



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Urutaí
Programa de Pós-Graduação em Conservação de
Recursos Naturais do Cerrado

**TRANSFERÊNCIA TRÓFICA DE
NANOFIBRAS DE CARBONO ENTRE
Eisenia fetida, *Danio rerio* E *Oreochromis niloticus*
E SUA TOXICIDADE NO ÚLTIMO NÍVEL
TRÓFICO**

ALEX RODRIGUES GOMES

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Urutaí, fevereiro de 2020



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Reitor

Prof. Dr. Elias de Pádua Monteiro

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Virgílio José Távira Erthal

Campus Urutaí

Diretor Geral

Prof. Dr. Paulo César Ribeiro da Cunha

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Anderson Rodrigo da Silva

Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

Coordenador

Prof. Dr. Daniel de Paiva Silva

Urutaí, fevereiro de 2020

ALEX RODRIGUES GOMES

TRANSFERÊNCIA TRÓFICA DE NANOFIBRAS DE CARBONO ENTRE
Eisenia fetida, *Danio rerio*, *Oreochromis niloticus* E SUA TOXICIDADE NO
ÚLTIMO NÍVEL TRÓFICO

Orientador

Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano -
Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do
Cerrado para obtenção do título de Mestre.

Urutaí (GO)
2020

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser gravada, armazenada em sistemas eletrônicos, fotocopiada ou reproduzida por meios mecânicos ou eletrônicos ou utilizada sem a observância das normas de direito autoral.

ISSN XX-XXX-XXX

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

G633t Gomes, Alex Rodrigues
 Transferência trófica de nanofibras de carbono
entre Eisenia fetida, Danio rerio e Oreochromis
niloticus e sua toxicidade no último nível trófico /
Alex Rodrigues Gomes; orientador Guilherme Malafaia.
-- Urutá, 2020.
 52 p.

 Dissertação (em Conservação de Recursos Naturais
do Cerrado) -- Instituto Federal Goiano, Campus
Urutá, 2020.

 1. Poluição aquática. 2. Nanopoluentes .. 3.
Cadeia alimentar. 4. Nanomateriais baseados em
carbono. I. Malafaia, Guilherme , orient. II. Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 n°2376

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: **Alex Rodrigues Gomes**

Matrícula: **2018101330940013**

Título do Trabalho: **Transferência trófica de nanofibras de carbono entre Eisenia fetida, Danio rerio e Oreochromis niloticus e sua toxicidade no último nível trófico**

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: **30/07/2020**

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí, 30/07/2020.

Local Data



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais



Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)



PPGRENAC

Programa de Pós-Graduação em Conservação de
Recursos Naturais do Cerrado

FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Título da dissertação:	Transferência trófica de nanofibras de carbono entre <i>Eisenia fetida</i> , <i>Danio rerio</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> e sua toxicidade no último nível trófico
Orientador(a):	Guilherme Malafaia
Coorientador(a):	
Autor(a):	Alex Rodrigues Gomes

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em 28 de fevereiro de 2020, como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, pela Banca Examinadora especificada a seguir.

Prof. Dr. **Guilherme Malafaia**
Orientador, IF Goiano – Campus Urutaí
Presidente

Profa. Dra. **Luciane Sperandio Floriano**
IF Goiano – Campus Urutaí
Membro titular

Prof. Dr. **Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes**

IF Goiano – Campus Urutaí
Membro titular

Dedico esta obra à minha mãe (*In memoriam*) Célia Rodrigues Gomes. Que sempre soube quão importante é a realização deste sonho. A ela, pois todos os dias, meu pensamento se atentou aos seus ensinamentos sobre educação, carinho, respeito e hombridade, aos que estão a minha volta. A ela, pelo jeitinho "rude" de demonstrar carinho, mas que sempre deu certo. A ela, que sempre esteve certa de que o esforço, o saber e o ser, são mais importantes e valem mais a pena que a inteligência sem sentido, o saber ser utilidade e o "ter" sem compromisso. Sempre em dias de dificuldade, reaprendi pelas palavras que soavam em minha memória, de que o esforço sempre vale a pena, o trabalho é árduo, mas seu produto é satisfatório. Afinal, podemos perder tudo, menos o conhecimento que adquirimos. Mas acima de tudo sendo humilde sempre, não permitindo que as vaidades do mundo nos contamine. Minha mãezinha querida, onde estiver, receba nessas linhas sem pautas, todo meu carinho. Ofereço ainda a comunidade o compartilhar de todo conhecimento que obtive e os que ainda obterei.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

(Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela a vida e, pelas oportunidades que tenho recebido. À força de conseguir ter me mantido na integridade, perseverança e conseguido exercitar a paciência e a resiliência em vários momentos que pensei não conseguir.

À minha família, mesmo que distante, e enfrentando dificuldades tem tido certo carinho. À minha mãe **Célia Rodrigues Gomes** (*In memoriam*) e meu pai **Alexandre Gomes Filho**, por terem sido os progenitores, e sempre terem dedicado suas vidas a nos ensinar sobre o respeito, educação e sermos um cidadão de bem. Em especial à minha irmã **Daniela Rodrigues Gomes**, que desde o início depositou confiança, dando forças em momentos críticos desta jornada. Ao meu sobrinho **João Victor** (o meu pequeno príncipe), que mesmo não entendendo muito sobre as “coisas de adulto”, ficava bravo pelo tio estar longe, sempre manifestando seu carinho por mensagens e, nos momentos em que nos revíamos, agradeço por serem sempre únicos, me fazendo reviver e me sentir novamente querido.

Ao orientador, **Guilherme Malafaia**, que ao longo da trajetória de grandes desafios, tem se tornado um amigo. Um cara exemplar, esforçado, inteligente, amoroso (do jeito dele) e companheiro. Por ter sido alguém que soube puxar orelhas, mas acalmar e ajudar em tudo que sempre precisei, desde burocracia de documento à vida pessoal, meu muito obrigado por termos se tornado amigo, amizade que levarei para a vida toda.

Ao **Thiago Lopes Rocha**, um grande amigo que se não fosse pelo grande esforço e incentivo, eu não teria abraçado esse “desafio” de voltar a estudar, um passo a mais na vida acadêmica, que no auge da vida foi me proporcionado. Pelos conselhos, atenção e grande companheirismo, tem provado várias vezes, que é mais que um amigo, e sim um irmão.

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisas Biológicas, venho agradecer aos que direto e indiretamente participaram da minha evolução acadêmica. Em especial à **Amanda Pereira da Costa Araújo**, por ser uma amizade à primeira vista, desde o primeiro dia que eu a vi na seleção de mestrado, logo seguimos com grande parceria nas práticas em laboratórios, trocas de informações e companhia, obrigado pela grande ajuda de sempre e amizade. Ao **Thales**, pelo companheirismo em experimentos, digo eu que é “um menino em corpo de homem”, acredito que a amizade será para vida toda, obrigado pela parceria. À **Julya**, **Abner** e **Thiarlen**, pela ajuda em práticas de laboratórios, serem companheiros em todos os momentos.

Ao **Instituto Federal Goiano** - Campus Urutaí, por todo apoio prestado desde o início.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1.INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Nanofibra de carbono e caracterização.....	15
2.2. Modelos animais e cadeia alimentar experimental.....	16
2.3. Procedimentos experimentais de delineamento da pesquisa.....	16
2.3.1. Fase I.....	16
2.3.2. Fase II.....	17
2.3.3. Fase III.....	18
2.4. Biomarcadores de toxicidade.....	20
2.4.1. Mutagenicidade	20
2.4.2. Citotoxicidade	20
2.5. Quantificação de carbono orgânico total.....	23
2.6. Análises estatísticas.....	23
3. RESULTADOS	24
4. DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO	38
6. AGRADECIMENTOS	38
7. REFERÊNCIAS	38

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1- Propriedades gerais dos CNFs fornecidas pelo fabricante.....	15
Tabela 2- Descrições e fórmulas para cálculos dos parâmetros morfométricos relacionados à forma eritrocitária (e de seus núcleos) de <i>O. niloticus</i> , expostas ou não aos CNFs via transferência trófica.....	22
Tabela 3- Morfometria eritrocitária e nuclear de <i>O. niloticus</i> expostas ou não às CNFs via cadeia alimentar.....	33
Figura 1- Sumário esquemático das diferentes etapas do experimento e indicação dos grupos experimentais estabelecidos em cada etapa.....	19
Figura 2- (A) Distribuição dos diâmetros individuais das CNFs, (B) fotomicrografia das CNFs gerada pela técnica de espectroscopia Raman (acoplada a um microscópio) e (C) espectro de Raman das CNFs.....	24
Figura 3- Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de um filme de CNFs em diferentes ampliações.....	25
Figura 4- Imagens de microscopia eletrônica de transmissão em diferentes ampliações. Setas amarelas: extremidades abertas das CNFs; setas brancas: CNFs encurvadas; setas vermelhas: partículas metálicas presentes nas CNFs.....	26
Figura 5- Concentrações de carbono orgânico total no (A) substrato e nas (B) <i>E. fetida</i> expostas ou não às CNFs. As barras representam a média + SEM. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos, após a realização dos testes estatísticos.....	27
Figura 6- Concentrações de carbono orgânico total no (A) fígado e (B) intestino de <i>O. niloticus</i> expostas ou não às CNFs via cadeia alimentar. As barras representam a média + SEM. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos, após a realização dos testes estatísticos.....	28
Figura 7- Fotomicrografias representativas das anormalidades eritrocitárias identificadas em <i>O. niloticus</i> expostas ou não às CNFs via cadeia alimentar. (A) eritrócito normal; (B-C) núcleos com constrição simétrica e assimétrica, respectivamente; (D) núcleo com vacúolo; (E) eritrócito binucleado; (F) núcleo <i>notched</i> ; (G) <i>kidney-shape</i> ; (H) núcleo deslocado; (I-J) núcleo multilobulado; (K) núcleo <i>blebbed</i> ; (L) eritrócito micronucleado e (M-T) outros tipos de anormalidades nucleares.....	29
Figura 8- Frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias do tipo (A) núcleo com constrição, (B) núcleo vacuolar, (C) <i>blebbed</i> , (D) <i>kidney-shape</i> , (E) micronúcleos e (F) outros. As barras representam a média + SEM. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos, após a realização dos testes estatísticos.....	30
Figura 9- Frequência de (A) eritrócitos binucleados, (B) com núcleo multilobulado, (C) deslocado e (D) <i>notched</i> . As barras representam a média + SEM. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos, após a realização dos testes estatísticos.....	31
Figura 10- (A) Área e (B) razão entre a área nuclear e citoplasmática em eritrócitos de <i>O. niloticus</i> expostas ou não às CNFs via cadeia alimentar. As barras representam a média + SEM. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos, após a realização dos testes estatísticos.....	32

31 **Trophic transfer of carbon nanofibers between *Eisenia fetida*, *Danio***
32 ***rerio*, *Oreochromis niloticus* and their toxicity at the last trophic level**

33
34 **ABSTRACT**

35
36 Although the toxicity of carbon-based nanomaterials has already been demonstrated, their
37 transfer in the food chains, as well as their impact on the upper trophic level, is an unexplored
38 theme. Thus, from the experimental food chain “*Eisenia fetida* → *Danio rerio* →
39 *Oreochromis niloticus*” we tested the hypothesis that carbon nanofibers (CNFs) accumulate in
40 animals, are transferred to the upper trophic level, causing mutagenic and cytotoxic changes. For
41 this purpose, *E. fetida* were exposed to CNFs (for 7 days) and then they were offered to *D. rerio*
42 (for 48 h), which subsequently served as food for *O. niloticus* (also for 48 h). The quantification
43 of total organic carbon provided evidence of the accumulation of CNFs at all trophic levels
44 evaluated, suggesting their absorption and translocation via the hepatic portal system. In tilapia
45 exposed to CNFs via the food chain, this accumulation was associated with a higher frequency of
46 erythrocyte nuclear abnormalities, such as constricted erythrocyte nuclei, vacuole, blebbed,
47 kidney-shaped and micronucleated erythrocytes. The frequency of binucleated erythrocytes and
48 displaced nuclei did not differ between tilapia fed with *D. rerio* exposed directly to CNFs and
49 those that ingested *D. rerio* previously fed with contaminated earthworms. In addition, the
50 pollutants' cytotoxicity was inferred by the smaller size of the erythrocyte nuclei and the lower
51 “nuclear/cytoplasmic” area ratio in tilapia exposed to CNFs via the food chain. In this segment,
52 we confirm the initial hypothesis, providing pioneering evidence of the accumulation of CNFs in
53 the trophic levels of the experimental food chain, as well as the mutagenic and cytotoxic effect of
54 these materials in *O. niloticus*.

55 **Keywords:** Water pollution, nanopollutants, food chain, carbon-based nanomaterials.

56 1. INTRODUÇÃO

57 Dentre os produtos da nanotecnologia que têm ganhado destaque internacional
58 destacam-se os nanomateriais de carbono (CNs) [e.g.: nanotubos de carbono (CNTs) e
59 nanofibras de carbono (CNFs)], os quais apresentam amplo potencial de aplicação em diferentes
60 campos industriais, tais como na fabricação de tintas antiincrustantes (Fu et al., 2019), eletrônicos
61 (Zheng et al., 2019; Liu et al., 2019), fármacos (Yoosefian & Jahani, 2019), dispositivos de
62 conversão de energia (Zhuang et al., 2019), sensores (Bhandari, 2019) e materiais de remediação
63 ambiental (Zhu et al., 2019), devido às suas excelentes propriedades térmicas, elétricas e alta
64 superfície de contato (Farré et al. 2011). No entanto, em razão da crescente demanda da aplicação
65 desses nanomateriais estudos têm ponderado os prós- e os contra de suas aplicações, haja vista o
66 potencial risco toxicológico da exposição a eles (Du et al., 2013; Myojo & Ono-Ogasawara, 2018).

67 Logo, isso explica o crescente número de publicações voltadas à avaliação da toxicidade
68 dos CNs, incluindo estudos de toxicologia ocupacional (Beard et al., 2018), estudos in vitro
69 (Snyder-Talkington et al., 2019; Requardt et al., 2019; Zhao et al., 2019; Cheng et al., 2020;
70 Adeyemi et al., 2020) e in vivo, utilizando diferentes modelos experimentais (*Mus musculus* e
71 *Rattus norvegicus* (Lee et al., 2019; Knudsen et al., 2019; Farombi et al., 2020),
72 *Drosophila melanogaster* (Andrade et al., 2014; Pandey et al., 2020), *Danio rerio* (Cheng et al.,
73 2007; Filho et al., 2014; Maes et al., 2014; Girardi et al., 2017); plantas (Andrade et al., 2014;
74 Ghosh et al., 2015), microrganismos (Chen et al., 2018), dentre outros. De um modo geral, esses
75 estudos e tantos outros na literatura [vide revisão em Chen et al. (2018)] demonstram que os
76 efeitos tóxicos dos CNs incluem inibição do crescimento e destruição de partes vegetativas das
77 plantas, alterações no desenvolvimento e crescimento de embriões de origem animal, bem como
78 alterações pulmonares, mutagênicas, citotóxicas, genotóxicas e redução da diversidade
79 microbiana. Assim, esse cenário reforça que embora os CNs proporcionem vários benefícios,
80 seus efeitos sobre os organismos não podem ser desconsiderados, sendo, portanto, necessário
81 que maior atenção seja dada aos impactos ambientais que os CNs podem ocasionar.

82 Entretanto, é notório a disparidade numérica entre os estudos voltados aos diferentes
83 tipos de CNs, sendo muito mais numerosos aqueles com foco nos CNTs [e.g.: single-wall
84 nanotubes (SWNTs) e multi-wall nanotubes (MWNTs)] (Genaidy et al., 2009; Peng et al., 2020).
85 Ao contrário dos CNTs, as CNFs apresentam numerosas bordas planas, expostas ao longo da
86 superfície, que facilitam as interações físicas e químicas com as outras substâncias no meio e
87 apresentam menor custo de produção comparado aos CNTs (Zhao, 2010; Feng et al., 2014).
88 Além disso, as diferenças entre os processos de fabricação desses nanomateriais proporcionam
89 características química-estruturais particulares que podem ser determinantes para sua toxicidade.

90 Aliado a isso, pouco sabemos sobre o impacto ecotoxicológico das CNFs, cujas investigações
91 nessa vertente são essenciais para conhecimento da magnitude dos danos ecossistêmicos que
92 esses nanomateriais podem causar, além de serem essenciais para o desenvolvimento de aspectos
93 regulatórios para seu uso (Du et al., 2013). Conforme sumarizado por Petersen et al. (2011), a
94 grande maioria dos estudos deu enfoque na toxicidade dos CNTs, já tendo sido demonstrado o
95 impacto desses nanomateriais em organismos de distintos habitats ecológicos, tais como
96 *Cucumis sativus* (Shen et al., 2018), *Daphnia magna* (Xu et al., 2019), *Amphiascus tenuiremis*
97 (Ferguson et al., 2008), *Arenicola marina* (Galloway et al., 2010), *Tetrahymena thermophila*
98 (Ghafari et al., 2008; Mortimer et al., 2016), *Drosophila melanogaster* (Philbrook et al., 2011;
99 Ong et al., 2015), *Xenopus laevis* (Mouchet et al., 2008; Mouchet et al., 2010; Bourdiol et al.,
100 2013; Saria et al., 2014), *Chironomus riparius* (Martínez-Paz et al., 2019), *Eisenia fetida* (Calisi et
101 al., 2016; Xu et al., 2019), dentre outros.

102 Um campo de investigação promissor refere-se à possível transferência trófica dos CNs.
103 No entanto, as investigações sobre essa temática envolvendo os CNs são muito escassas, com
104 destaque para os trabalhos de Mortimer et al. (2016) (*Pseudomonas aeruginosa* →
105 *Tetrahymena thermophila*) e Cano et al. (2018) (*Daphnia magna* → *Pimephales promelas*),
106 envolvendo CNTs. Logo, nenhum estudo avaliou a exposição a CNFs entre distintos níveis
107 tróficos. Conforme discutido por Biddinger & Gloss (1984) e Suedel et al. (1994), organismos
108 aquáticos que bioacumulam contaminantes da água podem transferir esses contaminantes para
109 seus potenciais predadores. Portanto, a extensão em que esses contaminantes podem se mover
110 através das redes alimentares aquáticas e, assim, afetar os organismos em níveis tróficos mais altos
111 é uma questão crucial para a tomada de decisões ambientais.

112 Nesse sentido, nosso objetivo foi avaliar a possível transferência trófica das CNFs entre
113 três níveis tróficos (*Eisenia fetida* → *Danio rerio* → *Oreochromis niloticus*) e seus efeitos danosos
114 no nível trófico superior, utilizando biomarcadores de mutagenicidade e citotoxicidade. Partimos
115 da hipótese inicial de que as CNFs podem se acumular nos animais da cadeia alimentar
116 experimental, chegar ao nível trófico superior (*O. niloticus*) e induzir alterações nucleares e
117 morfométricas em eritrócitos circulantes. Acreditamos que nosso estudo possa ser adicionado ao
118 rol de investigações que buscam compreender como os CNs podem afetar os organismos, assim
119 como a dinâmica de suas populações naturais.

120

121

122

123

124 2. MATERIAL E MÉTODOS

125 2.1. Nanofibras de carbono e caracterização

126 Utilizamos em nosso estudo nanofibras de carbono despidas piroliticamente (i.e.:
127 hidrocarbonetos poliaromáticos removidos da superfície da fibra), obtidas comercialmente
128 (Sigma-Aldrich – San Luis, Missouri, EUA, PR-25-XT-OS, MDL number: MFCD00133992). A
129 Tabela 1 apresenta um sumário das propriedades químicas das CNFs. Para confirmação da
130 composição química das CNFs, foi utilizado espectrômetro Raman (Horiba LabRam HR
131 Evolution) equipado com um *Single Mode Open Beam Laser Diode* (Innovative Photonic
132 Solutions) operando em comprimento de onda de 785 nm acoplado a um detector de dispositivo
133 de carga acoplada (Horiba Synapse). Para confirmar o diâmetro das CNFs, foram capturadas
134 imagens sob microscopia eletrônica de transmissão e posteriormente analisadas pelo software
135 ImageJ 1.52av. (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Além disso, as CNFs e seus agregados
136 foram observadas em microscopia eletrônica de varredura com “emissão de campo” [i.e.: *field*
137 *emission electron gun* (FEG)].

138 **Tabela 1.** Propriedades gerais dos CNFs fornecidas pelo fabricante.

Parâmetros	Descrição
Pureza	> 98% a base de carbono
Aparência (coloração)	Preta
Aparência (forma)	Pó Plaquetas cônicas
Fórmula	C
Peso molecular	12,01 g/mol
Impurezas	< 14,00 ppm (Fe)
Tamanho do poro	0,12 cm ³ /g (média do volume do poro) 89,3 Å (média do diâmetro do poro)
Área superficial	54 m ² /g (média da área superficial específica)
Densidade	1,9 g/mL a 25°C
Ponto de fusão	3652-3697 °C
Densidade aparente	0.5-3.5 lb/cu.ft

139 2.2. Modelos animais e cadeia alimentar experimental

140 A cadeia alimentar experimental estabelecida foi composta por três níveis tróficos. O
141 primeiro nível foi composto por minhocas conhecidas popularmente como minhocas vermelhas
142 da Califórnia (*Eisenia fetida*; Lumbricidae). Tais animais são amplamente utilizados como
143 modelos de invertebrados para estudos sobre contaminação de solos e utilizados em protocolos
144 para avaliação tóxica de xenobióticos pela *United States Environmental Protection Agency* (US
145 EPA) e *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) (Unrine et al.,
146 2010). Além disso, as minhocas foram definidas como modelo experimental representativo de
147 invertebrados terrestres que podem servir de alimentos aos peixes (especialmente durante
148 eventos de cheia que podem inundar seus habitats às margens dos rios e riachos) e por serem
149 largamente utilizadas na aquicultura como uma fonte de proteínas alternativa (Musyoka et al.,
150 2019).

151 O segundo nível trófico foi composto por adultos de zebrafish (*Danio rerio*; Cyprinidae)
152 de ambos os sexos, a qual é uma espécie tropical de água doce proveniente dos rios do Sul da
153 Ásia, principalmente do Norte da Índia, Paquistão, Butão e Nepal (Grunwald & Eisen, 2002;
154 Spence et al., 2006; Engeszer et al., 2007), sendo utilizado mundialmente em estudos
155 ecotoxicológicos (Garcia et al., 2016). Já as tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*; Cichlidae)
156 compuseram o terceiro nível trófico em razão de serem um dos predadores vertebrados mais
157 comuns nos sistemas aquáticos dulcícolas (Zambrano et al., 2006), competindo com outros
158 peixes e predando alevinos de diferentes espécies (Morgan et al., 2004), além de também serem
159 largamente utilizadas como sistemas-modelo em estudos ecotoxicológicos (Silva et al., 2017;
160 Campos et al., 2019). Conforme destacado por Popma & Lovshin (1995), as tilápias têm sua
161 distribuição original no centro sul da África para o norte da Síria.

162 2.3. Procedimentos experimentais e delineamento da pesquisa

163 2.3.1. Fase I

164 O delineamento experimental adotado foi composto por diferentes etapas. Na primeira,
165 minhocas *E. fetida*, obtidas do minhocário do Departamento de Solos do Instituto Federal
166 Goiano (IF Goiano) - Câmpus Urutaí (Urutaí, GO, Brasil), foram distribuídas em dois grupos.
167 As minhocas mantidas por sete dias em substrato contendo CNFs compuseram o grupo CNF-
168 EF (onde “EF” refere-se a *E. fetida*) e aquelas não expostas a qualquer poluente constituíram o
169 grupo controle (C-EF) (Figura 1A). Inicialmente as minhocas (n=12/pote) foram colocadas em
170 potes de polipropileno (réplicas) (n=6 réplicas/grupo) contendo 1 kg de substrato (em base seca),
171 similarmente a estudos prévios do nosso laboratório (Malafaia, et al., 2015; Mesak et al., 2018).

172 Tal substrato era composto por 50% de Latossolo Vermelho Distrófico Típico (coletado
173 em área não antropizada do município de Urutaí, GO, Brasil) e 50% de esterco bovino (obtido
174 do setor de Bovinocultura do IF Goiano - Campus Urutaí (Urutaí, GO, Brasil). Esse último foi
175 escolhido como material orgânico do substrato por representar boa fonte de alimento para as
176 minhocas (Aquino et al., 2005). Nos potes do grupo CNF-EF o substrato foi acrescido de CNFs
177 na concentração nominal de 500 µg/g de substrato, definida com base no estudo de Chung et al.
178 (2011). Embora essa concentração seja superior àquelas potencialmente identificadas no
179 ambiente natural (Pertersen, et al., 2009), ela simula um cenário pessimista de poluição com
180 produtos/materiais contendo CNFs.

181 A umidade dos substratos permaneceu entre 30 e 40% [conforme Malafaia et al. (2015)]
182 e a temperatura (27°C) foi mantida constante por meio da inserção dos potes em bandejas com
183 água contendo termostato. Tanto a aclimação das minhocas (7 dias) às condições de
184 laboratório, quanto o período de exposição ocorreu em sala escura (luzes apagadas) e com
185 isolamento acústico. Ao final do período de exposição, as minhocas foram retiradas dos potes,
186 lavadas com água purificada (via osmose reversa), desidratadas (em estufa, 60°C) e,
187 posteriormente, maceradas. Em seguida, o macerado foi pesado e distribuído em porções para
188 alimentação dos animais do nível trófico seguinte (*D. rerio*) (vide detalhes a seguir). Tais porções
189 foram armazenadas em local seco e sob temperatura ambiente, em frascos previamente
190 higienizados com álcool 70%.

191

192 **2.3.2. Fase II**

193 A segunda fase da pesquisa consistiu em distribuir 120 adultos de *D. rerio* (de ambos os
194 sexos, 6-8 meses de idade; 0.2-0.4 g) em três grupos experimentais (n = 40/cada). O primeiro e
195 segundo grupos foram compostos de *D. rerio* mantidos em água desclorada naturalmente
196 (aquários de 10 L), constantemente aerada, sem qualquer poluente, os quais foram alimentados
197 (por dois dias) com minhocas não expostas (i.e.: do grupo C-EF-DR, onde “DR” refere-se a
198 *D. rerio*) e expostas aos CNFs (i.e.: grupo CNF-EF-DR), respectivamente. Já o terceiro grupo
199 (grupo CNF-DIR-DR, onde “DIR” refere-se à exposição direta às nanofibras) foi composto por
200 *D. rerio* mantidos em água contendo CNFs (10 µg/mL) e que receberam como alimento (também
201 por dois dias), minhocas não expostas aos CNFs (Figura 1B). Tal grupo simula um cenário de
202 contaminação aquática por CNFs, cuja concentração foi definida com base nos estudos revistos
203 por Jackson et al. (2013) e Saria et al. (2014). Todos os *D. rerio* foram obtidos em criadouro
204 comercial (Goiânia, GO, Brasil) e mantidos em aclimação às condições de laboratório por um
205 período de 30 dias anterior ao início do experimento.

206 Vale salientar que adotamos o sistema estático de exposição, i.e., as águas dos aquários
207 não foram renovadas durante o experimento. Já as porções de minhocas foram oferecidas quatro
208 vezes ao dia (por um período de 48 h), cujas quantidades foram correspondentes à 8% da
209 biomassa corpórea fresca de cada *D. rerio*. Ao final do período de exposição, os *D. rerio* também
210 foram lavados, desidratados e macerados, sendo posteriormente distribuídos em porções que
211 serviram de alimento para as tilápias-do-Nilo (vide detalhes a seguir). Todas as porções de
212 *D. rerio* também foram armazenadas em local seco e sob temperatura ambiente, em frascos
213 previamente identificados e higienizados.

214

215 2.3.3. Fase III

216 Essa fase consistiu inicialmente em distribuir 30 tilápias (*O. niloticus*) de ambos os sexos
217 (proporção 1:1) (8,48 g; fase juvenil), obtidas no Departamento de Piscicultura do IF Goiano -
218 Campus Urutaí (Urutaí, GO, Brasil) e previamente aclimatados às condições de laboratório (por
219 15 dias) em três grupos experimentais (Figura 1C) (n=10/cada). Os animais que receberam
220 *D. rerio* alimentados com minhocas do grupo controle, compuseram o grupo C-EF-DR-ON
221 (onde “DR” refere-se à *D. rerio* e “ON” à *O. niloticus*). As tilápias que receberam *D. rerio*
222 alimentados previamente com minhocas expostas aos CNFs constituíram o grupo CNF-EF-DR-
223 ON. Já o grupo CNF-DIR-DR-ON foi composto por tilápias alimentadas com *D. rerio* expostos
224 diretamente à água contendo CNFs.

225 Os animais de todos os grupos foram mantidos individualmente em aquários cilíndricos
226 (2,2 L), com água desclorada desprovida de poluentes, com aeração constante. A alimentação
227 das tilápias ocorreu quatro vezes ao dia, por um período de 48 h, por meio do oferecimento de
228 porções do macerado dos *D. rerio*, conforme descrito anteriormente. A quantidade (em g) de
229 cada porção foi proporcional à 8% da biomassa corpórea de cada tilápia. A opção por manter as
230 tilápias individualmente deu-se em função desses animais apresentarem comportamento
231 territorialista acentuado (Volpato et al., 1989). Nesse caso, a manutenção desses animais em
232 grupos em um mesmo aquário poderia restringir o acesso à comida dos indivíduos submissos
233 pelos dominantes. Além disso, a individualização dos animais contribuiu para a minimização de
234 outros efeitos da subordinação social e estresse, como a redução de apetite e aumento da
235 susceptibilidade a doenças (Barton, 1997).

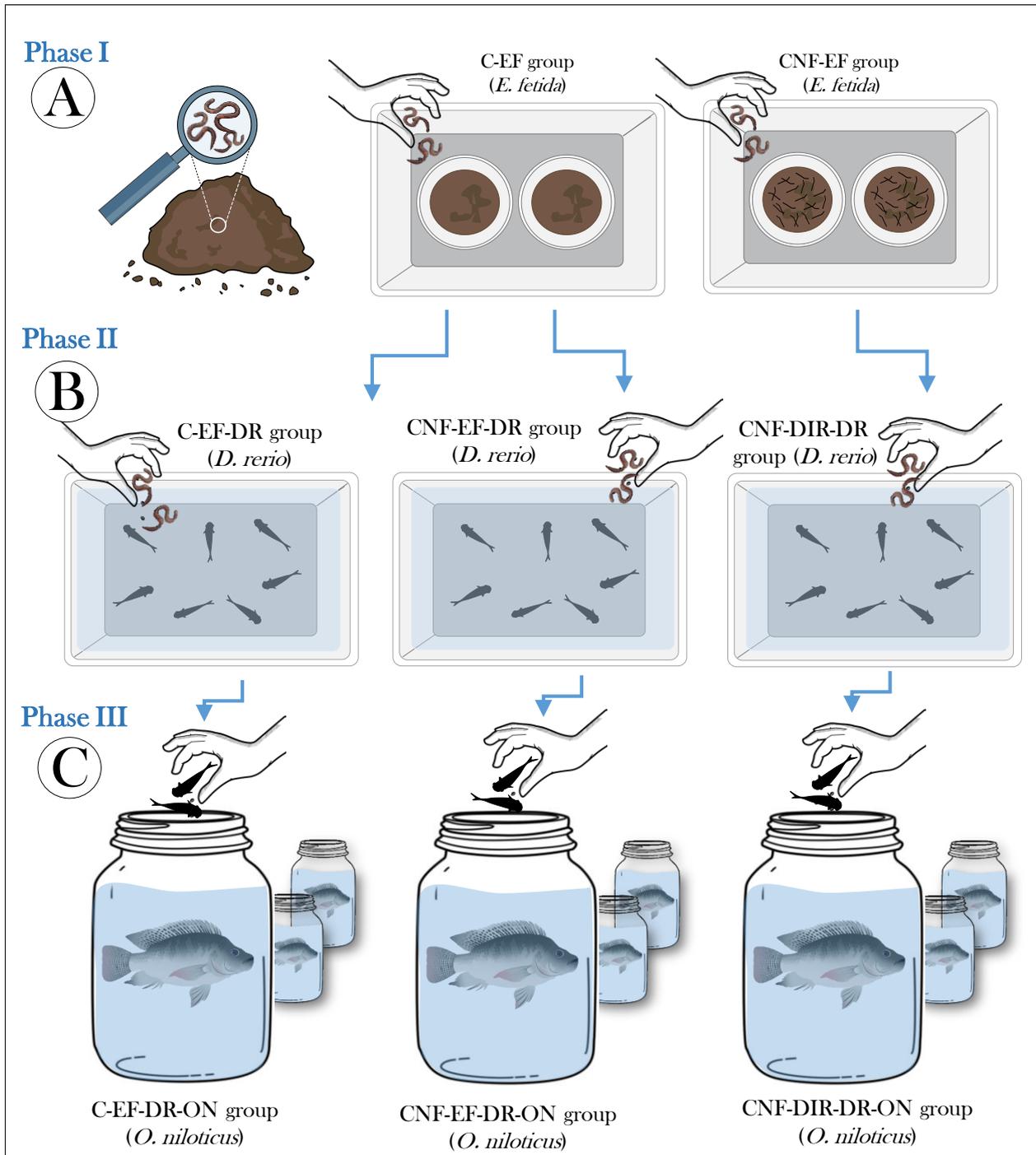


Figura 1. Sumário esquemático das diferentes etapas do experimento e indicação dos grupos experimentais estabelecidos em cada etapa.

C-EF: minhocas *E. fetida* (EF) não expostas aos CNFs; CNF-EF: minhocas *E. fetida* expostas aos CNFs; C-EF-DR: peixes *D. rerio* (DR) alimentados com minhocas *E. fetida* (EF) não expostas aos CNFs; CNF-EF-DR: peixes *D. rerio* (DR) alimentados com minhocas *E. fetida* (EF) expostas aos CNFs; CNF-DIR-DR: peixes *D. rerio* (DR) expostos diretamente (DIR) aos CNFs; C-EF-DR-ON: peixes *O. niloticus* (ON) alimentados com *D. rerio* (DR) que ingeriram minhocas *E. fetida* (EF) não expostas aos CNFs; CNF-EF-DR-ON: peixes *O. niloticus* (ON) alimentados com *D. rerio* (DR) que ingeriram minhocas *E. fetida* (EF) expostas aos CNFs; CNF-DIR-DR-ON: peixes *O. niloticus* (ON) alimentados com *D. rerio* (DR) expostos diretamente aos CNFs. As cores são meramente ilustrativas.

236 **2.4. Biomarcadores de toxicidade**

237 Para avaliação da toxicidade dos CNFs no último nível trófico da cadeia experimental
238 (tilápias) utilizamos biomarcadores de mutagenicidade (teste do micronúcleo e outras
239 anormalidades nucleares eritrocitárias) e de citotoxicidade (morfometria eritrocitária), conforme
240 especificações a seguir.

241

242 **2.4.1. Mutagenicidade**

243 Ao final do período de exposição, realizamos o teste do micronúcleo e outras
244 anormalidades nucleares para avaliação do potencial efeito mutagênico dos CNFs sobre as
245 tilápias. Para isso, adotamos metodologia similar à de Souza & Fontanetti (2006) e Özkan et al.
246 (2011). Resumidamente, 100 µL de sangue de cada animal foram coletados (via punção cardíaca)
247 para a confecção de esfregaços sanguíneos em lâmina previamente higienizada (duas lâminas por
248 animal). Em seguida, as lâminas foram fixadas em metanol a frio 100% (v/v) e coradas com
249 Panótico Rápido® (New Prov), conforme também realizado por Souza et al. (2017) e Kampke
250 et al. (2018). A análise dos eritrócitos ocorreu a cegas e de forma randomizada, utilizando
251 microscopia óptica (Nikon E100 LED, Minato, Tóquio, Japão) e lentes em imersão (objetiva de
252 100x). Foram contados 2000 eritrócitos por animal e apenas células não sobrepostas com
253 membrana celular e nuclear intactas foram utilizadas na avaliação. Durante a avaliação das
254 lâminas, a identificação de cada anormalidade nuclear foi sendo registrada [conforme Carasso et
255 al. (1990)], incluindo a formação de micronúcleos.

256

257 **2.4.2. Citotoxicidade**

258 Para avaliação da citotoxicidade induzida pelos CNFs realizamos a avaliação
259 morfométrica dos eritrócitos das tilápias utilizando o software ImageJ 1.52av, conforme
260 metodologia adotada por Gomes et al. (2020) e Araújo et al. (2020), com pequenas modificações.
261 Resumidamente, foram obtidas cinco fotomicrografias de campos aleatórios de visão de cada
262 lâmina confeccionada conforme descrito anteriormente, totalizando 50 fotomicrografias por
263 grupo experimental. Em seguida, essas imagens eram abertas no software ImageJ e convertidas
264 para um formato de 8 bits (escala de cinza) e sujeito a limiar automático, que converte imagens
265 em escala de cinza no modo binário (preto e branco) usando um valor de corte estabelecido por
266 algoritmos. Os artefatos eram eliminados e utilizando o comando “*analyze particles*” no ImageJ,
267 identificamos e contamos as partículas *thresholded* (no nosso caso, ilhas de pixels pretos). Esse
268 procedimento foi realizado tanto para as análises dos eritrócitos, quanto e de seus núcleos. Em
269 cada campo de análise 100 células eram medidas, totalizando 5000 eritrócitos/grupo.

270 As variáveis morfométricas de tamanho foram: área citoplasmática e nuclear (em μm^2 e
271 μm^3 , respectivamente) e razão entre a área “nuclear”/”citoplasmático”. Já para avaliação de
272 possíveis alterações na forma das células, os seguintes parâmetros foram avaliados: circularidade,
273 redondeza, alongamento, solidicidade e *aspect ratio*, considerando as descrições e as equações
274 apresentadas na Tabela 2. Tais parâmetros têm sido utilizados como biomarcadores sensíveis de
275 citotoxicidade (Veira et al., 2019; Araújo et al., 2019; Gomes et al., 2020; Araújo et al., 2020).
276

277 **Tabela 2.** Descrições e fórmulas para cálculos dos parâmetros morfométricos relacionados à forma eritrocitária (e de seus núcleos) de *O. niloticus*,
 278 expostas ou não aos CNFs via transferência trófica.

Parâmetro	Descrição	Fórmulas
Circularidade	Circularidade (C), é definida como o grau em que a partícula é semelhante a um círculo, levando em consideração a suavidade do perímetro. Isso significa que a circularidade é uma medida da forma e da rugosidade das partículas. Assim, quanto mais distanciada de um círculo suave e perfeitamente redondo uma partícula se torna, menor o valor da circularidade (Olson, 2011).	$C = 4 \times \frac{\text{Área}}{\text{Perímetro}^2}$ (Eq. 1)
Redondeza	A redondeza pode ser estimada com uma abordagem baseada em fundição por raio. Raios distribuídos uniformemente são traçados do centro do objeto até alguns pontos de amostra em sua superfície. Para cada raio, é calculada a diferença entre a distância do centro ao ponto de amostra correspondente e o raio de uma forma de referência nesse ponto. Então, a redondeza é estimada como uma média dessas distâncias (Cruz-Matías et al., 2019).	$R = 4 \times \frac{\text{Área}}{\pi \times [\text{Major axis}]^2}$ (Eq. 2)
Elongamento	O alongamento (E) de um círculo é zero e de uma elipse com a razão dos eixos 1: 2 é igual a um. O alongamento cresce para as elipses com um aumento na proporção dos eixos maior e secundário (Mikli-Valdek et al., 2001).	$E = \text{Log}_2 \left(\frac{\text{Major axis length} - \text{Legendre ellipse}}{\text{Minor axis length} - \text{Legendre ellipse}} \right)$ (Eq. 3)
Solidicidade	Solidicidade (S) é a medida da concavidade geral de uma partícula. Assim, à medida que a partícula se torna mais sólida, a área da imagem e a área convexa da partícula se aproximam, resultando em um valor de solidicidade um. No entanto, à medida que a forma da partícula se desvia de um círculo fechado, a área convexa aumenta e a solidicidade calculada diminui (Olson, 2011).	$S = \frac{\text{Área}}{\text{Convex hull area}}$ (Eq. 4)
<i>Aspect ratio</i>	A <i>aspect ratio</i> (RARA) é uma função de mais de um fator e usada historicamente como uma maneira de classificar a forma geral de partículas (por exemplo, equante, acicular ou fibrosa) (Olson, 2011).	$AR = \frac{\text{Feret's minimum length}}{\text{Feret's maximum length}}$ (Eq. 5)

279

280 2.5. Quantificação de carbono orgânico total

281 Visando associar possíveis alterações mutagênicas e citotóxicas com o acúmulo das
282 nanofibras, medimos o teor de *total organic carbon* (TOC) em fragmentos de fígado, músculo
283 esquelético caudal, cérebro e intestino das tilápias como indicativo da presença das CNFs,
284 conforme também quantificado por Schwab et al. (2011). Para isso, adotamos o método de
285 Walkley-Black, o qual utiliza o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) (Cr VI) em meio ácido como oxidante
286 (Walkley & Black, 1934), com algumas adaptações. Resumidamente, fragmentos dos órgãos
287 eram pesados e transferidos para frascos de erlenmeyer de vidro (capacidade volumétrica de 125
288 mL), no qual foram adicionados 4 mL de solução de dicromato de potássio e, posteriormente,
289 em capela de exaustão, adicionados 8 mL de ácido sulfúrico. Após 30 min, 80 mL of água
290 purificada (via osmose reversa), 2 mL de ácido ortofosfórico e três gotas do indicador
291 difenilamina foram adicionados ao sistema. Posteriormente, o sistema foi titulado usando uma
292 solução de sulfato ferroso de amônio até a cor mudar de azul para verde. Além disso, uma
293 amostra em branco (solução sem a presença da amostra) também foi titulada. Posteriormente,
294 aplicou-se as fórmulas seguintes para a quantificação do TOC:

$$295 \quad [\text{Fe}]^{+2} = \frac{(4 \times 0.167 \times 6)}{V_{bs}} \quad (\text{Eq. 6})$$

296

$$297 \quad \text{TOC (g/kg)} = \frac{(V_{bs} - V_n) \times [\text{Fe}]^{+2} \times 3}{0.2} \quad (\text{Eq. 7})$$

298

299 onde “V_{bs}” é o volume (em mL) usado na titulação da amostra “branco” e “V_n” é o volume (em
300 mL) usado na titulação do sistema de cada amostra.

301

302 2.6. Análises estatísticas

303 Inicialmente a normalidade residual e a homocedasticidade de todos os dados foi
304 verificada utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene, respectivamente. Os dados
305 paramétricos foram submetidos à *one-way ANOVA*, com pós-teste de Tukey e o teste de
306 Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não-paramétricos, utilizando o
307 teste de Dunn’s como pós-teste (ambos a 5% de probabilidade). Já os dados relativos à
308 quantificação de TOC nas amostras de substrato e nas minhocas foram analisados pelo teste t de
309 *Student* (para os dados paramétricos) e pelo teste Mann-Whitney (aplicado aos dados não-
310 paramétricos), ambos a 5% de probabilidade. As análises estatísticas e elaboração dos gráficos
311 foram conduzidas no software GraphPad Prism (versão 7.0).

312

313 3. RESULTADOS

314 Observamos nas análises de caracterização que as CNFs apresentaram diâmetro médio
315 de $86,85 \pm 1,80$ nm [média \pm standard error of the mean (SEM)], sendo que quase 80% delas
316 apresentaram valores na faixa de 60 a 100 nm (Figura 2), o que vai ao encontro às especificações
317 do fabricante (< 130 nm). Em relação à espectroscopia Raman, a varredura por área na superfície
318 da amostra (Figura 2B) permitiu a obtenção do espectro de Raman, no qual a *G-band/D-band*
319 *ratio* foi de aproximadamente 1.1, o que é compatível com as informações químicas estruturais
320 das CNFs. Na Figura 2C é mostrado o espectro de Raman correspondente a um ponto da
321 superfície analisada, onde houve a deposição do filme de CNFs, podendo-se observar a presença
322 da banda D, referente a estruturas defeituosas de grafite (1336 cm^{-1}) e a banda G (1750 cm^{-1}),
323 referentes a estruturas cristalinas de grafite, além da banda G' (2654 cm^{-1}).

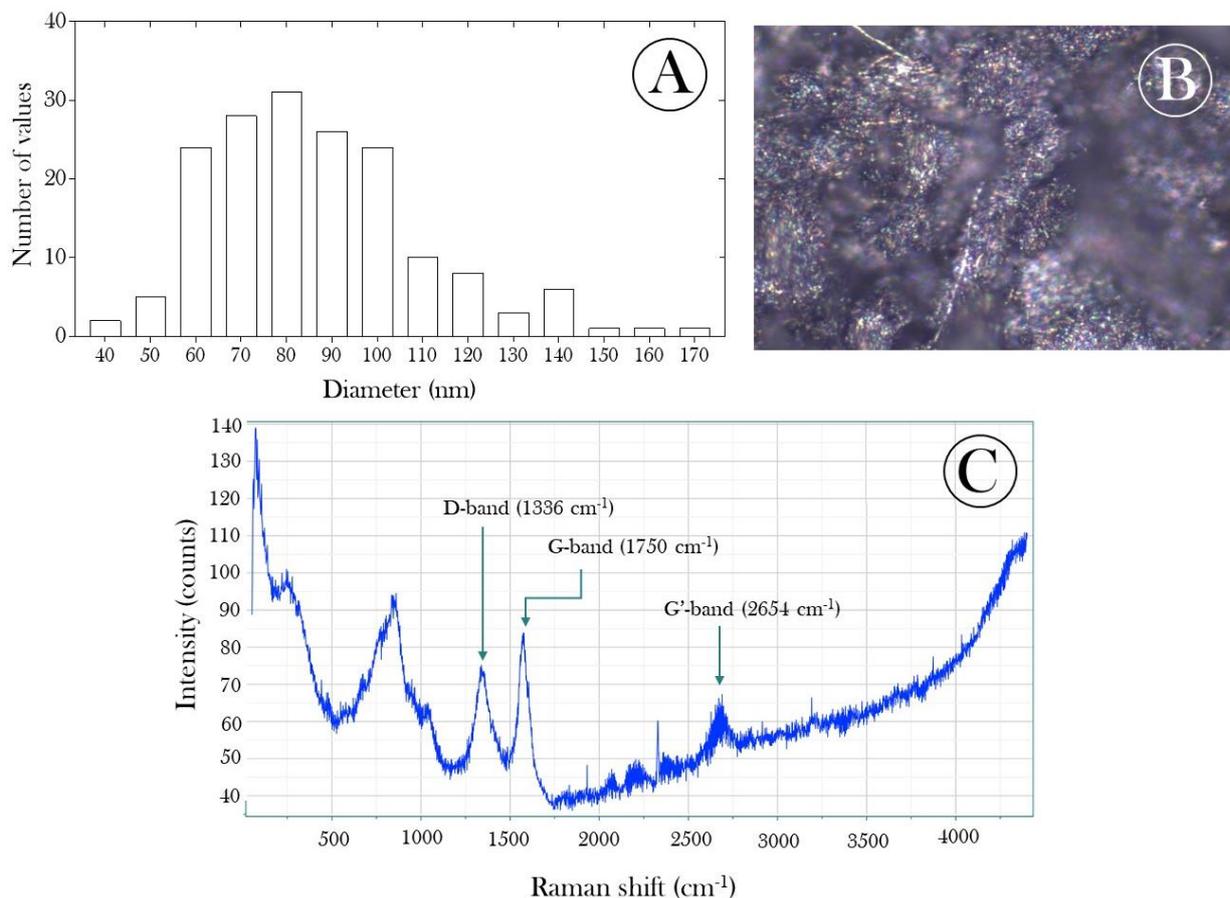


Figura 2. (A) Distribuição dos diâmetros individuais das CNFs, (B) fotomicrografia das CNFs gerada pela técnica de espectroscopia Raman (acoplada a um microscópio) e (C) espectro de Raman das CNFs .

324

325 Pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, observamos a presença de
326 aglomerados de CNFs dispersos nos filmes depositados sobre os substratos de vidro (Figura 3) e

327 as eletromicrografias de transmissão revelaram a presença de diferentes formas das nanofibras,
328 incluindo aquelas com extremidades abertas (Figura 4A-B - vide setas amarelas) e algumas com
329 curvaturas evidentes (Figura 4A - vide setas brancas), o que é ocasionalmente observado em
330 *pristine nanofibers*. Além disso, é possível observar a presença de partículas metálicas utilizadas
331 como catalisadores [Ca (140 ppm), Si (30 ppm), S (10200 ppm), Na (40 ppm), Mg (40 ppm) e
332 Fe (11372 ppm), conforme informado pelo fabricante] (Figura 4C - setas vermelhas) e a Figura
333 4D-E mostra a estrutura de grafite com espaçamento entre camadas de 0.131 ± 0.002 nm (média
334 \pm SEM).

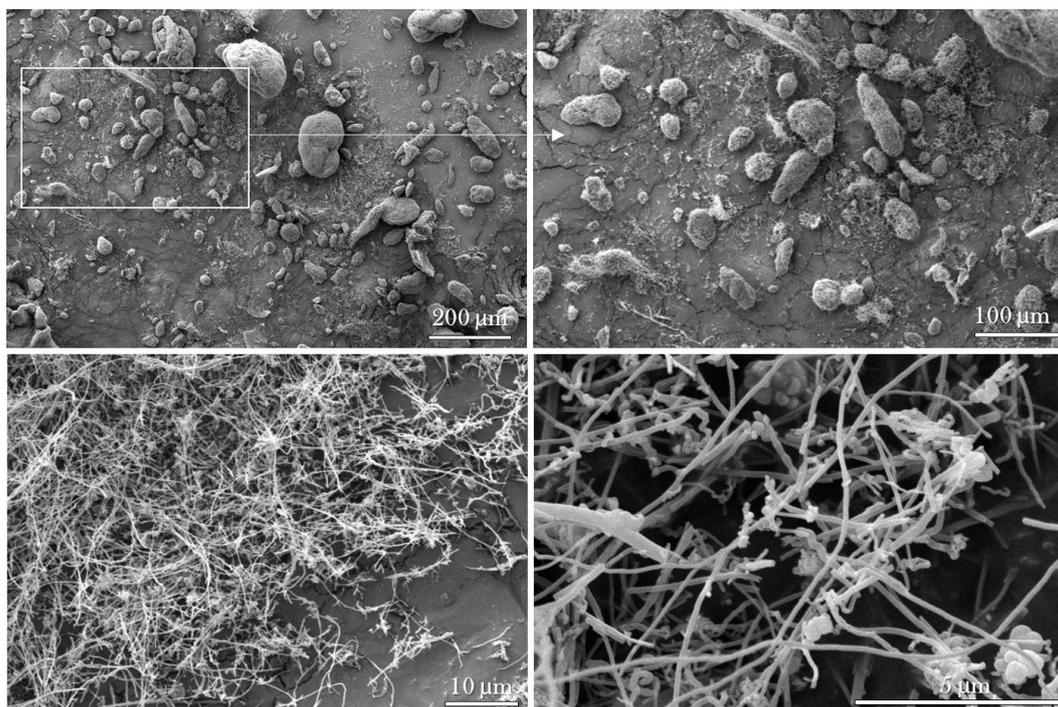


Figura 3. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de um filme de CNFs em diferentes ampliações.

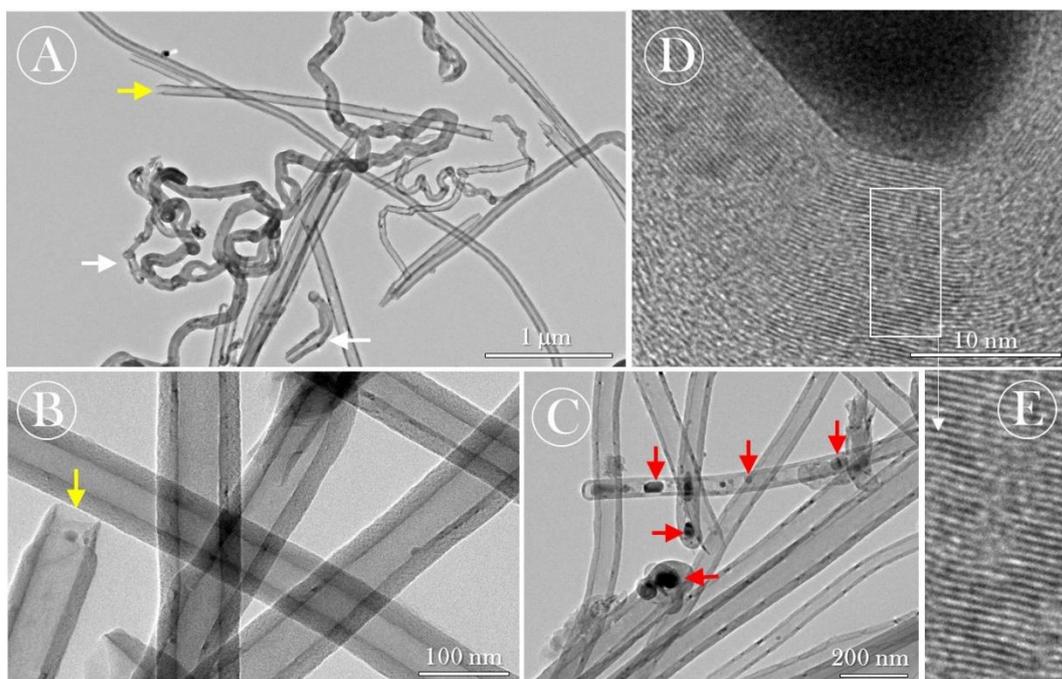


Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão em diferentes ampliações. Setas amarelas: extremidades abertas das CNFs; setas brancas: CNFs encurvadas; setas vermelhas: partículas metálicas presentes nas CNFs.

335

336 Em relação à quantificação de carbono, observamos que os substratos enriquecidos com
 337 as CNFs apresentaram maior concentração de TOC (Figura 5A), o que provavelmente explica o
 338 acúmulo dos nanomateriais nas minhocas mantidas nesses substratos (Figura 5B). Além disso,
 339 observamos que os *D. rerio* que ingeriram minhocas expostas às CNFs apresentaram maior
 340 concentração de TOC (Figura 5C), assim como as tilápias que ingeriram esses *D. rerio* (Figura
 341 6A-B), o que sugere que os nanomateriais foram transferidos do primeiro para o segundo e do
 342 segundo para o terceiro nível trófico da cadeia alimentar experimental. Embora a ingestão de
 343 *D. rerio* expostos diretamente às CNFs não tenha induzido aumento de TOC nas tilápias, as
 344 concentrações observadas no fígado e no intestino desses animais foram superiores às observadas
 345 nas tilápias do grupo controle (C-EF-DR-ON group) (Figura 6A-B). Logo, esses resultados
 346 também são sugestivos de acúmulo das CNFs nas tilápias a partir da ingestão de *D. rerio* expostos
 347 a esses nanomateriais. Além disso, observamos maiores concentrações de TOC no fígado das
 348 tilápias, em comparação àquelas identificadas no intestino (Figura 6C).

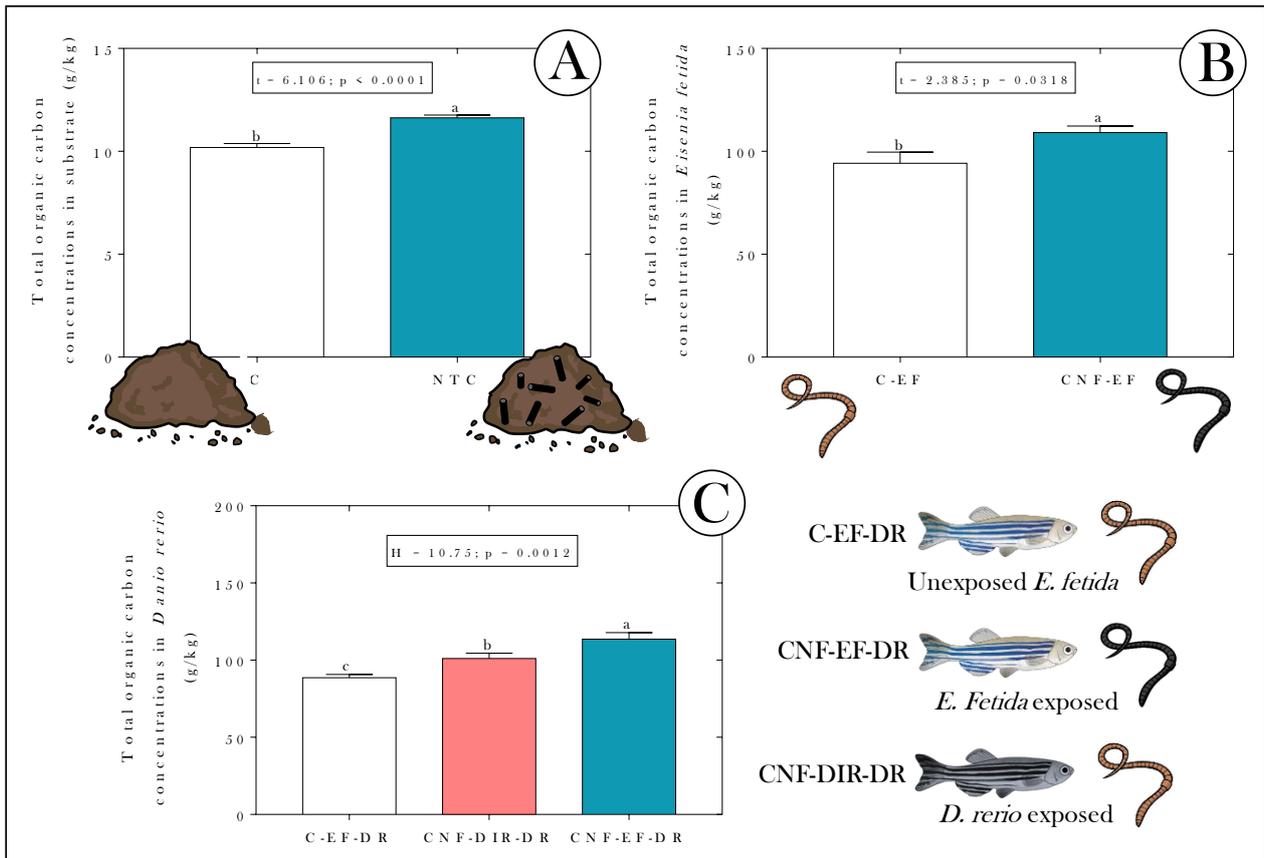


Figura 5. Concentrações de carbono orgânico total no (A) substrato e nas (B) *E. fetida* expostas ou não às CNFs. As barras representam a média + SEM. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos, após a realização dos testes estatísticos.

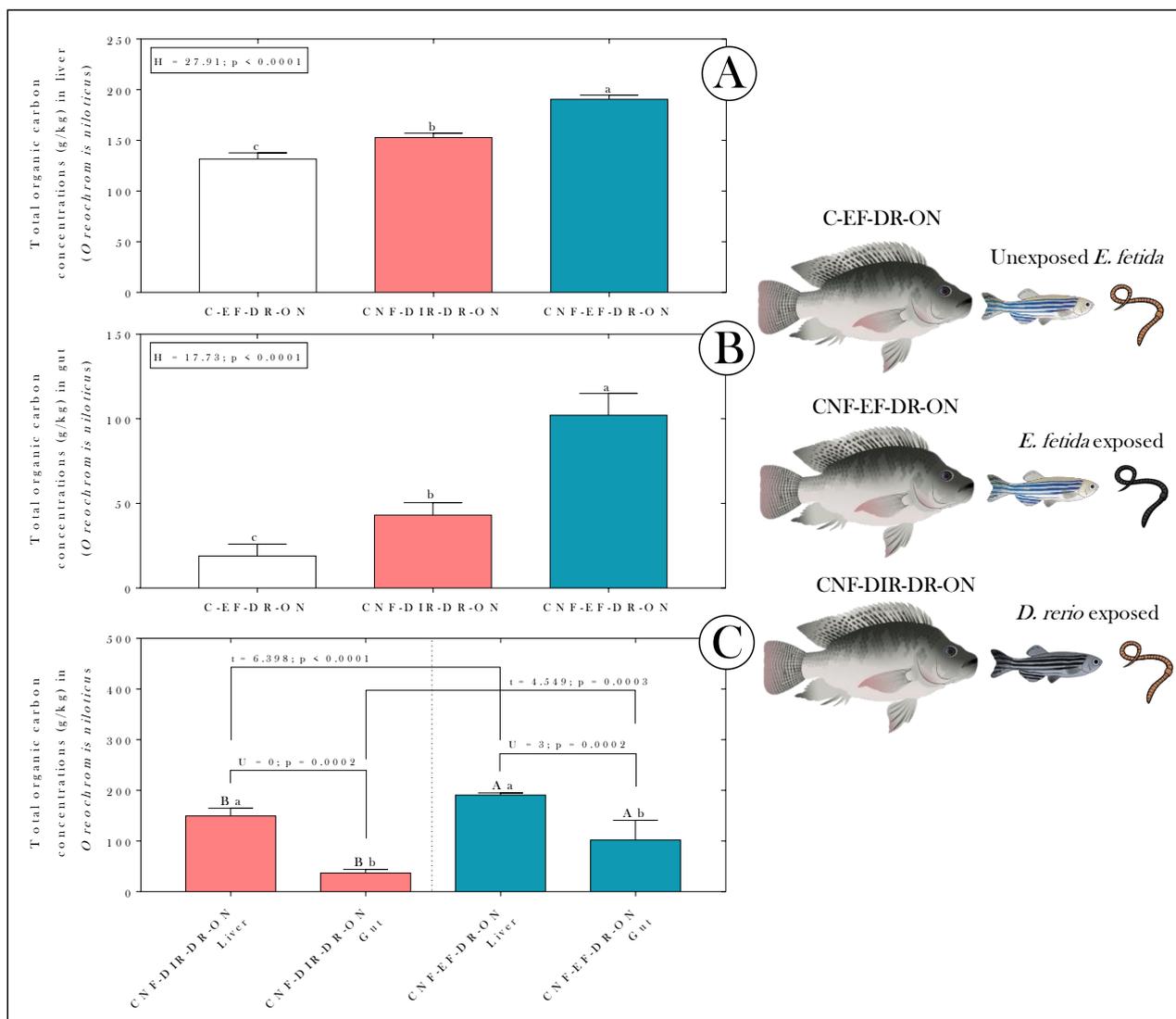


Figura 6. Concentrações de carbono orgânico total no (A) fígado e (B) intestino de *O. niloticus* expostas ou não às CNFs via cadeia alimentar. As barras representam a média + SEM. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos, após a realização dos testes estatísticos.

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

Em relação aos biomarcadores de toxicidade, observamos novamente que as tilápias que ingeriram *D. rerio* previamente alimentos com *E. fetida* contaminadas (grupo CNF-EF-DR-ON) foram aquelas que apresentaram maior frequência de anormalidades nucleares, seguidas das tilápias alimentadas com *D. rerio* expostos diretamente aos CNFs (Figura 5C). Portanto, esses dados sugerem efeito mutagênico superior nas tilápias expostas às CNFs a partir das minhocas contaminadas. Nas tilápias com maiores concentrações de TOC observamos distintas anormalidades nucleares eritrocitárias, as quais incluíram: núcleos com constrição (simétrica ou assimétrica), com vacúolo, eritrócitos binucleados, com núcleo *blebbled*, *notched*, *kidney-shaped*, deslocado, multilobulado, eritrócitos micronucleados, bem como outras anormalidades

360 cujos formatos são pouco comuns (Figuras 7). A frequência de núcleos com constrição, vacúolo,
361 *blebbed*, *kidney-shaped* e eritrócitos micronucleado foi superior nas tilápias expostas às CNFs
362 via cadeia alimentar a partir das minhocas contaminadas (grupo CNF-EF-DR-ON) (Figura 8). Já
363 a frequência de núcleos deslocados, *notched*, eritrócitos binucleados e de “outras anormalidades”
364 não diferiu entre as tilápias alimentadas com *D. rerio* expostos diretamente às CNFs e aquelas
365 que ingeriram *D. rerio* previamente alimentados com minhocas expostas aos nanomateriais
366 (Figura 9).

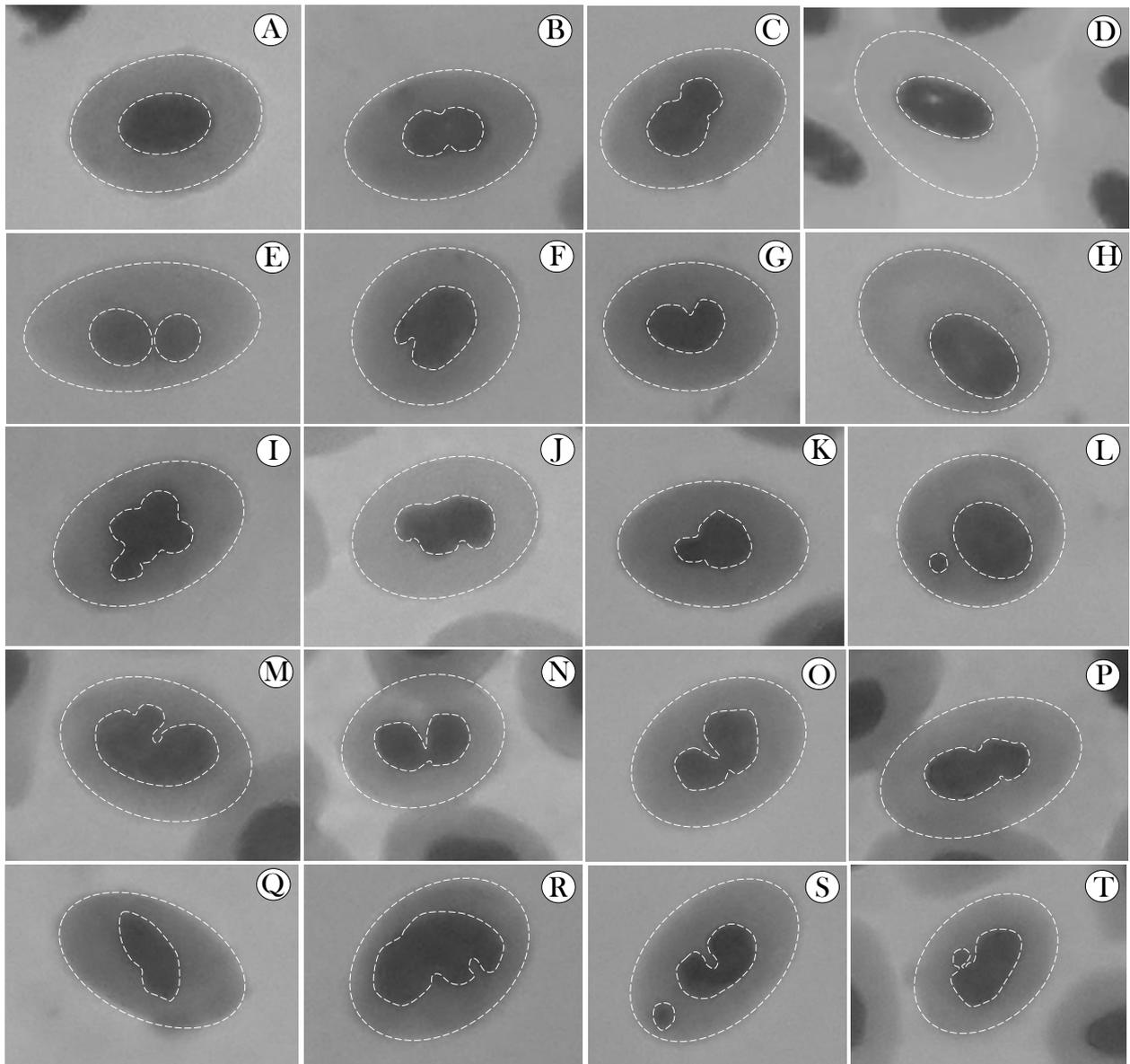


Figura 7. Fotomicrografias representativas das anormalidades eritrocitárias identificadas em *O. niloticus* expostas ou não às CNFs via cadeia alimentar. (A) eritrócito normal; (B-C) núcleos com constrição simétrica e assimétrica, respectivamente; (D) núcleo com vacúolo; (E) eritrócito binucleado; (F) núcleo *notched*; (G) *kidney-shape*; (H) núcleo deslocado; (I-J) núcleo multilobulado; (K) núcleo *blebbed*; (L) eritrócito micronucleado e (M-T) outros tipos de anormalidades nucleares.

368 A frequência de núcleos com constrição (Figura 8A), vacúolo (Figura 8B), *blebbed*
 369 (Figura 8C), *kidney-shaped* (Figura 8D) e eritrócitos micronucleados (Figura 8E) foi superior nas
 370 tilápias expostas às CNFs via cadeia alimentar a partir das minhocas contaminadas (grupo CNF-
 371 EF-DR-ON) (Figura 8). Já a frequência de eritrócitos binucleados (Figura 9A), com núcleos
 372 deslocados (Figura 9C), *notched* (Figura 9D), e de “outras anormalidades” (Figura 8F) não diferiu
 373 entre as tilápias alimentadas com *D. rerio* expostos diretamente às CNFs e aquelas que ingeriram
 374 *D. rerio* previamente alimentados com minhocas expostas aos nanomateriais.

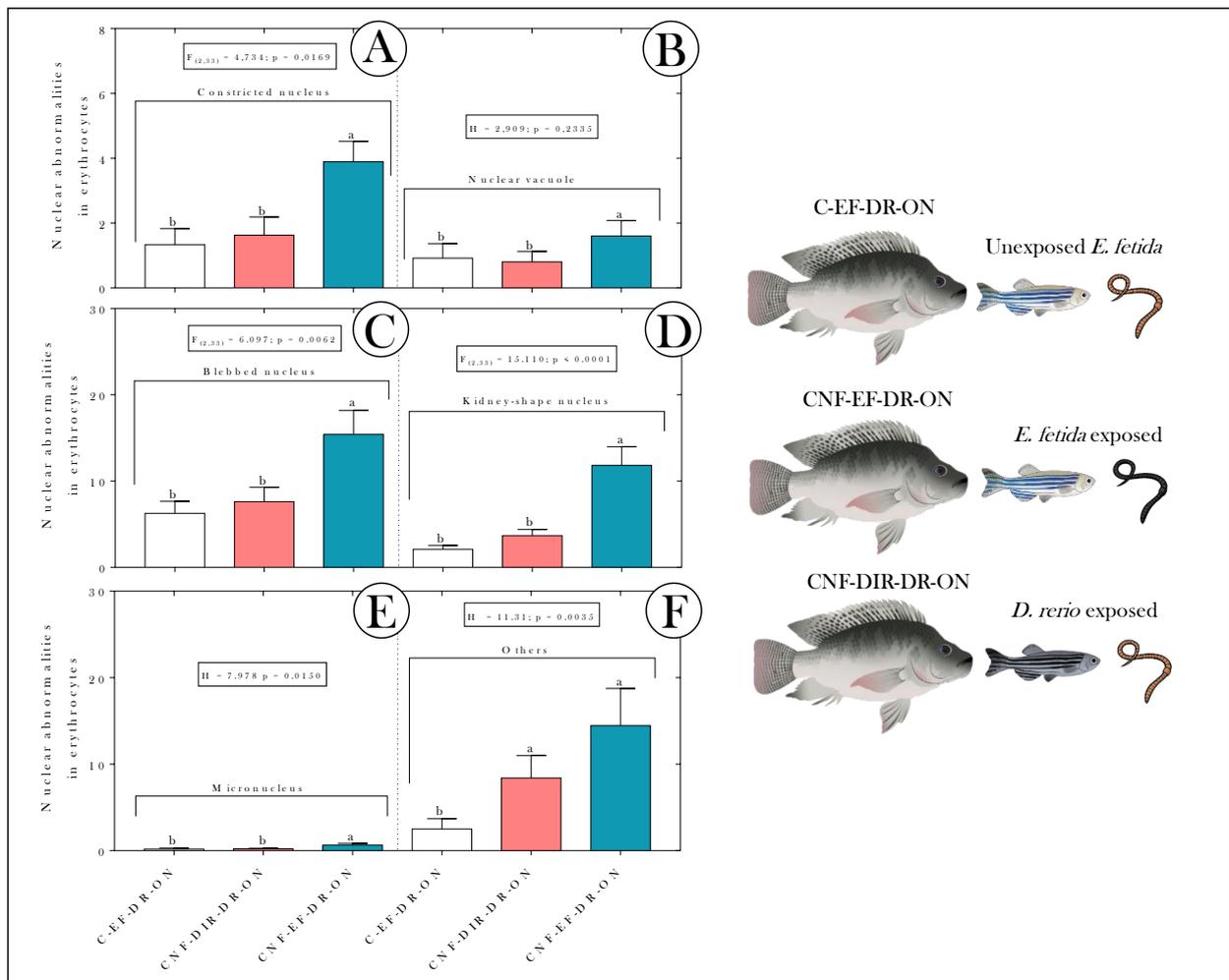


Figura 8. Frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias do tipo (A) núcleo com constrição, (B) núcleo vacuolar, (C) *blebbed*, (D) *kidney-shape*, (E) micronúcleos e (F) outros. As barras representam a média + SEM. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos, após a realização dos testes estatísticos.

375

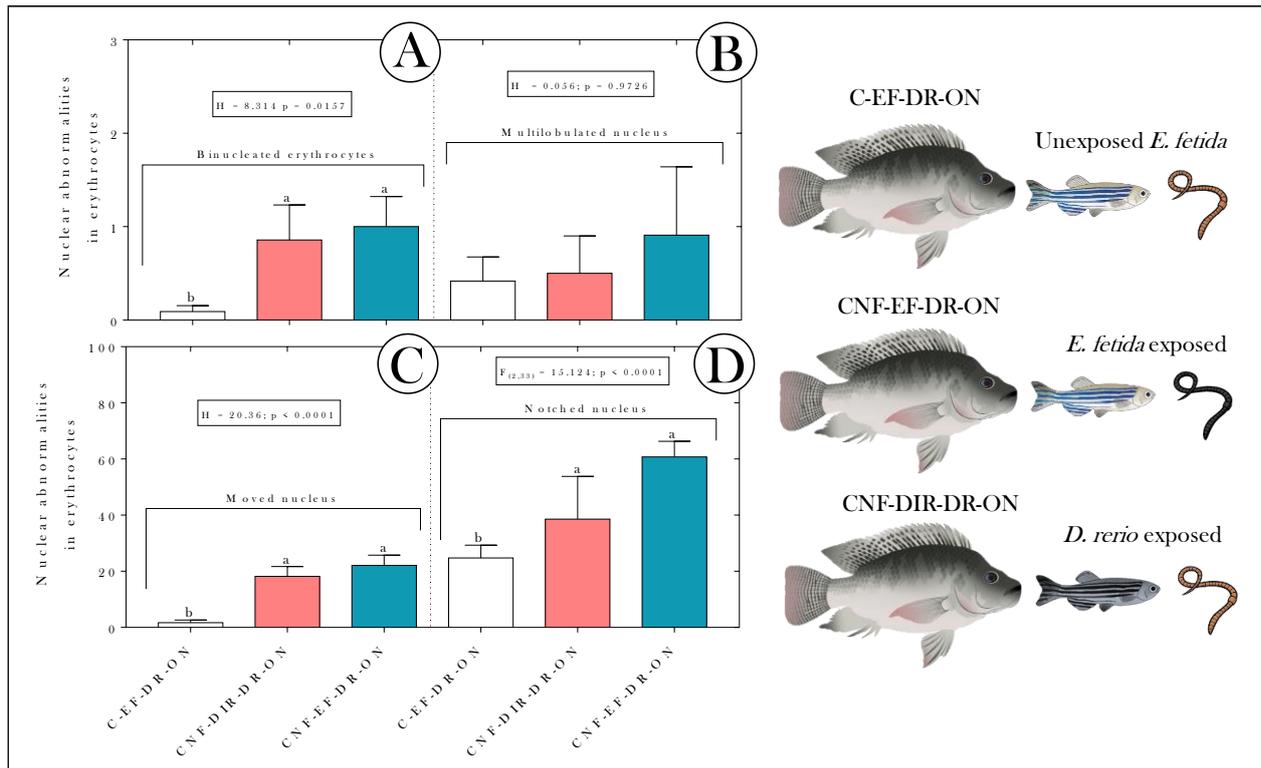


Figura 9. Frequência de (A) eritrócitos binucleados, (B) com núcleo multilobulado, (C) deslocado e (D) *notched*. As barras representam a média + SEM. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos, após a realização dos testes estatísticos.

376

377

378

379

380

381

382

383

Quanto à morfometria eritrocitária, não observamos alterações na forma das células, evidenciado pela ausência de diferença entre os tratamentos quanto aos parâmetros circularidade, redondeza, alongamento, silidicidade e aspect ratio (Tabela 2). No entanto, as tilápias que ingeriram *D. rerio* expostos diretamente aos nanomateriais (grupo CNF-DIR-DR-ON) e aquelas alimentadas com *D. rerio* que ingeriram minhocas expostas às CNFs (grupo CNF-EF-DR-ON) (Figura 10A) apresentaram menor tamanho dos núcleos eritrocitários e menor razão da área “nuclear/citoplasmática” (Figura 10B), o que sugere efeito citotóxico das CNFs.

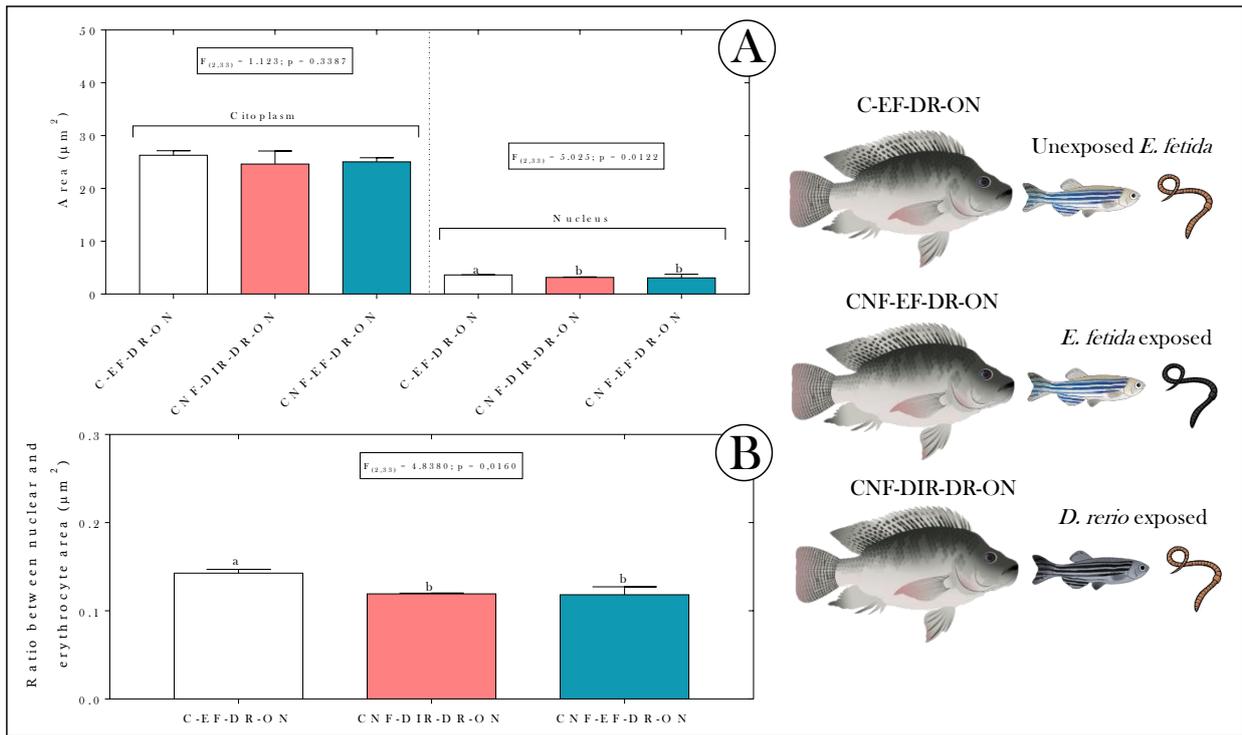


Figura 10. (A) Área e (B) razão entre a área nuclear e citoplasmática em eritrócitos de *O. niloticus* expostas ou não às CNFs via cadeia alimentar. As barras representam a média + SEM. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos, após a realização dos testes estatísticos.

385 **Tabela 3.** Morfometria eritrocitária e nuclear de *O. niloticus* expostas ou não às CNFs via cadeia alimentar.

Parâmetros	Grupos experimentais			Sumário estatístico**	
	C-EF-DR-ON*	CNF-DIR-DR-ON*	CNF-EF-DR-ON*		
Circularidade	Citoplasma	0,854 ± 0,001	0,857 ± 0,010	0,866 ± 0,002	H = 3,9300; p = 0,1110
	Núcleo	0,856 ± 0,004	0,856 ± 0,004	0,854 ± 0,002	F _(2,33) = 0,0958; p = 0,9089
Redondeza	Citoplasma	0,653 ± 0,004	0,664 ± 0,003	0,664 ± 0,005	H = 3,5120; p = 0,1727
	Núcleo	0,661 ± 0,011	0,654 ± 0,011	0,641 ± 0,006	F _(2,33) = 0,9805; p = 0,3855
Elongamento	Citoplasma	0,627 ± 0,008	0,601 ± 0,009	0,600 ± 0,011	H = 4,373; p = 0,1123
	Núcleo	0,551 ± 0,021	0,592 ± 0,020	0,585 ± 0,024	F _(2,33) = 0,8259; p = 0,4464
Solidicidade	Citoplasma	0,943 ± 0,008	0,936 ± 0,007	0,943 ± 0,001	H = 0,8712; p = 0,6469
	Núcleo	0,940 ± 0,003	0,943 ± 0,001	0,945 ± 0,001	H = 3,263; p = 0,1956
<i>Aspect ratio</i>	Citoplasma	0,653 ± 0,004	0,664 ± 0,004	0,664 ± 0,005	H = 3,512; p = 0,1720
	Núcleo	0,690 ± 0,009	0,670 ± 0,008	0,672 ± 0,010	H = 0,9800; p = 0,3850

386 *C-EF-DR-ON: peixes *O. niloticus* (ON) alimentados com *D. rerio* (DR) que ingeriram minhocas *E. fetida* (EF) não expostas aos CNFs; CNF-EF-DR-ON: peixes *O. niloticus* (ON) alimentados com *D. rerio* (DR) que
387 ingeriram minhocas *E. fetida* (EF) expostas aos CNFs; CNF-DIR-DR-ON: peixes *O. niloticus* (ON) alimentados com *D. rerio* (DR) expostos diretamente aos CNFs. **Os dados representam a média ± SEM. Os dados
388 paramétricos foram submetidos ao one-way ANOVA e os não-paramétricos ao teste Kruskal-Wallis, ambos a 5% de probabilidade.

389 4. DISCUSSÃO

390 O entendimento de como os poluentes podem afetar a saúde da biota e repassar,
391 inevitavelmente, pela etapa de identificação de seus efeitos nos organismos. Nesse sentido, nosso
392 estudo fornece evidências pioneiras dos impactos mutagênicos e citotóxicos das CNFs em
393 *O. niloticus* expostas aos nanopoluentes via cadeia alimentar. Inicialmente, a partir das análises
394 de TOC foi possível inferir sobre a absorção das CNFs pelas minhocas a partir do substrato
395 contaminado (Figuras 5A-B), o que confirma achados anteriores que mostram a capacidade
396 desses animais acumularem nanomateriais a base de carbono e de se constituírem um potencial
397 ponto de entrada para cadeias alimentares terrestres. Como exemplos desses achados citam-se
398 os estudos de Petersen et al. (2008a), Hu et al. (2013), Calisi et al. (2016) e Xu et al. (2019), nos
399 quais *E. fetida* foram expostas a *radio-labeled CNTs*, *multi-walled carbon nanotube* (MWCNTs),
400 MWCNTs adsorvido com nonilfenol e nanocarbono preto, respectivamente. Embora os
401 mecanismos exatos de absorção das CNFs pelas minhocas não tenham sido investigados, é
402 provável que os nanomateriais tenham adentrado nos organismos pela via dérmica ou por meio
403 da ingestão de substrato contaminado. No entanto, considerando que não foi realizada análise da
404 bioacumulação das CNFs nos tecidos corpóreos individualizados das minhocas, é possível que
405 as CNFs detectadas nesses organismos estejam associadas à sedimentos remanescentes no
406 sistema gastrointestinal, conforme já relatado por Pertesen et al. (2008b) (em *Lumbriculus*
407 *variegatus* expostas à CNTs).

408 Raciocínio semelhante pode ser aplicado aos dados de quantificação de TOC nos
409 *D. rerio* (Figura X), já que a análise também foi realizada a partir do animal inteiro. Nesse caso,
410 é provável que a maior concentração de TOC nos peixes alimentados com minhocas
411 contaminadas esteja relacionada ao acúmulo de CNFs no sistema gastrointestinal dos *D. rerio*,
412 sendo o tempo de exposição insuficiente para a depuração dos nanomateriais. No entanto, não
413 podemos descartar a possibilidade dos nanomateriais terem sido distribuídos sistemicamente
414 pelo organismo dos peixes via absorção intestinal, conforme já demonstrado por Maes et al.
415 (2014). Nesse estudo, em particular, os autores identificaram MWCNTs no sangue de *D. rerio*,
416 o que reforça essa hipótese. Já nos animais expostos diretamente às CNFs, os nanomateriais
417 podem ter sido absorvidos pelas brânquias ou pela ingestão do poluente disperso na água de
418 exposição. Por outro lado, a análise de TOC no fígado e no intestino das *O. niloticus* (Figura 6A-
419 B) sugerem fortemente que os CNFs tenham sido absorvidos pela via intestinal e chegado até o
420 fígado pelos vasos sanguíneos do sistema porta-hepático. Além disso, as maiores concentrações
421 de TOC no fígado das tilápias expostas às CNFs via cadeia alimentar, em comparação com

422 aquelas identificadas no intestino (Figura 6C) podem ser explicadas pela absorção e acúmulo
423 hepático dos nanopoluentes.

424 Dados interessantes também foram observados no teste do micronúcleo e outras
425 anormalidades nucleares nos eritrócitos das tilápias, cujas alterações identificadas têm sido
426 associadas a processos carcinogênicos e efeitos negativos na fecundidade, longevidade e
427 crescimento em indivíduos afetados (Zapata et al., 2016). A presença de eritrócitos
428 micronucleados (Figura 8E) e binucleados (Figura 9A), por exemplo, são sugestivas de defeitos
429 nos processos de divisão celular provocados pelas CNFs e a presença de núcleos *blebbed* (Figura
430 8C), *kidney-shape* (Figura 8D) e *notched* (Figura 9D) pode ser inferida como alterações
431 precursoras de micronúcleos, conforme proposto por diferentes autores (Shimizu et al., 1998;
432 Shimizu et al., 2000; Lindberg et al., 2007; Gisselsson et al., 2001; Kalsbeek & Golsteyn, 2017;
433 Hintzsche et al., 2017). Nesses casos, essas alterações poderiam ser interpretadas como
434 mecanismos pelos quais os micronúcleos são extrudados da célula.

435 Resultados similares foram reportados por estudos prévios *in vitro* envolvendo outros
436 tipos de carbon-based nanomaterials, tais como Kisin et al. (2007) [*single-walled carbon*
437 *nanotubes* (SWCNTs) vs. células V79 cells], Muller et al. (2008) (MWCNTs vs. células
438 epiteliais), Cveticanin et al. (2009) (MWCNTs vs. células humanas), Lindberg et al. (2009)
439 (CNTs/graphite nanofibers vs. células epiteliais bronquiais), Migliore et al. (2010) (CNTs vs.
440 células RAW 264.7) e Ghosh et al. (2011) (MWCNTs vs. células vegetais e de mamíferos). No
441 entanto, *in vivo*, outros estudos apontam para a inocuidade genotóxica/mutagênica dos
442 nanomateriais baseados em carbono, o que estimula o desenvolvimento de investigações futuras
443 envolvendo essa temática [Mouchet et al., 2010 (MWCNTs vs. *Xenopus laevis*); Naya et al., 2011
444 (SWCNTs vs. camundongos); Ema et al., 2013 (SWCNTs vs. camundongos CD-1); Kim et al.,
445 2015 (SWCNTs vs. camundongos ICR); Horibata et al. 2017 (MWCNTs vs. ratos F344/NSlc-
446 Tg (gpt-delta)].

447 Um dado particularmente interessante diz respeito à alta frequência de núcleos
448 deslocados nos eritrócitos das tilápias expostas às CNFs via cadeia alimentar (Figura 9C), o que
449 sugere a ocorrência de alterações de estruturas celulares (e.g.: elementos do citoesqueleto ou
450 similares) que mantêm a posição central dos núcleos eritrocitários, levando à rotação do núcleo.
451 Também é possível que as alterações encontradas nas tilápias expostas às CNFs tenham ocorrido
452 nas proteínas ou nos mecanismos que formam microtúbulos, microfilamentos e/ou filamentos
453 intermediários. Apesar de não haver estudos que já tenham relatado efeito semelhante em
454 sistemas-modelo expostos a nanomateriais baseados em carbono, alguns autores já observaram
455 alteração semelhante envolvendo outros poluentes. Esse é o caso dos estudos de Souza et al.

456 (2017), Sampaio et al. (2019), Vieira et al. (2019) e Araújo et al. (2020). Enquanto no primeiro e
457 segundo essas alterações foram observadas em *Melopsittacus undulatus* e
458 *Coturnix coturnix japonica* (respectivamente) expostos a efluente de curtume, no terceiro e
459 quarto o delineamento experimental envolveu a exposição de *Gallus gallus domesticus* à
460 nanopartícula de ZnO e de girinos de *Physalaemus cuvieri* a microplásticos, respectivamente.

461 Em nosso estudo, obviamente, é preciso reconhecer que a ação dos CNFs pode ter
462 ocorrida através de uma diversidade de mecanismos, conforme discutido por Scherzad et al.
463 (2017). No entanto, é plausível supor que a indução das anormalidades nucleares observadas
464 pode estar diretamente relacionada com o acúmulo de danos genotóxicos durante o período de
465 exposição. As CNFs podem ter agido diretamente no DNA das células, conforme evidenciado
466 por Patlolla et al. (2010) e Rahman et al. (2017) - ao exporem células de camundongos Swiss e
467 MutaTMMouse (camundongos transgênicos da linhagem 40.6) a MWCNTs, respectivamente -
468 ou indiretamente. Nesse último caso, a mutagenicidade das CNFs pode ter sido causada por
469 interferência física em componentes biológicos durante a citocinese, em vez de interagirem
470 diretamente com o material genético. Essa hipótese é especialmente reforçada pelo estudo de
471 Sasaki et al. (2016), nos quais a indução de aberrações cromossômicas de diferentes CNTs foi
472 avaliada.

473 Outra possibilidade que explicaria as anormalidades nucleares eritrocitárias observadas
474 refere-se à indução de estresse oxidativo pelas CNFs. Dos vários processos propostos utilizados
475 para explicar a toxicidade desses nanomateriais baseados em carbono, a produção de *reactive*
476 *oxygen species* (ROS) é reconhecida como uma das causas prováveis (Migliore et al., 2010;
477 Shvedova et al., 2012; Long et al., 2012; Hsieh & Jafvert, 2015; Alarifi & Ali, 2015; Mohanta et
478 al., 2019). Conforme destacado por Mohanta et al. (2019), a penetração de CNTs através da
479 membrana da bicamada lipídica celular resulta em estresse oxidativo que pode levar à inflamação
480 e também resultar em toxicidade celular. Além disso, de acordo com esses autores, a geração de
481 radicais livres, constitui outra razão plausível que pode explicar os mecanismos de ação das CNFs.
482 Sabe-se que o excesso de radicais livres oxida DNA, proteínas e lipídios nas células.

483 Por outro lado, as alterações morfométricas observadas nos eritrócitos das tilápias
484 expostas às CNFs via cadeia alimentar revelam interferências em processos biológicos que vão
485 além daqueles envolvidos nos processos de divisão celular. A menor área nuclear (Figura 8A),
486 assim como a reduzida razão “área nuclear: área eritrocitária” (Figura 8B) observadas nas tilápias
487 expostas aos nanomateriais sugerem, especialmente, alterações no tamanho das células avaliadas.
488 Esses resultados são particularmente interessantes, pois não há qualquer estudo que tenha
489 associado tais mudanças a exposição de peixes a qualquer nanomaterial baseado em carbono,

490 embora outros fatores biológicos já tenham sido relatados como causa dessas alterações [e.g.:
491 adaptações fisiológicas à hipoxia (Saint-Paul, 1984); de privação de alimento (Rios et al., 2005);
492 diferenças entre espécies (Kumar et al., 2016; Acharya & Mohanty, 2019); sexo dos animais
493 (Golemi et al., 2013); condição patológica (Hollamby et al., 2004), dentre outros].

494 Contudo, é tentador especular que essas alterações possam ter ocorrido em função da
495 interferência (direta ou indireta) das CNFs no balanço/metabolismo energético [o que já foi
496 demonstrado em bivalves expostos à MWCNTs (De-Marchi et al., 2018)] e/ou na eficiência do
497 transporte de oxigênio pelos eritrócitos. No primeiro caso, o aumento da produção de ROS
498 (induzido pelas CNFs) pode ter incrementado a demanda de oxigênio, uma vez que o
499 metabolismo antioxidante requer alto gasto energético. Assim, esse aumento pode ter ativado
500 mecanismos compensatórios para atendimento de maior demanda de oxigênio, refletido na
501 redução da razão da área “nuclear/citoplasmática” (Figura 8B). Por outro lado, não podemos
502 descartar a hipótese de que *adsorção de moléculas de hemoglobina* sobre a *superfície* das CNFs
503 possa ter induzido modificações que afetaram a retenção das propriedades de ligação das
504 hemoglobinas ao oxigênio e à cooperatividade. Essa hipótese é reforçada por estudos que já
505 demonstraram a capacidade adsorptiva da hemoglobina à nanomateriais baseados em carbono.
506 Esse é o caso, por exemplo, de Zheng et al. (2008) e Wang et al. (2016). No primeiro, os autores
507 descrevem a funcionalização não covalente de CNTs com o biopolímero natural quitosana (Chi)
508 como substrato para imobilização de hemoglobina (Hb). Já os resultados obtidos por Wang et
509 al. (2016), sugerem que a atividade adsorvente de MWCNT para proteínas, especialmente
510 hemoglobina e transferrina, é um mecanismo importante no dano mesotelial seguido por
511 carcinogênese.

512 Finalmente, é preciso reconhecer que dado o pioneirismo do nosso estudo, algumas das
513 nossas limitações servem de ponto de partida para investigações futuras. Questiona-se, por
514 exemplo, se os efeitos que observamos são gênero-específicos, espécie-dependentes, se variam
515 com a idade dos animais ou se outros predadores apresentariam resultados semelhantes. Além
516 disso, é possível que exposições prolongadas (pela via direta ou via cadeia alimentar) causem
517 efeitos mais severos? Que outros biomarcadores poderiam ser úteis para a identificação dos
518 efeitos das CNFs em delineamentos experimentais similares? O quanto as alterações observadas
519 podem impactar o fitness dos indivíduos e a dinâmica de suas populações? Os efeitos observados
520 teriam relação com os elementos químicos associados às CNFs – tidos como catalisadores à base
521 de metais –, conforme suscitado por Cheng et al. (2007)? Essas são abrangentes questões, para
522 as quais ainda não temos respostas. Logo, estimulamos fortemente que investigações futuras
523 sejam desenvolvidas, visando a caracterização e avaliação do impacto das CNFs sobre a saúde

524 dos peixes, o que certamente é importante para conhecermos a real magnitude dos impactos
525 desses nanomateriais na biota aquática.

526

527 **5. CONCLUSÃO**

528 Em conclusão, nosso estudo confirma a hipótese inicial, fornecendo indícios de acúmulo
529 das CNFs nos diferentes níveis tróficos da cadeia experimental (*Eisenia fetida* → *Danio rerio* →
530 *Oreochromis niloticus*) e evidenciando efeito mutagênico e citotóxico nos animais do último
531 nível trófico (*O. niloticus*). Portanto, nosso estudo fornece subsídio sobre a toxicidade das CNFs
532 via transferência trófica (temática muito pouco estudada) além de alertar para os riscos
533 ecotoxicológicos relacionados com a crescente criação/produção e uso de nanomateriais a base
534 de carbono.

535

536 **6. AGRADECIMENTOS**

537 Os autores do presente estudo agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)
538 (Processo nº 426531 / 2018-3) e ao Instituto Federal Goiano pelo apoio financeiro (Processo nº
539 23219.001797.2019-21). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
540 (CAPES, Brasil) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG, Brasil) pela
541 concessão da bolsa de estudos ao aluno que desenvolveu a pesquisa. Malafaiá G. gostaria de
542 agradecer ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (Proc. Nº 307743 / 2018-7).

543

544 **7. REFERÊNCIAS**

545 Acharya G, Mohanty PK. Comparative cytomorphometry of red blood cells of some fishes.
546 African Journal of Biological Sciences, 1(1): 23-32, 2019.

547 Adeyemi JA, Machado ART, Ogunjimi AT, Alberici LC, Antunes LMG, Barbosa F Jr.
548 Cytotoxicity, mutagenicity, oxidative stress and mitochondrial impairment in human
549 hepatoma (HepG2) cells exposed to copper oxide, copper-iron oxide and carbon
550 nanoparticles. Ecotoxicol Environ Saf. 2019 Dec 9;189:109982. doi:
551 10.1016/j.ecoenv.2019.109982. [Epub ahead of print]

552 Alarif S, Ali D. Mechanisms of Multi-walled Carbon Nanotubes-Induced Oxidative Stress and
553 Genotoxicity in Mouse Fibroblast Cells. International Journal of Toxicology, 34(3): 258-
554 265, 2015.

555 Andrade LR, Brito AS, Melero AM, Zanin H, Ceragioli HJ, Baranauskas V, Cunha KS, Irazusta
556 SP. Absence of mutagenic and recombinogenic activity of multi-walled carbon nanotubes

557 in the *Drosophila* wing-spot test and *Allium cepa* test. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014
558 Jan;99:92-7. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.013. Epub 2013 Nov 1.

559 AQUINO, A. M.; ALMEIDA, D. L.; GUERRA, J. G. M.; DE-POLLI, H. Biomassa
560 microbiana, coloides orgânicos e nitrogênio inorgânico durante a vermicompostagem de
561 diferentes substratos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1087-1093,
562 nov. 2005.

563 Araújo APC, de Melo NFS, de Oliveira Junior AG, Rodrigues FP, Fernandes T, de Andrade
564 Vieira JE, Rocha TL, Malafaia G. How much are microplastics harmful to the health of
565 amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. *J*
566 *Hazard Mater.* 2020 Jan 15;382:121066. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121066. Epub 2019
567 Aug 24.

568 Araújo APC, de Melo NFS, de Oliveira Junior AG, Rodrigues FP, Fernandes T, de Andrade
569 Vieira JE, Rocha TL, Malafaia G. How much are microplastics harmful to the health of
570 amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. *J*
571 *Hazard Mater.* 2020 Jan 15;382:121066. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121066. Epub 2019
572 Aug 24.

573 Araújo APC, Lima VS, Emmanuela de Andrade Vieira J, Mesak C, Malafaia G. First report on
574 the mutagenicity and cytotoxicity of ZnO nanoparticles in reptiles. *Chemosphere.* 2019
575 Nov;235:556-564. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.164. Epub 2019 Jun 29.

576 Aschberger K, Jonston HJ, Stone V, Aitken RJ, Hankin SM, Peters SAK, Tran L, Christensen
577 FM. Review of carbon nanotubes toxicity and exposure—Appraisal of human health risk
578 assessment based on open literature. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(9): 759-790, 2010.

579 Baldea I, Olteanu D, Filip GA, Pogacean F, Coros M, Suciú M, Tripon SC, Cenariu M,
580 Magerusan L, Staden RLS, Pruneanu S. Cytotoxicity mechanisms of nitrogen-doped
581 graphene obtained by electrochemical exfoliation of graphite rods, on human endothelial
582 and colon cancer cells. *Carbon*, 158: 267-281, 2020.

583 Barton, B.A., (1997). Stress in finfish: past, present and future—a historical perspective. Em:
584 Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health*
585 *in Aquaculture* (pp. 1-33). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

586 Beard, J.D., Erdely, A., Dahm, M.M., de Perio, M.A., Birch, M.E., Evans, D.E., Fernback, J.E.,
587 Eye, T., Kodali, V., Mercer, R.R., Bertke, S.J., Schubauer-Berigan, M.K., 2018. Carbon
588 nanotube and nanofiber exposure and sputum and blood biomarkers of early effect among
589 US workers. *Environ. Int.* 116, 214-228.

- 590 Bhandari S. (2019) Polymer/Carbon Composites for Sensor Application. In: Rahaman M.,
591 Khastgir D., Aldalbahi A. (eds) Carbon-Containing Polymer Composites. Springer Series
592 on Polymer and Composite Materials. Springer, Singapore
- 593 Biddinger G.R., Gloss S.P. (1984) The importance of trophic transfer in the bioaccumulation of
594 chemical contaminants in aquatic ecosystems. In: Gunther F.A., Gunther J.D. (eds)
595 Residue Reviews. Residue Reviews, vol 91. Springer, New York, NY
- 596 Bourdiol F, Mouchet F, Perrault A, Fourquaux I, Datas L, Gancet C, Boutonnet JC, Pinelli E,
597 Gauthier L, Flahaut E. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon
598 nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis*
599 amphibian larvae. *Carbon*, 54: 175-191, 2013.
- 600 Calisi A, Grimaldi A, Leomanni A, Lionetto MG, Dondero F, Schettino T. Multibiomarker
601 response in the earthworm *Eisenia fetida* as tool for assessing multi-walled carbon nanotube
602 ecotoxicity. *Ecotoxicology*. 2016 May;25(4):677-87. doi: 10.1007/s10646-016-1626-x. Epub
603 2016 Feb 18.
- 604 Calisi A, Grimaldi A, Leomanni A, Lionetto MG, Dondero F, Schettino T. Multibiomarker
605 response in the earthworm *Eisenia fetida* as tool for assessing multi-walled carbon nanotube
606 ecotoxicity. *Ecotoxicology*. 2016 May;25(4):677-87. doi: 10.1007/s10646-016-1626-x. Epub
607 2016 Feb 18.
- 608 Campos RP, Chagas TQ, da Silva Alvarez TG, Mesak C, de Andrade Vieira JE, Paixão CFC, de
609 Lima Rodrigues AS, de Menezes IPP, Malafaia G. Analysis of ZnO nanoparticle-induced
610 changes in *Oreochromis niloticus* behavior as toxicity endpoint. *Sci Total Environ*. 2019
611 Sep 10;682:561-571. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.183. Epub 2019 May 17.
- 612 Cano AM, Maul JD, Saed M, Irin F, Shah SA, Green MJ, French AD, Klein DM, Crago J, Canas-
613 Carrell JE. Trophic Transfer and Accumulation of Multiwalled Carbon Nanotubes in the
614 Presence of Copper Ions in *Daphnia magna* and Fathead Minnow (*Pimephales promelas*).
615 *Environmental Science & Technology*, 52(2): 794-800, 2018.
- 616 Carasso, K.R., Tillbury, L.K. and Myers, M.S. 1990. An assessment of the piscine micronuclei
617 test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish Aquat.*
618 *Sci.* 47: 2123-2136.
- 619 Chen M, Zhou S, Zhu Y, Sun Y, Zeng G, Yang C, Xu P, Yan M, Liu Z, Zhang W. Toxicity of
620 carbon nanomaterials to plants, animals and microbes: Recent progress from 2015-present.
621 *Chemosphere*. 2018 Sep;206:255-264. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.05.020. Epub
622 2018 May 4.

623 Cheng J, Flahaut E, Cheng SH. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*)
624 embryos. *Environ Toxicol Chem.* 2007 Apr;26(4):708-16.

625 Cheng J, Flahaut E, Cheng SH. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio Rerio*)
626 embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(4): 708-716, 2007.

627 Cheng Z, Liang X, Liang S, Yin N, Faiola F. A human embryonic stem cell-based in vitro model
628 revealed that ultrafine carbon particles may cause skin inflammation and psoriasis. *Journal*
629 *of Environmental Sciences*, 87: 194-204, 2020.

630 Chung H, Son Y, Yoon TK, Kim S, Kim W. The effect of multi-walled carbon nanotubes on
631 soil microbial activity. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2011 May;74(4):569-75. doi:
632 10.1016/j.ecoenv.2011.01.004. Epub 2011 Feb 9.

633 Cruz-Matías I, Ayala D, Hiller D, Gutsch S, Zacharias M, Estradé S, Peiró F. Sphericity and
634 roundness computation for particles using the extreme vertices model. *Journal of*
635 *Computational Science*, 30: 28-40, 2019.

636 Cveticanin J, Joksic G, Leskovac A, Petrovic S, Sobot AV, Neskovic O. Using carbon nanotubes
637 to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells.
638 *Nanotechnology.* 2010 Jan 8;21(1):015102. doi: 10.1088/0957-4484/21/1/015102. Epub
639 2009 Nov 30.

640 De-Marchi L, Neto V, Pretti C, Figueira E, Chiellini F, Morelli A, Soares AMVM, Freitas R.
641 Toxic effects of multi-walled carbon nanotubes on bivalves: Comparison between
642 functionalized and nonfunctionalized nanoparticles. *Sci Total Environ.* 2018 May 1;622-
643 623:1532-1542. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.031. Epub 2017 Oct 20.

644 Du J, Wang S, You H, Zhao X. Understanding the toxicity of carbon nanotubes in the
645 environment is crucial to the control of nanomaterials in producing and processing and the
646 assessment of health

647 Du J, Wang S, You H, Zhao X. Understanding the toxicity of carbon nanotubes in the
648 environment is crucial to the control of nanomaterials in producing and processing and the
649 assessment of health risk for human: a review. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013
650 Sep;36(2):451-462. doi: 10.1016/j.etap.2013.05.007. Epub 2013 May 24.

651 Ema M, Imamura T, Suzuki H, Kobayashi N, Naya M, Nakanishi J. Genotoxicity evaluation for
652 single-walled carbon nanotubes in a battery of in vitro and in vivo assays. *J Appl Toxicol.*
653 2013 Sep;33(9):933-9. doi: 10.1002/jat.2772. Epub 2012 Jul 5.

654 Engeszer RE, Ryan MJ, Parichy. Learned social preference in zebrafish. *Current Biology*, 14(10):
655 881-884, 2004.

656 Farombi, E.O., Awogbindin, I.O., Owoeye, O. et al. Kolaviron via anti-inflammatory and redox
657 regulatory mechanisms abates multi-walled carbon nanotubes-induced neurobehavioral
658 deficits in rats. *Psychopharmacology* (2020) doi:10.1007/s00213-019-05432-8.

659 Farré M, Sanchís J, Barceló D (2011) Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the
660 behavior of nanomaterials in the environment. *TrAC-Trend Anal Chem* 30:517–527.

661 Feng L, Xie N, Zhong J. Carbon nanofibers and their composites: a review of synthesizing,
662 properties and applications. *Materials*, 7: 3919-3945, 2014.

663 Ferguson, P. L.; Chandler, G. T.; Templeton, R. C.; Demarco, A.; Scrivens, W. A.; Englehart,
664 B. A. Influence of sediment-amendment with single-walled carbon nanotubes and diesel
665 soot on bioaccumulation of hydrophobic organic contaminants by benthic invertebrates.
666 *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42 (10), 3879–3885.

667 Filho Jde S, Matsubara EY, Franchi LP, Martins IP, Rivera LM, Rosolen JM, Grisolia CK.
668 Evaluation of carbon nanotubes network toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) model. *Environ*
669 *Res.* 2014 Oct;134:9-16. doi: 10.1016/j.envres.2014.06.017. Epub 2014 Jul 18.

670 Fu, Y.; Wang, W.; Zhang, L.; Vinokurov, V.; Stavitskaya, A.; Lvov, Y. Development of Marine
671 Antifouling Epoxy Coating Enhanced with Clay Nanotubes. *Materials* 2019, 12, 4195.

672 Galloway, T.; Lewis, C.; Dolciotti, I.; Johnston, B. D.; Moger, J.; Regoli, F. Sublethal toxicity of
673 nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete.
674 *Environ. Pollut.* 2010, 158 (5), 1748–1755.

675 Garcia GR, Noyes PD, Tanguay RL. Advancements in zebrafish applications for 21st century
676 toxicology. *Pharmacol Ther.* 2016 May;161:11-21. doi:
677 10.1016/j.pharmthera.2016.03.009. Epub 2016 Mar 22.

678 Genaidy A, Tolaymat T, Sequeira R, Rinder M, Dionysiou D. Health effects of exposure to
679 carbon nanofibers: systematic review, critical appraisal, meta analysis and research to
680 practice perspectives. *Science of The Total Environment*, 407: 3686-3701, 2009.

681 Ghafari, P.; St-Denis, C. H.; Power, M. E.; Jin, X.; Tsou, V.; Mandal, H. S.; Bols, N. C.; Tang,
682 X. W. Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated
683 protozoa. *Nat.*

684 Ghosh M, Bhadra S, Adegoke A, Bandyopadhyay M, Mukherjee A. MWCNT uptake in *Allium*
685 *cepa* root cells induces cytotoxic and genotoxic responses and results in DNA hyper-
686 methylation. *Mutat Res.* 2015 Apr;774:49-58. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2015.03.004. Epub
687 2015 Mar 16.

688 Ghosh M, Chakraborty A, Bandyopadhyay M, Mukherjee A. Multi-walled carbon nanotubes
689 (MWCNT): induction of DNA damage in plant and mammalian cells. *J Hazard Mater.*
690 2011 Dec 15;197:327-36. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.09.090. Epub 2011 Oct 1.

691 Girardi FA, Bruch GE, Peixoto CS, Bosco LD, Sahoo SK, Gonçalves COF, Santos AP, Furtado
692 CA, Fantini C, Barros DM. Toxicity of single-wall carbon nanotubes functionalized with
693 polyethylene glycol in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Applied Toxicology,*
694 37(2): 214-221, 2017.

695 Gisselsson D, Björk J, Höglund M, Mertens F, Dal Cin P, Akerman M, Mandahl N. Abnormal
696 nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *Am J Pathol.* 2001 Jan;158(1):199-
697 206.

698 Golemi S, Medja N, Lacej D. Influence of Sex on the Hematological and Morphometric
699 Parameters of *Cyprinus Carpio* (Linnaeus, 1758) from Shkodra Lake. *Academic Journal*
700 *of Interdisciplinary Studies,* 2(8): 45-49, 2013.

701 Gomes AR, Andrade Vieira JE, Costa Araújo APD, Malafaia G. Insights about the toxicity of
702 tannery effluent on chicken (*Gallus gallus domesticus*) embryos. *Chemosphere,* 244:
703 125403, 2020.

704 Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat*
705 *Rev Genet.* 2002 Sep;3(9):717-24. doi: 10.1038/nrg892.

706 Hintzsche H, Hemmann U, Poth A, Utesch D, Lott J, Stopper H; Working Group "In vitro
707 micronucleus test", Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (GUM, German-
708 speaking section of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society
709 EEMGS). Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutat Res.* 2017 Jan - Mar;771:85-
710 98. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.02.002. Epub 2017 Feb 13.

711 Hollamby S, Afema-Azikutu J, Sikarskie JG, Kaneene JB, Stuht JN, Fitzgerald SD, Bowerman
712 WW, Cameron K, Gandolf AR, Hui GN, Dranzoa C, Rumbeiha WK. Clinical pathology
713 and morphometrics of African fish *Aegles* in Uganda, 40(3): 523-532, 2004.

714 Horibata K, Ukai A, Ogata A, Nakae D, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Yuzawa K, Honma M.
715 Absence of in vivo mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal
716 instillation study using F344 gpt delta rats. *Genes Environ.* 2017 Jan 6;39:4. doi:
717 10.1186/s41021-016-0065-5. eCollection 2017.

718 Hsieh HS, Jafvert CT. Reactive oxygen species generation and dispersant-dependent electron
719 transfer through single-walled carbon nanotube in water. *Carbon,* 89: 361-371, 2015.

720 Hu C, Cai Y, Wang W, Cui Y, Li M. Toxicological effects of multi-walled carbon nanotubes
721 adsorbed with nonylphenol on earthworm *Eisenia fetida*. *Environ Sci Process Impacts*.
722 2013 Oct;15(11):2125-30. doi: 10.1039/c3em00376k.

723 Jackson P, Jacobsen NR, Baun A, Birkedal R, Kühnel D, Jensen KA, Vogel U, Wallin H.
724 Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chem Cent J*. 2013 Sep 13;7(1):154.
725 doi: 10.1186/1752-153X-7-154.

726 Jian Zhao (February 1st 2010). Morphology and Dispersion of Pristine and Modified Carbon
727 Nanofibers in Water, Nanofibers, Ashok Kumar, IntechOpen, DOI: 10.5772/8158.
728 Available from: [https://www.intechopen.com/books/nanofibers/morphology-and-](https://www.intechopen.com/books/nanofibers/morphology-and-dispersion-of-pristine-and-modified-carbon-nanofibers-in-water)
729 [dispersion-of-pristine-and-modified-carbon-nanofibers-in-water](https://www.intechopen.com/books/nanofibers/morphology-and-dispersion-of-pristine-and-modified-carbon-nanofibers-in-water)

730 Kalsbeek D, Golsteyn R. G2/M-Phase Checkpoint Adaptation and Micronuclei Formation as
731 Mechanisms That Contribute to Genomic Instability in Human Cells. *International Journal*
732 *of Molecular Sciences*, 18(11): 2344, 2017.

733 Kampke EH, de Souza Barroso ME, Marques FM, Fronza M, Scherer R, Lemos MF,
734 Campagnaro BP, Gomes LC. Genotoxic effect of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown essential
735 oil on fish (*Oreochromis niloticus*) and mammal (*Mus musculus*). *Environ Toxicol*
736 *Pharmacol*. 2018 Apr;59:163-171. doi: 10.1016/j.etap.2018.03.016. Epub 2018 Mar 26.

737 Kim JS, Song KS, Yu IJ. Evaluation of in vitro and in vivo genotoxicity of single-walled carbon
738 nanotubes. *Toxicol Ind Health*. 2015 Aug;31(8):747-57. doi: 10.1177/0748233713483201.
739 Epub 2013 Apr 3.

740 Kim YA, Hayashi T, Endo M, Dresselhaus MS. Carbon nanofibers. In: R. Vajtai (Ed.), Springer
741 Handbook of Nanomaterials. Springer Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013.

742 Kisin ER, Murray AR, Keane MJ, Shi XC, Schwegler-Berry D, Gorelik O, Arepalli S, Castranova
743 V, Wallace WE, Kagan VE, Shvedova AA. Single-walled carbon nanotubes: geno- and
744 cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2007
745 Dec;70(24):2071-9.

746 Knudsen KB, Berthing T, Jackson P, Poulsen SS, Mortensen A, Jacobsen NR, Skaug V, Szarek
747 J, Hougaard KS, Wolff H, Wallin H, Vogel U. Physicochemical predictors of Multi-
748 Walled Carbon Nanotube-induced pulmonary histopathology and toxicity one year after
749 pulmonary deposition of 11 different Multi-Walled Carbon Nanotubes in mice. *Basic &*
750 *Clinical Pharmacology & Toxicology*, 124(2): 211-227, 2019.

751 Kumar MV. Morphometric studies of blood cells in *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella*
752 and *Hypophthalmichthys molitrix* cultured fish in west Godavari region of Andhra
753 Pradesh. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(5): 489-493, 2016.

754 Lee YS, Sung JH, Song KS, Kim JK, Choi BS, Yu IJ, Park JD. Derivation of occupational
755 exposure limits for multi-walled carbon nanotubes and graphene using subchronic
756 inhalation toxicity data and a multi-path particle dosimetry model. *Toxicology Research*, 8:
757 580-586, 2019.

758 Lindberg HK, Falck GC, Suhonen S, Vippola M, Vanhala E, Catalán J, Savolainen K, Norppa
759 H. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon
760 nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicol
761 Lett.* 2009 May 8;186(3):166-73. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.11.019. Epub 2008 Dec 7.

762 Lindberg HK, Wang X, Järventaus H, Falck GC, Norppa H, Fenech M. Origin of nuclear buds
763 and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat Res.* 2007 Apr
764 1;617(1-2):33-45. Epub 2006 Dec 22.

765 Liu L, Ding L, Zhong D, Han J, Wang S, Meng Q, Qiu C, Zhang X, Peng LM, Zhang Z. Carbon
766 Nanotube Complementary Gigahertz Integrated Circuits and Their Applications on
767 Wireless Sensor Interface Systems. *ACS Babim* 13(2): 2526-2535, 2019.

768 Long Z, Ji J, Yang K, Lin D, Wu F. Systematic and quantitative investigation of the mechanism
769 of carbon nanotubes' toxicity toward algae. *Environ Sci Technol* 2012;46(15):8458-66.

770 Maes HM, Stibany F, Giefers S, Daniels B, Deutschmann B, Baumgartner W, Schäffer A.
771 Accumulation and distribution of multiwalled carbon nanotubes in zebrafish (*Danio rerio*).
772 *Environ Sci Technol.* 2014 Oct 21;48(20):12256-64. doi: 10.1021/es503006v. Epub 2014
773 Oct 9.

774 Maes HM, Stibany F, Giefers S, Daniels B, Deutschmann B, Baumgartner W, Schäffer A.
775 Accumulation and Distribution of Multiwalled Carbon Nanotubes in Zebrafish (*Danio
776 rerio*). *Environ Sci Technol*, 48(20): 12256-12264, 2014.

777 Malafaia G, Estrela DC, Guimarães ATB, Araújo FG, Leandro WM, Rodrigues ASL.
778 Vermicomposting of different types of tanning sludge (liming and primary) mixed with
779 cattle dung. *Ecological Engineering*, 85: 301-3065, 2015a.

780 Malafaia G, Jordão CR, Araújo FG, Leandro WM, Rodrigues ASL. Vermicomposting of tannery
781 sludge mixed with cattle dung using *Eisenia fetida*. *Eng Sanit Ambiental*, 20(4): 709-716,
782 2015b.

783 Martínez-Paz P, Negri V, Esteban-Arranz A, Martínez-Guitarte JL, Ballesteros P, Morales M.
784 Effects at molecular level of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) in *Chironomus
785 riparius* (DIPTERA) aquatic larvae. *Aquat Toxicol.* 2019 Apr;209:42-48. doi:
786 10.1016/j.aquatox.2019.01.017. Epub 2019 Jan 21.

787 Mesak C, de Campos RP, de Melo MA, de Oliveira Mendes B, Malafaia G. Behavioral response
788 and dynamics of *Eisenia fetida* hemocytes exposed to environmentally relevant
789 concentration of sulfentrazone. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018 Oct;25(30):30728-30736.
790 doi: 10.1007/s11356-018-3175-8. Epub 2018 Sep 15.

791 Migliore L, Saracino D, Bonelli A, Colognato R, D'Errico MR, Magrini A, et al. Carbon
792 nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells. *Environ Mol Mutagen*
793 2010;51(4):294-303.

794 Migliore L, Saracino D, Bonelli A, Colognato R, D'Errico MR, Magrini A, Bergamaschi A,
795 Bergamaschi E. Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells.
796 *Environ Mol Mutagen.* 2010 May;51(4):294-303. doi: 10.1002/em.20545.

797 Mikli V, Käerdi H, Kulu P, Besterci M. Characterization of powder particle morphology. *Proc*
798 *Estonian Acad Sci Eng*, 7(1): 22-34, 2001.

799 Mohanta S, Patnaik S, Sood S, Das N. Carbon nanotubes: Evaluation of toxicity at biointerfaces.
800 *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(5): 293-300, 2019.

801 Morgan, D.L., Gill, H.S., Maddern, M.G., and Beatty, S.J. 2004. Distribution and impact of
802 introduced freshwater fishes in Western Australia. *N.Z. J. Mar. Freshw. Res.* 38: 511-523.

803 Mortimer M, Petersen EJ, Buchholz BA, Orias E, Holden PA. Bioaccumulation of Multiwall
804 Carbon Nanotubes in *Tetrahymena thermophila* by Direct Feeding or Trophic Transfer.
805 *Environmental Science and Technology*, 50(16): 8876-8885, 2016.

806 Mouchet F, Landois P, Puech P, Pinelli E, Flahaut E, Gauthier L. Carbon nanotube ecotoxicity
807 in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-
808 walled carbon nanotubes. *Nanomedicine (Lond).* 2010 Aug;5(6):963-74. doi:
809 10.2217/nmm.10.60.

810 Mouchet F, Landois P, Sarremejean E, Bernard G, Puech P, Pinelli E, Flahaut E, Gauthier L.
811 Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in
812 larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquat Toxicol.* 2008 Apr 28;87(2):127-37. doi:
813 10.1016/j.aquatox.2008.01.011. Epub 2008 Feb 2.

814 Muller J, Decordier I, Hoet PH, Lombaert N, Thomassen L, Huaux F, Lison D, Kirsch-Volders
815 M. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells.
816 *Carcinogenesis.* 2008 Feb;29(2):427-33. doi: 10.1093/carcin/bgm243. Epub 2008 Jan 3.

817 Musyoka SN, Liti DM, Ogello E, Waidbacher H. Utilization of the earthworm, *Eisenia fetida*
818 (*Savigny, 1826*) as an alternative protein source in fish feeds processing: A review.
819 *Aquaculture Research*, 50(9): 2301-2315, 2019.

820 Myojo, T., Ono-Ogasawara, M., 2018. Review; risk Assessment of aerosolized SWCNTs,
821 MWCNTs, fullerenes and carbon black. *KONA Powder Part. J.* 80-88.
822 *Nanotechnol.* 2008, 3 (6), 347-351.

823 Naya M, Kobayashi N, Mizuno K, Matsumoto K, Ema M, Nakanishi J. Evaluation of the
824 genotoxic potential of single-wall carbon nanotubes by using a battery of in vitro and in vivo
825 genotoxicity assays. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 61(2): 192-198, 2011.

826 Olson E. Particle shape factors and their use in image analysis-part 1: theory. *Journal of GxP*
827 *Compliance.* 2011; 15: 85-96.

828 Ong C, Yung LY, Cai Y, Bay BH, Baeg GH. *Drosophila melanogaster* as a model organism to
829 study nanotoxicity. *Nanotoxicology.* 2015 May;9(3):396-403. doi:
830 10.3109/17435390.2014.940405. Epub 2014 Jul 22.

831 Orger MB, Polavieja GG. Zebrafish behavior: opportunities and challenges. *Annu Ver Neurosci*,
832 40: 125-147, 2017.

833 Özkan F, Gündüz SG, Berköz M, Hunt Ö. Induction of micronuclei and other nuclear
834 abnormalities in peripheral erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, following
835 exposure to sublethal cadmium doses. *Turk J Zool*, 35(4): 585-592, 2011.

836 Pandey H, Saini S, Singh SP, Gautam NK, Singh S. Candle soot derived carbon nanoparticles:
837 An assessment of cellular and progressive toxicity using *Drosophila melanogaster* model.
838 *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2020 Feb;228:108646. doi:
839 10.1016/j.cbpc.2019.108646. Epub 2019 Oct 22.

840 Patlolla AK, Hussain SM, Schlager JJ, Patlolla S, Tchounwou PB. Comparative study of the
841 clastogenicity of functionalized and nonfunctionalized multiwalled carbon nanotubes in
842 bone marrow cells of Swiss-Webster mice. *Environ Toxicol.* 2010 Dec;25(6):608-21. doi:
843 10.1002/tox.20621.

844 Peng Z, Liu X, Zhan W, Zeng Z, Liu Z, Zhang C, Liu Y, Shao B, Liang Q, Tang W, Yuan X.
845 Advances in the application, toxicity and degradation of carbon nanomaterials in
846 environment: a review. *Environment International*, 134: 105298, 2020.

847 Petersen EJ, Huang Q, Weber WJ Jr. Bioaccumulation of radio-labeled carbon nanotubes by
848 *Eisenia foetida*. *Environ Sci Technol.* 2008a Apr 15;42(8):3090-5.

849 Petersen EJ, Huang Q, Weber WJ. Ecological uptake and depuration of carbon nanotubes by
850 *Lumbriculus variegatus*. *Environ Health Perspect.* 2008b Apr;116(4):496-500. doi:
851 10.1289/ehp.10883.

852 Petersen EJ, Zhang L, Mattison NT, O'Carroll DM, Whelton AJ, Uddin N, Nguyen T, Huang
853 Q, Henry TB, Holbrook RD, Chen KL. Potential release pathways, environmental fate,
854 and ecological risks of carbon nanotube. *Environ Sci Technol*, 45: 9837-9856, 2011.

855 Petersen, E.J., Pinto, R.A., Landrum, P.F., Weber, W.J., 2009. Influence of carbon nanotubes
856 on pyrene bioaccumulation from contaminated soils by earth- worms. *Environ. Sci.*
857 *Technol.* 43, 4181-4187.

858 Philbrook NA, Walker VK, Afrooz AR, Saleh NB, Winn LM. Investigating the effects of
859 functionalized carbon nanotubes on reproduction and development in *Drosophila*
860 *melanogaster* and CD-1 mice. *Reprod Toxicol.* 2011 Dec;32(4):442-8. doi:
861 10.1016/j.reprotox.2011.09.002. Epub 2011 Sep 24.

862 Popma, T. & Lovshin, L. (1995) Tilápia especial. *Panorama da Aqüicultura* 5 (27): 7-13.

863 Rahman L, Jacobsen NR, Aziz SA, Wu D, Williams A, Yauk CL, White P, Wallin H, Vogel U,
864 Halappanavar S. Multi-walled carbon nanotube-induced genotoxic, inflammatory and pro-
865 fibrotic responses in mice: Investigating the mechanisms of pulmonary carcinogenesis.
866 *Mutat Res.* 2017 Nov;823:28-44. doi: 10.1016/j.mrgentox.2017.08.005. Epub 2017 Sep 8.

867 Requardt H, Braun A, Steinberg P, Hampel S, Hansen T. Surface defects reduce carbon
868 nanotube toxicity in vitro. *Toxicology in Vitro*, 60: 12-18, 2019.

869 Rios FS, Oba ET, Fernandes MN, Kalinin AL, Rantin FT. Erythrocyte senescence and
870 haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias*
871 *malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*
872 *Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140(3): 281-287, 2005.

873 risk for human: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36: 451-462, 2013.

874 Saint-Paul U. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma*
875 *macropomum*, Serrasalminidae. *Environmental Biology of Fishes*, 11: 53-62, 1984.

876 Sampaio DMDR, Estrela FN, Mendes BO, Estrela DDC, Montalvão MF, Mesak C, Silva FG,
877 Araújo APDC, de Freitas CS, Gontijo BV, Rodrigues ASL, Malafaia G. Ingestion of
878 tannery effluent as a risk factor to the health of birds: A toxicological study using *Coturnix*
879 *coturnix japonica* as a model system. *Sci Total Environ.* 2019 Sep 1;681:275-291. doi:
880 10.1016/j.scitotenv.2019.05.046. Epub 2019 May 11.

881 Saria R, Mouchet F, Perrault A, Flahaut E, Laplanche C, Boutonnet JC, Pinelli E, Gauthier L.
882 Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA
883 damage in *Xenopus laevis* tadpoles. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014 Sep;107:22-9. doi:
884 10.1016/j.ecoenv.2014.05.010. Epub 2014 Jun 4.

885 Sasaki T, Asakura M, Ishioka C, Kasai T, Katagiri T, Fukushima S. In vitro chromosomal
886 aberrations induced by various shape of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs).
887 *Journal of Occupational Health*, 58:
888 Schwab F, Bucheli TD, Lukhele LP, Magrez A, Nowack B, Sigg L, Knauer K. Are Carbon
889 Nanotube Effects on Green Algae Caused by Shading and Agglomeration? *Environmental*
890 *Science & Technology*, 45: 6136-6144, 2011.
891 Shen X, Li S, Zhang H, Chen W, Yang Y, Li J, Tao S, Wang X. Effect of multiwalled carbon
892 nanotubes on uptake of pyrene by cucumber (*Cucumis sativus* L.): Mechanistic
893 perspectives. *NanoImpact*, 10: 168-176, 2018.
894 Shimizu, N., N. Itoh, H. Utiyama and G.M. Wahl, 1998. Selective entrapment of
895 extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S
896 phase. *J. Cell Biol.*, 140: 1307-1320. Shimizu, N., T. Shimura and T. Tanaka, 2000.
897 Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of
898 micronuclei. *Mutat. Res.*, 448: 81-90.
899 Shvedova AA, Pietroiusti A, Fadeel B, Kagan VE. Mechanisms of carbon nanotube-induced
900 toxicity: Focus on oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261(2): 121-133,
901 2012.
902 Silva M, Motta TCS, Tintor DB, Dourado TA, Alcântara AL, Menegário AA, Ferreira JR.
903 Tilapia (*Oreochromis niloticus*) as a Bioindicator of Copper and Cadmium Toxicity. A
904 Bioavailability Approach. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(1): 143-151, 2017.
905 Snyder-Talkington BN, Dong C, Castranova V, Qian Y, Guo NL. Differential gene regulation in
906 human small airway epithelial cells grown in monoculture versus coculture with human
907 microvascular endothelial cells following multiwalled carbon nanotube exposure. *Toxicol*
908 *Rep.* 2019 May 28;6:482-488. doi: 10.1016/j.toxrep.2019.05.010. eCollection 2019.
909 Souza JM, Montalvão MF, da Silva AR, de Lima Rodrigues AS, Malafaia G. A pioneering study
910 on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to tannery
911 effluent. *Chemosphere.* 2017 May;175:521-533. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.087.
912 Epub 2017 Feb 17.
913 Souza JM, Montalvão MF, da Silva AR, de Lima Rodrigues AS, Malafaia G. A pioneering study
914 on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to tannery
915 effluent. *Chemosphere.* 2017 May;175:521-533. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.087.
916 Epub 2017 Feb 17.

- 917 Souza TS, Fontanetti CS. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes
918 of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research/Genetic*
919 *Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 605(1-2): 87-93, 2006.
- 920 Spence R., Fatema M. K., Reichard M., Huqk K. A., Wahab M. A., Ahmed Z. F., and Smith C.
921 (2006). The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of*
922 *Fish Biology*, 69, 1435-1448.
- 923 Suedel B.C., Boraczek J.A., Peddicord R.K., Clifford P.A., Dillon T.M. (1994) Trophic Transfer
924 and Biomagnification Potential of Contaminants in Aquatic Ecosystems. In: Ware G.W.
925 (eds) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Reviews of Environmental*
926 *Contamination and Toxicology (Continuation of Residue Reviews)*, vol 136. Springer, New
927 York, NY.
- 928 Unrine JM, Hunyadi SE, Tsyusko OV, Rao W, Shoults-Wilson WA, Bertsch PM. Evidence for
929 bioavailability of Au nanoparticles from soil and biodistribution within earthworms (*Eisenia*
930 *fetida*). *Environ Sci Technol*. 2010 Nov 1;44(21):8308-13. doi: 10.1021/es101885w.
- 931 Vieira JEA, de Oliveira Ferreira R, Marcel Dos Reis Sampaio D, Pereira da Costa Araújo A,
932 Malafaia G. An insight on the mutagenicity and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in
933 *Gallus gallus domesticus* (Phasianidae). *Chemosphere*. 2019 Sep;231:10-19. doi:
934 10.1016/j.chemosphere.2019.05.111. Epub 2019 May 16.
- 935 Vieira JEA, de Oliveira Ferreira R, Marcel Dos Reis Sampaio D, Pereira da Costa Araújo A,
936 Malafaia G. An insight on the mutagenicity and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in
937 *Gallus gallus domesticus* (Phasianidae). *Chemosphere*. 2019 Sep;231:10-19. doi:
938 10.1016/j.chemosphere.2019.05.111. Epub 2019 May 16.
- 939 Volpato, G.L.; Frioli, P.M.A.; Carrieri, M.P. Heterogeneous growth in fishes: some new data in
940 the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and a general view about the cusal mechanisms.
941 *Boletim of Physiology Animal*, v.13, p.7-22, 1989.
- 942 Walkley, A.; Black, I. A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic
943 matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*,
944 Baltimore, v. 37, n. 1, p. 29-38, Jan./ June 1934.
- 945 Wang Y, Okazaki Y, Shi L, Kohda H, Tanaka M, Taki K, Nishioka T, Hirayama T, Nagasawa
946 H, Yamashita Y, Toyokuni S. Role of hemoglobin and transferrin in multi-wall carbon
947 nanotube-induced mesothelial injury and carcinogenesis. *Cancer Sci*, 107(3): 250-257,
948 2016.
- 949 Xu K, Liu YX, Wang XF, Cheng JM. Effect of Nano-Carbon Black Surface Modification on
950 Toxicity to Earthworm (*Eisenia fetida*) Using Filter Paper Contact and Avoidance Test.

951 Bull Environ Contam Toxicol. 2019 Jul;103(1):206-211. doi: 10.1007/s00128-019-02572-
952 7. Epub 2019 Mar 22.

953 Xu K, Liu YX, Wang XF, Cheng JM. Effect of Nano-Carbon Black Surface Modification on
954 Toxicity to Earthworm (*Eisenia fetida*) Using Filter Paper Contact and Avoidance Test.
955 Bull Environ Contam Toxicol. 2019 Jul;103(1):206-211. doi: 10.1007/s00128-019-02572-
956 7. Epub 2019 Mar 22.

957 Xu Z., Liu Y., Wang Y. (2019) Application of *Daphnia magna* for Nanoecotoxicity Study. In:
958 Zhang Q. (eds) Nanotoxicity. Methods in Molecular Biology, vol 1894. Humana Press,
959 New York, NY

960 Yoosefian M, Jahani M. A molecular study on drug delivery system based on carbon nanotube
961 for the novel norepinephrine prodrug, Droxidopa. Journal of Molecular Liquids, 284: 258-
962 264, 2019.

963 Zambrano L, Martínez-Meyer E, Menezes N, Peterson AT. Invasive potential of common carp
964 (*Cyprinus carpio*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in American freshwater systems.
965 Can J Fish Aquat Sci, 63: 1903-1910, 2006.

966 Zhao X, Chang S, Long J, Li J, Li X, Cao Y. The toxicity of multi-walled carbon nanotubes
967 (MWCNTs) to human endothelial cells: The influence of diameters of MWCNTs. Food
968 Chem Toxicol. 2019 Apr;126:169-177. doi: 10.1016/j.fct.2019.02.026. Epub 2019 Feb 22.

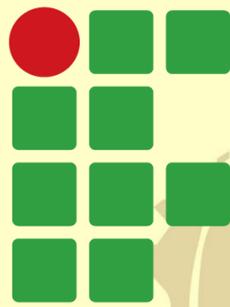
969 Zheng T, Abadi PPSS, Seo J, Cha BH, Miccoli B, Li YC, Park K, Park S, Choi SJ, Bayaniahangar
970 R, Zhang D, Lee SH, Lee CK, Khademhosseini A, Shin SR. Biocompatible Carbon
971 Nanotube-Based Hybrid Microfiber for Implantable Electrochemical Actuator and
972 Flexible Electronic Applications. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11, 23, 20615-20627.

973 Zheng W, Chen YQ, Zheng YF. Adsorption and electrochemistry of hemoglobin on Chi-carbon
974 nanotubes composite film. Applied Surface Science, 255: 571-573, 2008.

975 Zhu L, Meng L, Shi J, Li J, Zhang X, Feng M. Metal-organic frameworks/carbon-based materials
976 for environmental remediation: A state-of-the-art mini-review. Journal of Environmental
977 Management, 232: 964-977, 2019.

978 Zhuang YL, Lei L, Lan T, Li Y, Li P, Lin X, Liu R, Huang Z, Fen X, Ma Y. Chemical vapor
979 deposition-grown carbon nanotubes/graphene hybrids for electrochemical energy storage
980 and conversion. FlatChem, 15: 100091, 2019.

981



INSTITUTO FEDERAL

Goiano

Campus
Urutaí

