

---

# Nanopartículas e peixes: atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas ao dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>)

*Nanoparticle and fish: enzymes activity of the antioxidant defense system in tilapia (Oreochromis niloticus) exposed to titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)*

Theila Santana<sup>1</sup>, Marilene Santos<sup>1</sup>, Elissandra Ulbricht Winkaler<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Curso de Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Brasil.

---

## Resumo

**Objetivo** – Analisar a resposta das enzimas catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GST) de tilápias (*Oreochromis niloticus*) após 48 e 96 h de exposição à nanopartícula de dióxido de titânio (NP-TiO<sub>2</sub>). **Métodos** – Dez peixes foram distribuídos em aquários (30 L), contendo: 0 (controle), 1, 5, 10 e 100 mg.L<sup>-1</sup> da NP-TiO<sub>2</sub>. Após 48 e 96 h de exposição, os animais foram retirados dos aquários e crioadestesiados para a remoção do fígado, que foi homogeneizado e centrifugado. O sobrenadante foi separado e armazenado (- 80°C) para posterior determinação da atividade das enzimas CAT e GST. **Resultados** – Não observamos variação significativa na atividade da CAT nas tilápias expostas durante 48 h a NP-TiO<sub>2</sub>. Após 96 h, a atividade da CAT foi maior nos animais expostos a 10 e 50 mg.L<sup>-1</sup>. Nessas concentrações, a CAT foi significativamente maior no fígado dos animais expostos durante 96 h, em relação a exposição de 48 h. Para a GST, nas primeiras 48 h a atividade foi menor nos animais expostos a 1, 5 e 50 mg.L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub>, enquanto que, na exposição de 96 h a maior atividade da GST foi observada nos animais expostos a 50 mg.L<sup>-1</sup>. Comparando-se o tempo de exposição, em todas as concentrações testadas, a atividade da GST hepática foi maior nos animais expostos durante 96 h. **Conclusão** – A exposição de tilápias (*O. niloticus*) às concentrações de NP-TiO<sub>2</sub> testadas foram capazes de provocar alterações significativas na atividade dos biomarcadores avaliados. Além da concentração, o tempo de exposição a NP parece influenciar na resposta das enzimas, aumentando sua atividade.

**Descritores:** Enzimas; Antioxidantes; Catalase; Glutaciona

## Abstract

**Objective** – To analyze the response of catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) enzymes of tilapia (*Oreochromis niloticus*) after 48 and 96 h of exposure to titanium dioxide nanoparticles (NP-TiO<sub>2</sub>). **Methods** – Ten fish samples were distributed in aquariums (30 L), with: 0 (control), 1, 5, 10 and 100 mg.L<sup>-1</sup> of NP-TiO<sub>2</sub>. After 48 and 96 h of exposure, animals were removed from aquariums and cryo-anesthetized to remove liver, which was homogenized and centrifuged. Supernatant was separated and stored (- 80°C) to determine the activity of CAT and GST enzymes. **Results** – No significant variation in CAT activity in tilapia exposed for 48 h to NP-TiO<sub>2</sub> was observed. After 96 h, CAT activity was higher in animals exposed to 10 and 50 mg.L<sup>-1</sup> NP-TiO<sub>2</sub>. At these concentrations, CAT was significantly higher in the liver of animals exposed for 96 h, compared to those exposed for 48 h. In the first 48h, GST activity was lower in animals exposed to 1, 5 and 50 mg.L<sup>-1</sup> NP-TiO<sub>2</sub>, whereas for exposure of 96 h, greater GST activity was observed in animals exposed to 50mg.L<sup>-1</sup> NP-TiO<sub>2</sub>. Regarding time of exposure, at all concentrations, the GST activity was higher in animals exposed for 96 h. **Conclusion** – The exposure of tilapia (*O. niloticus*) to different NP-TiO<sub>2</sub> concentrations was able to cause significant changes in the activity of evaluated biomarkers. In addition to concentration, the time of exposure to NP-TiO<sub>2</sub> seems to influence the response of enzymes, increasing their activity.

**Descriptors:** Enzymes; Antioxidant; Catalase; Glutathione

---

## Introdução

A nanotecnologia inclui a aplicação de material com nanoescala, que possuem dimensões na faixa de 1 a 100 nm. Dentre essas, destaca-se a nanopartícula (NP) de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), com produção anual acima de 10.000 toneladas e com previsão de atingir 2,5 milhões de toneladas até 2025<sup>1</sup>.

As NPs-TiO<sub>2</sub> são comumente usadas em produtos industriais, incluindo tintas, materiais têxteis, papéis, plásticos, protetores solares, cosméticos, sensores eletrônicos e também utilizados na indústria de alimentos<sup>2</sup>. Devido a grande utilização das NPs, a estimativa é que entre 63 e 91% do total de toneladas de nanopartículas manufaturadas produzidas acabaram em aterros ou foram liberados no solo e na atmosfera. Desse montante, até 7% podem ter alcançado os corpos de água<sup>3</sup>.

Os organismos aquáticos são mais suscetíveis a contaminação do ambiente e podem ser considerados excelentes bioindicadores<sup>4</sup>. Os peixes podem fornecer um modelo para avaliação de danos oxidativos relacionados à exposição crônica ou concentrações subletais, mutagenicidade e outros efeitos adversos de xenobióticos no compartimento aquático<sup>5</sup>. Em vários trabalhos foi possível evidenciar o potencial tóxico de NPs-TiO<sub>2</sub> em peixes<sup>5-7</sup> devido o aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)<sup>8-12</sup>.

As EROs são produzidas principalmente devido à redução incompleta do O<sub>2</sub> e podem causar peroxidação lipídica das membranas e danos diretos às biomoléculas, prejudicando assim, os processos metabólicos celulares<sup>13</sup>. Todos os organismos possuem um sistema de defesa antioxidante formado por enzimas responsá-

veis em neutralizar as EROs produzidos em excesso. A análise da atividade dessas enzimas pode indicar o status antioxidante dos organismos, funcionando como um potencial biomarcador bioquímico para o estresse oxidativo<sup>14</sup>. Em estudos nanotoxicológicos, os biomarcadores podem ser úteis, pois são indicadores chave de alerta precoce dos riscos para os seres humanos e para os ecossistemas<sup>15</sup>.

Segundo Clemente et al. (2013), a exposição de organismos aquáticos a NP-TiO<sub>2</sub> pode induzir o aumento ou decréscimo na atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, superóxido dismutase, glutathione S-transferase e a peroxidase. A enzima catalase (CAT) está presente em organismos aeróbicos e anaeróbicos e sua função é diminuir a toxicidade do peróxido de hidrogênio. A glutathione S-transferase (GST), além da desintoxicação, atua como nos processos de biotransformação, tornando o xenobiotico menos tóxico para a célula<sup>17</sup>. Assim, ambas as enzimas estão envolvidas no processo de defesa contra as EROs e suas respostas têm sido empregadas para avaliar os efeitos da exposição a nanomateriais no nível celular.

Tendo em vista o atual cenário de expansão do uso de NPs-TiO<sub>2</sub> e o seu potencial tóxico para os organismos aquáticos, o presente estudo tem como objetivo analisar o efeito da exposição aguda (48 e 96 h) a diferentes concentrações de NP-TiO<sub>2</sub> em peixes (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758), utilizando a atividade das enzimas CAT e GST como biomarcadores bioquímicos.

## Métodos

A realização do experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (Protocolo nº 23007. 001517/2016-27). Para tanto, exemplares jovens de tilápias, *Oreochromis niloticus* (Figura 1), fornecidos pela piscicultura Aqua Vale (Ituberá, BA) foram transferidos para o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (LABEA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

Os animais foram aclimatados por 60 dias em tanques de polietileno (250 L), aeração contínua e fotoperíodo controlado (12Claro/12Escuro). A água do tanque foi renovada diariamente e os peixes alimentados *ad libitum*. As variáveis físico-químicas da água (temperatura: 24,4±0,3 °C, oxigênio dissolvido: 6,8±0,5 mg.L<sup>-1</sup>, pH: 6,8±0,4, condutividade: 410,3±50,1 µS cm<sup>-3</sup> e salinidade: 0,2±0,1 ‰) foram monitoradas diariamente e se mantiveram constantes durante o período de aclimação.

As concentrações da nanopartícula de TiO<sub>2</sub> (NP-TiO<sub>2</sub>), correspondentes a 1, 5, 10 e 50 mg.L<sup>-1</sup> (concentração nominal), foram preparadas a partir do nano pó de TiO<sub>2</sub> anatase (Sigma-Aldrich®), com 99,7 % de pureza, 21 nm de tamanho da partícula, superfície específica de 45-55 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> e diluídas em água ultrapura. Em seguida, as suspensões foram homogêneas em banho maria com ultrassom por 40 minutos a 37 KHz. As soluções foram preparadas no mesmo dia dos testes, evitando aglutinação das nanopartículas.

Para a realização dos testes, 10 exemplares de *O. niloticus* foram distribuídos aleatoriamente em 10 aquários de vidro (30 L) e foram aclimatados por 24 h. Em seguida, foram adicionados aos aquários as soluções de 0 (grupo controle), 1, 5, 10 e 50 mg.L<sup>-1</sup> da NP-TiO<sub>2</sub>. No grupo controle (CTR), os peixes foram expostos somente a água de abastecimento do laboratório, sem a presença da nanopartícula. Os animais não foram alimentados durante os experimentos e a oxigenação da água, garantida por sopradores de ar. O teste foi do tipo estático com fotoperíodo (12Claro/12Escuro) controlado com timer digital.

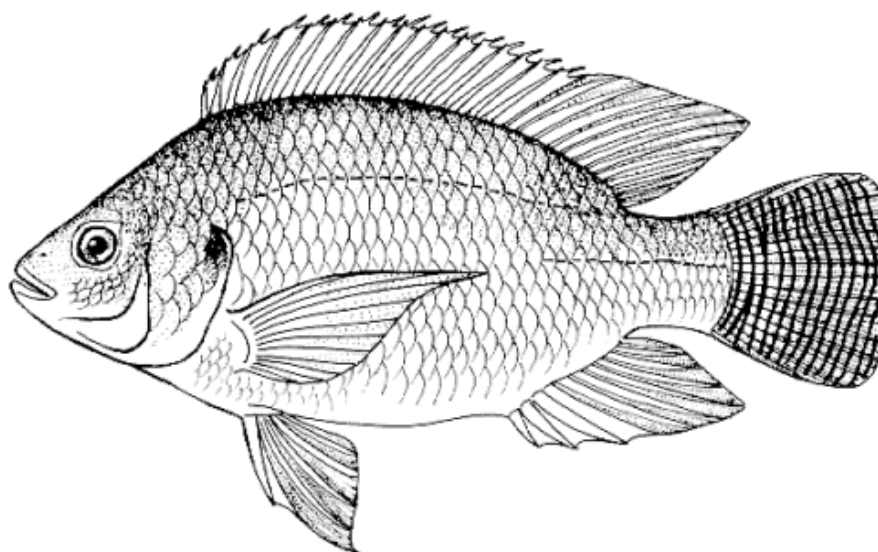
Após 48 e 96 h de exposição a NP-TiO<sub>2</sub>, os animais foram retirados individualmente dos aquários e anestesiados por hipotermia em caixas isotérmicas contendo gelo e água (1:1). Ainda anestesiados, os animais foram pesados e medidos (massa corpórea: 30,7±4,8 g, comprimento total: (12,2±0,7 cm) e comprimento padrão: 9,6±0,7 cm). Em seguida foram eutanasiados via secção medular e o fígado foi e armazenado em freezer – 80 ° C, para as análises bioquímicas.

Durante todo período de exposição a NP-TiO<sub>2</sub>, os parâmetros da água (oxigênio dissolvido, pH, temperatura, condutividade e salinidade) foram mensurados com auxílio de sonda multiparâmetro (Hanna HI9828) a cada 24 horas (Tabela 1). Os valores mantiveram-se, de modo geral, dentro dos parâmetros ideais estabelecidos pela ABNT NBR 15088, assim, nós consideramos que as variáveis não influenciaram nos resultados.

Para a determinação dos biomarcadores bioquímicos, as amostras de fígado foram pesadas e homogêneas na proporção de 1:10 (m/v) em tampão fosfato de potássio (Tris-HCl, 50 mM, 0,15 M KCl, pH 6,8). O homogêneo foi centrifugado durante 25 minutos (4 ° C) a 12.300 g. Após esse procedimento, o sobrenadante foi separado e congelado a – 80 ° C, para posterior determinação da atividade das enzimas CAT e GST.

A atividade da CAT (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg.pt<sup>-1</sup>) foi determinada com base na degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno pela CAT, gerando como subproduto a H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro UV/Vis (*software Reaction kinetics*) em cubetas de quartzo e comprimento de 240 nm. A atividade da GST (nmol CDNB min<sup>-1</sup> mg pt<sup>-1</sup>) foi determinada com base na catalisação da reação de conjugação do substrato 1-26 cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione reduzida, no comprimento de 340 nm em cubetas de acrílico<sup>17</sup>. A concentração de proteína total hepática foi mensurada utilizando-se kit comercial (Interkit®).

A atividade da CAT e GST foi comparada estatisticamente pelo teste paramétrico ANOVA two way, onde foram utilizadas duas variáveis: tempo de exposição e concentrações de NP-TiO<sub>2</sub> com posterior teste de Tukey. As análises foram realizadas com o auxílio do programa Past versão 2.17 C. Na ocorrência de variações entre as médias (p < 0,05) o teste de TUKEY foi aplicado para identificar os grupos que se distinguem.



**Figura 1.** Exemplar de tilápia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757) utilizado nos testes de exposição aguda (48 e 96 h) a nanopartícula de dióxido de oxigênio (NP-TiO<sub>2</sub>)

**Tabela 1.** Valores dos parâmetros abióticos da água durante a realização dos testes de exposição aguda (48 e 96 h) de tilápias, *Oreochromis niloticus*, a diferentes concentrações da nanopartícula de dióxido de titânio (NP-TiO<sub>2</sub>)

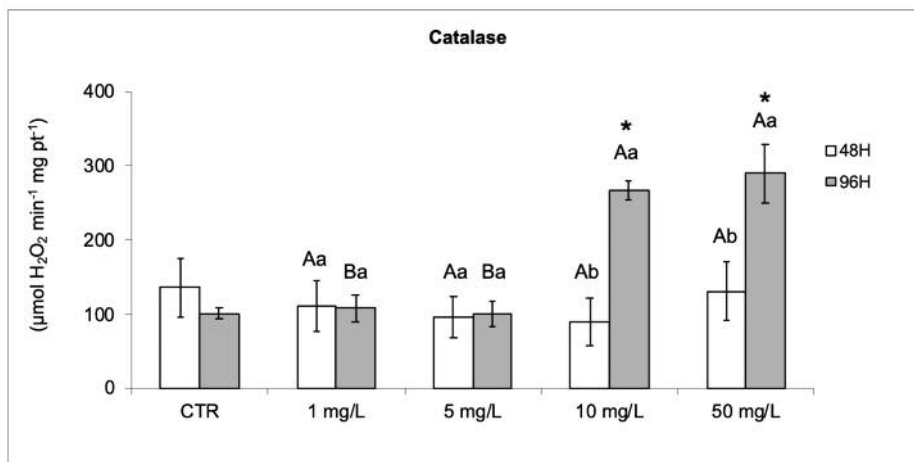
Concentração* NP-TiO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Temperatura (°C)	Condutividade (mS.cm <sup>-1</sup> )	Salinidade (‰)	Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )
0 (CTR)	7,2±0,3	24,3±0,2	387,0±29,9	0,2±0,1	5,1± 0,4
1	7,0±0,4	24,3±0,3	375,4± 20,0	0,2±0,0	5,4±0,7
5	7,0±0,3	24,4±0,2	415,3± 81,8	0,2±0,0	5,9±0,1
10	6,9±0,3	24,3±0,2	542,3±26,4	0,2±0,1	5,9±0,1
50	6,9±0,5	24,4±0,2	438,8±25,1	0,2±0,0	5,3±0,7

\*Concentração nominal. Valores expressos como média±D.P de cinco medidas: 0, 24, 48, 72 e 96 após o início da exposição aguda

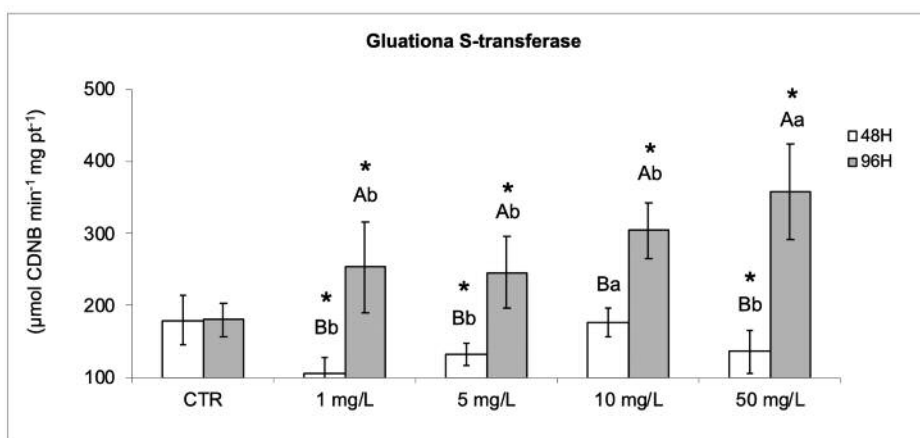
## Resultados

Em nosso trabalho, não observamos variação significativa ( $F=1,04$  e  $p=0,45$ ) na atividade da CAT no fígado das tilápias expostas durante 48 h as diferentes concentrações da nanopartícula de TiO<sub>2</sub>. A atividade da CAT também não variou em relação ao grupo controle (CTR), onde os animais foram expostos somente a água de diluição (Gráfico 1). Entretanto, após 96 horas de exposição, a atividade da CAT foi significativamente

maior ( $F=13,03$  e  $p=0,00$ ) nos animais expostos as concentrações as maiores concentrações (10 e 50 mg.L<sup>-1</sup>) da NP-TiO<sub>2</sub>, quando comparada com o grupo CTR e as concentrações de 1 e 5 mg.L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub>. Comparando-se o tempo de exposição, nas concentrações de 10 e 50 mg.L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub> a atividade da CAT foi significativamente maior ( $t=-6,35$  e  $p=0,00$ ;  $t=-3,10$  e  $p=0,005$ ) nos animais expostos durante 96 h a nanopartícula. Entretanto, esses valores não diferiram significativamente entre si (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Atividade da catalase (CAT) hepática de tilápia (*O. Niloticus*) expostas a 0 (controle), 1, 5, 10 e 50 mg.L<sup>-1</sup> da nanopartícula de TiO<sub>2</sub> após 48 e 96 horas de exposição. Valores apresentados como média e desvio padrão. Letras iguais indicam valores sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) e letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas referente a diferença entre as concentrações, letras minúsculas diferença referente ao tempo de exposição dentro do mesmo grupo. (\*) indica diferença significativa entre o grupo controle



**Gráfico 2.** Atividade da glutatona S-transferase (GST) epática de tilápia (*O. Niloticus*) expostas a 0 (controle), 1, 5, 10 e 50 mg.L<sup>-1</sup> da nanopartícula de TiO<sub>2</sub> após 48 e 96 horas de exposição. Valores apresentados como média e desvio padrão. Letras iguais indicam valores sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) e letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas referente a diferença entre as concentrações, letras minúsculas diferença referente ao tempo de exposição dentro do mesmo grupo. (\*) indica diferença significativa entre o grupo controle

Diferentemente da CAT, já nas primeiras 48 h de exposição a NP-TiO<sub>2</sub> nós observamos uma variação significativa na atividade da GST hepática dos peixes expostos a nanopartícula (Gráfico 2). A atividade da GST foi significativamente menor ( $F=10,29$  e  $p=0,00$ ) nos animais expostos a 1, 5 e 50 mg.L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub>, quando comparado com o grupo CTR. Entretanto, a atividade nos animais expostos a 10 mg.L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub> não variou em relação ao controle.

Na exposição de 96 h, a atividade da GST variou significativamente somente nos animais expostos a maior concentração testada (50 mg.L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub>), sendo esta,

maior quando comparada com as demais concentrações e seu grupo CTR ( $F=12,38$  e  $p=0,00$ ). Nas demais concentrações testadas, nós não observamos diferenças significativas entre os tratamentos. Na comparação entre o tempo de exposição, observamos que a atividade da GST hepática foi significativamente maior nos animais expostos durante 96 h a NP-TiO<sub>2</sub>, quando comparados com os valores obtidos nos animais expostos as mesmas concentrações durante o período de 48 h. Em nosso trabalho, não observamos diferença significativa entre os resultados do grupo CTR (48 e 96 h) e não houve mortalidade dos animais durante os testes.

## Discussão

O mecanismo de toxicidade da NP-TiO<sub>2</sub> para os organismos pode ser descrito em três aspectos: (1) Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) após a indução de pares radicais livres na presença de irradiação UV; (2) Fluxo de citoplasma e ligação da NP-TiO<sub>2</sub> a organelas intracelulares e macromoléculas biológicas, após danos às membranas celulares e; (3) Danos na parede celular e peroxidação lipídica da membrana celular causada pela fixação de células da NP por força eletrostática, devido à grande área superficial<sup>18</sup>.

Esse dano oxidativo, devido a presença das NPs, pode ser neutralizado pelo sistema de defesa antioxidante e por mecanismos de reparo, que inclui enzimas que regulam os intermediários reativos produzidos nas células<sup>13</sup>. A enzima superóxido dismutase catalisa a dismutação do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enquanto que, a catalase (CAT) catalisa a conversão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que é tóxico para as células em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub><sup>17</sup>.

A atividade dessas enzimas antioxidantes pode aumentar ou ser inibida sob estresse químico, indicando que não há uma regra geral para a atividade dessas enzimas<sup>19</sup>. Em nosso trabalho, mesmo nas maiores concentrações testadas (10 e 50 mg.L<sup>-1</sup> de NP-TiO<sub>2</sub>), a maior atividade da CAT foi observada somente nos animais expostos durante 96 h. Ou seja, a exposição mais curta (48 h) não foi capaz de induzir a atividade da CAT nas *O. niloticus* testadas, mesmo quando expostas as maiores concentrações. Resultado semelhante foi descrito por Hao et al. (2009), que só observaram o aumento na atividade da CAT hepática de carpas (*C. carpio*) expostas a 10 e 50 mg.L<sup>-1</sup> da NP-TiO<sub>2</sub> após 96 h de exposição. A exposição aguda de 48 h as concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg.L<sup>-1</sup> NP-TiO<sub>2</sub> também não provocaram variação significativa na atividade da CAT hepática de peixes da espécie *Prochilodus lineatus*<sup>11</sup>. Assim, curtos períodos de exposição a NP-TiO<sub>2</sub> parecem não interferir na atividade da CAT hepática.

Além do tempo de exposição, a concentração da NP é um fator importante e interferente na atividade das enzimas. Xiong et al. (2011) não observaram variação na atividade da CAT hepática de zebrafish (*Danio rerio*) expostos a 5 mg.L<sup>-1</sup> NP-TiO<sub>2</sub> e sugerem que a concentração testada, mesmo durante 96 h, foi baixa para gerar EROs suficientes e ativar o sistema de defesa antioxidante. O mesmo pode ter ocorrido nas tilápias testadas em nosso trabalho, visto que, não observamos variação significativa na atividade da CAT hepática dos animais expostos as concentrações de 1 e 5 mg.L<sup>-1</sup> de NP, mesmo durante 96 h. Diferente de nossos resultados, Varela-Valencia et al. (2014) evidenciaram que mesmo em baixas concentrações (0,1 mg.L<sup>-1</sup> de NP-TiO<sub>2</sub> via intraperitoneal), ocorre aumento nos níveis de transcrição do RNAm de CAT hepática de *O. niloticus*. Porém, cabe salientar que a via de administração foi diferente da testada em nosso trabalho. Na água as NPs-TiO<sub>2</sub> podem sofrer agregação, que consequentemente leva à sua precipitação e reduz a disponibilidade das NPs. Carmo et al. (2018) relataram uma redução

de aproximadamente 62% na concentração de NPs-TiO<sub>2</sub> disponíveis na água após 24 h.

A principal função da CAT é diminuir a toxicidade do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) através da quebra dessa molécula em água e oxigênio. Assim, exposição a altas concentrações de NP-TiO<sub>2</sub> podem estar relacionadas com a menor atividade da CAT observada nas tilápias, mesmo em períodos de exposição mais curto. Karthigarani e Navaraj (2012) observaram menor atividade da CAT em tilápias (*O. Mossambicus*) expostas a 50, 75 e 100 mg.L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub> durante 48 h. Segundo os autores, o TiO<sub>2</sub> pode ter inibido a atividade da CAT hepática, devido a sua alta capacidade de acumulação no fígado. Embora a maioria dos estudos indique que o rim é responsável por metabolizar e/ou eliminar a NP-TiO<sub>2</sub>, Carmo et al. (2018) apontaram que o fígado também tem um papel de destaque nesses processos.

As NP-TiO<sub>2</sub> tem uma característica específica de se ligar a enzima CAT por forças eletrostáticas e de ligações de hidrogênio, podendo, em altas concentrações inibir a atividade dessa enzima<sup>22</sup>. A redução da atividade da CAT não foi observada em nosso estudo, porém, cabe ressaltar que as concentrações testadas em nosso trabalho foram menores que as testadas por Karthigarani e Navaraj (2012). A redução na atividade da CAT também foi observada em carpas (*C. carpio*) expostas a concentrações de NP-TiO<sub>2</sub> de 2 a 4 vezes maiores que as testadas em nosso trabalho<sup>9</sup>.

Apesar de não interferir na atividade da CAT, a presença de NPs-TiO<sub>2</sub> pode influenciar na toxicidade de outros poluentes coexistentes no ambiente aquático, com impacto indireto nos organismos. A presença de NPs-TiO<sub>2</sub> na água aumentou significativamente o acúmulo cádmio e arsênio em carpas (*C. carpio*),<sup>22-23</sup> atuando como transportador desses metais. Em duas espécies de peixes (*C. auratus* e *C. carpio*), os metais cromo, ferro e níquel enriquecidos com TiO<sub>2</sub> também foram responsáveis por lesões histopatológicas, alterações comportamentais e estresse oxidativo, caracterizado por alterações significativas nas atividades da CAT<sup>4</sup>. Zhang et al. (2018) observaram que em sistemas aquáticos naturais a alta concentração de NP-TiO<sub>2</sub> pode aumentar a toxicidade de outras nanopartículas de prata.

Além da CAT, a enzima GST também apresenta importância no processo de defesa do estresse oxidativo, visto que, protegem proteínas, lipídios e o DNA da oxidação<sup>17</sup>. A GST é uma importante enzima de biotransformação de fase II, e constitui a segunda linha de defesa contra a toxicidade causada pelos oxidantes. Ela atua conjugando xenobióticos, incluindo os aldeídicos produzidos durante a lipoperoxidação, com a glutationa na forma reduzida (GSH) tornando-os mais polares e facilitando a remoção intracelular<sup>25</sup>. Assim, a GST hepática é conhecida por seu importante papel na defesa do organismo contra danos oxidativos nas células.

Diferentemente da enzima CAT, a atividade da GST variou nas 48 h de exposição, sendo significativamente menor no fígado das tilápias expostas a 1, 5 e 50 mg.L<sup>-1</sup> da NP. Segundo Varela-Valencia et al. (2014), o pico da expressão gênica da GST hepática em *O. niloticus*

ocorre nas primeiras 6 h de exposição, com subsequente redução na atividade até as 24 h. Como em nosso trabalho a atividade da GST hepática foi determinada após 48 h de exposição, provavelmente esse comportamento inicial na ativação da GST não foi detectado.

O sistema antioxidante é capaz de neutralizar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e outras EROs formadas pelas NPs e, consequentemente, proteger o organismo do estresse oxidativo. Assim, a menor atividade da GST observada nos peixes expostos a NP-TiO<sub>2</sub> sugere sistema foi ativado. A redução da atividade da GST também foi observada no tecido muscular de *O. niloticus* em expostas a 2 mg.L<sup>-1</sup> de NP-ZnO durante 7 dias, sendo essa redução mais acentuada após 14 dias de exposição<sup>26</sup>. Entretanto, as mesmas concentrações testadas em nosso trabalho não provocaram alteração na atividade da GST de curimbas (*P. lineatus*) expostos a 48 h a NP-TiO<sub>2</sub><sup>11</sup>.

O tempo prolongado de exposição a altas concentrações parece ter um resultado diferente. A maior atividade da GST observada nas tilápias expostas a 50 mg.L<sup>-1</sup> de NP-TiO<sub>2</sub> pode estar relacionado a um mecanismo compensatório ao estresse oxidativo, devido ao aumento em sua síntese, ao longo da exposição a NP26. Carmo et al. (2018)<sup>11</sup> também observaram maior atividade da GST hepática em *P. lineatus* expostos a 10 e 50 mg.L<sup>-1</sup> de NP-TiO<sub>2</sub> durante 14 dias. Sabe-se que a síntese de GST pode aumentar devido a um mecanismo adaptativo ao leve estresse oxidativo o que pode explicar nosso resultado<sup>22</sup>. A maior atividade da GST também foi observada em outras duas espécies de peixes, *D. rerio* e *C. auratus*, expostas a 10 e 100 mg.L<sup>-1</sup> de NP-TiO<sub>2</sub> durante 7 dias<sup>27</sup>. Entretanto, após 21 dias de exposição os autores observaram redução significativa na atividade da enzima para ambas as espécies. Resultado semelhante foi observado em carpas (*C. auratus*) expostas a 100 mg.L<sup>-1</sup> da NP-ZnO<sup>17</sup>. A redução da atividade da GST pode estar relacionada com a diminuição da síntese de GST por estresse severo, devido à concentração dessas nanopartículas em tecidos alvo, como o fígado. O estresse oxidativo severo pode suprimir suas atividades devido a uma perda de mecanismos de resposta ao estresse induzido<sup>22</sup>, resultado geralmente observado em peixes expostos a altas concentrações de TiO<sub>2</sub> ou durante longos períodos de exposição. A redução na atividade da GST não foi observado em nosso trabalho, provavelmente devido ao tempo de exposição (4 dias), indicando que, durante esse período, o fígado parece ser capaz de produzir a GST para combater as EROs.

A maior atividade da GST também foi observada em outros animais aquáticos expostos a NP-TiO<sub>2</sub>, como em moluscos bivalves *Mytilus galloprovincialis*<sup>16</sup>, em microcrustáceos *Daphnia magna*<sup>28</sup> e em diferentes órgãos de mamíferos<sup>30</sup>. Isso pode indicar que a ativação do mecanismo de resposta antioxidante funciona de maneira semelhante para vertebrados e invertebrados. Assim, os peixes representam um modelo biológico relevante na área da nanoecotoxicologia, visto que, os resultados podem ser extrapolados para os mamíferos.

Aparentemente, as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> causam efeitos semelhantes em peixes e ratos, sendo o fígado o tecido mais afetado<sup>25</sup>.

## Conclusão

Em nosso trabalho, a exposição de tilápias (*O. niloticus*) às concentrações de NP-TiO<sub>2</sub> testadas foram capazes de provocar alterações significativas na atividade dos biomarcadores avaliados. Além da concentração, o tempo de exposição à nanopartícula parece influenciar na resposta das enzimas, aumentando sua atividade.

Esses resultados são importantes, pois, contribuem para o conhecimento do impacto final dos nanomateriais na saúde e no meio ambiente, bem como, sua interferência nos processos metabólicos dos animais. No entanto, são necessárias mais informações sobre os efeitos das NP-TiO<sub>2</sub> por períodos mais longos de exposição, se quisermos entender a vias bioquímicas pelas quais as nanopartículas são metabolizadas.

## Referências

1. Mahaling B, Dinabandhu A. Nanotoxicology: the emerging nanoresearch. *Sci Horizon*. 2018;6(6):14-6.
2. Martirosyan A, Schneider YJ. Engineered nanomaterials in food: Implications for food safety and consumer health. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(6):5720-50.
3. Keller AA, McFerran S, Lazareva A, Suh S. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J Nanopart Res*. 2013;15.
4. Pirsahab M, Azadi NA, Miglietta ML, Sayadi MH, Blahova J, Fathi M, et al. Toxicological effects of transition metal-doped titanium dioxide nanoparticles on goldfish (*Carassius auratus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*. 2019; 215: 904-15.
5. Karthigarani M, Navaraj PS. Impact of nanoparticle on enzymes activity in *Oreochromis mossambicus*. *Int J Scientif Technol Res*. 2012;1(10):13-7.
6. Varela-Valencia R, Gómez-Ortiz N, Oskam G, Coss R, Rubio-Piña J, Río-García M, et al. The effect of titanium dioxide nanoparticles on antioxidant gene expression in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Nanopart Res*. 2014;16:2369.
7. Hajirezaee S, Mohammadib G, Naserabad SS. The protective effects of vitamin C on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to titanium oxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub>-NPs). *Aquaculture*. 2019.
8. Federici G, Shaw BJ, Handy R. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol*. 2007; 84: 415-30.
9. Hao L, Wang Z, Xing B. Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *J Environ Sci*. 2009; 21:1459-66.
10. Reeves JF, Davies SJ, Dodd NJF, Jha AN. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat Res*. 2008; 640: 113-22.
11. Carmo TLL, Siqueira PR, Azevedo VC, Tavares D, Pesenti EC, Cestari MM, et al. Overview of the toxic effects of titanium dioxide nanoparticles in blood, liver, muscles, and brain of a Neotropical detritivorous fish. *Environ Toxicol*. 2019; 34(4):457-68.
12. Carmo TLL, Azevedo VC, Siqueira PR, Galvão TD, Santos FA, Martinez CBR, et al. Reactive oxygen species and other biochemical and morphological biomarkers in the gills and kidneys of

- the Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*, exposed to titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles. *Environ Sci Pol Res Int*. 2018;25: 22963-76. B
13. Paital B. Removing small non-enzymatic molecules for biochemical assay of redox regulatory enzymes; An exemplary comments on "Antioxidant responses in gills and digestive gland of oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston) under lead exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018; 154: 337-40.
  14. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2006; 64: 178-89.
  15. Pham CH, Yi J, Gu MB. Biomarker gene response in male Medaka (*Oryzias latipes*) chronically exposed to silver nanoparticle. *Ecotoxicol Environ Safe*. 2012; 78: 239-45.
  16. Clemente Z, Castro VL, Feitosa LO, Jonsson CM, Maia AHN, Fraceto LF. Fish exposure to nano-TiO<sub>2</sub> under different experimental conditions: Methodological aspects for nanoecotoxicology investigations. *Sci Total Environ*. 2013; 463-4: 647-56.
  17. Benavides M, Fernandez-Lodeiro J, Coelho P, Lodeiro C, Diniz MS. Single and combined effects of aluminum (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) and zinc (ZnO) oxide nanoparticles in a freshwater fish, *Carassius auratus*. *Environ Sci Pollut Res*. 2016; 23(24): 24578-91.
  18. Keen JH, Habig WH, Jakoby WB. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J Biol Chem*. 1976; 251(20): 6183-8.
  19. Hou J, Wang L, Wang C, Zhang S, Liu H, Li S. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *J Environ Sci*. 2019;75:40-53.
  20. Cheung CC, Zheng GJ, Li AMY, Richardson BJ, Lam PK. Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat Toxicol*. 2001; 52: 189-203.
  21. Xiong D, Fang T, Yu L, Sima X, Zhu W. Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci Total Environ*. 2011; 409: 1444-52.
  22. Zhang, HM, Cao J, Tang BP, Wang YQ. Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the structure and activity of catalase. *Chem Biol Interact*. 2014; 219: 168-174.
  23. Zhang X, Sun H, Zhang Z, Niu Q, Chen Y, Crittenden JC. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere*. 2007; 67(1): 160-6.
  24. Sun H, Zhang X, Zhang Z, Chen Y, Crittenden JC. Influence of titanium dioxide nanoparticles on speciation and bioavailability of arsenite. *Environ Pollut*. 2009; 157: 1165-70.
  25. Zhang Y, Qiang L, Yuan Y, Wu W, Sun B, Zhu L. Impacts of titanium dioxide nanoparticles on transformation of silver nanoparticles in aquatic environments. *Environ Sci Nano*. 2018; 5: 1191-9.
  26. Canli EG, Dogan A, Canli M. Serum biomarker levels alter following nanoparticle (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, TiO<sub>2</sub>) exposures in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018; 62: 181-7.
  27. Abdelazim AM, Saadeldin IM, Swelum AA, Afifi MM, Alkaladi A. Oxidative stress in the muscles of the fish Nile Tilapia caused by zinc oxide nanoparticles and its modulation by vitamins C and E. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 1-9.
  28. Diniz MS, Matos AA, Lourenço J, Castro L, Peres I, Mendonça E, Picado A. Histological and biochemical effects of exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles in livers of two freshwater fish species: *Carassius auratus* and *Danio rerio*. *Microsc Microanal*. 2013; 19(S4): 51-2.
  29. Kim KT, Klaine SJ, Cho J, Kim SH, Kim SD. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles according to size fraction. *Sci Total Environ*. 2010, 408(10): 2268-72.
  30. Kang SJ, Kim BM, Lee YJ, Chung HW. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*. 2008; 49: 399-405.

#### Endereço para correspondência:

Elissandra Ulbricht Winkaler  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Rua Rui Barbosa, 710  
Cruz das Almas-BA, CEP 44380-000  
Brasil

E-mail: elis@ufrb.edu.br

Recebido em 27 de maio de 2020  
Aceito em 28 de agosto de 2020