



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

LUIZ GUSTAVO VIEIRA OLIVEIRA

**EFEITO DA DECORIONAÇÃO NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM EMBRIÕES DE *Danio rerio***

FORTALEZA

2025

LUIZ GUSTAVO VIEIRA OLIVEIRA

**EFEITO DA DECORIONAÇÃO NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM EMBRIÕES DE *Danio rerio***

Monografia apresentada ao curso de Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal do
Ceará, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Emilio de Castro Miguel.
Coorientador: M^a. Ana Kamila Medeiros Lima.

FORTALEZA

2025

O48e Oliveira, Luiz Gustavo Vieira.
Efeito da decoronação na avaliação da toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio em embriões de Danio rerio / Luiz Gustavo Vieira Oliveira. – 2025.
54 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.
Orientação: Prof. Dr. Emilio de Castro Miguel.
Coorientação: Profa. Ma. Ana Kamila Medeiros Lima.

1. Nanotoxicologia. 2. Córion. 3. Peixe-zebra. 4. Dióxido de titânio. 5. Nanotecnologia. I. Título.
CDD 661

LUIZ GUSTAVO VIEIRA OLIVEIRA

EFEITO DA DECORIONAÇÃO NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM EMBRIÕES DE *Danio rerio*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
curso de Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Ceará, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia.

Aprovada em: 23/07/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emilio de Castro Miguel (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Raquel Guimarães Benevides
Universidade Federal do Ceará (UFC)

M.^a Roberta Laiz Bezerra Santos Albano
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho ao meu pai, Solão, que
segue vivo no meu peito.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de Iniciação Científica e por me propiciar tantas experiências que contribuíram para a minha formação como pessoa e cientista.

Ao meu orientador Emilio de Castro Miguel, por me acolher como seu aluno em fases fundamentais para a minha formação acadêmica e por comprovar que o esforço e a sensatez geram bons frutos no trabalho e nas relações entre as pessoas.

A todos os outros Professores que contribuíram para a minha formação.

À minha coorientadora Ana Kamila Medeiros Lima, por me ensinar muito do que foi necessário para que eu fizesse este trabalho, por mostrar que a perseverança aproxima alguém dos seus sonhos e por, acima de tudo, ser uma amiga cujas conversas tive o prazer de ter.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Emilio, Dr.^a Raquel e M.^a Roberta por aceitarem o convite de fazer parte dela, pelas valiosas considerações feitas a respeito deste trabalho e por possibilitarem uma conquista tão valiosa para mim.

À minha mãe, Meirilândia Coutinho Vieira Oliveira, por me amar em todos os dias da minha vida, por me querer perto de si e por cuidar de mim.

Ao meu pai, Solão Eduardo de Oliveira, por ter sido o maior responsável por minha educação, por ter feito de tudo para que eu ficasse bem e por ter construído tantas boas memórias que não cabem no papel.

Ao meu namorado, Juma, por me incentivar a concluir essa trajetória, comemorando meus avanços e sarando minhas angústias, e por construir comigo uma conexão de amor, carinho e companheirismo.

Ao meu irmão Luiz Fernando, por ser o melhor amigo que eu já tive e por compartilhar tantas coisas comigo.

Ao meu irmão Eduardo, por todas as vezes que viajou para estar com nossa família e por nunca deixar de ser meu irmão.

À minha avó Marlene, pelo olhar que brilha na mais pura vontade de me ver feliz.

À minha avó De Jesus, pelo café, pelo bolo e pela ternura que irradia na sua casa.

Aos meus avôs: Antônio e Faustino, por me mostrarem a importância de nos cercarmos de pessoas que amamos.

Aos meus amigos de longa data, Rian e Vinícius, pela amizade que nunca diminui, não importa quanto tempo fiquemos sem nos ver.

Aos meus amigos do ensino médio, Letícia, Luan e Nayury, por me fazerem tão feliz com nossos encontros.

Aos meus amigos de faculdade, Amanda, Arianne, Ariel, Dino, Fe, Gabi, João Neto, Laís, Leo, Matheus, pelo sentimento de pertencimento num lugar onde a descontração das risadas e a força do apoio são tão importantes.

Aos meus amigos de laboratório, Alexia, Ana, André, Bia, Davi, Jorge, Léo, Roberta e Vinícius, pela amizade que criei com cada um e pela parceria durante meu tempo de aprendizagem no Laboratório de Biomateriais (Biomat).

“Continue a nadar” (Procurando Dory, 2016).

RESUMO

Nanopartículas, como as de dióxido de titânio, têm ganhado extrema importância na produção industrial e nos avanços científicos. Suas propriedades físico-químicas únicas e melhoradas despertam o interesse tanto em aplicá-las de diversas formas quanto em investigar os riscos que elas apresentam à saúde humana e ao meio ambiente. Nesse contexto, modelos de ecotoxicidade possibilitam preencher as lacunas de conhecimento no campo da nanotoxicologia. A espécie de peixe *Danio rerio* se destaca pela semelhança genética com o ser humano e pelas vantagens como organismo modelo, como ensaios com seus embriões serem considerados *in vitro*. No entanto, a estrutura que protege o embrião de agentes externos, o córion, muitas vezes interfere na avaliação toxicológica. Por isso, este trabalho objetiva investigar a influência do córion na análise da toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio. Para isso, foi conduzido um estudo de toxicidade com embriões de *Danio rerio*, em um teste convencional e um teste com decorionação, e os parâmetros de toxicidade foram analisados. Também foi utilizada a técnica de microscopia fluorescente confocal, para verificar dano celular. O teste de toxicidade aguda convencional e o com decorionação sugeriram que as nanopartículas de dióxido de titânio não são tóxicas. As variações no comprimento das larvas e a adsorção de partículas agregadas à superfície do córion provaram que ele influencia os resultados de toxicidade. A microscopia confocal revelou a citotoxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio, que causaram dano celular aos embriões e larvas. O córion também mostrou afetar a interação entre o embrião e as nanopartículas. Dessa forma, a decorionação dos embriões garantiu resultados mais confiáveis e expressou a importância de considerar a presença do córion como uma possível interferência no estudo da toxicidade de nanopartículas com embriões de peixe. Espera-se que essa e outras melhorias sejam realizadas continuamente nos ensaios ecotoxicológicos e nanotoxicológicos, a fim de estabelecer consensos claros sobre a segurança dessas nanopartículas.

Palavras-chave: nanotoxicologia; córion; peixe-zebra; TiO₂, nanotecnologia.

ABSTRACT

Nanoparticles, such as titanium dioxide nanoparticles, have gained significant importance in industrial production and scientific advancements. Their unique and enhanced physicochemical properties spark interest both in applying them in many fields and in investigating the risks they pose to human health and the environment. In this context, ecotoxicity models help to fill knowledge gaps in the field of nanotoxicology. The fish species *Danio rerio* stands out due to its genetic similarity to humans and advantages as a model organism, such as its embryo assays being considered in vitro. However, the structure that protects the embryo from external agents - the chorion - often interferes with toxicological assessments. Therefore, this study aims to investigate the influence of the chorion on the toxicity analysis of titanium dioxide nanoparticles. For this purpose, a toxicity study was conducted with *Danio rerio* embryos, using a conventional test and a test with dechoriation, and toxicity parameters were analyzed. Confocal fluorescence microscopy was also used to assess cellular damage. The conventional acute toxicity test and the test with dechoriation both suggested that titanium dioxide nanoparticles are not toxic. Variations in larval length and the adsorption of aggregated particles on the chorion surface demonstrated that it influences toxicity results. Confocal microscopy revealed the cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles, which caused cellular damage to embryos and larvae. The chorion also appeared to affect the interaction between the embryo and the nanoparticles. Thus, dechoriation of the embryos ensured more reliable results and highlighted the importance of considering the presence of the chorion as a potential interference in nanoparticle toxicity studies using fish embryos. It is expected that this and other improvements will continue to be made in ecotoxicological and nanotoxicological assays, in order to establish clear consensus regarding the safety of these nanoparticles.

Keywords: nanotoxicology; chorion; zebrafish; TiO₂; nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Partes do corpo do embrião de <i>Danio rerio</i> com 48 hpf (a) e com 96 hpf (b)	20
Figura 2	– Estrutura geral do embrião de peixe-zebra, envolto pelo córion	22
Figura 3	– Aquário com bolas de vidro (a) e divisória (b) delimitando espaço entre machos e fêmeas	27
Figura 4	– Esquema de montagem das placas com os embriões	28
Figura 5	– Embrião com 5,3 hpf	29
Figura 6	– Prancha de imagens de campo claro de embriões com 24 hpf e larvas com 96 hpf para cada solução no FET convencional	32
Figura 7	– Prancha de imagens de campo claro de embriões com 48 hpf e larvas com 96 hpf para cada solução no FET com decorionação	35
Figura 8	– Imagens de microscopia fluorescente confocal de embriões de <i>Danio rerio</i> com 24 hpf	41
Figura 9	– Imagens de microscopia fluorescente confocal de embriões de <i>Danio rerio</i> provenientes de FET convencional com 96 hpf	43
Figura 10	– Imagens de microscopia fluorescente confocal de embriões decorionados de <i>Danio rerio</i> com 96 hpf	44
Figura 11	– Ampliações na região da nadadeira ventral dos embriões, nas imagens de microscopia fluorescente confocal	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Taxa de sobreviventes em teste com embriões de <i>Danio rerio</i> sem interferência no córion	33
Gráfico 2 – Taxa de sobreviventes em teste com embriões de <i>Danio rerio</i> decorionados	36
Gráfico 3 – Comprimento corporal das larvas de <i>Danio rerio</i> com 96 hpf	38
Gráfico 4 – Comparação do comprimento entre os dois tratamentos: convencional e decorionação, nas soluções	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulação da água reconstituída	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NPs	Nanopartículas
TiO ₂	Dióxido de titânio
NPs-TiO ₂	Nanopartículas de dióxido de titânio
UFC	Universidade Federal do Ceará
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
FET	Teste de toxicidade aguda em embriões de peixe
nm	Nanômetros
µm	Micrômetros
mg	Miligramas
mL	Mililitros
L	Litro
°C	Graus Celsius
pH	Potencial de hidrogênio
µS	Micro Siemens
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
CaSO ₄	Sulfato de cálcio
KCl	Cloreto de potássio
hpf	Horas pós-fertilização
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CL50	Concentração Letal 50%

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
%	Porcentagem
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Nanopartículas (NPs)	17
1.2	Dióxido de titânio (TiO₂)	17
1.3	Toxicologia das nanopartículas de dióxido de titânio (NPs-TiO₂) em modelos aquáticos	19
1.4	Peixe-zebra	20
1.5	Córion	22
2	OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	MÉTODOS E MATERIAIS	25
3.1	Dióxido de titânio (TiO₂)	25
3.2	Teste de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET)	25
3.2.1	<i>Diluições</i>	25
3.2.2	<i>Produção de embriões</i>	26
3.2.3	<i>Decorionação</i>	27
3.2.4	<i>Montagem das placas</i>	28
3.2.5	<i>Registro de dados</i>	29
3.3	Análises estatísticas	30
3.4	Microscopia Fluorescente Confocal	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	FET	31
4.1.1	<i>FET convencional</i>	31
4.1.2	<i>FET com decorionação</i>	34
4.2	Variação no comprimento das larvas com 96 hpf	36
4.3	Dano celular	39
5	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Em poucas décadas, a nanotecnologia e a nanociência ganharam extrema importância na produção industrial e nos avanços científicos (Bayda et al., 2020). No campo da nanotecnologia, as nanopartículas (NPs) se destacam por suas propriedades físico-químicas novas ou melhoradas em comparação aos materiais a granel, como alta superfície de contato, grande força mecânica, atividade óptica e reatividade química (Khan; Saeed; Khan, 2019).

1.1 Nanopartículas (NPs)

As NPs em geral são classificadas em três classes com base na sua composição: orgânicas, à base de carbono e inorgânicas. As orgânicas são feitas de proteínas, carboidratos, lipídeos ou qualquer outro composto orgânico. As NPs à base de carbono são feitas apenas de átomos de carbono. Por fim, as inorgânicas compreendem as demais e, dentro desta categoria, podem ser nanopartículas metálicas, cerâmicas ou semicondutoras (Joudeh; Linke, 2022).

Por conta de suas peculiaridades, as NPs são aplicadas de diversas formas nos setores de medicina, agricultura, meio ambiente, alimentos, informática e segurança (Altammar, 2023). Essa demanda crescente tem despertado na comunidade científica internacional a urgência de estudar seus efeitos toxicológicos. Com isso, a nanotoxicologia surgiu como uma disciplina para atender à necessidade de investigar a toxicidade de nanomateriais, nanopartículas e nanocompósitos e os efeitos que eles podem ter nos seres humanos e na biota (Solano *et al.*, 2021).

1.2 Dióxido de titânio (TiO₂)

O dióxido de titânio (TiO₂) é um óxido metálico encontrado na forma de três estruturas cristalinas: rutilo, anatase e brookita (Braun; Baidins; Marganski, 1992). É mais conhecido como um pigmento sólido, branco e termicamente estável (Chen; Mao, 2007). Comumente, ele é empregado na forma de NPs, devido ao aumento da sua superfície de contato e ao crescimento de suas propriedades físico-químicas (Haider; Jameel; Al-Hussaini, 2019; Racovita, 2022).

A cor característica do TiO₂ se deve à sua capacidade de não absorver luz no espectro visível das cores e de realizar espalhamento de luz branca, graças aos altos índices de refração de suas formas minerais rutilo e anatase (Pfaff, 2023). Em virtude disso, ele é

amplamente usado tanto como pigmento quanto como revestimento, conferindo brilho à superfície de outros materiais (Wu, 2021). Estima-se que os pigmentos de TiO_2 dominem aproximadamente 60% da produção global de pigmentos (Pfaff, 2022).

Outra importante característica do TiO_2 se deve à sua banda proibida, termo dado à quantidade de energia necessária para os elétrons de materiais semicondutores passarem da camada de valência para a camada de condução (Fouad; Shihata; Morgan, 2017). Por apresentar uma larga banda proibida, o TiO_2 absorve luz ultravioleta (UV) e, ao fazer isso, induz a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que reagem espontaneamente com a matéria orgânica ao redor (Haider et al., 2017). Esse processo é um exemplo de atividade fotocatalítica, propriedade do TiO_2 bastante explorada por degradar microrganismos (Serov et al., 2024; Vargas et al., 2024). As NPs- TiO_2 exercem esse efeito com maior intensidade, pelo aumento na superfície de contato e na velocidade das reações (Abbood; Ali, 2024). Assim, elas são classificadas como NPs cerâmicas e semicondutoras. Por conta de sua excelente atividade fotocatalítica, as NPs- TiO_2 são utilizadas como agente descontaminante no tratamento de águas e no revestimento de embalagens de alimentos (Ameta et al., 2020; Armaković; Savanović; Armaković, 2023; Krakowiak et al., 2021; Tang et al., 2018).

A capacidade do TiO_2 absorver luz UV também o torna um excelente filtro solar inorgânico (Araki; Baby, 2025). A faixa de absorção do composto coincide com os comprimentos de onda dos raios UV do tipo A e do tipo B, os dois provenientes do sol, que conseguem atravessar a atmosfera e causar sérios danos à pele humana, como o desenvolvimento de câncer (Smijs; Pavel, 2011). Nesse contexto, junto ao óxido de zinco (ZnO), o TiO_2 é uma das principais substâncias utilizadas na formulação de protetores solares (Schneider; Lim, 2019). Nesse produto, o tamanho ideal das partículas de TiO_2 se encontra entre 50 nm e 150 nm, pois nessa faixa o composto se torna transparente e possui uma textura mais uniforme quando aplicado sobre a pele (Ghamarpoor; Fallah; Jamshidi, 2023).

Além das aplicações mencionadas, o TiO_2 , inclusive como nanomaterial, é utilizado em produtos farmacêuticos, pastas de dente, implantes dentários, tintas acrílicas, tintas de tatuagem, nanofertilizantes, plásticos, borrachas e papéis (Aljubran et al., 2025; Chandoliya et al., 2024; Das; Ambardekar; Bandyopadhyay, 2021; Li et al., 2023; Rompelberg et al., 2016; Weir et al., 2012).

Por conta da ampla utilização das NPs- TiO_2 , durante décadas, preocupações têm sido levantadas quanto à sua segurança e aos riscos que ele apresenta ao corpo humano e ao meio ambiente (Kessler, 2011). Na indústria de alimentos, foram feitas diferentes considerações sobre a segurança do uso de TiO_2 em diversos produtos, como chicletes, doces, bolos, biscoitos

e sorvetes (Blaznik et al., 2021). A União Europeia proibiu o uso do corante alimentício E171 de TiO_2 em 2022 devido aos riscos de inalação e de genotoxicidade apontados pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos no ano anterior, porém há divergências entre outras autoridades com relação a essa decisão (Warheit, 2024; Younes et al., 2021). No Brasil, a Anvisa concerne aos riscos do TiO_2 em alimentos, mas não bane o uso do corante (ANVISA, 2023). Além disso, O descarte de TiO_2 em mares soma grandes quantidades pelo uso de protetor solar durante o banho em praias, e representa um risco aos ecossistemas aquáticos (Dedman et al., 2021; Slomberg et al., 2021; Tovar-Sánchez; Sánchez-Quiles; Rodríguez-Romero, 2019).

1.3 Toxicologia das nanopartículas de dióxido de titânio em modelos aquáticos

A utilização massiva das NPs- TiO_2 na indústria e na formulação de cosméticos aumenta a probabilidade de despejo em ambientes aquáticos (Ortiz-Román; Casiano-Muñiz; Román-Velázquez, 2024). Nesses ambientes, as NPs- TiO_2 podem persistir devido à sua estabilidade química e à capacidade de formar agregados e de interagir com a matéria orgânica ao redor, além de expressar toxicidade de diversas formas nos organismos aquáticos, de acordo com suas propriedades físico-químicas (Permana; Andhikawati, 2025). A toxicidade das NPs- TiO_2 tem sido estudada em diferentes espécies aquáticas, ao passo em que seus efeitos podem variar entre elas (Miguel; Pinheiro; Miguel, 2021).

Citotoxicidade e genotoxicidade são as principais categorias de toxicidade das NPs- TiO_2 apontadas na literatura (Permana; Andhikawati, 2025). Ambas são ocasionadas sobretudo pela indução à formação de espécies reativas de oxigênio, que é mais causada pela forma de anatase do TiO_2 do que pelo rutilo (Wang; Fan, 2014). A citotoxicidade das NPs- TiO_2 é comumente observada pela ativação de vias de sinalização de apoptose, estresse oxidativo e inflamação nas células (Bevacqua et al., 2022). Enquanto isso, a genotoxicidade se expressa no dano ao DNA, o que foi percebido em células semelhantes às do epitélio pulmonar e em pessoas que trabalhavam com a produção de NPs- TiO_2 (Jugan et al., 2012; Pelclova et al., 2016).

Em alguns estudos com modelos aquáticos, as NPs- TiO_2 não se mostraram tóxicas. Em um ensaio com o microcrustáceo de água doce *Daphnia similis*, as amostras de NPs- TiO_2 não apresentaram toxicidade na concentração de 100 mg/L (Marcone et al., 2012). Outro trabalho indicou que não havia toxicidade para três espécies de alga: *Synedra ulna*, *Scenedesmus quadricauda* e *Sigeoclonium tenue* (Kulacki et al., 2012).

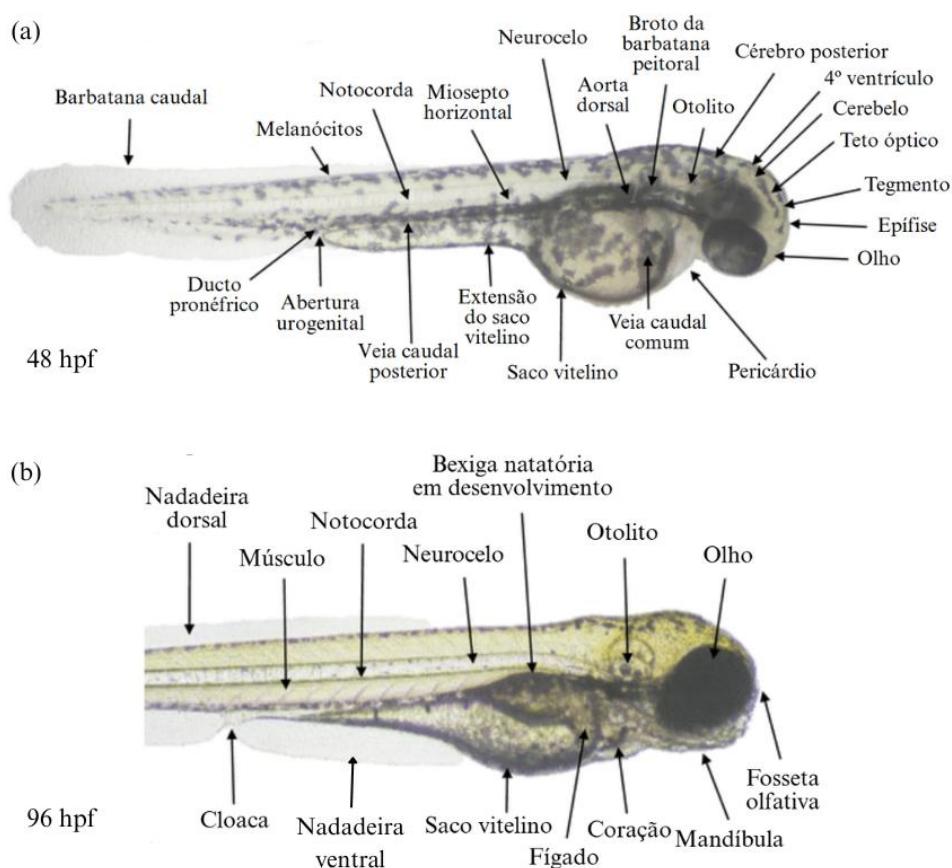
Em outros estudos, as NPs- TiO_2 se revelaram tóxicas, em concentrações diferentes entre as espécies. A concentração letal 50 (CL50), parâmetro que indica a concentração

necessária de uma substância para matar metade de uma população, foi de apenas 2,2 mg/L nos peixes de *Oryzias latipes*; e de 29,8 mg/L no microcrustáceo *Daphnia magna* (Ma; Brennan; Diamond, 2012). Já nos náuplios de *Artemia salina*, um microcrustáceo de água doce, a CL50 observada foi de 50 mg/L (Pinheiro et al., 2023).

1.4 Peixe-zebra

O *Danio rerio*, conhecido como peixe-zebra ou paulistinha, é uma espécie de peixe tropical de água doce (Silva et al., 2024). Seu crescimento é dividido entre: embrião, larva, juvenil e adulto (Singleman; Holtzman, 2014). O desenvolvimento do embrião compreende mudanças morfológicas intensas e finda dando início ao estágio de larva em aproximadamente 72 horas pós-fertilização (hpf), com a eclosão (Paatero et al., 2017). Algumas partes notáveis da anatomia dos embriões e larvas de peixe-zebra estão apontadas na Figura 1.

Figura 1 – Partes do corpo do embrião de *Danio rerio* com 48 hpf (a) e com 96 hpf (b)



Fonte: adaptado de Von Hellfeld et al. (2020)

O peixe-zebra é um dos organismos modelos mais utilizados em pesquisas (Bedell et al., 2025). Isso se deve, em parte, à espécie ter seu genoma completamente sequenciado e apresentar uma homologia genética de 70% com o genoma humano (Howe et al., 2013). Por isso, o peixe-zebra é objeto de estudo em muitas pesquisas genéticas, como na descoberta de genes e no entendimento de bases moleculares associadas a doenças humanas (Adhish; Manjubala, 2023; Shimizu; Shiraishi; Hanada, 2023). Além disso, linhagens transgênicas da espécie têm revolucionado a pesquisa biomédica no entendimento de transdução de sinais, organelas intracelulares e sistemas hematopoiético, nervoso, urogenital e digestivo (Choe et al., 2021).

A popularidade do *Danio rerio* como organismo modelo também se atribui à sua fácil manutenção, tamanho pequeno, alta fecundidade, rápido desenvolvimento e extensa literatura (Hickman et al., 2017). Os embriões desse peixe são transparentes, visíveis com pouca aproximação de imagem e possuem desenvolvimento externo (Teame et al., 2019). Somado a isso, estudos conduzidos com esses embriões são considerados *in vitro* por até 5 dias após a fecundação e atendem à política dos “3 Rs” (substituição, redução e refinamento) como uma alternativa viável à experimentação animal (Poh; Stanslas, 2024). Isso torna os experimentos com embriões de peixe-zebra mais éticos do que os realizados *in vivo* com mamíferos, por exemplo, ao mesmo tempo em que eles possuem uma complexidade de sistemas maior e mais próxima do ser humano do que outros ensaios *in vitro*, como culturas de células e tecidos (Canedo et al., 2022; Santiago; Félix, 2024).

Além de sua viabilidade ética, os embriões de *Danio rerio* têm grande potencial em estudos de toxicidade, por apresentarem um desenvolvimento sensível aos efeitos nocivos de diferentes compostos e representarem os impactos que substâncias químicas podem causar ao meio ambiente (Bauer; Mally; Liedtke, 2021). Tendo isso em vista, a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) padronizou o teste de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET, do inglês “*Fish Embryo Acute Toxicity*”), o qual é majoritariamente efetuado com peixes-zebra (Busquet et al., 2014; OCDE, 2013). A investigação de toxicidade também se expande a fármacos e nanomateriais, que vêm sendo desenvolvidos com preocupações sobre os seus riscos (Cassar et al., 2020; Jia et al., 2019).

O peixe-zebra atende a demanda crescente em avaliar a toxicidade de nanomateriais, que são produzidos em larga escala e podem afetar de diferentes formas os sistemas biológicos (Lin et al., 2013; Pereira et al., 2019). Nesse contexto, embriões de peixe-zebra têm sido usados em estudos de nanotoxicologia com nanotubos de carbono, nanopartículas de selênio, cobre, prata e óxido de zinco (Cordeiro et al., 2018; Hariharan et al.,

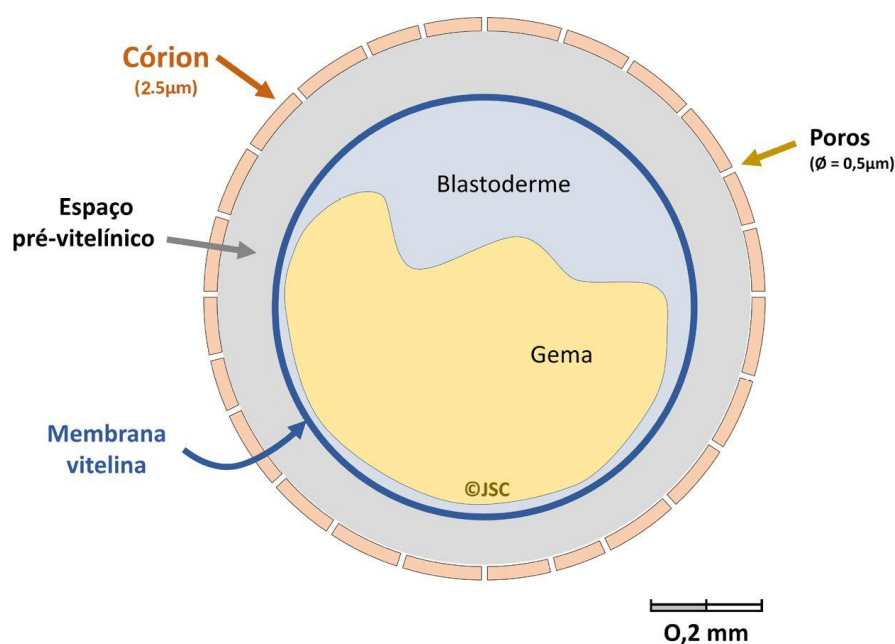
2024; Liu et al., 2024; Qiang et al., 2020; Valdiglesias et al., 2023). Além disso, experimentos *in vivo* com o peixe-zebra permitem aprimorar novas tecnologias com nanomateriais, como sistemas de entrega de fármacos auxiliados por nanopartículas (Mutalik et al., 2024).

A análise da toxicidade de NPs-TiO₂ em diferentes ensaios é pertinente, levando em consideração que seus formatos, tamanhos, propriedades físico-químicas e comportamentos podem variar (Noël et al., 2012). Nesse sentido, um estudo recentemente indicou, por meio de um FET, que as NPs-TiO₂ não têm efeito significativo na mortalidade e eclosão de embriões de peixe-zebra, mas afetaram profundamente o desenvolvimento deles (Ortiz-Román; Casiano-Muñiz; Román-Velázquez, 2024). Outro FET com peixe-zebra indicou que o material em questão, na forma de nanopartículas, causou uma redução no peso corporal e no comprimento dos embriões, o que aumentava com a dose (Gu et al., 2021).

1.5 Córion

O córion (Figura 2) é a membrana biológica mais externa do embrião de peixes, que atua como barreira protetiva contra impactos mecânicos, dessecação e mudanças abruptas nas condições físico-químicas do meio (Pérez-Atehortúa et al., 2023). No desenvolvimento embrionário dos peixes-zebra, esse envelope tem uma grossura de 1,5 a 2,5 µm e possui poros com 0,5 a 0,7 µm de diâmetro (Browning et al., 2009; Rawson et al., 2001).

Figura 2 – Estrutura geral do embrião de peixe-zebra, envolto pelo córion



Fonte: adaptado de Ribeiro et al. (2024).

Apesar de seus poros terem um tamanho suficiente para passagem de moléculas e de materiais com dimensões nanométricas, há indícios de que o córion impede que alguns compostos acessem totalmente o interior do embrião (Osborne et al., 2013). Isso ocorre principalmente por dois fatores vinculados aos nanomateriais: a adsorção deles ao córion e a tendência que alguns deles têm de formar aglomerados (Kim; Tanguay, 2014; Shih et al., 2016).

No teste de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra, a reprodutibilidade de resultados é essencial (Canedo et al., 2022). Quando os nanomateriais são impedidos, parcial ou totalmente, de atravessar o córion e interagir com o embrião, a real influência da sua toxicidade pode não ser aplicada, levando a resultados incongruentes (Pereira et al., 2019).

Nessas circunstâncias, técnicas de decorionação vêm sendo empregadas como um meio de retirar a membrana que, em alguns casos, dificulta a avaliação correta da toxicidade de substâncias nos embriões de peixe-zebra (Carbaugh; Van der Schalie; Widder, 2022). Essa abordagem tem mostrado impactos positivos, visto que experimentos que compararam a condução do FET feita com ou sem o córion demonstraram um aumento na sensibilidade dos embriões e consequentemente na percepção da toxicidade dos compostos (Paatero et al., 2017; Panzica-Kelly; Zhang; Augustine-Rauch, 2015; Tran et al., 2021).

Os principais métodos de decorionação são o mecânico e o enzimático. A remoção mecânica geralmente é feita com o uso de duas pinças afiadas, realizando um rasgo no córion e expelindo o embrião para o meio externo. A decorionação mecânica nas primeiras horas pós-fertilização resulta em taxas de sobrevivência abaixo da porcentagem exigida pela OCDE de 90% para o controle negativo do FET; contudo o emprego do método em embriões com 24 hpf eleva essa taxa a um número viável para a realização do experimento. Por sua vez, a remoção mediada por enzimas é comumente feita com pronase, uma enzima do tipo protease. Com esse método, a taxa de ocorrência de danos aos embriões varia com a concentração de pronase e com o tempo de vida do embrião, demonstrando-se estável a 0,5 mg/mL em 24 hpf. (Hasegawa; Farr; Maves, 2023; OCDE, 2013).

É importante ressaltar que nem todo nanomaterial necessita da decorionação para acessar o interior do embrião e exercer seus efeitos tóxicos plenamente (Duan et al., 2020; Henn; Braunbeck, 2011). Contudo a quantidade de estudos que verificam essa condição ainda é escassa frente à enorme variedade de nanomateriais, com diferentes tamanhos, cargas e propriedades físico-químicas. Assim, o presente estudo visa investigar o efeito da decorionação no estudo da toxicidade de NPs-TiO₂ em embriões de *Danio rerio*.

2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

2.1 Geral

Investigar o efeito da decorionação no estudo da toxicidade de NPs-TiO₂ a partir de análises com embriões de *Danio rerio*.

2.1 Específicos

- Realizar dois testes de toxicidade aguda com embriões de *Danio rerio*: um de acordo com o protocolo convencional e outro com remoção do córion;
- Avaliar o desenvolvimento dos embriões expostos às nanopartículas;
- Verificar a capacidade das nanopartículas de causarem danos às células;
- Examinar o efeito da decorionação sobre os resultados de toxicidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Dióxido de titânio (TiO₂)

O TiO₂ foi comprado da distribuidora Via Farma pelo Grupo de Química de Materiais Avançados da UFC. As partículas comerciais possuíam um tamanho aproximado de 114,5 nm, tendo o rutilo 58,8 nm e a anatase 86 nm (Barbosa *et al*, 2018). O Grupo concedeu gentilmente para o Laboratório de Biomateriais uma parte das partículas, que ficaram armazenadas dentro de um microtubo na geladeira.

3.2 Teste de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET)

Foram feitos dois testes, descritos adiante, seguindo o protocolo da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) “Teste N° 236: Teste de Toxicidade Aguda em Embriões de Peixe” (OCDE, 2013). O primeiro teste, considerado convencional, seguiu os procedimentos detalhados no documento. O segundo teste, por outro lado, teve a decorionação mecânica dos embriões no estágio de 24 hpf, o que os privou da exposição às NPs-TiO₂ até esse momento, mas ainda permitiu verificar o efeito das NPs sobre eles após 24 horas de exposição, no momento de 48 hpf, e no final do teste, com 96 hpf. Ambos os testes foram feitos em triplicata. Os parâmetros de análise da toxicidade foram adaptados conforme atualizações na literatura.

3.2.1 Diluições

Em todas as diluições do ensaio, o solvente empregado foi água reconstituída ajustada a pH 7,3 (Tabela 1) e condicionada a 26° C.

Tabela 1 – Formulação da água reconstituída

Água reconstituída - pH 7,3	
NaHCO ₃	96 mg
MgSO ₄	60 mg
CaSO ₄ · 2H ₂ O	60 mg
KCl	4 mg
Água destilada	~ 1000 mL

Fonte: Adaptado de OCDE (2013).

Uma solução estoque de dióxido de titânio a 100 mg/L foi preparada em um balão volumétrico de 100 mL. A solução foi homogeneizada no banho de ultrassom do Laboratório de Materiais Funcionais Avançados, da UFC.

A partir da solução estoque, foram feitas duas diluições seriadas de 10x, utilizando-se micropipetas automáticas, tubos de centrifuga do tipo falcon de 50 mL e balões volumétricos de 50 mL. Ao todo, obtiveram-se três concentrações do material: 100 mg/L, 10 mg/L e 1 mg/L.

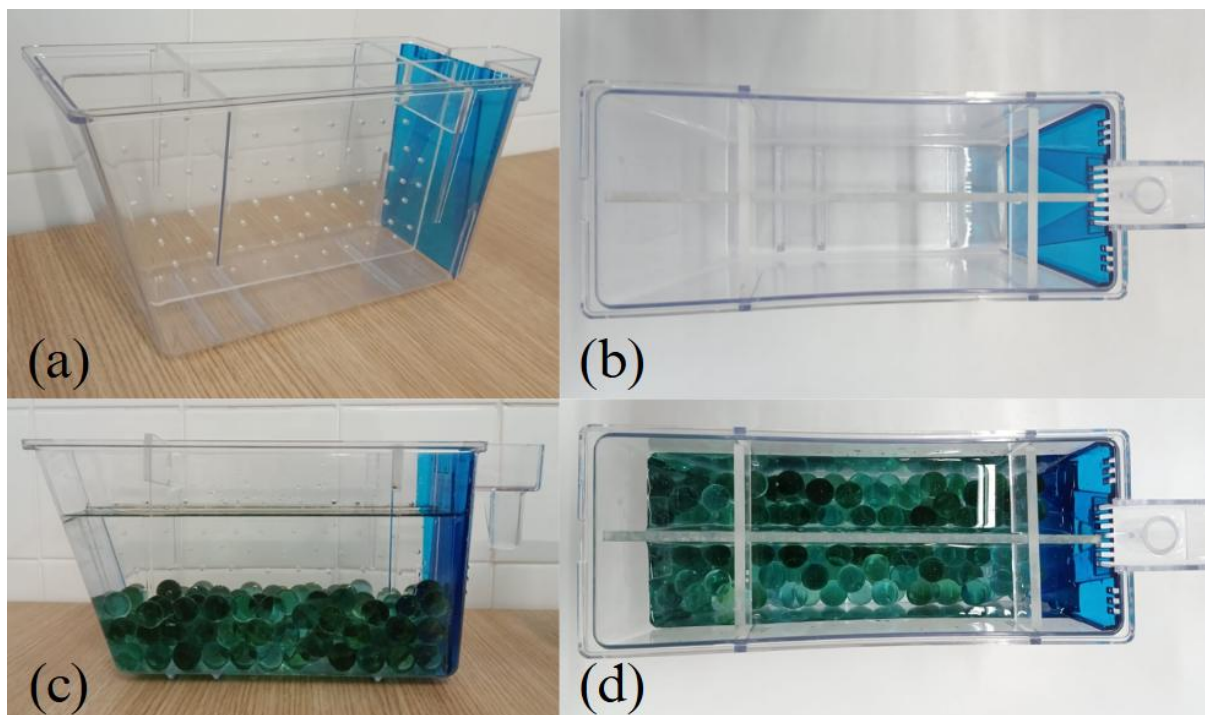
Para o controle negativo do experimento, foi usada a água reconstituída com pH 7,3. Já para o controle positivo, foi preparada uma solução de 3,4-dicloroanilina a 4 mg/L, um pesticida com toxicidade a embriões de peixe bem fundamentada em testes convencionais (OCDE, 2013).

3.2.2 Produção de embriões

Os embriões foram obtidos a partir de reprodução de peixes-zebras da colônia do Laboratório de Biomateriais, mantida em condições laboratoriais com um rack Altamar® e os parâmetros: temperatura $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2$, pH $7,0 \pm 0,2$, condutividade $650\text{ }\mu\text{S}$. O pH foi mantido com solução tampão de bicarbonato de sódio, e a condutividade, com sal Red Sea®. Os parâmetros eram estabilizados automaticamente pelo rack e monitorados integralmente via *software*.

Três aquários de acasalamento foram montados, cada um com 3 machos e 6 fêmeas em idade fértil. Os peixes de sexos diferentes ficaram separados por uma divisória no centro dos aquários, e bolas de vidro foram colocadas no fundo para evitar que os peixes adultos consumissem os ovos gerados, como visto na Figura 3. As divisórias foram recolhidas logo antes do acender das luzes na manhã do dia seguinte, dando início à cópula. O ambiente foi isolado de sons e de pessoas por cerca de 3 horas, até o encerramento da reprodução.

Figura 3 – Montagem do aquário de reprodução dos peixes-zebra



Fonte: Autor, 2025.

Legenda: Aquário com divisória para separar machos e fêmeas antes do momento de cópula (a), visto de cima (b); acrescido de bolas de vidro para evitar que os peixes alcancem os ovos depositados e alimentem-se deles (c), visto de cima (d).

Ao final das 3 horas de reprodução, os peixes presentes nos aquários de cruzamento foram transferidos de volta para os seus aquários de origem e as bolas de vidro foram removidas. A água dos aquários foi escoada em uma peneira pequena, coletando os embriões. Estes foram enxaguados com água reconstituída e colocados em placas de Petri com a mesma solução. Os ovos não fertilizados e outros resíduos foram retirados e descartados usando um estereomicroscópio (Zeiss Stemi®) e uma pipeta de Pasteur. Após a limpeza, os embriões foram mantidos a 28°C em uma câmara de cultivo de embriões (Scienlabor Embryo UV®).

3.2.3 Decorionação

O córion dos embriões foi removido manualmente com o uso de duas pinças de precisão, sob ampliação do estereomicroscópio. O procedimento foi feito em embriões com 24 hpf, a fim de contornar a letalidade do método em embriões com poucas hpf, observada por Hasegawa; Farr; Maves, (2023), e obter uma quantidade de viáveis suficiente para a realização do FET. Paatero *et al.* (2017) também realizaram a decorionação em embriões com 24 hpf,

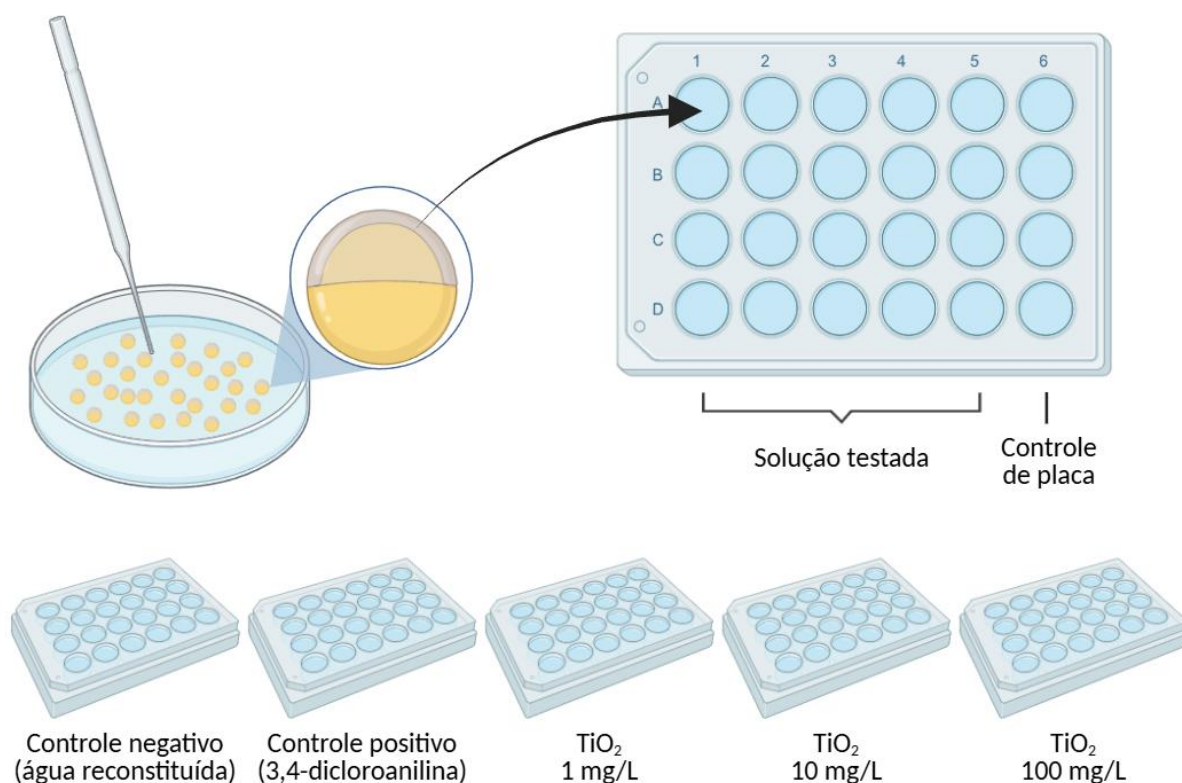
iniciando a partir disso a exposição às soluções, e fizeram o primeiro registro de dados em 48 hpf.

Na técnica de microscopia fluorescente confocal, a baixa taxa de sobrevivência resultante do emprego da decorronação mecânica no estágio de 5,3 hpf não era um fator limitante. Por isso, foi possível fazer a decorronação dos embriões nesse estágio e iniciar sua exposição às NPs-TiO₂ concomitante com os embriões do teste convencional, obtendo-se imagens de 24 e 96 hpf de um indivíduo de cada tratamento, com tempos iguais de exposição.

3.2.4 Montagem das placas

Para o controle negativo, foram adicionados 2 mL de água reconstituída em todos os poços de uma placa de 24 poços. Já para o positivo, 20 dos poços foram preenchidos com a solução de 3,4-dicloroanilina a 4 mg/L. Para cada uma das três concentrações de dióxido de titânio, 1 mg/L, 10 mg/L e 100 mg/L, foram pipetados 2 mL em 20 poços. Os poços restantes nas placas foram inteirados com água reconstituída, para controle interno da placa, conforme esquematizado na figura 4.

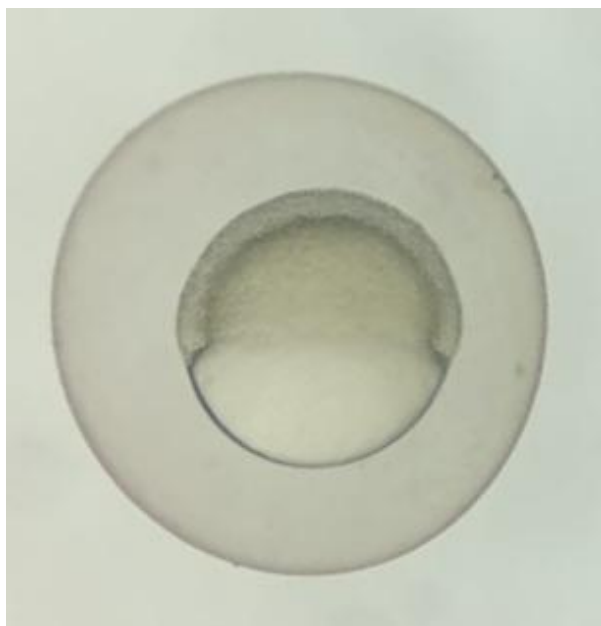
Figura 4 – Esquema de montagem das placas com os embriões



Fonte: elaborado pelo autor.

Embriões com córion foram selecionados em aproximadamente 5,3 hpf, identificados pela organização embrionária ilustrada na Figura 5, e colocados nas placas, um por poço. As placas foram armazenadas a 28 ° C na câmara indicada (Scienlabor Embryo UV®). Diferentemente, embriões sem córion foram escolhidos com 24 hpf e postos nas mesmas condições, em um outro experimento.

Figura 5 – Embrião com 5,3 hpf



Fonte: elaborado pelo autor.

3.2.5 Registros de dados

Nos FETs, os embriões com córion foram expostos às nanopartículas durante 4 dias, enquanto que os embriões sem córion, durante 3 dias. A cada 24 horas, foram anotados os números de embriões que se encontravam vivos, eclodidos, sem desprendimento correto da cauda, atraso no desenvolvimento de somitos e deformações. Esses parâmetros foram adaptados do protocolo para FET da OCDE (2013).

Um indivíduo de cada solução do teste convencional foi fotografado às 24 e 96 hpf, utilizando um estereomicroscópio acoplado a um computador com o programa ZEN (Zeiss®). Os indivíduos do teste com decorionação foram fotografados às 48 e 96 hpf. Cada embrião escolhido para ter sua imagem capturada possuía características em comum com a maioria na sua placa de poços. Também foram tiradas fotografias contendo todos os sobreviventes de um

mesmo tratamento às 96 hpf. Apesar de diferentes tempos de contato com as NPs, verificou-se o desenvolvimento dos embriões com e sem córion nas primeiras e últimas horas de exposição. Posteriormente, eles tiveram seu comprimento corporal medido com o programa *Image J*.

Por fim, os dados numéricos foram compilados em planilhas e gráficos no Excel (Microsoft®). Foram montadas pranchas de imagens com as fotografias obtidas, usando a ferramenta de edição *Inkscape*.

3.3 Análises estatísticas

Os dados de comprimento dos embriões foram submetidos a diferentes testes utilizando o programa R. Inicialmente, foram feitos os Testes de Shapiro-Wilk e de Levene para examinar se os dados eram distribuídos normalmente e se havia homogeneidade entre eles, respectivamente. Após isso, foi realizado o Teste de Kruskal-Wallis, seguido do Teste de Dunn, a fim de verificar se havia diferença significativa entre os grupos e entre quais deles havia essa diferença. Por fim, foi executado um Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, com o intuito de investigar o impacto do córion nos resultados de crescimento.

3.4 Microscopia fluorescente confocal

Alguns embriões e larvas de peixe-zebra, com 24 hpf e 96 hpf respectivamente, foram emergidos em solução de laranja de acridina, que se liga a DNA extravasado e marca dano celular, a 5 mg/L durante 40 minutos, em temperatura de 28°C (Pinheiro *et al.*, 2023). As placas de poços onde elas estavam foram cobertas com papel alumínio para evitar a degradação do corante pela luz mediante ação fotocatalítica do TiO₂ (Lu *et al.*, 2008). Após isso, a solução foi retirada com uso de uma pipeta de Pasteur, e as larvas foram lavadas três vezes durante 5 minutos cada com água reconstituída, para retirar o excesso de corante. Outros indivíduos não passaram pelo procedimento de marcação com laranja de acridina, a fim de visualizar a autofluorescência do organismo e, por comparação aos corados, permitir estimar o real dano celular.

A eutanásia sob anestesia foi feita por submersão em triclaína a 250 mg/L durante pelo menos 3 minutos de ausência de movimento opercular (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - UNIFESP, 2024).

As imagens foram produzidas a partir do Microscópio Confocal LM-710 (Zeiss®) da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará – UFC. O laser utilizado foi de 405 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos resultados dos ensaios de toxicidade aguda (FET) nos tratamentos convencional e com decorionação, a partir das análises de sobrevivência, desenvolvimento, desprendimento de cauda, formação de somitos, deformações e crescimento. O crescimento das larvas foi examinado mediante análises estatísticas. Também foram obtidas imagens de microscopia fluorescente confocal dos embriões.

4.1 FET

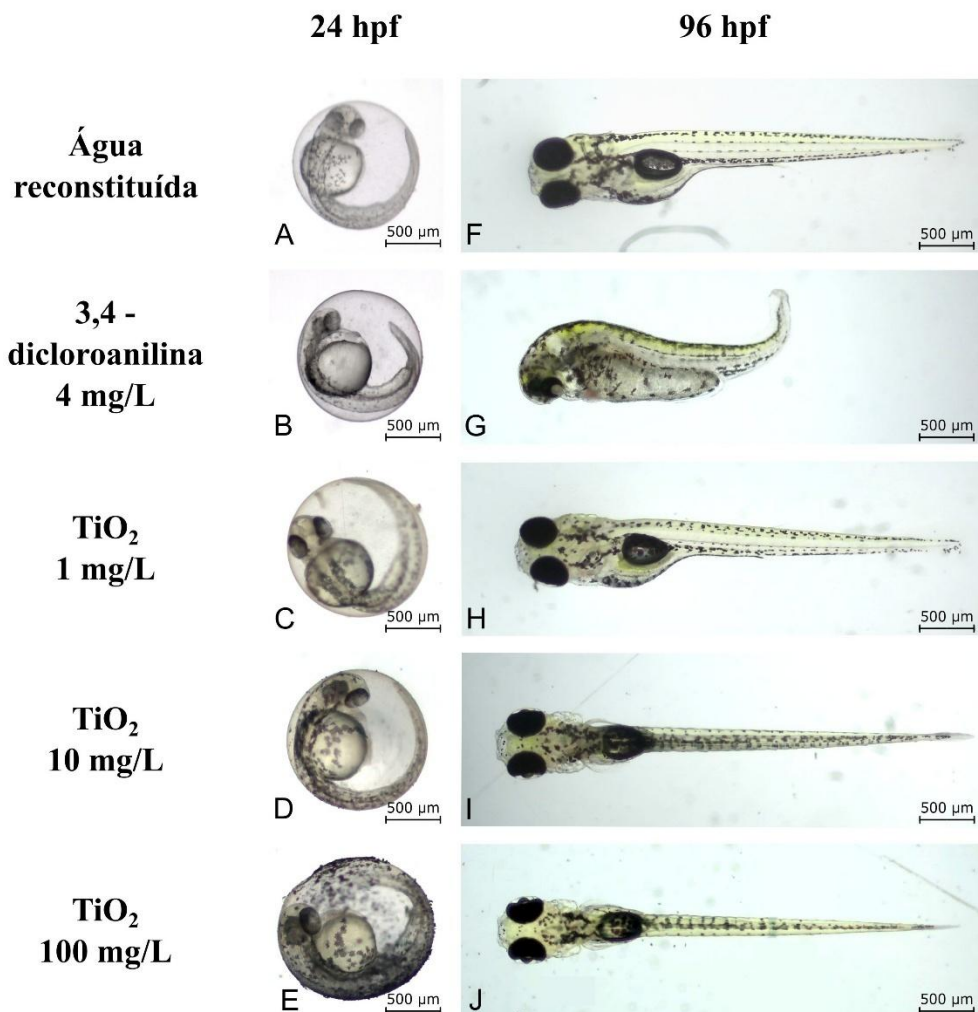
Os dois FETs realizados, um convencional e outro com decorionação, resultaram em baixa toxicidade apontada para as NPs-TiO₂.

4.1.1 FET convencional

As NPs-TiO₂ não exerceram toxicidade aos embriões convencionais de peixe-zebra, em nenhuma das concentrações testadas. Esse resultado corresponde ao obtido por um experimento em que uma baixa toxicidade a embriões de *Danio rerio* só foi observada à concentração de 1000 mg/L, dez vezes maior do que a usada aqui, e por outro com *Daphnia similis*, na qual as NPs-TiO₂ não apresentaram toxicidade na concentração de 100 mg/L (Faria et al., 2014; Marcone et al., 2012). Neste teste, os embriões não apresentaram má formações devido às NPs-TiO₂.

Nas soluções de 100 mg/L de NPs-TiO₂, foi notada uma intensa agregação do material, como pode ser visto na Figura 6. A agregação dessas partículas tende a acontecer quando estão dispersas em soluções (Hu et al., 2017). Além disso, uma precipitação de agregados estava presente no córion antes da eclosão dos embriões, o que já havia sido registrado com a mesma concentração em embriões do peixe *Oryzias latipes* (Paterson et al., 2011).

Figura 6 – Imagens de campo claro de embriões com 24 hpf e larvas com 96 hpf para cada solução no FET convencional



Fonte: elaborado pelo autor.

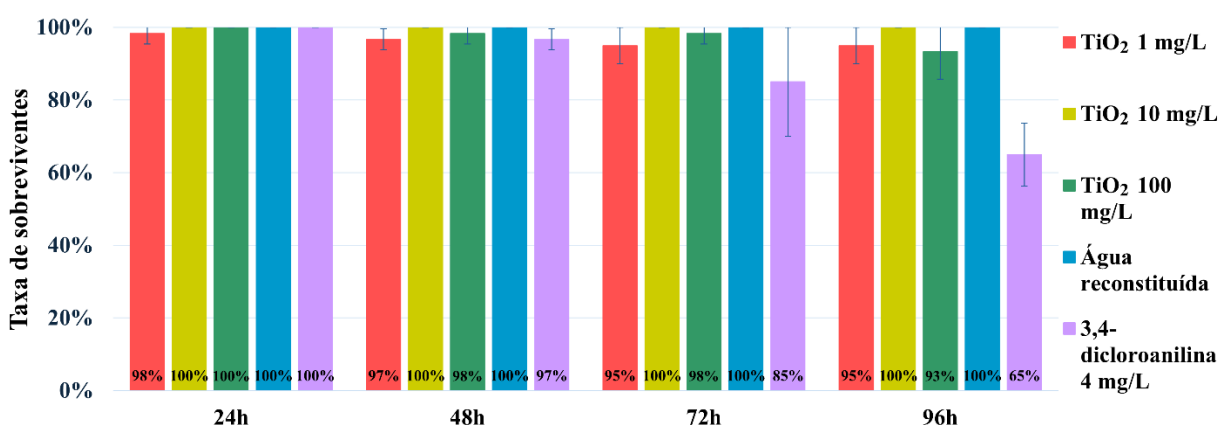
Legenda: Imagens de embriões e larvas de *Danio rerio* provenientes do FET convencional. A, B, C e D: controle negativo com água reconstituída, controle positivo com 3,4-dicloroanilina, TiO₂ a 1 mg/L e TiO₂ a 10 mg/L, respectivamente, com embriões de 24 hpf saudáveis. E: concentração de 100 mg/L de TiO₂, com embrião apresentando acúmulo de nanopartículas aglomeradas sobre o córion. F: controle negativo com larva de 96 hpf saudável. G: controle positivo com larva de 96 hpf com alterações morfológicas de redução no comprimento, encurvamento da cauda, crânio mal formado e edemas no coração e no saco vitelino. H, I e J: concentrações de 1, 10 e 100 mg/L de TiO₂, respectivamente, com larvas de 96 hpf saudáveis.

A porcentagem de sobrevivência foi maior que 90% no controle negativo e menor que 70% no controle positivo até o fim das 96 horas de exposição. Dessa forma, comprova-se a validade do FET convencional realizado, pois ele atendeu às diretrizes estabelecidas para os controles (OCDE, 2013).

As taxas de sobrevivência nas soluções de NPs-TiO₂ estiveram acima de 90% durante todas as análises, como pode ser conferido no Gráfico 1. Pela baixa letalidade até 100 mg/L, é difícil supor que a CL50 esteja próxima. CL50 é a concentração necessária para

provocar a morte de metade da população. Um estudo estimou valores muito altos para a CL50 das NPs-TiO₂, como de mais de 2000 mg/L (Felix et al., 2013). Enquanto isso, outro trabalho determinou uma CL50 de 124,5 mg/L (Xiong et al., 2011). Apesar dessa última ser próxima à maior concentração testada aqui, não houve proporção significativa de mortes para inferir que as NPs-TiO₂ são tóxicas nessas condições.

Gráfico 1 – Taxa de sobreviventes em teste com embriões de *Danio rerio* sem interferência no córion



Fonte: elaborado pelo autor.

A manutenção de ótimas taxas de sobrevivência até o final do período de exposição não foi observada em outro estudo com NPs-TiO₂, que registrou um decréscimo significativo no número de sobreviventes da concentração de 10 mg/L para 100 mg/L em 120 hpf (Vicario-Parés et al., 2014). Apesar disso, outros autores obtiveram valores semelhantes ao deste estudo, e evidenciaram que a disparidade de resultados pode ocorrer devido a diferenças nas formas cristalinas e no tamanho das nanopartículas (Tang; Zhang; Zhu, 2019). Neste estudo, por exemplo, as NPs-TiO₂ possuíam as fases cristalinas rutilo e anatase e um tamanho, em média, de 114,5 nm aproximadamente.

Para a OCDE, outros parâmetros, indicados a seguir, também são importantes para determinar a toxicidade a partir desse teste (OCDE, 2013). Todos os embriões tiveram o desprendimento correto de cauda. Somente no controle positivo houve atraso na formação de somitos. A taxa de eclosão se manteve acima de 90% nos tratamentos com dióxido de titânio e água reconstituída.

A taxa de eclosão poderia ter sido dificultada pela adsorção de aglomerados de NPs-TiO₂ à superfície do córion, na concentração mais alta, como fora descrito na literatura (Shih et al., 2016). Isso não pareceu ocorrer nestes resultados, mas a não toxicidade ainda pode ter sido

influenciada por tal, visto que a aglomeração superficial do material no córion reduz o acesso das NPs ao embrião.

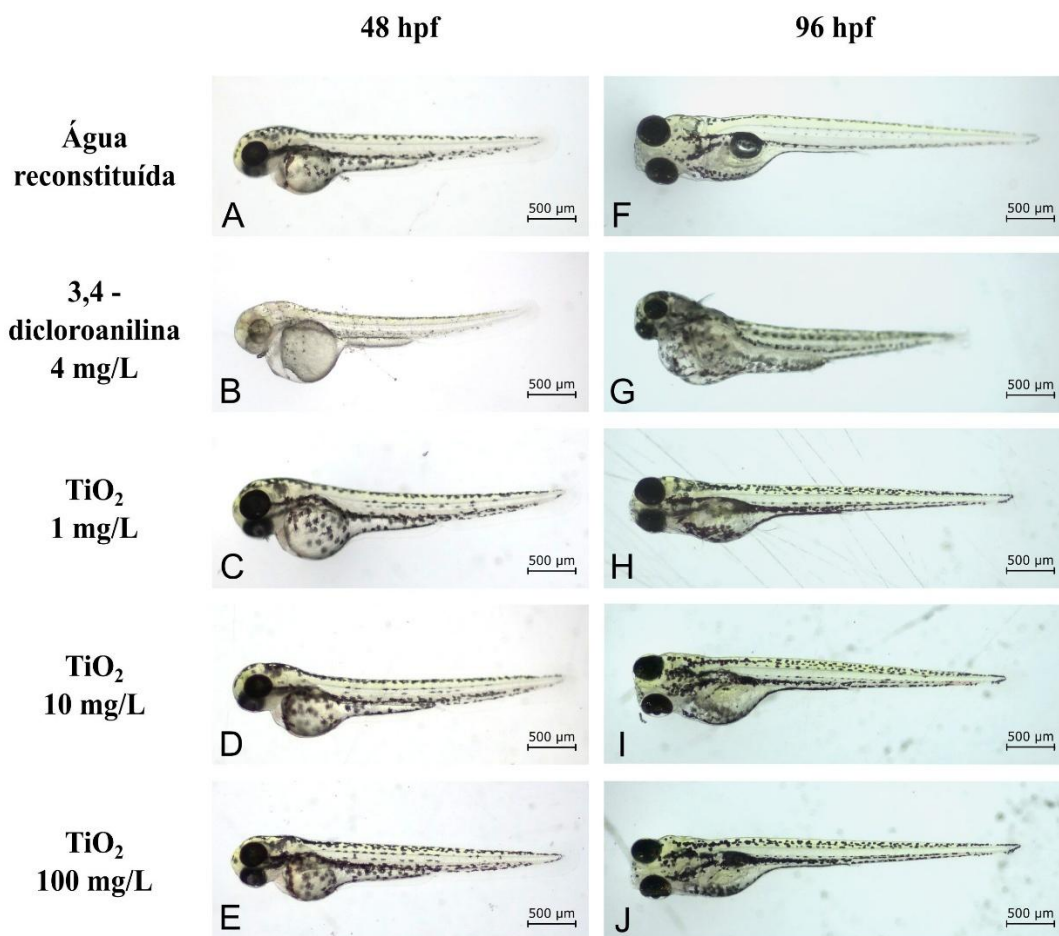
Às 96 hpf, evidenciou-se que os embriões submetidos ao controle positivo tiveram um mau desenvolvimento pela influência da 3,4-dicloroanilina. As deformidades evidenciadas foram de tamanho reduzido, encurvamento anormal da cauda, crânio mal formado, excesso de pigmentação, edema cardíaco e edema do saco vitelino. Essas características e mais algumas são compreendidas pelo termo “deformidades” neste e em outros estudos (Chahardehi; Arsad; Lim, 2020). Os indivíduos expostos às concentrações de TiO_2 não apresentaram essas anomalias fenotípicas, assim como os do controle negativo. Apesar de não serem consideradas um fator de letalidade pelo principal protocolo de teste de toxicidade aguda em embriões de peixe, as deformidades são características registradas em estudos recentes de avaliação da toxicidade de nanopartículas que utilizam o peixe-zebra como modelo, compreendendo edemas, curvatura anormal da cauda e má formação de órgãos (Hariharan et al., 2024; OCDE, 2013).

No geral, os resultados para sobrevivência, eclosão e deformidades na concentração de 100 mg/L se assemelham com os de outro teste realizado com NPs- TiO_2 em embriões de *Danio rerio* (Tang; Zhang; Zhu, 2019). Próximo a isso, um segundo trabalho reportou que as NPs- TiO_2 não apresentaram letalidade nem interferiam na eclosão dos embriões, mas tiveram um efeito negativo no desenvolvimento, com notocorda curvada, retardo no crescimento, cauda torcida, bexiga natatória não inflada, dano em tecido e escoliose (Ortiz-Román; Casiano-Muñiz; Román-Velázquez, 2024).

4.1.2 FET com decorionação

No FET com embriões decorionados, a primeira análise, a 48 hpf, permitiu visualizar o desenvolvimento normal dos embriões expostos às NPs- TiO_2 . Por sua vez, o controle positivo induziu a uma redução na pigmentação e à formação de um edema no pericárdio embrionário, vistos na Figura 7. É importante poder comparar o estado dos embriões convencionais às 24 hpf com os decorionados às 48 hpf, pois, apesar de terem sido inicialmente expostos às NPs- TiO_2 em estágios diferentes (5,3 e 24 hpf, respectivamente), pôde-se visualizar como cada um foi afetado pela absorção do material durante o mesmo tempo de exposição. Fent et al., (2010) perceberam que NPs de outro tipo não foram absorvidas pelos embriões de *Danio rerio* no FET que conduziram; em vez disso, as NPs se acumularam principalmente no córion, possivelmente não exercendo os efeitos tóxicos que poderiam exercer.

Figura 7 – Imagens de campo claro de embriões com 48 hpf e larvas com 96 hpf para cada solução no FET com decorionação



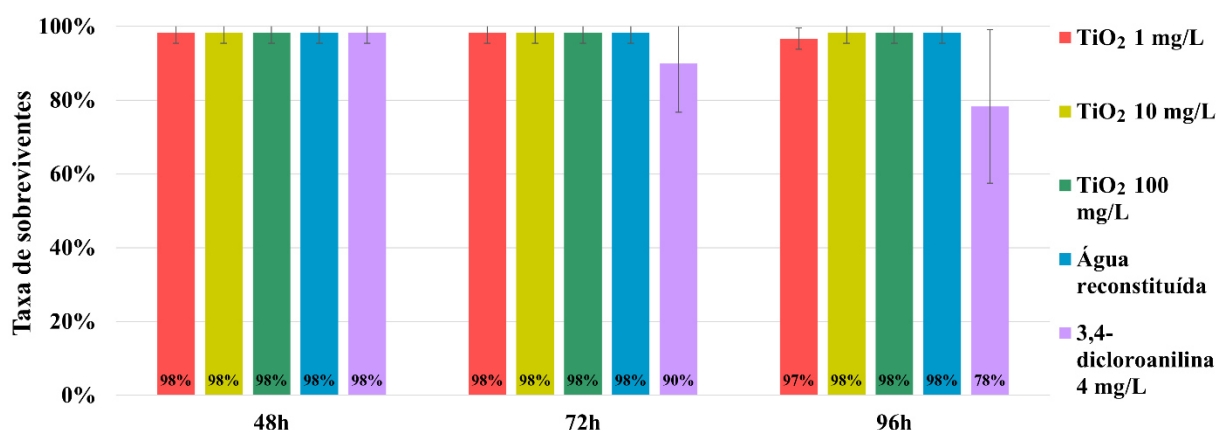
Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Imagens de embriões e larvas de *Danio rerio* provenientes do FET com decorionação. A, C, D e E: controle negativo, com água reconstituída, e concentrações de 1, 10 e 100 mg/L de TiO_2 , respectivamente, com embriões de 48 hpf saudáveis e semelhantes entre si. B: controle positivo, com 3,4-dicloroanilina, e embrião com 48 hpf apresentando edema no pericárdio e pigmentação reduzida. F: controle negativo com larva de 96 hpf saudável. G: controle positivo com larva de 96 hpf possuindo edema no coração e no saco vitelino, encurvamento da medula espinhal e pigmentação excessiva. H, I e J: concentrações de 1, 10 e 100 mg/L de TiO_2 , respectivamente, com larvas de 96 hpf possuindo pigmentação ligeiramente maior que no controle negativo, sem mais alterações morfológicas.

Uma pigmentação ligeiramente maior que a visualizada no controle negativo foi observada nas larvas com 96 hpf e expostas às NPs- TiO_2 . A hiperpigmentação é uma característica anormal que pode ser causada por inflamação, machucados e exposição a substâncias químicas (Qu et al., 2023). Apesar disso, essa característica não foi manifestada intensamente, e não houve evidências claras de toxicidade. Já no controle positivo, as larvas desenvolveram diversas más formações, como os edemas no coração e no saco vitelino, encurvamento da medula espinhal e pigmentação excessiva.

A taxa de sobrevivência dos embriões no decorrer dos três dias foi bastante consistente para os tratamentos com NPs-TiO₂, como pode ser visto no Gráfico 2. As porcentagens de sobreviventes nas três concentrações de dióxido de titânio foram maiores que 97%. No controle negativo, a razão de vivos foi de 98% em todos os intervalos analisados; o que corrobora a validade do teste (OCDE, 2013). Ao mesmo tempo, o controle positivo registrou uma queda cada vez maior, que todavia ainda foi maior que o ideal no controle positivo. Essa variação no controle positivo fomenta a hipótese de que a 3,4-dicloroanilina tem sua letalidade determinada pelo contato com o embrião nos seus primeiros estágios de desenvolvimento (Henn; Braunbeck, 2011; Lahnsteiner, 2008).

Gráfico 2 – Taxa de sobreviventes em teste com embriões de *Danio rerio* decorionados



Fonte: elaborado pelo autor.

A incidência de deformações nos embriões decorionados e expostos às NPs-TiO₂ foi muito pequena, e nenhum dos desenvolvidos no controle negativo demonstrou características atípicas no fenótipo. Isso comprova a eficácia da decorionação manual feita, pois lesões nos embriões certamente afetariam seu crescimento, e por isso se deve garantir que elas não ocorram (Hasegawa; Farr; Maves, 2023). No controle positivo do FET com decorionação, houve uma taxa alta de deformações, até mesmo maior do que no controle positivo do FET convencional.

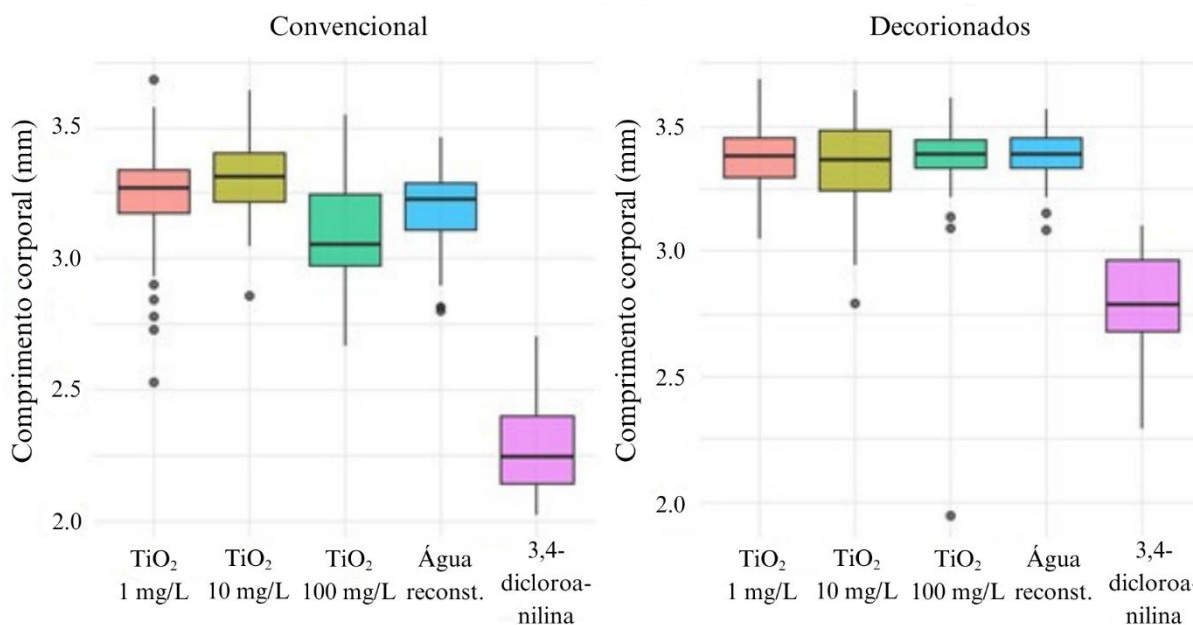
4.2 Variação no comprimento das larvas com 96 hpf

A observação do comprimento corporal de larvas de *Danio rerio* como um indicador da toxicidade de nanopartículas já havia sido feita com nanopartículas de prata, as quais reduziram o crescimento nas condições realizadas (Qiang et al., 2020). Como resultado

do FET convencional, as medianas do comprimento corporal ficaram próximas de 3,25 mm nas concentrações de 1 mg/L e 10 mg/L de NPs-TiO₂ e no controle negativo. Na concentração de 100 mg/L, os valores foram um pouco menores.

Com uma análise estatística, foi verificado que essa diferença se deveu a algum fator real, não à aleatoriedade. Nesse sentido, suspeita-se que ela esteja relacionada ao acúmulo de material na superfície do córion, que foi observado nas imagens de campo claro. Segundo Shih et al., (2016), a eficiência com que os embriões de peixe-zebra eclodem pode ser afetada pela adsorção de agregados de NPs-TiO₂, fenômeno que se intensifica nas concentrações maiores. Apesar disso, os embriões deste ensaio que tiveram alta adsorção de NPs-TiO₂ em seu córion não levaram mais tempo do que o esperado para eclodir. Isso leva à hipótese de que um esforço maior foi feito para que eles escapassem do envoltório, gastando assim uma parte da sua reserva de energia e nutrientes que estava destinada ao seu crescimento. Ainda, um estudo com nanopartículas de sílica relatou que o acúmulo de agregados na superfície do córion aumenta com o tempo de exposição (Chao et al., 2018). Pela similaridade de comportamento hidrodinâmico entre as nanopartículas, pode-se presumir que os embriões estavam sobrecarregados com a maior quantidade de NPs-TiO₂ no momento da eclosão, o que corrobora a hipótese.

Em contrapartida, no FET com decorionados, não houve formação de agregados sobre o córion dos peixes porque essa membrana foi removida logo antes de iniciar a exposição. Por consequência, as medianas de comprimento corporal dos embriões se fizeram muito próximas, nas três concentrações testadas de NPs-TiO₂ e no controle negativo, como consta no Gráfico 3. A maior uniformidade foi confirmada pela análise estatística, determinando que essas soluções não apresentaram diferença significativa entre si. Apesar do tempo diferente de exposição entre os tratamentos com córion e sem córion, uma variação estatística nos dados de sobrevivência foi observada somente diante do acúmulo de NPs sobre o córion na concentração de 100 mg/L. Portanto, respalda-se a alegação de que a decorionação aprimora os efeitos do FET no estudo da toxicidade de algumas nanopartículas.

Gráfico 3 – Comprimento corporal das larvas de *Danio rerio* com 96 hpf

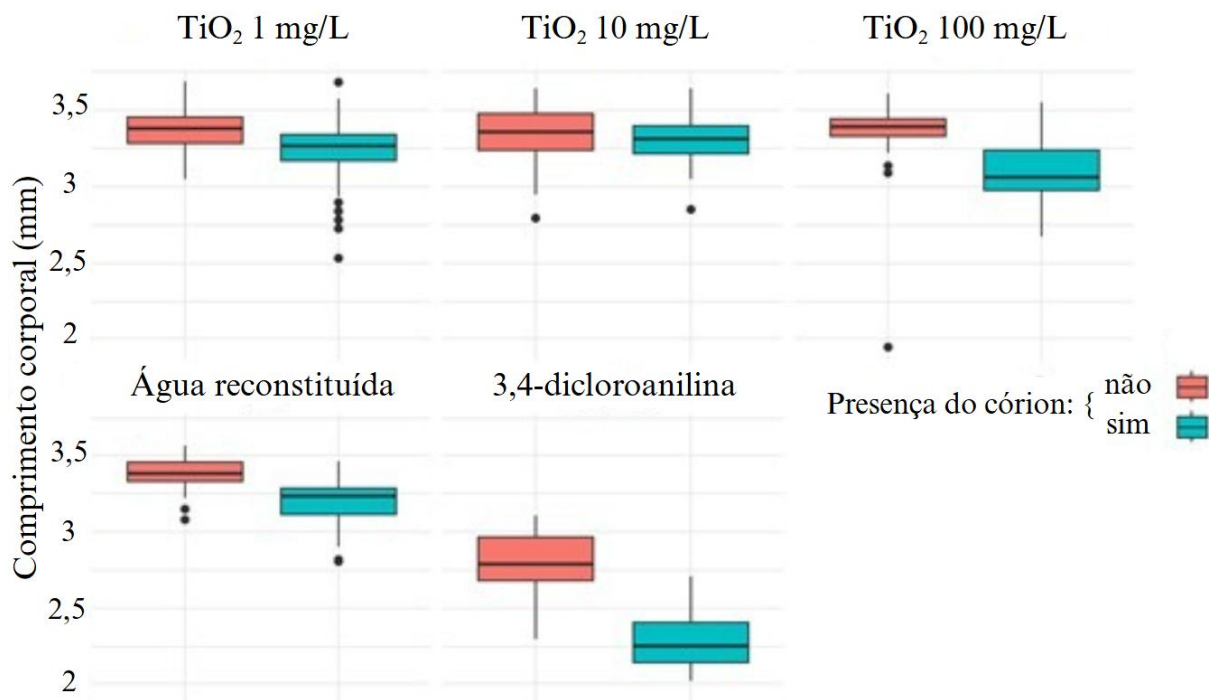
Fonte: elaborado pelo autor.

A diferença de comprimento registrada para o controle positivo entre os embriões que passaram pela decorionação e os que não passaram reflete ainda a constatação de que a 3,4-dicloroanilina age de forma mais letal nos primeiros estágios de desenvolvimento dos embriões (Henn; Braunbeck, 2011).

Com os resultados, reitera-se que as nanopartículas não impactaram o crescimento dos embriões, salvo o caso em que o córion teve influência, pois, no geral, os resultados de comprimento nas concentrações de NPs- TiO_2 não divergiram dos valores obtidos no controle negativo.

A fim de visualizar melhor o efeito que a presença do córion teve sobre o comprimento das larvas, os diagramas de caixa foram colocados em pares entre decorionados e não decorionados, no Gráfico 4. Além da diferença que pode ser visualmente observada no gráfico, um Teste de Mann-Whitney revelou que a presença do córion impactou significativamente o crescimento dos embriões em quase todas as concentrações. A única que não apresentou diferença significativa foi a concentração de 10 mg/L de TiO_2 .

Gráfico 4 – Comparação do comprimento entre os dois tratamentos: convencional e decorionação, nas soluções



Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar de os dados de comprimento na ausência do córion terem sido maiores, estudos mostram que a retirada dessa membrana torna os embriões mais sensíveis aos efeitos de toxicidade das nanopartículas no FET. Duan et al., (2020) identificou que, com 32 hpf, o córion dos embriões estava coberto quase completamente por nanopartículas de poliestireno, enquanto apenas uma ou duas partículas foram detectadas no espaço pré-vitelínico. O aumento da toxicidade de nanopartículas de prata na ausência do córion foi reportado por um estudo que, assim como este, objetivou investigar a influência do córion sobre o FET com peixe-zebra (Kim; Tanguay, 2014). Junto a isso, um trabalho focado em avaliar a atividade fotocatalítica das NPs-TiO₂ detectou 15 vezes mais titânio nos embriões decorionados do que nos que mantiveram seu córion intacto durante a exposição (Bar-Ilan et al., 2012).

4.3 Dano celular

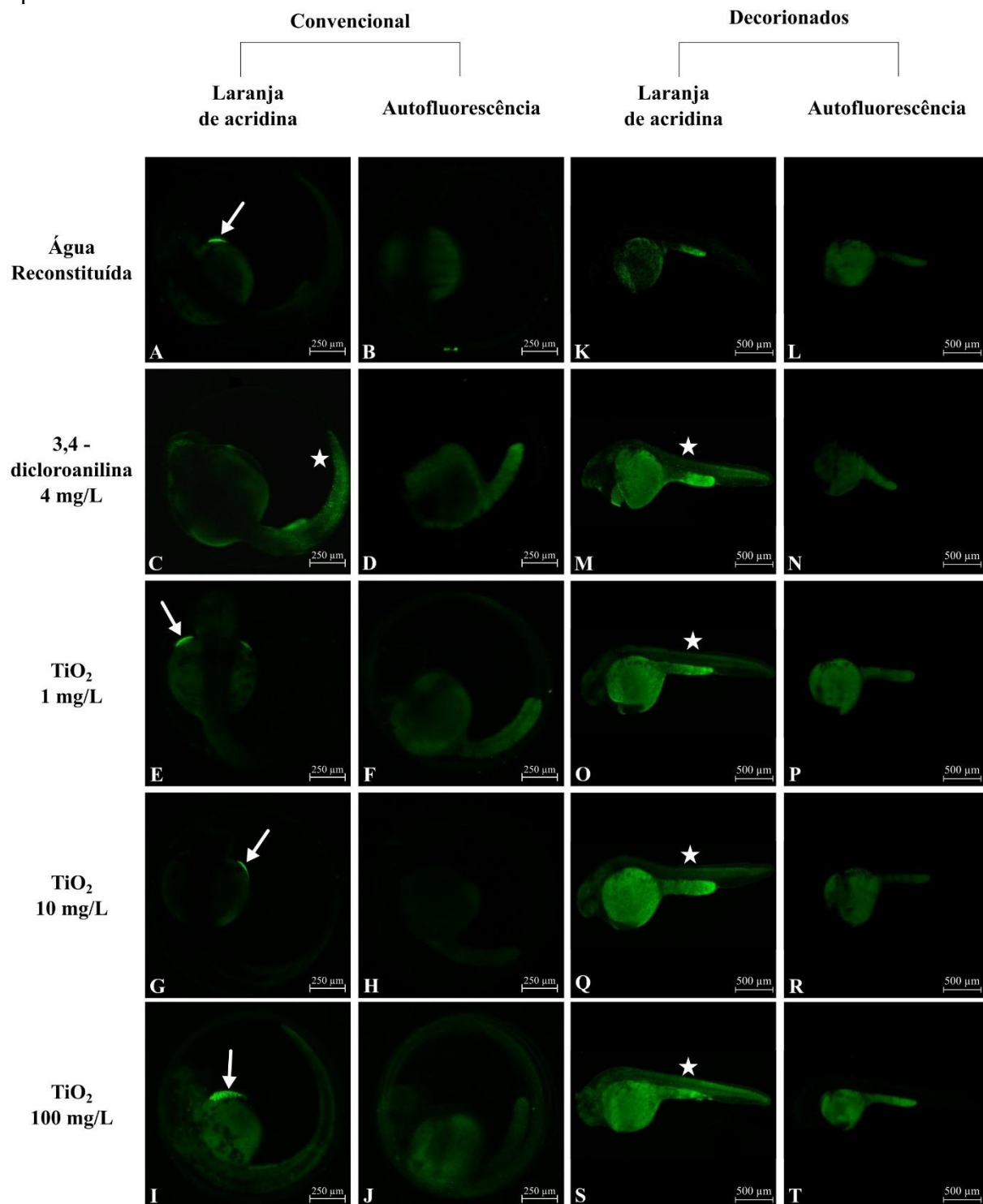
Mesmo que resultados de exposição aguda não sinalizem a toxicidade de nanopartículas de acordo com os parâmetros analisados, a investigação de possível dano a nível celular ou cromossômico concede um entendimento melhor dos riscos que elas apresentam aos sistemas biológicos, inclusive a longo prazo. O principal mecanismo de toxicidade a nível

celular das NPs-TiO₂ consiste na produção de espécies reativas de oxigênio, que podem causar morte celular, danos ao DNA e modificações em proteínas e genes que expressam células de defesa (Chandoliya et al., 2024). Por isso, Pinheiro et al., (2023) empregou a técnica de microscopia confocal utilizando laranja de acridina como sonda em um estudo de ecotoxicidade de partículas de dióxido de titânio, observando um aumento de apoptoses nos microcrustáceos *Artemia salina* até a concentração de 100 mg/L de TiO₂. Baseado nisso, foram feitas análises de microscopia confocal em embriões de *Danio rerio*, com o intuito não só de averiguar a ocorrência de dano celular, como também de verificar o impacto da decorionação a partir dessa técnica.

As imagens de microscopia fluorescente confocal mostraram a intensidade da cor dos embriões em exposição aos diferentes tratamentos e concentrações. A cor obtida através da excitação dos fluoróforos presentes nas amostras pelo laser do microscópio deriva tanto do laranja de acridina ligado a DNA celular extravasado, quanto da autofluorescência que o embrião de peixe-zebra possui de forma evidente no saco vitelino, rede vascular e em outras áreas na superfície (Høgset et al., 2020).

Os embriões com e sem córion, na fase de 24 hpf e após o mesmo período de exposição, se encontram dispostos na Figura 8. De modo geral, o saco vitelino demonstrou ter autofluorescência perante o laser de excitação em 405 nm utilizado, cujo valor é próximo do conhecido na literatura em relação à fluorescência desse órgão (Otterstrom et al., 2022). A maior fluorescência apresentada no controle positivo, em especial na região da cauda, exemplifica a marcação que o laranja de acridina faz no dano celular, que, nesse caso, se deu pela nocividade da 3,4-dicloroanilina e que não é mostrado na autofluorescência. No tratamento convencional, os embriões expostos às NPs-TiO₂ não mostraram fluorescência específica de dano celular em comparação com o controle negativo de água reconstituída. Já no tratamento com decorionados, houve uma diferença visível na emissão de fluorescência nas três concentrações de TiO₂, cujos embriões se assemelharam mais ao controle positivo do que ao negativo dessa vez. Entende-se, por isso, que o córion dificultou a interação entre as NPs-TiO₂ e o embrião, levando a um falso negativo de que elas não expressaram citotoxicidade nesse estágio do desenvolvimento embrionário.

Figura 8 – Imagens de microscopia fluorescente confocal de embriões de *Danio rerio* com 24 hpf



Fonte: elaborado pelo autor.

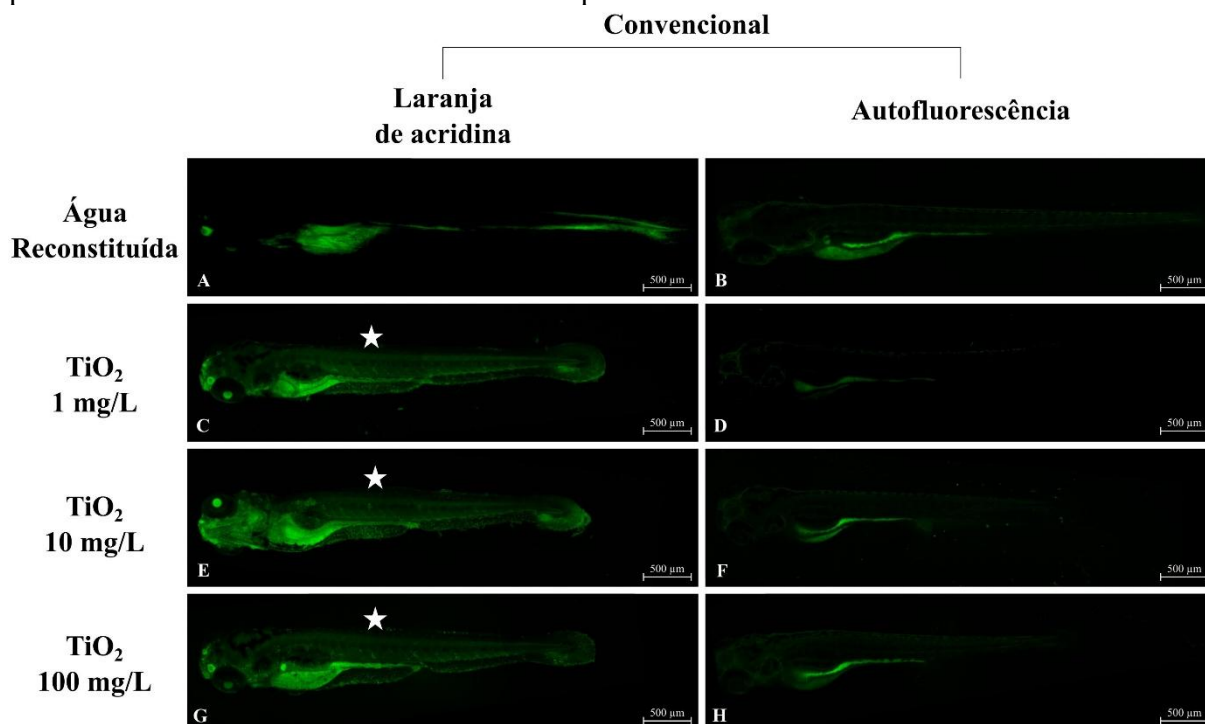
Legenda: Imagens de embriões com córion e sem córion de *Danio rerio* com 24 hpf, expostos às diferentes concentrações de TiO₂ e aos controles. A e B: controle negativo, com água reconstituída e embriões com córion, mostrando região de dano celular apontada pela seta. C e D: controle positivo, com 3,4-dicloroanilina e embriões com córion e ocorrência de dano celular na extensão do organismo, marcado com a estrela. E e F; G e H; I e J: concentrações de 1, 10 e 100 mg/L de TiO₂, respectivamente, com embriões com córion, possuindo região de dano celular idêntica à do controle negativo, apontada pela seta. K e L: controle negativo, com água reconstituída e embriões sem córion, mostrando nenhum indício de citotoxicidade. M e N: controle positivo, com 3,4-dicloroanilina e embriões sem córion, havendo dano celular na extensão do organismo, marcado com a estrela. O

e P; Q e R; S e T: concentrações de 1, 10 e 100 mg/L de TiO₂, respectivamente, com embriões sem córion, mostrando dano celular na extensão do organismo, marcados com a estrela.

A limitação da viabilidade biológica de NPs pelo córion já foi constatada e relacionada ao comportamento de aglomeração (Wehmas et al., 2015). Nesta análise, a influência do córion foi percebida mesmo nas concentrações mais baixas, que têm menos estímulo a agregar as NPs-TiO₂. No controle negativo dos decorionados, não existiu diferença visualmente significativa entre a autofluorescência e o tratamento com laranja de acridina, o que reforça que a fluorescência emitida nas soluções de nanopartículas se deve ao dano que elas causaram às células dos embriões. Diante disso, foi verificado que as nanopartículas de dióxido causaram morte celular nos embriões de *Danio rerio* com 24 hpf e que essa atividade só foi percebida com a decorionação.

O dano celular causado às larvas de peixe-zebra em tratamento convencional e ao final de 96 horas de exposição às NPs-TiO₂ pode ser visualizado na Figura 9. Nas três concentrações de dióxido de titânio, o laranja de acridina ligado ao DNA extravasado de células mortas emitiu uma fluorescência muito maior que a emitida pelo próprio peixe, especialmente nas regiões dos olhos, boca, mandíbula e nadadeira ventral. O indício generalizado de apoptoses nos olhos provavelmente está relacionado ao acúmulo de nanopartículas na região, que foi identificado por outro trabalho a partir de microscopia fluorescente (Van Pomeroy et al., 2017). No controle negativo, essa diferença não foi notada. Isso aponta que, apesar de não terem provocado indícios de toxicidade visíveis nas imagens de campo claro dos embriões, as nanopartículas testadas causaram danos às células deles.

Figura 9 – Imagens de microscopia fluorescente confocal de embriões de *Danio rerio* provenientes de FET convencional com 96 hpf



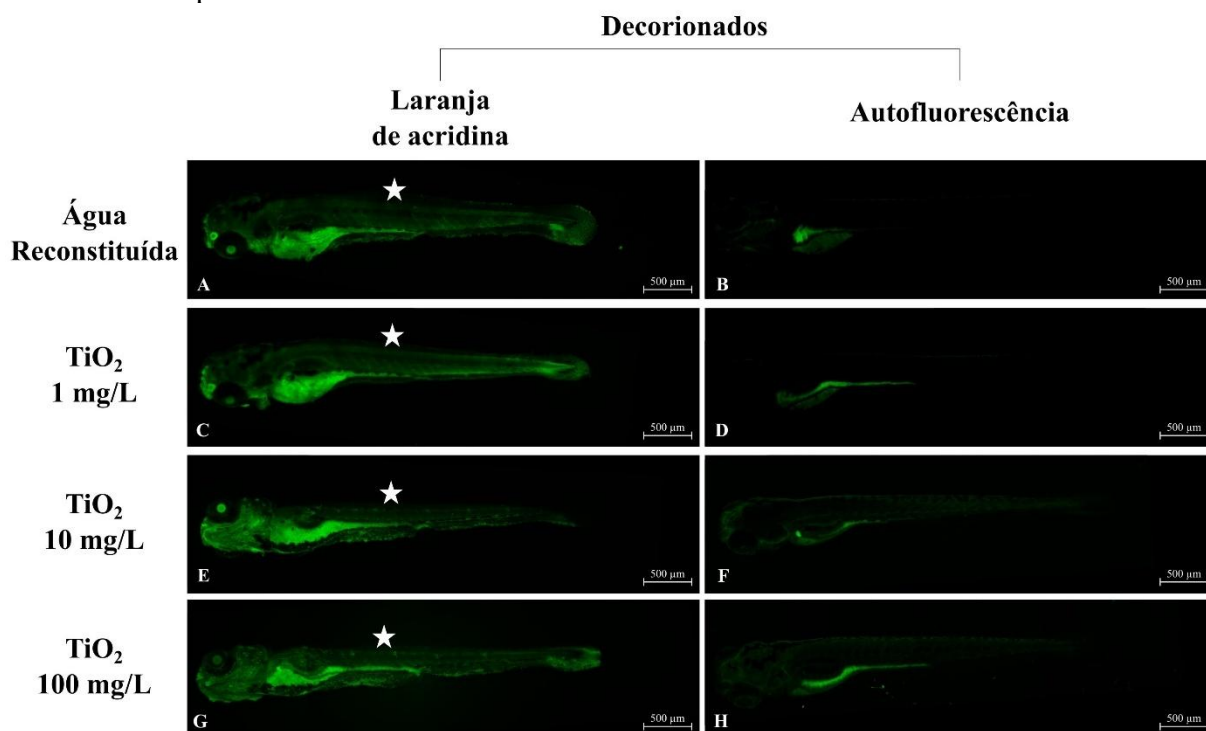
Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Imagens de larvas de *Danio rerio* com 96 hpf, provenientes do teste convencional e expostas às diferentes concentrações de TiO_2 e aos controles. A e B: controle negativo, com água reconstituída e larvas sem alterações morfológicas. C e D; E e F; G e H: concentrações de 1, 10 e 100 mg/L de TiO_2 , respectivamente, com larvas apresentando dano celular em toda sua extensão, marcado pela estrela.

Um dos motivos elencados para o resultado observado são as dimensões do material, posto que as nanopartículas de TiO_2 já se mostraram ser mais tóxicas a outros tipos de células do que o óxido metálico a granel (Kumar et al., 2020). Além disso, a citotoxicidade verificada também é explicada pela formação de espécies reativas de oxigênio, que depende da atividade fotocatalítica do material e da incidência de luz (Zhang et al., 2013). Na coloração com laranja de acridina e nas lavagens subsequentes, perdeu-se a integridade dos embriões do controle positivo, que já estava comprometida pela toxicidade do pesticida, e, por isso, não foi possível obter imagens de microscopia confocal deles.

Já nos embriões que haviam sido decorionados, o resultado obtido com as imagens de microscopia fluorescente confocal às 96 hpf foi diferente. Os indivíduos do controle negativo apresentaram uma coloração intensa de laranja de acridina, de maneira semelhante aos tratamentos com dióxido de titânio (Figura 10). Com isso, não se pode aferir imediatamente que as nanopartículas causaram algum dano celular e que ele foi marcado pela sonda, pois o dano pode ter sido causado pelo método de decorionação ou pelo preparo da amostra para a microscopia fluorescente confocal.

Figura 10 – Imagens de microscopia fluorescente confocal de embriões decorionados de *Danio rerio* com 96 hpf



Fonte: elaborado pelo autor.

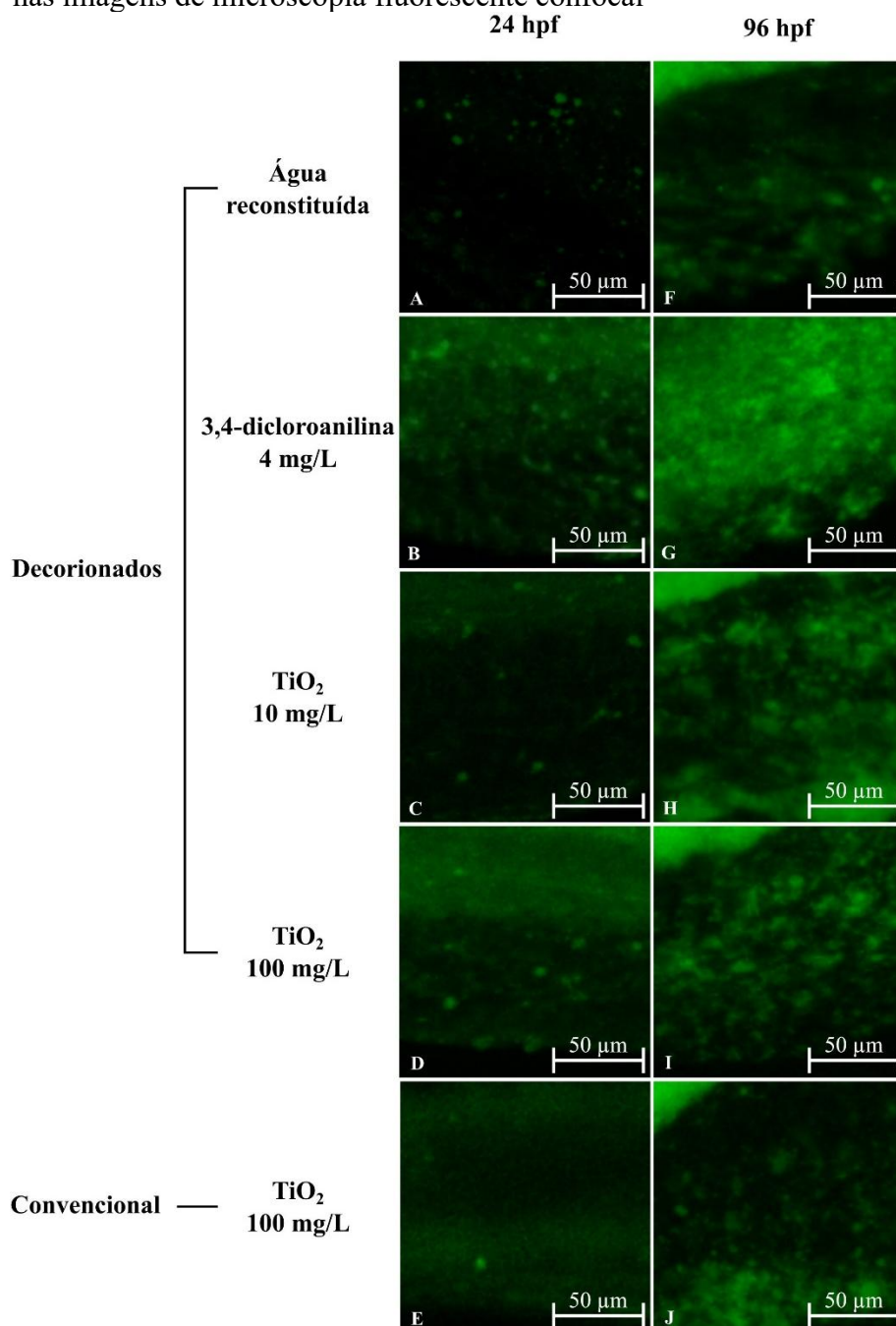
Legenda: Imagens de larvas de *Danio rerio* com 96 hpf, provenientes do teste com decorionação e expostas às diferentes concentrações de TiO_2 e aos controles. A e B: controle negativo, com água reconstituída e larvas mostrando dano celular em sua extensão, marcado com a estrela. C e D; E e F; G e H: concentrações de 1, 10 e 100 mg/L de TiO_2 , respectivamente, com larvas apresentando dano celular em sua extensão, marcado com a estrela.

Em virtude da inconclusão, uma análise mais incisiva foi feita aproximando-se as imagens nos controles e nas maiores concentrações de TiO_2 . A presença de pontos verdes brilhantes é um indicativo seguro de células que entraram em apoptose para estudos com microscopia fluorescente confocal de embriões de peixe-zebra (Asharani et al., 2008; Liu et al., 2021). Levando isso em consideração, os embriões decorionados foram analisados mediante ampliações em diferentes partes do seu corpo, revelando os pontos verdes mencionados com boa distribuição na nadadeira ventral. Também foi visualizado um pouco de tecido dos embriões que estavam no controle positivo, mesmo com a perda da integridade de sua forma corporal.

Na Figura 11, identifica-se que a incidência de pontos verdes brilhantes é maior no controle positivo e nas duas maiores concentrações de NPs- TiO_2 do que no controle negativo, especialmente nas 96 hpf. Também foram realizadas aproximações na nadadeira ventral dos embriões que foram expostos com córion às NPs- TiO_2 na maior concentração, com intuito de comparar os resultados. Assim, percebe-se que as nanopartículas causaram danos celulares aos embriões decorionados, e que essas lesões aumentaram de 24 hpf para 96 hpf. Além disso, a citotoxicidade das NPs- TiO_2 na maior concentração, de 100 mg/L, foi ligeiramente maior nos

embriões decorionados do que naqueles que vieram do FET convencional, fomentando a observação de que o córion dificultou a interação entre as NPs e o embrião, devido ao acúmulo de material agregado antes da eclosão, e aliando esse estudo a outros que demonstraram que a remoção do córion aumenta a sensibilidade do embrião de *Danio rerio* à toxicidade das nanopartículas, um fator importantíssimo na nanotoxicologia.

Figura 11 – Ampliações na região da nadadeira ventral dos embriões, nas imagens de microscopia fluorescente confocal



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Ampliações na nadadeira ventral dos embriões e larvas de *Danio rerio*, expostos às diferentes concentrações de TiO₂ e aos controles. A a E: embriões com 24

hpf. F a J: larvas com 96 hpf. A: controle negativo com embrião decorionado, com poucos pontos verdes brilhantes. B: controle positivo com embrião decorionado, com maior quantidade de pontos indicando apoptose. C e D: concentrações de 10 e 100 mg/L de TiO_2 , respectivamente, com embriões decorionados, apresentando poucos pontos verdes. E: concentração de 100 mg/L de TiO_2 com larva proveniente do teste convencional, mostrando quase nenhum ponto verde. F: controle negativo com larva decorionada, com poucos pontos verdes. G: controle positivo com tecido da larva decorionada, completamente marcado por apoptoses. H e I: concentrações de 10 e 100 mg/L de TiO_2 , respectivamente, com incidência muito alta de apoptoses. J: concentração de 100 mg/L de TiO_2 com larva proveniente do teste convencional, com forte presença de apoptoses, ainda menor que nas larvas decorionadas.

5 CONCLUSÃO

Em meio à incerteza sobre a segurança de nanopartículas amplamente utilizadas, aumentar a eficácia de testes é essencial para determinar os efeitos nocivos que elas podem causar ao meio ambiente.

Os FETs realizados demonstraram que as NPs-TiO₂ não tiveram efeitos tóxicos na sobrevivência de embriões de *Danio rerio*. Somente no teste convencional, foi observado um acúmulo de NPs no córion à concentração de 100 mg/L, que possivelmente foi o que causou a redução no crescimento dos embriões. O FET com decorionação apresentou resultados mais uniformes. O desenvolvimento geral de embriões saudáveis no controle negativo provou que o método de decorionação manual foi bem sucedido.

Nas análises de microscopia fluorescente confocal, a remoção do córion impactou significativamente a ocorrência de dano celular em embriões de 24 hpf, corroborando a suspeita de o córion barrar a interação entre as NPs e o embrião. Com 96 hpf, o dano celular foi visível nos dois tratamentos (convencional e com decorionação) e se manifestou em partes que em 24 hpf ainda não estavam desenvolvidas, como o olho. A apoptose de células registrada é um mecanismo comum de citotoxicidade de NPs, o que leva a acreditar que esse tipo de toxicidade foi provocado pelas NPs-TiO₂ e que seus efeitos poderiam ser melhor visualizados a longo prazo.

No geral, a decorionação dos embriões fez com que os resultados exprimissem melhor os efeitos da toxicidade das NPs-TiO₂, tanto nos casos em que elas não se mostraram tóxicas, quanto no caso em que foi observada sua citotoxicidade. Espera-se que mais trabalhos com embriões de peixe-zebra considerem o córion como uma possível barreira para a entrada de nanopartículas, e que a decorionação seja adotada com mais frequência nesses testes, permitindo uma visão mais clara da segurança desse e de outros nanomateriais. Também há expectativa de que sejam investigadas outras condições que possam interferir na expressão correta dos resultados de toxicidade em FETs e outros tipos de ensaios de nanotoxicologia.

REFERÊNCIAS

- ABBOOD, Hiba Kamil; ALI, Nathera Abass. **Studying of the structural and optical properties of titanium dioxide nanoparticles prepared by chemical method.** Journal of Optics (Índia), v. 53, n. 3, p. 2698–2703, 1 jul. 2024.
- ADHISH, Mazumder; MANJUBALA, I. **Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases—A review of models.** Heliyon, 1 mar. 2023.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Segurança de uso do aditivo alimentar corante dióxido de titânio (INS 171).** 2023
- ALJUBRAN, Batool A. *et al.* **Challenges in laser tattoo removal: the impact of titanium dioxide on photodegradation of yellow inks.** Archives of Toxicology, 1 abr. 2025.
- ALTAMMAR, Khadijah A. **A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges.** Frontiers in Microbiology, Frontiers Media S.A., 2023.
- AMETA, Satish Kumar *et al.* **Use of nanomaterials in food science.** In: Biogenic Nano-Particles and their Use in Agro-ecosystems, Springer (Singapura), p. 457–488, 2020.
- ARAKI, Stephany Mayumi; BABY, André Rolim. **New Perspectives on Titanium Dioxide and Zinc Oxide as Inorganic UV Filters: Advances, Safety, Challenges, and Environmental Considerations.** Cosmetics, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 abr. 2025.
- ARMAKOVIĆ, Sanja J.; SAVANOVIĆ, Maria M.; ARMAKOVIĆ, Stevan. **Titanium Dioxide as the Most Used Photocatalyst for Water Purification: An Overview.** Catalysts, MDPI, 1 jan. 2023.
- ASHARANI, P. V. *et al.* **Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models.** Nanotechnology, v. 19, n. 25, 25 jun. 2008.
- BAR-ILAN, Ofek *et al.* **Titanium dioxide nanoparticles produce phototoxicity in the developing zebrafish.** Nanotoxicology, v. 6, n. 6, p. 670–679, set. 2012.
- BAUER, Benedikt; MALLY, Angela; LIEDTKE, Daniel. **Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing.** International Journal of Molecular Sciences, MDPI, 1 dez. 2021.
- BAYDA, Samer *et al.* **The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine.** Molecules. MDPI AG, 2020.
- BEDELL, Victoria M. *et al.* **Zebrafishology, study design guidelines for rigorous and reproducible data using zebrafish.** Communications Biology, Nature Research, 1 dez. 2025.
- BEVACQUA, Emilia *et al.* **TiO₂-NPs Toxicity and Safety: An Update of the Findings Published over the Last Six Years.** Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, v. 23, n. 9, p. 1050–1057, 30 set. 2022.

- BLAZNIK, Urška *et al.* **Use of food additive titanium dioxide (E171) before the introduction of regulatory restrictions due to concern for genotoxicity.** *Foods*, v. 10, n. 8, 1 ago. 2021.
- BRAUN, Juergen H.; BAIDINS, Andrejs; MARGANSKI, Robert E. **TiO₂ pigment technology: a review.** *Progress in Organic Coatings*. [S.l.].
- BROWNING, Lauren M. *et al.* **Random walk of single gold nanoparticles in zebrafish embryos leading to stochastic toxic effects on embryonic developments.** *Nanoscale*, v. 1, n. 1, p. 138–152, 2009.
- BUSQUET, François *et al.* **OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 69, n. 3, p. 496–511, 2014.
- CANEDO, Aryelle *et al.* **Zebrafish (*Danio rerio*) meets bioethics: the 10Rs ethical principles in research.** *Ciencia Animal Brasileira*, v. 23, 2022.
- CARBAUGH, Chance M.; VAN DER SCHALIE, William H.; WIDDER, Mark W. **High throughput embryonic zebrafish test with automated dechoriation to evaluate nanomaterial toxicity.** *PLoS ONE*, v. 17, n. 9 September, 1 set. 2022.
- CASSAR, Steven *et al.* **Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology.** *Chemical Research in Toxicology*, v. 33, n. 1, p. 95–118, 21 jan. 2020.
- CHAHARDEHI, Amir Modarresi; ARSAD, Hasni; LIM, Vuanghao. **Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants.** *Plants*, MDPI AG, 1 out. 2020.
- CHANDOLIYA, Rakhi *et al.* **Titanium Dioxide Nanoparticle: A Comprehensive Review on Synthesis, Applications and Toxicity.** *Plants*, MDPI, 1 nov. 2024.
- CHAO, Shu Ju *et al.* **Uptake of BDE-209 on zebrafish embryos as affected by SiO₂ nanoparticles.** *Chemosphere*, v. 205, p. 570–578, 1 ago. 2018.
- CHEN, Xiaobo; MAO, Samuel S. **Titanium dioxide nanomaterials: Synthesis, properties, modifications and applications.** *Chemical Reviews*, jul. 2007.
- CHOE, Chong Pyo *et al.* **Transgenic fluorescent zebrafish lines that have revolutionized biomedical research.** *Laboratory Animal Research BioMed Central Ltd*, 1 dez. 2021.
- COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) - UNIFESP. **Guia de eutanásia para animais em pesquisa e ensino.** Brasil, 15 jan. 2024.
- CORDEIRO, Marcos F. *et al.* **Toxicological assessment of PEGylated single-walled carbon nanotubes in early developing zebrafish.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 347, p. 54–59, 15 maio 2018.
- DAS, Rajib; AMBARDEKAR, Vibhav; BANDYOPADHYAY, Partha Pratim. **Titanium**

Dioxide and Its Applications in Mechanical, Electrical, Optical, and Biomedical Fields. [S.l.].

DEDMAN, Craig J. *et al.* **Environmentally relevant concentrations of titanium dioxide nanoparticles pose negligible risk to marine microbes.** *Environmental Science: Nano*, v. 8, n. 5, p. 1236–1255, 21 maio 2021.

DUAN, Zhenghua *et al.* **Barrier function of zebrafish embryonic chorions against microplastics and nanoplastics and its impact on embryo development.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 395, 5 ago. 2020.

FARIA, Melissa *et al.* **Oxidative stress effects of titanium dioxide nanoparticle aggregates in zebrafish embryos.** *Science of the Total Environment*, v. 470–471, p. 379–389, 1 fev. 2014.

FELIX, Lindsey C. *et al.* **Physicochemical characteristics of polymer-coated metal-oxide nanoparticles and their toxicological effects on zebrafish (*Danio rerio*) development.** *Environmental Science and Technology*, v. 47, n. 12, p. 6589–6596, 18 jun. 2013.

FENT, Karl *et al.* **Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages.** *Aquatic Toxicology*, v. 100, n. 2, p. 218–228, 15 out. 2010.

FOUAD, M. M.; SHIHATA, Lamia A.; MORGAN, El Sayed I. **An integrated review of factors influencing the performance of photovoltaic panels.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Elsevier Ltd, 2017.

GHAMARPOOR, Reza; FALLAH, Akram; JAMSHIDI, Masoud. **Investigating the use of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on the amount of protection against UV irradiation.** *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.

GU, Jie *et al.* **Titanium dioxide nanoparticle affects motor behavior, neurodevelopment and axonal growth in zebrafish (*Danio rerio*) larvae.** *Science of the Total Environment*, v. 754, 1 fev. 2021.

HAIDER, Adawiya J. *et al.* **Exploring potential Environmental applications of TiO₂ Nanoparticles.** Elsevier Ltd, 2017.

HAIDER, Adawiyah J.; JAMEEL, Zainab N.; AL-HUSSAINI, Imad H. M. **Review on: Titanium dioxide applications.** Elsevier Ltd, 2019.

HARIHARAN, Sneha *et al.* **Developmental toxicity and neurobehavioral effects of sodium selenite and selenium nanoparticles on zebrafish embryos.** *Aquatic Toxicology*, v. 266, 1 jan. 2024.

HASEGAWA, Eva H.; FARR, Gist H.; MAVES, Lisa. **Comparison of Pronase versus Manual Dechoriation of Zebrafish Embryos for Small Molecule Treatments.** *Journal of Developmental Biology*, v. 11, n. 2, 1 jun. 2023.

HENN, Kirsten; BRAUNBECK, Thomas. **Dechoriation as a tool to improve the fish**

embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, v. 153, n. 1, p. 91–98, 2011.

HICKMAN, D. L. *et al.* **Commonly Used Animal Models.** Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students. Elsevier Inc., 2017. p. 117–175.

HØGSET, Håkon *et al.* **In vivo biomolecular imaging of zebrafish embryos using confocal Raman spectroscopy.** Nature Communications, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.

HOWE, Kerstin *et al.* **The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.** Nature, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 25 abr. 2013.

HU, Qinglian *et al.* **Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on parkinsonism in zebrafish larvae and PC12.** Chemosphere, v. 173, p. 373–379, 2017.

JIA, Hao Ran *et al.* **Nanomaterials meet zebrafish: Toxicity evaluation and drug delivery applications.** Journal of Controlled Release, Elsevier B.V., 1 out. 2019.

JOUDEH, Nadeem; LINKE, Dirk. **Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists.** Journal of Nanobiotechnology, BioMed Central Ltd, 1 dez. 2022.

JUGAN, Mary Line *et al.* **Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells.** Nanotoxicology, v. 6, n. 5, p. 501–513, ago. 2012.

KESSLER, Rebecca. **Engineered Nanoparticles in Consumer Products Understanding a New Ingredient.** National Institute of Environmental Health Sciences, v. 119, n. 3, p. A120–A125, 1 mar. 2011.

KHAN, Ibrahim; SAEED, Khalid; KHAN, Idrees. **Nanoparticles: Properties, applications and toxicities.** Arabian Journal of Chemistry, Elsevier B.V., 1 nov. 2019.

KIM, Ki-Tae; TANGUAY, Robert L. **The role of chorion on toxicity of silver nanoparticles in the embryonic zebrafish assay.** Environmental Health and Toxicology, v. 29, p. e2014021, 10 dez. 2014.

KRAKOWIAK, Rafal *et al.* **Titanium dioxide-based photocatalysts for degradation of emerging contaminants including pharmaceutical pollutants.** Applied Sciences (Suécia), MDPI, 1 set. 2021.

KULACKI, Konrad J. *et al.* **How do stream organisms respond to, and influence, the concentration of titanium dioxide nanoparticles? A mesocosm study with algae and herbivores.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 31, n. 10, p. 2414–2422, out. 2012.

KUMAR, S. *et al.* **Comparative toxicity assessment of nano- and bulk-phase titanium dioxide particles on the human mammary gland in vitro.** Human and Experimental Toxicology, v. 39, n. 11, p. 1475–1486, 1 nov. 2020.

LAHNSTEINER, Franz. **The Sensitivity and Reproducibility of the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Test for the Screening of Waste Water Quality and for Testing the**

Toxicity of Chemicals. ATLAS, v. 36, p. 299–1, 2008.

LI, Dan *et al.* **Optimized titanium dioxide nanotubes for dental implants: Estimation of mechanical properties and effects on the biological behaviors of human gingival fibroblasts and oral bacteria.** Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, v. 144, 1 ago. 2023.

LIN, Shuo *et al.* **Zebrafish: An in vivo model for nano EHS studies.** Small, 27 maio 2013.

LIU, Na *et al.* **Copper-Nanoparticle-Induced Neurotoxic Effect and Oxidative Stress in the Early Developmental Stage of Zebrafish (*Danio rerio*).** Molecules, v. 29, n. 11, 1 jun. 2024.

LIU, Pai *et al.* **Combined toxicity of silica nanoparticles and cadmium chloride on the cardiovascular system of zebrafish (*Danio rerio*) larvae.** Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology, v. 239, 1 jan. 2021.

LU, Chung Shin *et al.* **Titanium dioxide-mediated photocatalytic degradation of Acridine Orange in aqueous suspensions under UV irradiation.** Dyes and Pigments, v. 76, n. 3, p. 706–713, 2008.

MA, H.; BRENNAN, Amanda; DIAMOND, Stephen A. **Phototoxicity of TiO₂ nanoparticles under solar radiation to two aquatic species: *Daphnia magna* and Japanese medaka.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 31, n. 7, p. 1621–1629, jul. 2012.

MARCONE, Glauciene P. S. *et al.* **Ecotoxicity of TiO₂ to *Daphnia similis* under irradiation.** Journal of Hazardous Materials, v. 211–212, p. 436–442, 15 abr. 2012.

MIGUEL, T. B. A. R.; PINHEIRO, S. K. DE P.; DE CASTRO MIGUEL, E. **Interaction of nanomaterials with biological systems.** Nanomaterials and Nanotechnology, Springer Singapore, 2021. p. 375–409.

MUTALIK, Chinmaya *et al.* **Zebrafish Insights into Nanomaterial Toxicity: A Focused Exploration on Metallic, Metal Oxide, Semiconductor, and Mixed-Metal Nanoparticles.** International Journal of Molecular Sciences, MDPI, 1 fev. 2024.

NOËL, A. *et al.* **Effects of inhaled nano-TiO₂ aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs.** Toxicology Letters, v. 214, n. 2, p. 109–119, 17 out. 2012.

OCDE. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.** 2013

ORTIZ-ROMÁN, Melissa I.; CASIANO-MUÑIZ, Ileska M.; ROMÁN-VELÁZQUEZ, Felix R. **Ecotoxicological Effects of TiO₂ P25 Nanoparticles Aqueous Suspensions on Zebrafish (*Danio rerio*) Eleutheroembryos.** Nanomaterials, v. 14, n. 4, 1 fev. 2024.

OSBORNE, Olivia J. *et al.* **Effects of particle size and coating on nanoscale Ag and TiO₂ exposure in zebrafish (*Danio rerio*) embryos.** Nanotoxicology, v. 7, n. 8, p. 1315–1324, 2013.

OTTERSTROM, Jason J. *et al.* **Technologies bringing young Zebrafish from a niche field to the limelight.** SLAS Technology, v. 27, n. 2, p. 109–120, 1 fev. 2022.

PAATERO, Ilkka *et al.* **Analyses in zebrafish embryos reveal that nanotoxicity profiles are dependent on surface-functionalization controlled penetrance of biological membranes.** Scientific Reports, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

PANZICA-KELLY, Julieta M.; ZHANG, Cindy X.; AUGUSTINE-RAUCH, Karen A. **Optimization and Performance Assessment of the Chorion-Off [Dechorinated] Zebrafish Developmental Toxicity Assay.** 2015

PATERSON, Gordon *et al.* **The toxicity of titanium dioxide nanopowder to early life stages of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*).** Chemosphere, v. 82, n. 7, p. 1002–1009, 2011.

PELCLOVA, D. *et al.* **Markers of oxidative damage of nucleic acids and proteins among workers exposed to TiO₂ (nano) particles.** Occupational and Environmental Medicine, v. 73, n. 2, p. 110–118, 1 fev. 2016.

PEREIRA, Aryelle Canedo *et al.* **The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach.** Environmental Pollution, Elsevier Ltd, 1 set. 2019.

PÉREZ-ATEHORTÚA, Maritza *et al.* **Chorion in fish: Synthesis, functions and factors associated with its malformations.** Aquaculture Reports, Elsevier B.V., 1 jun. 2023.

PERMANA, Rega; ANDHIKAWATI, Aulia. **Environmental and Industrial Implications of Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles: Applications, Toxicity, and Ecological Risks.** 2025

PFAFF, Gerhard. **The world of inorganic pigments.** ChemTexts, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 ago. 2022.

PINHEIRO, S. K. *et al.* **Acute toxicity of titanium dioxide microparticles in *Artemia* sp. nauplii instar I and II.** Microscopy research and technique, v. 86, n. 6, p. 636–647, 2023.

POH, Wen Tsin; STANSLAS, Johnson. **The new paradigm in animal testing – “3Rs alternatives”.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, Academic Press Inc., 1 nov. 2024.

QIANG, Liyuan *et al.* **Silver nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) embryos: Uptake, growth and molecular responses.** International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 5, 1 mar. 2020.

QU, Junying *et al.* **Zebrafish in dermatology: a comprehensive review of their role in investigating abnormal skin pigmentation mechanisms.** Frontiers in Physiology, Frontiers Media SA, 2023.

RACOVITA, Anca Diana. **Titanium Dioxide: Structure, Impact, and Toxicity.** International Journal of Environmental Research and Public Health, MDPI, 1 maio 2022.

RAWSON, D. *et al.* **Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration.** Aquaculture Research, v. 31, p. 325–336, 24 dez. 2001.

RIBEIRO, O. M., *et al.* **Embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*).** Revista Ciência Elementar, V12(1):003, 2024.

ROMPELBERG, Cathy *et al.* **Oral intake of added titanium dioxide and its nanofraction from food products, food supplements and toothpaste by the Dutch population.** Nanotoxicology, v. 10, n. 10, p. 1404–1414, 25 nov. 2016.

SANTIAGO, Magda Regina; FÉLIX, Mariana Sandes. **Bioethical and practical aspects of experimentation with zebrafish embryos and adults.** Arquivos do Instituto Biológico, v. 91, 2024.

SCHNEIDER, Samantha L.; LIM, Henry W. **A review of inorganic UV filters zinc oxide and titanium dioxide.** Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine, Blackwell Publishing Ltd, 1 nov. 2019.

SEROV, Dmitriy A. *et al.* **Review of Antimicrobial Properties of Titanium Dioxide Nanoparticles.** International Journal of Molecular Sciences, MDPI, 1 out. 2024.

SHIH, Yu Jen *et al.* Adsorption characteristics of nano-TiO₂ onto zebrafish embryos and its impacts on egg hatching. **Chemosphere**, v. 154, p. 109–117, 1 jul. 2016.

SHIMIZU, Nobuyuki; SHIRAISHI, Hiroshi; HANADA, Toshikatsu. **Zebrafish as a Useful Model System for Human Liver Disease.** Cells, MDPI, 1 set. 2023.

SILVA, Maria *et al.* **Zebrafish (*Danio rerio*): um potencial modelo experimental em pesquisas pré-clínicas.** Pesquisa Multidisciplinar em Saúde - Edição VIII, 2024. p. 85–93.

SINGLEMAN, Corinna; HOLTZMAN, Nathalia G. **Growth and maturation in the zebrafish, *Danio rerio*: A staging tool for teaching and research.** Zebrafish, v. 11, n. 4, p. 396–406, 1 ago. 2014.

SLOMBERG, Danielle L. *et al.* **Release and fate of nanoparticulate TiO₂ UV filters from sunscreen: Effects of particle coating and formulation type.** Environmental Pollution, v. 271, 15 fev. 2021.

SMIJS, Threes G.; PAVEL, Stanislav. **Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: Focus on their safety and effectiveness.** Nanotechnology, Science and Applications, Dove Medical Press Ltd, 2011.

SOLANO, Ricardo *et al.* **Metal- and metal/oxide-based engineered nanoparticles and nanostructures: a review on the applications, nanotoxicological effects, and risk control strategies.** Environmental Science and Pollution Research, v. 28, p. 16962–16981, 27 fev. 2021.

- TANG, Siying *et al.* **Degradable and photocatalytic antibacterial Au-TiO₂/sodium alginate nanocomposite films for active food packaging.** *Nanomaterials*, v. 8, n. 11, 8 nov. 2018.
- TANG, Tianle; ZHANG, Zhang; ZHU, Xiaopeng. **Toxic effects of TiO₂ NPs on Zebrafish.** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 16, n. 4, 2 fev. 2019.
- TEAME, Tsegay *et al.* **The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models.** *Animal Frontiers*, v. 9, n. 3, p. 68–77, 25 jun. 2019.
- TOVAR-SÁNCHEZ, Antonio; SÁNCHEZ-QUILES, David; RODRÍGUEZ-ROMERO, Araceli. **Massive coastal tourism influx to the Mediterranean Sea: The environmental risk of sunscreens.** *Science of the Total Environment*, Elsevier B.V., 15 mar. 2019.
- TRAN, Cong M. *et al.* **Effects of the chorion on the developmental toxicity of organophosphate esters in zebrafish embryos.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 401, 5 jan. 2021.
- VALDIGLESIAS, Vanessa *et al.* **Effects of Zinc Oxide Nanoparticle Exposure on Human Glial Cells and Zebrafish Embryos.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 15, 1 ago. 2023.
- VAN POMEREN, M. *et al.* **Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages.** *Aquatic Toxicology*, v. 190, p. 40–45, 2017.
- VARGAS, Bruna B. *et al.* **Disinfection of indoor air using ultraviolet and titanium dioxide photocatalytic reactor.** *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 96, n. 4, p. e20240304, 2024.
- VICARIO-PARÉS, Unai *et al.* **Comparative toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, ZnO and TiO₂) to developing zebrafish embryos.** *Journal of Nanoparticle Research*, v. 16, n. 8, 2014.
- VON HELLFELD, Rebecca *et al.* **Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos.** *Environmental Sciences Europe*, v. 32, n. 1, 1 dez. 2020.
- WANG, Jiangxue; FAN, Yubo. **Lung injury induced by TiO₂ nanoparticles depends on their structural features: Size, shape, crystal phases, and surface coating.** *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI AG, 3 dez. 2014.
- WARHEIT, David B. **Safety of titanium dioxide (E171) as a food additive for humans.** *Frontiers in Toxicology*, v. 6, 2024.
- WEHMAS, Leah C. *et al.* **Comparative metal oxide nanoparticle toxicity using embryonic zebrafish.** *Toxicology Reports*, v. 2, p. 702–715, 1 jan. 2015.
- WEIR, Alex *et al.* **Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products.**

Environmental Science and Technology, v. 46, n. 4, p. 2242–2250, 21 fev. 2012.

WU, Xiaoping. **Applications of Titanium Dioxide Materials**. 2021

XIONG, Daowen *et al.* **Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage**. Science of the Total Environment, v. 409, n. 8, p. 1444–1452, 15 mar. 2011.

YOUNES, Maged *et al.* **Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive**. EFSA Journal, v. 19, n. 5, 1 maio 2021.

ZHANG, Jinyang *et al.* **Cytotoxicity of different sized TiO₂ nanoparticles in mouse macrophages**. Toxicology and Industrial Health, v. 29, n. 6, p. 523–533, 2013.