, 2005; ARIAS et al., 2007).

Na tentativa de tratar as águas muitos produtos estão sendo desenvolvidos, entre os quais a vermiculita expandida magnética, o qual é um material com a capacidade de absorver compostos orgânicos como petróleo, óleo diesel, gasolina (OLIVEIRA, 2008). A remoção destas substâncias que contaminam os ambientes aquáticos é facilitada, utilizando-se da ajuda de um ímã, pela presença das nanopartículas superparamagnéticas adsorvidas na vermiculita expandida, tal como descrito na patente PI0513014A (OLIVEIRA, 2008).

A caracterização físico-química dos nanomateriais é essencial na determinação das suas propriedades intrínsecas, o que é importante para elucidar a homogeneidade, estabilidade, reatividade, durabilidade biológica e potencial de aplicação destes em diferentes ambientes, assim como, seu potencial toxicológico (OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER, 2005; FISCHER; CHAN, 2007; KARLSSON et al., 2009; PERALTA-VIDEA et al., 2011).

Neste trabalho foi observado que o potencial zeta do compósito variou entre -13 e -28 mV (Tabela 2); esses valores não foram afetados pelo pH. O potencial zeta representa a diferença de potencial entre a superfície de uma partícula e seu meio circunvizinho (ANDRADE, 2008). É conhecido que as membranas celulares possuem grandes áreas de carga negativa o que pode influir nas interações eletrostáticas com os nanomateriais; portanto, as nanopartículas carregadas negativamente são repelidas e as carregadas positivamente são adsorvidas por apresentarem uma elevada afinidade por biomoléculas (PATIL et al., 2007).

Por esta razão, as nanopartículas de carga negativa são potencialmente menos tóxicas que as de carga positiva (QIU et al., 2010; YANG et al., 2012). Nesse contexto, estudos *in vitro* (células HeLa e A549) com nanopartículas de maghemita e nanopartículas de óxido de cério (WILHELM et al., 2003; PATIL et al., 2007), respectivamente; sugerem que as partículas carregadas negativamente se ligam aos sítios catiônicos, devido às suas interações repulsivas com as grandes domínios de carga negativa da superfície da célula, favorecendo sua absorção. Entretanto, estudos *in vivo* realizados em peixes da espécie *Oryzias latipes* expostos a nanopartículas de ouro, indicam que as nanopartículas carregadas positivamente são absorvidas em maior proporção do que as neutras ou com carga negativa (ZHU et al., 2010).

Alguns autores sugerem que características como o tamanho particular, a composição elementar, entre outras, podem influir no transporte e na rapidez da incorporação destes materiais em células, afetando a fisiologia dos organismos (KARLSSON et al., 2009; PERALTA-VIDEA et al., 2011). No entanto, a maneira pela qual estas características físico-químicas afetam a toxicidade de materiais em ecossistemas não está completamente estabelecida na literatura científica. Desta maneira, estudos de caracterização físico-química e toxicológica de materiais é um ponto chave a ser abordado em estudos nanotoxicológicos.

O principal objetivo dos estudos de toxicidade aguda em peixes adultos é o estabelecimento da concentração que produza 50% de mortalidade (CL_{50}) após exposição a 24, 48, 72 e/ou 96 horas (OECD, 1992). Neste estudo, houve ocorrência de mortalidade de um único espécime de peixe no subgrupo VEM_{150} , a qual foi atribuída a uma eventualidade não determinada, ou seja, provavelmente não correlacionada com a exposição. Desta forma, não foi possível estabelecer a curva concentração-resposta ou a CL_{50} . Ressalta-se que a maior concentração utilizada neste trabalho foi o dobro do que é recomendado pelos órgãos normativos (OECD, 1992) para substâncias químicas em geral, a qual corresponde a 100 mg/L. Outras ocorrências como morbidade, alterações macroscópicas externas, clínicas ou comportamentais também não foram observadas durante todo o período experimental. É importante referir que uma boa qualidade da água é essencial na condução dos estudos com peixes. A dureza, o pH, a condutividade e a temperatura, nos diferentes grupos experimentais desse trabalho, permaneceram nas faixas estabelecidas pela OECD 203 (1992). Os resultados dos critérios acima descritos indicam que os materiais-testes não influíram na qualidade da água.

Na realização de monitoramentos ambientais são utilizados biomarcadores que indicam em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, comportamentais ou energéticos a presença de substâncias contaminantes, a magnitude da resposta do organismo-alvo (LAM; GRAY, 2003),

e em alguns casos, o grau de contaminação (WALKER et al., 1996). Existem dois tipos principais de biomarcadores, os de exposição, que indicam a quantidade de determinado material incorporado no organismo, e os biomarcadores de efeito, que revelam a magnitude da resposta dos organismos expostos a poluentes (MOORE et al., 2004). Entre os biomarcadores de efeito estão a fragmentação do DNA (VIGANÒ et al., 2002; SINGH et al., 2009), que podem ser detectados por, entre outros métodos, pelo teste do cometa (BOETTCHER et al., 2010; VASQUEZ, 2010), o teste de micronúcleo (ALI; SEEHY, 2008; TSANGARIS et al., 2011), e as alterações histológicas (PACHECO; SANTOS, 2002; CÁCERES-VÉLEZ; TELLO; TORRES, 2010).

A combinação do teste de cometa com o ensaio do MN é apresentado por Vasquez (2010) como uma abordagem sensível para a detecção eficiente do efeito de múltiplas classes de compostos genotóxicos em diferentes órgãos-alvo. Villela e colaboradores (2006) relataram que existe alta correlação entre os resultados do teste do cometa e do MN em hemócitos de *Limnoperna fortunei* expostos a CuSO_4 . Semelhantemente, Mughal e colaboradores (2010), Boettcher e colaboradores (2010), encontraram resultados parecidos ao compararem os dois testes em sangue periférico de ratos, em ensaios *in vitro* (células hepáticas de truta arco íris (RTL-W1)) e *in vivo* em eritrócitos de *Barbus barbus*. Outras investigações, no entanto, demonstraram resultados negativos para o teste do cometa e positivos para o teste do MN, ou vice-versa (WANG et al., 2007). Portanto, fica claro que os efeitos da exposição detectados pelo teste do cometa e pelo ensaio de MN podem variar amplamente, dependendo do organismo bioindicador, tecido, material teste e das condições testadas (BOMBAIL et al., 2001; DIXON et al., 2002; KLOBUCAR et al., 2003).

No presente estudo os resultados obtidos no teste do MN não foram correspondentes aos resultados obtidos pelo teste do cometa, os quais podem estar relacionados as concentrações ou tempo de exposição utilizados, assim como à ausência de potencial citotóxico ou mutagênico relacionadas a esta exposição. O ensaio do cometa (realizado sob condições alcalinas) pode detectar sítios álcali-lábeis, danos de DNA como quebras de fita simples e dupla, que ainda podem ser reparados (SINGH et al., 1988; GIANNOTTI et al., 2002), enquanto que o teste de MN detecta danos cromossômicos fixos do tipo estrutural e/ou numérico (GOETHEM; LISON; KIRSCH-VOLDERS, 1997; KRISHNA; HAYASHI, 2000), efeitos aneugênicos e quebras de fita dupla de DNA irreparáveis (BOLOGNESI et al., 2004). Além disso, danos genéticos observados pelo teste do cometa, mas não detectados pelo ensaio de MN, podem ser decorrentes de eliminação seletiva de células micronucleadas da circulação

pelo baço (MUGHAL et al., 2010), ou podem ser devido a ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteína que inibem a migração do DNA (KLOBUCAR et al., 2003).

Neste trabalho, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no teste do cometa, mas não no teste de micronúcleos e anormalidades nucleares nos diferentes subgrupos expostos à vermiculita expandida magnética e à vermiculita expandida em relação aos subgrupos controle (VE₀, VEM₀, respectivamente). O fato de os dados do teste do cometa serem estatisticamente significativos indicam que as concentrações testadas causaram danos genotóxicos, mas não mutagênicos, e também que a fragmentação ocasionada, possivelmente corresponde à detecção de sítios álcali-lábeis e/ou quebras de fita simples de DNA, foi provavelmente corrigida pelo sistema de reparo.

A maior genotoxicidade causada pela vermiculita expandida magnética em comparação a vermiculita expandida pode ter sido causada pelos óxidos de ferro deste material, já que o ferro é um catalisador da formação de radicais livres (KAKHLON; CABANTCHIK, 2002). De fato, foi relatado em diferentes estudos que organismos expostos a altas concentrações de ferro sofrem danos em seu DNA, os quais são produzidos por radicais livres (FREITAS et al., 2002; KAKHLON; CABANTCHIK, 2002; LI et al., 2009; GHOSH; BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2010; SADIQ et al., 2012). Vale ressaltar que não foi possível determinar em nosso estudo se as nanopartículas associadas à vermiculita se dissociaram ou não do compósito, tendo uma ação como se fossem nanopartículas de ferro livres. Uma outra possibilidade é a dissociação do elemento ferro das nanopartículas, que também poderia ter ação isolada. Esta hipótese, também não pôde ser confirmada em nossos achados.

Além do estudo de genotoxicidade, foram realizadas análises histopatológicas de brânquias, fígado e intestino de animais expostos à vermiculita expandida ou à vermiculita expandida magnética. Todos os animais apresentaram partículas de vermiculita expandida e vermiculita expandida magnética no lúmen intestinal, no interior de enterócitos e em células caliciformes, indicando absorção pelo intestino. Porém, não foram encontradas alterações histológicas estatisticamente significativas nos animais expostos em relação aos indivíduos do grupo controle. Em um estudo realizado por Li e colaboradores (2009), foi observado que a exposição de *Oryzias latipes* a nanopartículas de ferro (0,5; 5,0 e 50 µg/mL) ocasionou alterações histopatológicas e morfológicas em brânquias e no intestino em todas as concentrações testadas. Também foi observado por esses pesquisadores a presença de nanopartículas no lúmen intestinal nas concentrações 5,0 e 50 µg/mL. No presente estudo, a associação das nanopartículas de ferro à vermiculita expandida provavelmente promoveu

redução do seu potencial tóxico, entretanto, não foi quantificada a dissociação de nanopartículas do nanocompósito na água na qual estariam expostos os organismos-teste.

O uso de diferentes biomarcadores constitui-se em uma ferramenta robusta, fornecendo resultados mais precisos para a avaliação de diferentes nanomateriais. Ao comparar os biomarcadores utilizados no presente estudo pode-se dizer que a fragmentação do DNA observada por meio do teste do cometa foi o biomarcador mais sensível. Entretanto, sugere-se a realização de outros estudos utilizando diferentes organismos-teste e outras condições experimentais para determinar o risco da utilização da vermiculita expandida e da vermiculita expandida magnética para descontaminação de ambientes aquáticos.

C ONCLUSÕES

A exposição à vermiculita expandida e à vermiculita expandida magnética nas concentrações testadas não estão correlacionadas com a ocorrência de alterações clínicas ou comportamentais, morbidade ou mortalidade, alterações histológicas ou formação de micronúcleos e anormalidades nucleares. A CL_{50} foi maior que a concentração máxima testada, indicando que a ocorrência de mortalidade está acima da concentração de 200 mg/L no período de exposição.

Entretanto, a vermiculita expandida promoveu efeito genotóxico na maior concentração testada. Esse efeito genotóxico foi observado em todos os subgrupos experimentais expostos à vermiculita expandida magnética, indicando que a presença de nanopartículas tem capacidade de influir na genotoxicidade ao promover fragmentação de DNA. Contudo, os benefícios ocasionados pela descontaminação aquática por meio da utilização dos materiais testados, se sobressaem aos riscos provocados pela exposição aos diferentes xenobióticos, como, metais tóxicos, compostos orgânicos aromáticos, pesticidas, herbicidas entre outros.

R

EFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas - Citações em documentos**, 2002.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation research**, v. 343, n. 2-3, p. 121-35, jun. 1995.

ALI, F. K.; SEEHY, M. A. Micronucleus test in fish genome : A sensitive monitor for aquatic pollution. **Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 5, p. 606-612, 2008.

ANDRADE, J. E. **Medidas de tamanho e potencial zeta de nanopartículas utilizando espalhamento de luz**. Universidade Federal do Sergipe, 2008.

ARIAS, A. R. L. et al. Use of bioindicators for assessing and monitoring pesticides contamination in streams and rivers. **Ciência & saúde coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10007: Amostragem de Resíduos - Procedimento**, 2004.

ATKINSON, G.R., ROSE, D., THOMAS, K., JONES, D., C.; E.J., GOING, J. E. Collection, analysis and characterization of vermiculita samples for fiber content and asbestos contamination. **Prepared for EPA office of pesticides and toxic substances, field studies branch by Midwest Research Institute**, 1982.

BARSIENE, J. et al. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic toxicology**, v. 78 Suppl 1, p. S99-104, 1 jun. 2006.

BAUN, A. et al. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 387-95, jul. 2008.

BEHRA, R.; KRUG, H. Nanoecotoxicology: nanoparticles at large. **Nature nanotechnology**, v. 3, n. 5, p. 253-4, maio. 2008.

BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25-34, jan. 1999.

BOETTCHER, M. et al. Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. **Mutation research**, v. 700, n. 1-2, p. 11-7, 19 jul. 2010.

BOLOGNESI, C. et al. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. **The Science of the total environment**, v. 333, n. 1-3, p. 127-36, 15 out. 2004.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205-13, jan. 2011.

BOMBAIL, V. et al. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 383-92, jul. 2001.

CALLISTO, M.; GONÇALVES, J. F.; MORENO, P. Invertebrados aquáticos como bioindicadores. In: **Navegando o rio das Velhas das Minas aos Gerais: Proj. Manuelzão**. Belo Horizonte, p. 555-567.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 327-336, set. 2007.

CARLOS, J. et al. Introdução às questões bioéticas suscitadas pela nanotecnologia. **Centro Universitário São Camilo**, v. 1, n. 1, p. 61-67, 2007.

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 Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, nov. 1990.

COLLINS, A. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-51, maio. 2008.

CÁCERES-VÉLEZ, P. R.; TELLO, A.; TORRES, A. Uso de biomarcadores genotóxicos e histopatológicos para evaluar el efecto de los metales en la tilapia (*Oreochromis niloticus*) presente en la laguna de sonso (Valle del Cauca). **Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas**, v. 22, p. 109-121, 2010.

DA SILVA, D. C. et al. Magnetic characterization of vermiculite-based magnetic nanocomposites. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, n. 44-49, p. 2574-2577, out. 2010.

DAUTREMEPUITS, C. et al. Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio L.*) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 68, n. 4, p. 325-38, 14 jul. 2004.

DIXON, D. R. et al. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. **Mutagenesis**, v. 17, n. 6, p. 495-507, nov. 2002.

DOMINGOS, R. F.; TUFENKJI, N.; WILKINSON, K. I. Aggregation of titanium dioxide nanoparticles: role of a fulvic acid. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 5, p. 1282-6, 1 mar. 2009.

DOMINGUES, I. et al. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 152, n. 3, p. 338-45, set. 2010.

ELAHEE, K. B.; BHAGWANT, S. Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 68, n. 3, p. 361-71, nov. 2007.

FAKO, V. E.; FURGESON, D. Y. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 6, p. 478-86, 21 jun. 2009.

FENECH, M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation research**, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 10 jan. 2003.

FENG, W.; WANG, B.; ZHAO, Y. Nanotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Vivo. In: SAHU, S. C. ; CASCIANO, D.. **Nanotoxicity: From In Vivo and In Vitro Models to Health Risks**, p. 247 – 269. 2009.

FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. W. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Current opinion in biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 565-71, dez. 2007.

FLORES-LOPES, F.; THOMAZ, A T. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 71, n. 1, p. 179-88, fev. 2011.

FRANÇA, S. C. A.; UGARTE, J. F. O. **Vermiculite utilization on the treatment of water contaminated with organic compounds**. Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral Ministério da Ciência e Tecnologia, 2005. p. 1-11.

FREITAS, M. L. L. et al. A double-coated magnetite-based magnetic fluid evaluation by cytometry and genetic tests. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, p. 396-398, nov. 2002.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation research**, v. 681, n. 1, p. 80-92, 2009.

FRÄNZLE, O. Bioindicators and environmental stress assessment. In: MARKERT, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G.. **Bioindicators and biomonitors**, p. 41-84. 2003.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. **Chemosphere**, v. 81, n. 10, p. 1253-62, nov. 2010.

GIANNOTTI, E. et al. A comparison of the in vitro Comet assay with the in vitro chromosome aberration assay using whole human blood or Chinese hamster lung cells: validation study using a range of novel pharmaceuticals. **Mutagenesis**, v. 17, n. 2, p. 163-70, mar. 2002.

GOULART, M. D. C.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, 2003.

GOVINDASAMY, R.; RAHUMAN, A. A. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 6, p. 1091-1098, jun. 2012.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 235-239, mar. 2000.

HEDDLE, J. A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation research**, v. 123, n. 1, p. 61-118, set. 1983.

JALOSZYNSKI, P. et al. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 385, n. 3, p. 223-233, dez. 1997.

KAKHLON, O.; CABANTCHIK, Z. LOA. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. This article is part of a series of reviews on "Iron and Cellular Redox Status." The full list of papers may be found on the homepage of the journal. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 8, p. 1037-1046, out. 2002.

KAKKAR, P.; JAFFERY, F. N. Biological markers for metal toxicity. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 19, n. 2, p. 335-49, fev. 2005.

KARLSSON, H. L. et al. Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. **Toxicology letters**, v. 188, n. 2, p. 112-8, 24 jul. 2009.

KEHAL, M.; REINERT, L.; DUCLAUX, L. Characterization and boron adsorption capacity of vermiculite modified by thermal shock or H₂O₂ reaction and/or sonication. **Applied Clay Science**, v. 48, n. 4, p. 561-568, maio. 2010.

KELLER, E. T.; MURTHA, J. M. The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology**, v. 138, n. 3, p. 335-41, jul. 2004.

KIM, J.; VAN DER BRUGGEN, B. The use of nanoparticles in polymeric and ceramic membrane structures: review of manufacturing procedures and performance improvement for water treatment. **Environmental pollution**, v. 158, n. 7, p. 2335-49, jul. 2010.

KLOBUCAR, G. I. V et al. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic toxicology**, v. 64, n. 1, p. 15-23, 19 jun. 2003.

KNIE, J.; LOPES, E. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA, p. 289. 2004.

KNOBEL, M. Partículas finas: superparamagnetismo e Magnetoresistência gigante. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, 2000.

KOSMEHL, T. et al. DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. **Mutation research**, v. 650, n. 1, p. 1-14, 31 jan. 2008.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation research**, v. 455, n. 1-2, p. 155-66, 20 nov. 2000.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine pollution bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182-6, fev. 2003.

LAMMER, E. et al. Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 23, n. 7, p. 1436-42, out. 2009.

LI, H. et al. Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 3, p. 684-92, mar. 2009.

MONROY, C. M.; CORTÉS, A. C.; SICARD, D. M. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. **Biomédica**. v. 25, p. 335-45. 2005.

MOORE, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment international**, v. 32, n. 8, p. 967-76, dez. 2006.

MOOREA, M. N. et al. Exposure pathway evaluations for sites that processed asbestos-contaminated vermiculite. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 208, n. 1-2, p. 55-65, 8 abr. 2005.

MORAIS, P. C. et al. Synthesis and characterization of size-controlled cobalt-ferrite-based ionic ferrofluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 225, n. 1-2, p. 37-40, 2001.

MUGHAL, A et al. Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. **Mutation research**, v. 700, n. 1-2, p. 86-94, 19 jul. 2010.

MYSORE, D.; VIRARAGHAVAN, T.; JIN, Y.-C. Treatment of oily waters using vermiculite. **Water research**, v. 39, n. 12, p. 2643-53, jul. 2005.

NERO, V. et al. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 63, n. 3, p. 365-377, 2006.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental health perspectives**, v. 113, n. 7, p. 823-39, jul. 2005.

OECD. Guideline for testing of chemicals. **Water**, n. 17, July, p. 1-9, 1992.

OLIVEIRA, E. C. DE. **Processo de obtenção de vermiculita expandida magnética com aplicações em remoção de agentes poluentes**. PI0513014-0A, 31 ago. 2005, 08 abr. 2008.

OLIVEIRA, R. et al. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. **Environmental science and pollution research international**, v. 16, n. 6, p. 679-88, set. 2009.

PACI, P. **Caracterização magnética de nanocomposito a base de vermiculita**. 2009. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

PATIL, S. et al. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4600-7, nov. 2007.

PERALTA-VIDEA, J. R. et al. Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008-2010. **Journal of hazardous materials**, v. 186, n. 1, p. 1-15, 15 fev. 2011.

PINTO, R.; NETO, C. **Utilização de vermiculita em sistema dessalinizador com colunas percoladas**. [S.l: s.n.], p. 1-7. 2007.

POOMAN, K; FARHAT, N. J. Biological markers for metal toxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 335-349, 2004.

POTTER, M. J. Vermiculite. **U.S. Geological Survey Minerals Yearbook**, p. 1-5, 2001.

PRADEEP, T. Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review. **Thin Solid Films**, v. 517, n. 24, p. 6441-6478, out. 2009.

QIU, Y. et al. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. **Biomaterials**, v. 31, n. 30, p. 7606-19, out. 2010.

RABITTO, I. S. et al. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 60, n. 2, p. 147-56, fev. 2005.

RALDÚA, D. et al. Mercury levels and liver pathology in feral fish living in the vicinity of a mercury cell chlor-alkali factory. **Chemosphere**, v. 66, n. 7, p. 1217-25, jan. 2007.

RASHED, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment international**, v. 27, n. 1, p. 27-33, jul. 2001.

RECILLAS, S. et al. Use of CeO₂, TiO₂ and Fe₃O₄ nanoparticles for the removal of lead from water. **Desalination**, v. 277, n. 1-3, p. 213-220, ago. 2011.

SADIQ, R. et al. Genotoxicity of TiO₂ anatase nanoparticles in B6C3F1 male mice evaluated using Pig-a and flow cytometric micronucleus assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 745, n. 1-2, p. 65-72, jun. 2012.

SHEN, Y. F. et al. Preparation and application of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles for wastewater purification. **Separation and Purification Technology**, v. 68, n. 3, p. 312-319, 25 ago. 2009.

SIMÓN-VÁZQUEZ, R. et al. Nanotoxicology. In: FUENTE, J.; GRAZU, V. **Frontiers of Nanoscience**. v. 4p. 443-485. 2012.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, mar. 1988.

SINGH, N. et al. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 23-24, p. 3891-914, ago. 2009.

SOMASUNDARAN, P., MEHTA, S.C., RHEIN, L., C. S. Nanotechnology and related safety issues for delivery of active ingredients in cosmetics. **MRS Bulletin**, v. 32, p. 779-786, 2007.

TEH, S. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 51-70, jan. 1997.

TORRES DE LEMOS, C. et al. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 66, n. 3, p. 391-401, mar. 2007.

TSANGARIS, C. et al. Genotoxicity and oxidative stress biomarkers in *Carassius gibelio* as endpoints for toxicity testing of Ukrainian polluted river waters. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 8, p. 2240-4, nov. 2011.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Nanotechnology White Paper**. Washington. 2007.

UGARTE, J. F.; CRISTINA, S.; FRANÇA, A. Rochas e Minerais Industriais: Usos e Especificações. In: **Rochas Minerais Industriais: Usos e Especificações**. Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral Ministério da Ciência e Tecnologia, 2008. p. 865-887.

UGARTE, J. F.; MONTE, M. B. **Estudo da vermiculita como adsorvente de óleo e cobre em solução**. Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral Ministério da Ciência e Tecnologia, 2005. p. 1-3.

UGARTE, J. F.; MONTE, M. B. **Estudo da vermiculita como adsorvente de óleo e metal pesado**. Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006. p. 9-35.

ULLMANN, J. F. P. et al. A three-dimensional digital atlas of the zebrafish brain. **NeuroImage**, v. 51, n. 1, p. 76-82, 2010.

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, n. 2, p. 57-149, mar. 2003.

VAN GOETHEM, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutation research**, v. 392, n. 1-2, p. 31-43, 1 ago. 1997.

VASQUEZ, M. Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis**, v. 25, n. 2, p. 187-99, mar. 2010.

VIGANÒ, L. et al. Mutagenicity of sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas. **Mutation research**, v. 515, n. 1-2, p. 125-34, 25 mar. 2002.

VILLELA, I. V. et al. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation research**, v. 605, n. 1-2, p. 78-86, 16 jun. 2006.

WALKER, C. H. et al. **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor and Francis, 1996.

WALKER CH, HOPKIN SP, SIBLY RM, P. D. **Principles of Ecotoxicology**. 2nd Editio ed. London: Taylor and Francis, 2001.

WANG, J. J.; WANG, H.; SANDERSON, B. J. S. Ultrafine quartz-induced damage in human lymphoblastoid cells in vitro using three genetic damage end-points. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 17, n. 4, p. 223-32, jan. 2007.

WILHELM, C. et al. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. **Biomaterials**, v. 24, n. 6, p. 1001-11, mar. 2003.

YANG, H. et al. Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy. **Scientific reports**, v. 2, p. 847, jan. 2012.

YOON, H.-S. et al. Strategies for Risk Assessment of Nanomaterials. **Nanotoxicity**, 2009.

YU, L. et al. Cognitive aging in zebrafish. **PLoS one**, v. 1, n. 1, p. e14, jan. 2006.

ZHANG, X. et al. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. **Chemosphere**, v. 67, n. 1, p. 160-6, fev. 2007.

ZHU, Z.-J. et al. Surface properties dictate uptake, distribution, excretion, and toxicity of nanoparticles in fish. **Small**, v. 6, n. 20, p. 2261-5, 18 out. 2010.

ZUNAN, Q.; YI, Z.; YUQIAO, F. Removal of oil from concentrated wastewater by attapulgite and coagulant. **Environmental water chemistry**, p. 89-99, 1995.

9

A

PÊNDICES

APÊNDICE A – Protocolo do Teste do Cometa

- As lâminas usadas foram limpas e mergulhadas em agarose normal 1,5% (Pronadisa) até a metade da parte fosca, posteriormente foram secas a temperatura ambiente e guardadas na geladeira (4°C);
- 120 µL de agarose “low melting point agarose” (LMP) 7% (UltraPURE™) previamente fundida e mantida em banho-maria a 37°C foi rapidamente misturada com 40 µL da mistura (PBS-sangue) até homogeneizar;
- Pingou-se a mistura (sangue + agarose LMP) em diferentes pontos da lâmina previamente preparada (forrada) com a agarose normal a 1,5%;
- Foram colocadas sobre as lâminas uma lamínula grande (24 x 60 mm) tomando-se o cuidado de soltá-la lentamente sobre as lâminas;
- As lâminas deixaram-se na geladeira por 10 minutos (sempre no escuro) até solidificar para facilitar a retirada da lamínula;
- Posteriormente foram mergulhadas por duas horas na solução de lise uso (Triton X de Merck, DMSO de Macron™, e lise estoque, pH=10) e foram mantidas a 4°C na geladeira (abrigada da luz);
- Foram retiradas as lâminas da solução de lise e colocadas na cuba de eletroforese, padronizando a posição para que os cometas corram sempre para o mesmo lado;
- Foi preenchida a cuba com a solução de eletroforese (EDTA 0,2M de Vetec, NaOH 10M de Vetec, pH=13) até cobrir as lâminas;
- As lâminas descansaram na cuba (dentro da geladeira) por 20 minutos;
- A fonte de eletroforese foi regulada para 25 Volts – 300 mA (com tampão, se necessário) para realizar a eletroforese (20 minutos);

- Seguidamente foram retiradas as lâminas cuidadosamente e mergulhadas em solução tampão de neutralização (Tris de Vetec-Sigma, pH=7,5) por 5 minutos na solução, 5 minutos descansando fora da solução (3 vezes);
- As lâminas foram colocadas para secar a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora;
- Posteriormente as lâminas foram fixadas com etanol 100% por 5 minutos, deixaram-se secar em temperatura ambiente e depois foram guardadas na geladeira (4°C).
- Antes de analisar as amostras foi realizado um cego escrevendo códigos nas lâminas de modo que, quando for executada a análise não for conhecida a origem das amostras.

APÊNDICE B – Protocolo para Microscopia de Luz

- De cada peixe foram retirados os órgãos de interesse o mais rápido possível para ser fixadas utilizando o fixador Davidson (glicerina de Cromoline®, formaldeído 100%, etanol 100%, ácido acético glacial de Vetec-Sigma e água destilada) durante 12 horas na geladeira;
- Após 12 horas o fixador Davidson foi substituído por álcool 70%;
- As amostras foram colocadas em cassetes previamente etiquetados para seu posterior processamento no histotécnico (ONA DM-40);
- Seguidamente foi realizada a inclusão das amostras em parafina (Sigma) cada uma com sua respectiva etiqueta;
- As amostras emblocadas foram piramidadas antes de ser cortadas em espessuras de 5 μm no micrótomo (LEICA RM2235). Os cortes obtidos foram colocados em lâminas de vidro;
- As lâminas com os cortes foram colocadas dentro de cubas que continham xilol (Vetec), em seguida, foram realizadas reidratações utilizando concentrações descendentes de álcoois (100, 90, 80 e 70%) com um minuto de duração cada;
- Seguidamente as lâminas foram colocadas dentro da Hematoxilina de Harris durante 1 minuto e realizaram-se três lavados com água da torneira para retirar o excesso de corante;
- Depois, as lâminas foram mergulhadas em Eosina durante 2 minutos e realizaram-se três lavados com água da torneira para retirar o excesso de corante;
- Posteriormente foi realizada a desidratação das amostras usando concentrações ascendentes de álcoois (70, 80, 90 e 100%) e xilol durante um minuto cada;
- Finalmente em cada lâmina foi fixada uma lamínula utilizando verniz para sua posterior observação e análise no microscópio de luz (ZEISS Axioskop 2 - HAL 100) que tem acoplado um sistema de captura de imagens.

APÊNDICE C – Protocolo para Microscopia Eletrônica de Varredura

- Uma pequena amostra das brânquias, fígado e intestino (3 indivíduos por grupo) foram fixadas usando o fixador Karnovsky (2% paraformaldeído, 2% glutaraldeído, 3% sacarose, 5mM cloreto de cálcio em tampão CaCO_3 0,1 M; pH 7,4) durante 5 horas;
- Posteriormente, o fixador foi substituído por tampão CaCO_3 de Electron Microscopy Sciences (0,1 M; pH 7,4);
- Sucessivamente o material foi pós- fixado com Tetróxido de Ósmio (4%) durante 1 hora;
- Imediatamente foram realizadas desidratações utilizando acetona (Vetec) em concentrações ascendentes (30, 50, 70, 90 e 100 %);
- Adicionalmente, foram realizadas desidratações com o secador ao ponto crítico de CO_2 (Balzers CPD 030);
- As amostras foram dispostas sobre os suportes (stubs) previamente identificados e na sequência, a metalização foi realizada no equipamento Balzers (SCD 050);
- Posteriormente foi feita a observação, a análise e a captura de imagens no microscópio de varredura JEOL (JSM-700 1F).

ANEXOS

ANEXO A – PATENTE (PI0513014-0A)



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0513014-0 A**

(22) Data de Depósito: 31/08/2005
(43) Data de Publicação: **08/04/2008**
(RPI 1944)



(51) Int. Cl.:
B03C 1/00 (2008.04)

(54) Título: **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VERMICULITA EXPANDIDA MAGNÉTICA COM APLICAÇÕES EM REMOÇÃO DE AGENTES POLUENTES**

(71) Depositante(s): Emilia Celma de Oliveira Lima (BR/GO)

(72) Inventor(es): Emilia Celma de Oliveira Lima

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VERMICULITA EXPANDIDA MAGNÉTICA COM APLICAÇÕES EM REMOÇÃO DE AGENTES POLUENTES A presente invenção possibilita produzir vermiculitas expandidas magnéticas hidrofílicas ou hidrofóbicas, com características absorvedoras de líquidos, que permitam a recuperação, por separação magnética, de substâncias nocivas ao meio ambiente, como metais tóxicos, compostos orgânicos aromáticos, pesticidas e herbicidas, óleos ou graxas, dispersos em ambientes aquáticos. O processo descrito produz vermiculitas expandidas magnéticas, hidrofílicas ou hidrofóbicas, nas quais o componente magnético pode ser constituído de metais ou ligas metálicas magnéticos ou óxidos magnéticos tais como magnetita (Fe_3O_4), maghemita (Fe_2O_3), e ferritas Mfe_2O_4 ($M = Mn, Co, Ni, Ba$ etc), incorporadas na matriz vermiculita através de métodos de adsorção das nanopartículas provenientes de fluidos magnéticos.

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VERMICULITA EXPANDIDA MAGNÉTICA COM APLICAÇÕES EM REMOÇÃO DE AGENTES POLUENTES

Introdução

5 A presente invenção possibilita produzir vermiculitas expandidas magnéticas hidrofílicas ou hidrofóbicas, com características absorvedoras de líquidos, que permitam a recuperação, por separação magnética, de substâncias nocivas ao meio ambiente, como metais tóxicos, compostos orgânicos aromáticos, pesticidas e herbicidas, óleos ou graxas, dispersos em
10 ambientes aquáticos.

Estado da Técnica

Vermiculita é um mineral da família das argilas micáceas, com vastas aplicações na construção civil, indústria de manufaturados, agricultura, horticultura e meio ambiente.

15 Mais especificamente, o mineral vermiculita expandida têm sido destinado a aplicações variadas, tais como: isolante térmico e absorção acústica; construção de concreto leve; construção de painéis e divisórias; construção de portais à prova de fogo; agricultura hidropônica; condicionador de solos; e absorvedores de ions metálicos, compostos orgânicos, solventes orgânicos,
20 óleos e graxas.

A vermiculita expandida é obtida através do aquecimento brusco do mineral vermiculita até 1000 °C, provocando a evaporação rápida da água contida em sua estrutura, esfoliando as lâminas e expandindo o volume do mineral vermiculita em até 20 vezes. Os espaços vazios originados desta expansão
25 são preenchidos com ar, o que confere a vermiculita expandida as suas propriedades resultantes.

Pode-se obter vermiculita expandida hidrofobizada a partir de um processo aperfeiçoado de hidrofobização de vermiculita expandida (P19004025, de 08/08/1990; Martins), utilizando reagentes orgânicos derivados de silício, tais
30 como etilsilicato, organohalogênicos, siloxanos e siliconas, que ao entrarem em contato com a vermiculita expandida, durante o seu resfriamento, logo

2/6

após a expansão a uma temperatura que varia de 80 °C a 400 °C, a transforma em material hidrofóbico, ou seja hidrorrepelente.

O reagente orgânico reage fortemente com a superfície da vermiculita expandida, tornando-a apta a absorver com mais eficácia, líquidos orgânicos como óleos e petróleo e seus derivados, de águas industriais ou de quaisquer tipo de águas contaminadas com estes líquidos imiscíveis em água.

Para a aplicação em despoluição ambiental existem referências em bancos de dados que descrevem nanocompósitos magnéticos à base de:

- 10 i) nanocompósitos hidrofóbicos de poliestireno-divinilbenzenos preparados pela síntese *in situ* de nanopartículas magnéticas (PI0300855-0, de 7 de abril de 2003; Lima, *et al.*);
- 15 ii) compósitos que são obtidos pela mistura das partículas magnéticas (previamente preparadas) aos monômeros, que são polimerizados em seguida para a obtenção de uma espuma magnética a base de poliuretana, felizol e poliestireno expandido (WO9817387, "New magnetic, porous and oleophilic copolymer used for oil spill and oil recovery from the sea and the environment"; Nicolaidis);
- 20 iii) espumas inorgânicas à base de silicatos minerais nas quais as partículas magnéticas são incorporadas na espuma através da mistura mecânica do material magnético com o mineral, seguido de tratamento térmico a 1000 °C para a obtenção da espuma magnética (WO0206419, "Porous and magnetic, inorganic-based composite material used as sorbent for cleaning water and the environment from oil spill"; Christodoulou);
- 25 iv) agregados de partículas poliméricas contendo óxido de ferro obtidos pela polimerização de suspensões de óxidos de ferro em diversos monômeros (US3,890,224, de 17 de junho de 30 1975; Weiss *et al.*).

3/6

Aplicações da vermiculita modificada conforme a presente invenção

A vermiculita obtida por meio do processo de tratamento ora inventado apresentará características absorvedoras de líquidos, que permitam a recuperação, por separação magnética, de substâncias nocivas ao meio ambiente, como metais tóxicos, compostos orgânicos aromáticos, pesticidas e herbicidas, óleos ou graxas, dispersos em meios aquáticos, possibilitando o controle ambiental e o combate à poluição.

5 O processo descrito na presente invenção para a preparação de vermiculita expandida magnética poderá ainda ser utilizado para dar propriedade magnética a diversos tipos de sólidos, bastando para isso imergir o sólido em um fluido magnético com alta concentração de nanopartículas magnéticas, em condições tais que as nanopartículas se adsorvam na superfície do sólido.

Portanto, o método descrito aqui também se aplica à incorporação de nanopartículas magnéticas a diversos tipos de sólidos micrométricos ou milimétricos tais como: minerais como perilita, argila expandida e amianto crisotila; espumas poliméricas em geral como Isopor e poliuretanas; fibras vegetais; fibras de vidro; lã de vidro; sólidos lamelares trocadores iônicos; zeólitas; sílica mesoporosa e sílica gel.

Breve descrição da invenção

A invenção aqui descrita prevê a produção de vermiculitas expandidas magnéticas, hidrofílicas ou hidrofóbicas, em que o componente magnético pode ser constituído de metais ou ligas metálicas magnéticos ou óxidos magnéticos tais como magnetita (Fe_3O_4), maghemita (Fe_2O_3), e ferritas MFe_2O_4 ($\text{M} = \text{Mn}, \text{Co}, \text{Ni}, \text{Ba}$ etc), incorporadas na matriz vermiculita através de métodos de adsorção das nanopartículas provenientes de fluidos magnéticos.

As vermiculitas expandidas magnéticas aqui compreendidas podem ser preparadas por diversas metodologias que envolvem a incorporação de partículas magnéticas ao mineral, anteriormente ou após expansão.

4/6

Um exemplo de metodologia de preparação é a incorporação de nanopartículas magnéticas a vermiculita expandida através da adsorção de nanopartículas magnéticas a partir de fluidos magnéticos.

Por esta metodologia pode-se preparar vermiculitas expandidas magnéticas com características hidrofílicas, hidrofóbicas, ou ainda, que contenham funções químicas específicas para interação com íons metálicos e/ou moléculas orgânicas diversas.

As características hidrofílicas podem ser conseguidas fazendo-se a adsorção de nanopartículas magnéticas, a partir de um fluido magnético aquoso, em vermiculita expandida.

As características hidrofóbicas podem ser adquiridas das seguintes formas:

- i) tratando-se uma vermiculita expandida previamente hidrofizada tal como descrito na patente PI 9004025, aqui citada, e torná-la magnética pela adsorção de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com uma molécula contendo um grupo apolar, a partir de um fluido magnético orgânico;
- ii) tratando-se uma vermiculita expandida original com nanopartículas magnéticas funcionalizadas com uma molécula contendo um grupo apolar, a partir de um fluido magnético orgânico. Este segundo método permite, ao mesmo tempo, tornar a vermiculita expandida magnética e hidrofóbica;
- iii) fazendo-se a hidrofobização da vermiculita expandida posteriormente à incorporação das nanopartículas magnéticas a partir de fluidos magnéticos, através do tratamento com moléculas ou polímeros contendo grupos hidrofóbicos.

As características principais que a presente invenção introduz nas vermiculitas expandidas tratadas pelo método aqui descrito são:

- i) possibilidade de transformação de vermiculitas expandidas em vermiculitas expandidas magnéticas sem requerer tratar a vermiculita expandida a temperaturas superiores a 100°C;
- ii) possibilidade de produção de vermiculitas expandidas magnéticas com afinidade por líquidos polares ou apolares;

5/6

- iii) possibilidade de produção de vermiculitas expandidas magnéticas hidrofílicas ou hidrofóbicas com magnetização relativamente alta em campos magnéticos relativamente baixos e economicamente acessíveis.

5 **Procedimentos para realizar a invenção**

1) Preparação dos fluidos magnéticos

Nanopartículas de ferritas magnéticas podem ser sintetizadas pelo método de coprecipitação de íons metálicos em meio aquoso. Fluidos magnéticos aquosos podem ser obtidos pela dispersão das nanopartículas magnéticas em água ou em soluções aquosas ácidas, obtendo-se uma suspensão coloidal estabilizada por repulsão eletrostática. Fluidos magnéticos orgânicos estabilizados por repulsão estérica ou eletrostérica podem ser preparados fazendo-se a dispersão, em solventes orgânicos, das nanopartículas magnéticas cujas superfícies foram previamente funcionalizadas com moléculas contendo terminações apolares. Esses solventes orgânicos podem ser tais como: tolueno, hexano, ciclohexano, e outros solventes derivados de petróleo.

2) Produção de vermiculita expandida magnética hidrofílica

A vermiculita expandida pode ser imersa em um fluido magnético aquoso (contendo nanopartículas magnéticas carregadas mantidas em suspensão por repulsão eletrostática ou eletrostérica) por tempo suficiente para adsorção de nanopartículas sobre a superfície do mineral. A separação do mineral do fluido remanescente após o processo de adsorção pode ser feita por decantação ou filtração, seguida de secagem ao ar ou em estufa resulta na obtenção da vermiculita magnética. A quantidade de nanopartículas incorporadas na vermiculita pode ser variada, controlando-se a concentração de nanopartículas no fluido ou fazendo-se mais de um ciclo de adsorção. O controle da quantidade de nanopartículas adsorvidas permite modular as propriedades magnéticas do material.

30 **3) Produção de vermiculita expandida magnética hidrofóbicas**

A vermiculita expandida pode ser imersa em um fluido magnético orgânico (contendo nanopartículas magnéticas funcionalizadas com moléculas

6/6

contendo grupos apolares) mantidas em suspensão por repulsão estérica) por tempo suficiente para adsorção de nanopartículas sobre a superfície do mineral. A separação do mineral do fluido remanescente após o processo de adsorção pode ser feita por decantação ou filtração, seguida de secagem ao ar ou em estufa resulta na obtenção da vermiculita magnética. A quantidade de nanopartículas incorporadas na vermiculita pode ser variada, controlando-se a concentração de nanopartículas no fluido ou fazendo-se mais de um ciclo de adsorção. O controle da quantidade de nanopartículas adsorvidas permite modular as propriedades magnéticas do material.

10 Exemplos de características da vermiculita expandida magnética

Foram obtidas amostras de vermiculitas expandidas magnéticas, hidrofóbicas e hidrofílicas, de granulometrias de 1, 2 e 5 mm, contendo fração volumétrica de óxido de ferro na faixa de 0,06 a 0,5%, valores determinados experimentalmente através da análise do teor de ferro por absorção atômica e apresentando magnetizações na faixa de 0,1 a 20 emu por grama em campos magnéticos de 200 a 2000 Oe possuindo campos coercivos entre 1 e 300 Oe, à temperatura ambiente, determinados experimentalmente por medidas de magnetização.

As vermiculitas expandidas magnéticas hidrofílicas com granulometrias de 1, 2 e 5 mm foram testadas na remoção, por separação magnética, de petróleo espalhado sobre água. As vermiculitas expandidas magnéticas foram acrescentadas ao óleo espalhado sobre a água e após 5 min, removidas com a ajuda de um ímã. A quantidade de petróleo associado à vermiculita, que foi removido por grama de vermiculita expandida magnética está apresentada na tabela abaixo, para cada granulometria empregada.

Tabela . Quantidades de petróleo removido por separação magnética usando-se vermiculita expandida magnética hidrofílica de diferentes granulometrias.

Granulometria da vermiculita expandida magnética hidrofílica	Quantidades de petróleo removido por grama de vermiculita magnética
1mm	3,3 g
2mm	3,8 g
5mm	3,7 g

1/2

REIVINDICAÇÕES

1. **VERMICULITA EXPANDIDA MAGNÉTICA PARA APLICAÇÕES EM DESPOLUIÇÃO**, com característica hidrofílica ou hidrofóbica, com características absorvedoras de líquidos, que permitem recuperar, por separação magnética, substâncias nocivas ao meio ambiente, tais como metais tóxicos, compostos orgânicos aromáticos, pesticidas e herbicidas, óleos ou graxas espalhados em ambientes aquáticos, em consequência de acidentes ambientais, ou utilizadas no tratamento de águas industriais ou municipais, caracterizada pela incorporação de um componente magnético na matriz vermiculita por meio de métodos de adsorção das nanopartículas provenientes de fluidos magnéticos.
2. **VERMICULITA EXPANDIDA MAGNÉTICA PARA APLICAÇÕES EM DESPOLUIÇÃO**, conforme a Reivindicação 1, preparada por metodologias caracterizadas pela incorporação de nanopartículas magnéticas como as de metais e ligas metálicas magnéticas ou óxidos magnéticos como magnetita (Fe_3O_4), maghemita (Fe_2O_3), e ferritas MFe_2O_4 ($\text{M} = \text{Mn, Co, Ni, Ba}$ etc) ao mineral vermiculita, anteriormente ou após expansão da vermiculita.
3. **VERMICULITA EXPANDIDA MAGNÉTICA PARA APLICAÇÕES EM DESPOLUIÇÃO**, conforme as Reivindicações 1 e 2, cujo método de produção é caracterizado pela incorporação de partículas magnéticas à vermiculita expandida através da adsorção de partículas magnéticas sobre a superfície da vermiculita a partir de fluidos magnéticos aquosos ou orgânicos.
4. **VERMICULITA EXPANDIDA MAGNÉTICA PARA APLICAÇÕES EM DESPOLUIÇÃO**, conforme as Reivindicações 1, 2 e 3, com características hidrofílicas e de alta afinidade por líquidos polares, e caracterizada por funções químicas específicas introduzidas pela funcionalização das nanopartículas magnéticas com moléculas contendo grupos ionizáveis anterior ou posteriormente à incorporação das partículas magnéticas à vermiculita.
5. **VERMICULITA EXPANDIDA MAGNÉTICA PARA APLICAÇÕES EM DESPOLUIÇÃO**, conforme a Reivindicações 1, 2 e 3, com características hidrofóbicas e de alta afinidade por líquidos apolares, e que se caracteriza pela funcionalização das partículas magnéticas com moléculas orgânicas contendo

2/2

grupos apolares, anterior ou posteriormente à incorporação das partículas magnéticas à vermiculita, ou ainda através do recobrimento de uma vermiculita magnética hidrofílica com substâncias que contenham grupos hidrofóbicos; ou ainda, alternativamente, pelo tratamento de vermiculitas previamente

5 hidrofobizada com fluidos magnéticos orgânicos.

6. VERMICULITA EXPANDIDA MAGNÉTICA PARA APLICAÇÕES EM DESPOLUIÇÃO, conforme as Reivindicações anteriores, obtida por métodos de produção caracterizados por possibilitarem variar a quantidade de partículas magnéticas incorporadas na vermiculita, resultando em produtos com

10 magnetização na faixa de 0,1 - 20 emu por grama em campos magnéticos de 200 a 2000 Oe e possuindo campos coercitivos entre 1 e 300 Oe à temperatura ambiente.

7. PROCESSO PARA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM SÓLIDOS MICROMÉTRICOS OU MILIMÉTRICOS,

15 caracterizado por utilizar ao invés da vermiculita, outro sólido para imersão no fluido magnético com alta concentração de nanopartículas magnéticas, sendo o sólido escolhido, qualquer mineral, como a perlita, argila expandida e amianto crisotila; espumas poliméricas em geral como Isopor e poliuretanas; fibras vegetais; fibras de vidro; lã de vidro; sólidos lamelares trocadores iônicos;


20 zeólitas; sílica mesoporosa e sílica gel.

RESUMO

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VERMICULITA EXPANDIDA
MAGNÉTICA COM APLICAÇÕES EM REMOÇÃO DE AGENTES
POLUENTES


- 5 A presente invenção possibilita produzir vermiculitas expandidas magnéticas hidrofílicas ou hidrofóbicas, com características absorvedoras de líquidos, que permitam a recuperação, por separação magnética, de substâncias nocivas ao meio ambiente, como metais tóxicos, compostos orgânicos aromáticos, pesticidas e herbicidas, óleos ou graxas, dispersos em
- 10 ambientes aquáticos. O processo descrito produz vermiculitas expandidas magnéticas, hidrofílicas ou hidrofóbicas, nas quais o componente magnético pode ser constituído de metais ou ligas metálicas magnéticos ou óxidos magnéticos tais como magnetita (Fe_3O_4), maghemita (Fe_2O_3), e ferritas MFe_2O_4 ($\text{M} = \text{Mn, Co, Ni, Ba}$ etc), incorporadas na matriz vermiculita através
- 15 de métodos de adsorção das nanopartículas provenientes de fluidos magnéticos.

ANEXO B – DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



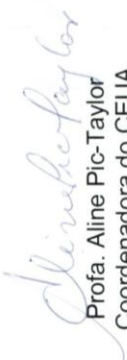
Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 24 de outubro de 2011.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**AValiação DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO DE NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITAS E MAGNETITAS COM DIFERENTES COBERTURAS EM PEIXES-PAULISTINHA (DANIO RERIO)**”, UnBDOC n.º 99145/2011, sob responsabilidade do Prof. Ricardo Bentes de Azevedo, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Aline Pic-Taylor
 Coordenadora do CEUA

