



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**NÚCLEO DE ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA DA AMAZÔNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA**

**Análise *in vitro* e *in vivo* de efeitos de nanopartículas de dióxido de titânio sobre a espécie amazônica *Hyphessobrycon heterorhabdus***

**BELÉM - PA**  
**2023**

MARIA LETÍCIA MARQUES MORAES

**Análise *in vitro* e *in vivo* dos efeitos das nanopartículas de dióxido de titânio sobre a espécie amazônica *Hyphessobrycon heterorhabdus***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lílian Lund Amado

**Co-orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Sarita Nunes Loureiro

Maria Letícia Marques Moraes

**Análise *in vitro* e *in vivo* de efeitos de nanopartículas de dióxido de titânio sobre a espécie amazônica *Hyphessobrycon heterorhabdus***

**Banca examinadora:**

31/05/2023

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lílian Lund Amado

(Universidade Federal do Pará – Presidente)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rossineide Martins da Rocha

(Universidade Federal do Pará – Membro interno)

---

Prof Dr Thiago Lopes Rocha

(Universidade Federal de Goiás – Membro externo à instituição)

---

Prof Dr José María Monserrat

(Universidade Federal de Rio Grande – Membro externo à instituição)

---

Prof Dr Aduino Lima Cardoso

(Universidade Federal do Pará – Suplente externo)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sildiane Martins Cantanhede

(Universidade Federal do Pará – Suplente interno)

BELÉM – PA  
2023

### **Agradecimentos**

À Universidade Federal do Pará pelo oferecimento do curso e estrutura para realização da pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia aquática e Pesca pelo suporte dado ao desenvolvimento do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha família, minha mãe Alessandra Marques Moraes, minha vó Joana Célia Marques Moraes, minha irmã Leilane Raissa Moraes da Conceição, meus primos Gersica Raphaela Veiga Silva Silveira e Pedro Rafael Veiga da Silva, minhas tias Elisangela Moraes de Hadad e Helena Maria Veiga da Silva, por todo apoio e incentivo durante todo meu processo de aprendizagem.

À minha orientadora, Dra. Lilian Lund Amado, pela paciência, pelos ensinamentos, compreensão e apoio que foram fundamentais para o cumprimento deste trabalho. À minha co-orientadora, Dra. Sarita Nunes Loureiro, por todo incentivo, ensinamentos, paciência e amizade.

À Carla Carolina Miranda dos Santos por toda sua imensa ajuda durante meu experimento, dosagem e cálculo, essencial para realização deste trabalho, e pela amizade durante esse processo.

Aos membros do Labecotox: João Pedro Pantoja Monteiro, Kawe dos Santos Bezerra e Alana Rodrigues Nauar, pela ajuda durante o experimento e dosagens e por toda paciência e convivência no laboratório.

Aos meus amigos, Yago da Rocha Santos e Letícia Oliveira Lobato por todas as palavras de incentivo e passeios nos meus momentos de desespero.

A todos vocês meu mais sincero

Obrigada!

“Palavras são, na minha nada humilde opinião,  
nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de  
formar grandes sofrimentos e também de  
remediá-los”  
(Alvo Dumbledore, Harry Potter e as Relíquias  
da Morte).

## RESUMO

As nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub> NP) podem ser liberadas através de processos biogeoquímicos ou mecânicos, sem ligação direta ou indireta com alguma atividade humana. Na região amazônica ocorre a presença natural de Ti, pelo fato deste elemento ser um dos constituintes majoritários na formação geológica local, o que favorece a presença de TiO<sub>2</sub> NP de origem natural. Somada a essa carga ambiental potencial de TiO<sub>2</sub> NP temos o seu uso crescente na indústria farmacêutica e de dermocosméticos. Sendo assim, esses fatores influenciam claramente no acúmulo e transporte de TiO<sub>2</sub> NP presentes nos corpos d'água da região, aumentando sua concentração e exposição de organismos aquáticos residentes. Com isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar respostas bioquímicas e moleculares de uma espécie de peixe nativa (*Hyphessobrycon heterorhabdus*) exposta às TiO<sub>2</sub> NP em concentrações ambientalmente realistas para o estuário amazônico, de acordo com dados pretéritos sobre Titânio dissolvido em corpos d'água da região. Para isso, foram realizadas abordagens experimentais *in vivo* e *in vitro* utilizando a espécie amazônica *H. heterorhabdus*. Para o teste *in vitro*, foram utilizadas células da linhagem HHE derivada de nadadeira caudal de *H. heterorhabdus* semeadas em placa de 96 poços, separada em quatro grupos experimentais: controle, 0,2 mg/L, 0,6 mg/L e 1 mg/L de TiO<sub>2</sub> NP. A viabilidade celular foi avaliada em 24, 48 e 72h. A expressão de genes relacionados com as defesas antioxidantes (*nrf2*, *gst*, *gsr* e *gclc*) e sequestro de metais (*mfl* e *mt*) foram avaliados para cada concentração em 6 e 12h de exposição. Para o teste *in vivo*, 80 peixes foram distribuídos nos grupos experimentais já citados, sendo que cada grupo continha 5 réplicas, com um pool de 4 peixes em cada. O experimento teve duração de 96 horas. Foram analisadas em pools de peixe inteiro, a capacidade antioxidante total (ACAP), concentração de glutatona reduzida (GSH), atividade das enzimas glutatona S-transferase (GST), glutamato cisteína-ligase (GCL), glutatona redutase (GR), atividade da catalase (CAT) e lipoperoxidação (LPO). Para o teste *in vitro*, verificamos que nenhuma das concentrações testadas interferiu na viabilidade celular que permaneceu próxima a 100% em todos os grupos ao longo das 72h de exposição. A expressão dos genes relacionados com a defesa antioxidante e o sequestro de metais também não apresentou diferenças significativas nem entre os tratamentos nem nos diferentes tempos de exposição (6 e 12h). O mesmo padrão de ausência de diferenças significativas entre tratamentos foi verificado no estudo *in vivo*. As atividades da GST, GR, CAT, GCL, a concentração de GSH e a capacidade antioxidante total, não apresentaram diferença significativa entre grupos experimentais dentro das 96h de exposição ao TiO<sub>2</sub> NP. Da mesma forma, não foram registradas diferenças no conteúdo de lipídeos peroxidados ao longo das concentrações testadas. De forma geral, foi verificado que as concentrações ambientalmente realistas testadas neste estudo não afetaram a expressão e as atividades das enzimas antioxidantes, tão pouco ocasionaram incremento nos danos oxidativos a lipídios ou alteração nas concentrações de GSH em *H. heterorhabdus* no estudo *in vivo*. Tais resultados podem sugerir uma adaptação à essas concentrações, pois se trata de um peixe nativo da região amazônica, que naturalmente tem o potencial de ser exposto a concentrações de Ti nos níveis testados. No entanto, novos testes empregando outros tipos celulares para o estudo *in vitro*, a análise órgão específica nos estudos *in vivo*, bem como maiores tempos de exposição em ambas as abordagens são recomendados para um maior aprofundamento sobre o nível de tolerância da espécie nativa a TiO<sub>2</sub> NP.

**Palavras-chave:** TiO<sub>2</sub> NP; Estresse Oxidativo; expressão gênica; ecotoxicologia; enzimas antioxidantes; lipoperoxidação

## Abstract

Titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub> NP) can be released through biogeochemical or mechanical processes, without direct or indirect connection with any human activity. In the Amazon region there is a natural presence of Ti, because this element is one of the major constituents in the local geological formation, which favors the presence of TiO<sub>2</sub> NP of natural origin. Added to this potential environmental burden of TiO<sub>2</sub> NP there is an increasing use of this nanoparticle in the pharmaceutical and dermocosmetic industries. Therefore, these factors clearly influence the accumulation and transport of TiO<sub>2</sub> NP present in water bodies in the region, increasing its concentration and exposure of resident aquatic organisms. Thus, the aim of the present study was to evaluate biochemical and molecular responses of a native fish species (*Hyphessobrycon heterorhabdus*) exposed to TiO<sub>2</sub> NP at environmentally realistic concentrations for the Amazon estuary, according to available data on Titanium dissolved in water bodies of the region. For this, *in vivo* and *in vitro* experimental approaches were carried out using the Amazonian species *H. heterorhabdus*. For the *in vitro* test, cells of the HHE lineage derived from the caudal fin of *H. heterorhabdus* were seeded in a 96-well plate, separated into four experimental groups: control, 0.2 mg/L, 0.6 mg/L and 1 mg/L of TiO<sub>2</sub> NP. Cell viability was evaluated at 24, 48 and 72h. The expression of genes related to antioxidant defenses (*nrf2*, *gst*, *gsr* and *gclc*) and metal sequestration (*mtf1* and *mt*) were evaluated for each concentration at 6 and 12 hours of exposure. For the *in vivo* test, 80 fish were distributed in the aforementioned experimental groups, each group containing 5 replicates, with a pool of 4 fish in each. The experiment lasted 96 hours. Total antioxidant capacity (ACAP), reduced glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST), glutamate cysteine ligase (GCL), glutathione reductase (GR) of catalase (CAT) and lipoperoxidation (LPO). For the *in vitro* test, none of the concentrations tested interfered with cell viability, which remained close to 100% in all groups over the 72 hours of exposure. The expression of genes related to antioxidant defense and metal sequestration also did not show significant differences either between treatments or at different exposure times (6 and 12h). The same pattern of absence of significant differences between treatments was observed in the *in vivo* study. GST, GR, CAT, GCL activities, GSH concentration and total antioxidant capacity did not show significant difference between experimental groups within 96 hours of exposure to TiO<sub>2</sub> NP. Likewise, no differences were registered in the content of peroxidized lipids along the tested concentrations. In general, it was found that the environmentally realistic concentrations tested in this study did not affect the expression and activities of antioxidant enzymes, nor did they cause an increase in oxidative damage to lipids or changes in GSH concentrations in *H. heterorhabdus* in the *in vivo* study. Such results may suggest an adaptation to these concentrations, as this is a fish native to the Amazon region, which naturally has the potential to be exposed to Ti concentrations at the tested levels. However, new tests using other cell types for the *in vitro* study, specific organ analysis in *in vivo* studies, as well as longer exposure times in both approaches are recommended to more detailed examination of native species tolerance level to TiO<sub>2</sub> NP.

**Keywords:** TiO<sub>2</sub> NP; Oxidative stress; gene expression; ecotoxicology; antioxidant enzymes; lipoperoxidation

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>4</b>
1.1.	Titânio dissolvido no ambiente .....	5
1.2.	Nanopartículas de dióxido de titânio (TiO <sub>2</sub> NP) e sua toxicidade .....	5
1.3.	Ensaio de toxicidade com <i>Hyphessobrycon heterohabdus</i> .....	9
1.4.	Teste <i>in vitro</i> com células cultivadas .....	10
1.5.	Parâmetros de defesa antioxidante e danos oxidativos avaliados em níveis genético (expressão gênica) e bioquímico .....	12
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1.	Objetivos gerais .....	14
2.2.	Objetivos específicos .....	14
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>14</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
4.1.	Análise da dispersão das nanopartículas de TiO <sub>2</sub> NP .....	15
4.2.	Teste <i>in vitro</i> .....	16
4.2.1.	Viabilidade celular .....	16
4.2.2.	Expressão de gênica .....	16
4.3.	Teste <i>in vivo</i> .....	18
4.3.1.	Coleta dos peixes, aclimação e manutenção dos organismos .....	18
4.3.2.	Teste de toxicidade em peixes adultos de <i>H. heterorhabdus</i> .....	19
4.4.	Biomarcadores bioquímicos .....	20
4.4.1.	Determinação de proteínas totais .....	20
4.4.2.	Determinação da capacidade antioxidante total (ACAP) .....	20
4.4.3.	Atividade da Glutathione Redutase (GR) .....	21
4.4.4.	Atividade da catalase (CAT) .....	21
4.4.5.	Atividade da Glutamato Cisteína Ligase (GCL) e concentração da Glutathione Reduzida (GSH) .....	21
4.4.6.	Atividade da Glutathione-S Transferase (GST) .....	22
4.4.7.	Lipoperoxidação (LPO) .....	22
4.5.	Análise Estatística .....	23
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
5.1.	Caracterização e dinâmica das TiO <sub>2</sub> NP em suspensão .....	23



5.2. Teste <i>in vitro</i> .....	23
5.3. Teste <i>in vivo</i> .....	25
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

Os nanoelementos (NE) são materiais orgânicos, inorgânicos ou mistos (organometálicos) que apresentam propriedades químicas, físicas e/ou elétricas distintas devido ao seu tamanho em nanoescala (na maioria das vezes de 1 nm até algumas dezenas de nanômetros) (Hochella *et al.*, 2019).

Os NE são produzidos ou disponibilizados a partir de diversas origens, podendo ser naturais, derivados de processos biogeoquímicos ou mecânicos, sem ligação direta ou indireta com uma atividade humana (Lahde *et al.*, 2013). Também, podem ser formas incidentais, produzido involuntariamente como resultado de qualquer influência antropogênica (Zee *et al.*, 2003), ou ainda, formas projetadas, concebidas intencionalmente por humanos e aplicadas em áreas distintas como, medicina, farmácia, têxteis, agricultura, energia, eletrônica e meio ambiente (Léon *et al.*, 2019).

Os NE naturais foram essenciais durante a formação da Terra e ao longo de sua evolução (Hochella *et al.*, 2019). Através de reações de intemperismo, por exemplo, o (oxi)hidróxido de ferro torna-se biodisponível e é transportado para os oceanos por vias fluviais e atmosféricas e que influenciam a produtividade primária da superfície do oceano (Lahde *et al.*, 2013).

A natureza de NE incidentais na subsuperfície de terras afetadas pela mineração, tem sido um crescente campo de interesse para pesquisa (Hochella *et al.*, 2019). As práticas de mineração e agricultura são conhecidas por produzir solos incidentais ricos em NE que podem acabar em planícies de inundação e atrás de barragens, influenciando claramente o transporte destes para os oceanos (Zee *et al.*, 2003).

O meio aquático é uma das matrizes com mais probabilidade de ser afetado por NE, devido ao fluxo de resíduos, descargas de águas residuais tratadas de forma inadequada, escoamento e lançamentos de lamas contaminadas colocadas em aterros (Besha *et al.*, 2020). Os sistemas aquáticos podem interagir com NE, que através dessa interação passam por processos de transformações físicas e químicas, alterando potenciais efeitos biológicos. Essas transformações são facilitadas devido a características inerentes aos NE, como: solubilidade altamente variável, área superficial específica, estado de agregação, tamanho, forma e potenciais efeitos físico-químicos e biológicos decorrentes de pequenas mudanças na morfologia de diferentes NE. Além disso, a possibilidade de interação com material inorgânico e/ou orgânico, bem como com componentes biológicos do ambiente também podem ser importantes meios de transformação que os NE estão suscetíveis no ambiente aquático (Díaz *et al.*, 2017).

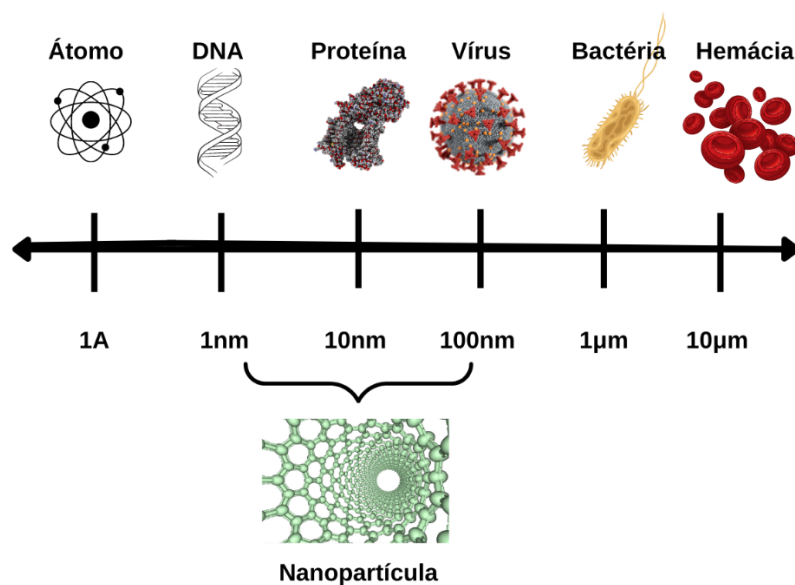
As transformações das propriedades dos NE podem resultar no aumento da biodisponibilidade, aumentando sua toxicidade e tornando-se uma ameaça não apenas para o bem-estar dos organismos aquáticos, mas também para a segurança das fontes utilizadas para a produção de água potável (Sousa *et al.*, 2020). Os NE (TiO<sub>2</sub> NP, ZnO NP, Ag NP, nanotubo de carbono) já foram detectados em fontes de água potável e até mesmo na água da torneira em concentrações na faixa de ng/L e µg/L, tornando-os um risco potencial para humanos (Park *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2014).

### **1.1. Titânio dissolvido no ambiente**

O titânio de ocorrência natural é comumente encontrado em solos, e apresenta-se em minerais anatase e rutilo (ambos com a fórmula TiO<sub>2</sub>) chegando até a escala nanométrica (Hochella *et al.*, 2019). Esse metal está presente na composição da bauxita, um minério bastante explorado na Amazônia. Amostras de um perfil da bauxita de Paragominas (Brasil) foram analisadas extensivamente, e demonstraram que diferenças nos padrões de concentração para alguns metais refratários (Al, Ti, Zr, Hf etc.) levam à sugestão de que alguns desses metais (Ti, Zr, Hf) podem participar de reações biológicas (Kronberg *et al.*, 1981). O Ti dissolvido também pode ser encontrado em estuários Amazônicos, sendo que sua concentração foi de 0,13 mg/L no rio Pará e 0,212 mg/L no rio Amazonas (Schneider *et al.*, 2022). Os autores comparam seus dados com um estudo realizado em 1995, apresentando uma estabilidade nessa concentração, mas fazem um alerta para o crescente estresse climático e ambiental que a região vem sofrendo.

### **1.2. Nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub> NP) e sua ecotoxicidade**

Um nanoelemento é considerado uma nanopartícula, quando todas as suas três dimensões possuem medidas inferiores a 100 nm, (Figura 1) (ISO, 2004). Comercialmente, a TiO<sub>2</sub> NP está presente em alimentos, como gomas de mascar (<0,02 á 1,45 µg/mg), fármacos (Gu *et al.*, 2021) e produtos de cuidados pessoais, como protetores solares e sabonetes (<0,01 µg/mg) (Weir *et al.*, 2012), onde são usadas para melhorar a penetração dos ingredientes ativos na pele (Jovanović, 2015). Além disso, a TiO<sub>2</sub> NP é utilizada principalmente na produção de tintas autolimpantes, superfícies autoesterilizantes, cimentos e asfalto para construção de estradas, pavimentos e túneis (Clemente *et al.*, 2012; Bergamonti *et al.*, 2014), e no tratamento de resíduos ambientais (Formoso *et al.*, 2016). De acordo com o banco de dados de uso de TiO<sub>2</sub> NP dos Estados Unidos, são vendidas anualmente, entre 3.800 e 7.800 toneladas (Biola-Clier *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Comparação de estruturas nas escalas nanométrica e micrométrica.

Devido a ampla aplicação da  $\text{TiO}_2$  NP, sua concentração aumentou nos meios bióticos e abióticos dos ecossistemas, através de efluentes industriais e descargas diárias humanas (Griffin *et al.*, 2018), provocando o acúmulo em corpos d'água, assim levantando preocupações sobre a biodisponibilidade dessas nanopartículas (Khosravi *et al.*, 2012). As crescentes concentrações de  $\text{TiO}_2$  NP nos ecossistemas aquáticos aumentam exposição ambiental de organismos aquáticos, pois já foram detectadas concentrações dessa nanopartícula, que variam de 0,1 a 1,0 mg/L (Khosravi *et al.*, 2012; Gottschalk *et al.*, 2013).

A  $\text{TiO}_2$  NP é fotoativa e tem o potencial de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), essa característica as torna nocivas à muitos organismos, devido à indução de alterações celulares e fisiológicas, dano oxidativo e morte (Faria *et al.*, 2014; Biola-Clier *et al.*, 2020). Também são reconhecidos os efeitos genotóxicos da  $\text{TiO}_2$  NP. Estes estão associados à alterações na montagem do fuso mitótico, o que compromete a progressão do ciclo celular e reduz o reparo do DNA, causando efeitos genotóxicos diretos e indiretos (Biola-Clier *et al.*, 2020; Gu *et al.*, 2021).

Os efeitos ecotoxicológicos do  $\text{TiO}_2$  NP têm sido objeto de muitos estudos envolvendo espécies de peixes, incluindo embriões de zebrafish (*Danio rerio*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e *Carassius auratus* (Gu *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2011; Federici *et al.*, 2007; Diniz *et al.*, 2013) (Tabela 1). Além desses, existem estudos com algas, plantas, invertebrados (Lu *et al.*, 2021; Nunes *et al.*, 2020; Hou *et al.*, 2019) e anfíbios (Amaral *et al.*, 2022), e até o presente momento nenhum estudo se concentrou especificamente em uma espécie nativa da Amazônia. A Tabela 1 sumariza dados de estudos ecotoxicológicos em diferentes espécies de peixes com base na fase

de desenvolvimento, órgãos analisados, concentrações utilizadas e efeitos observados devido a exposição a TiO<sub>2</sub> NP.

**Tabela 1.** Resumo dos estudos ecotoxicológicos de TiO<sub>2</sub> NP em diferentes espécies de peixes.

Espécies	Fase de desenvolvimento	Órgãos analisados	Concentrações	Efeitos observados	Referências
<i>Wallago attu</i>	Adulto	Células Branquiais	50 mg/L	Genotóxico e Estresse oxidativo (SOD/ ROS/ LPO/CAT/ ACAP/GSH)	Dubey <i>et al.</i> , 2015
<i>Danio rerio</i>	Embriolarval	Sangue	1 e 10 µg/L	Genotóxico/ danos nos nucleotídeos	Rocco <i>et al.</i> , 2015
<i>Danio rerio</i>	Larval	Organismo inteiro	0,1 mg/L	Estresse oxidativo (ROS/GSH/SOD/LPO)	Fang <i>et al.</i> , 2015
<i>Trachinotus carolinus</i>	Adulto	Sangue	1,5 e 3,0 µg/L	Danos no DNA (formação de micronúcleos)	Vignardi <i>et al.</i> , 2015
<i>Danio rerio</i>	Embriolarval	Organismo inteiro Pele, fígado, cérebro e brânquias	0,01, 0,1 e 1 mg/ml	Indução de ROS e alteração de enzimas antioxidantes (ROS/SOD/GSH)	Faria <i>et al.</i> , 2014
<i>Cyprinus carpio</i>	Juvenil	brânquias	5, 10, 20, 40 e 80 mg/L	Alteração de enzimas antioxidantes (GST, CAT)	Lee <i>et al.</i> , 2012
<i>Danio rerio</i>	Embriolarval	Organismo inteiro	20 ppt	Alteração na expressão de genes (Bcl2/Bax)	Yeo <i>et al.</i> , 2012
<i>Danio rerio</i>	Embriolarval	Organismo inteiro	0,1 e 1 mg/L	Danos no desenvolvimento embrionário e efeitos na expressão genica	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>Cyprinus carpio</i>	Juvenil	Brânquias, fígado, cérebro	10, 50, 100, 200 mg/L	Estresse oxidativo (SOD/CAT/POD/LPO)	Hao <i>et al.</i> , 2009
<i>Carassius auratus</i>		Células da pele (GFSk-S1)	1, 10 e 100 µg ml <sup>-1</sup>	Oxidação de bases purinas de DNA	Reeves <i>et al.</i> , 2008
<i>Danio rerio</i>	Adultos	Sangue	10 µg/L	Genotóxico (danos no DNA e Viabilidade celular)	Mottola <i>et al.</i> , 2022
<i>Danio rerio</i>	Embriolarval	Organismo inteiro	0,1 e 1mg/L	Apoptose celular e Estresse oxidativo (ERO/ CAT/LPO)	Chen <i>et al.</i> , 2021
<i>Danio rerio</i>	Adultos	Intestino, rim, fígado	200 µg/L e 400 µg/L	Alteração de enzimas antioxidantes (CAT/SOD)	Cunha e Brito-Gitirana, 2020.
<i>Rhamdia quelen</i>	Adultos	Sangue	0,05, 0,5 e 5mg/L	Estresse oxidativo (SOD/CAT/GST/GPx/LPO/ MTs)	Oya-Silva <i>et al.</i> , 2021
<i>Clarias gariepinus</i>	Juvenil	Sangue	6,25, 12,5, 25,0, 50,0 e 100,0 mg L	Alterações citogenéticas, hematológicas (Glóbulos vermelhos, plaquetas, heterófilos)	Ogunsuyi <i>et al.</i> , 2020
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Adultos	Estomago, intestino	3,1–50,2 µg L <sup>-1</sup>	Estresse oxidativo (SOD/ CAT/ GST/ LPO/ AChE)	Zeumer <i>et al.</i> , 2020

Os estudos supracitados na Tabela 1, no entanto, não destacam se as concentrações de exposição são ambientalmente relevantes. De fato, nosso conhecimento sobre os efeitos ecotóxicológicos de TiO<sub>2</sub> NP em organismos aquáticos ainda é limitado.

### 1.3. Ensaio de ecotoxicidade com *Hyphessobrycon heterorhabdus*

*Hyphessobrycon heterorhabdus* (Ulrey, 1894), popularmente conhecido como tetra bandeira, é um peixe pertencente à ordem Characiformes e à família Characidae. Essa espécie possui uma mancha umeral alongada e bem definida, contínua com uma faixa escura bem definida no meio-lateral que se torna borrada em direção ao pedúnculo caudal (Figura 2) e uma faixa longitudinal tricolor padrão, composto dorsalmente por uma faixa longitudinal avermelhada e uma faixa longitudinal média iridescente, dourada ou prateada (Faria *et al.*, 2021). *H. heterorhabdus* é uma espécie comum na bacia do baixo rio Amazonas, é nectônica e habita predominantemente os remansos, com uma dieta onívora (Ulrey, 1894), consumindo invertebrados terrestres, aquáticos e outros tipos de alimento vegetal (Silva *et al.*, 2019). Não há registros na literatura com a descrição de dimorfismo sexual para *H. heterorhabdus*.



**Figura 2.** Exemplo de *Hyphessobrycon heterorhabdus* adulto do Laboratório de Pesquisa e Monitoramento Ambiental Marinho. Imagem: Autora.

Apenas dois trabalhos realizaram ensaios de ecotoxicidade com *H. heterorhabdus*. Pereira (2019) realizou análise genotóxica (técnicas do micronúcleo, anormalidades nucleares eritrocitárias e ensaio cometa) das células sanguíneas e uma análise histopatológica dos danos teciduais de brânquias e fígado do *H. heterorhabdus* expostos ao chorume da lixeira pública de Santarém, Pará. O estudo de Nascimento (2022) analisou as alterações bioquímicas e genéticas no peixe *H. heterorhabdus* após exposição ao Alumínio em meio ácido utilizando biomarcadores

de exposição (ACAP, GST, GSH, GCL, GR) e de efeito (LPO). Em ambos os trabalhos, os autores descrevem que a espécie tem um potencial positivo para ser utilizada como organismo teste em bioensaios ecotoxicológicos.

#### **1.4. Teste *in vitro* com células cultivadas**

De acordo com os princípios éticos e o de bem-estar no uso de animais para fins educacionais e científicos, tem-se a necessidade de substituição de sistemas modelo para eliminar ou reduzir a dor, o estresse e o sofrimento (Canedo *et al.*, 2022). Sugere-se que os cientistas empreguem os 3Rs em seus experimentos. O primeiro R, refere-se a “*Replacement (1R)*” ou substituição, em português. A substituição pode ser total ou parcial. Caso seja a substituição dos animais seja total, não deve comprometer os resultados das pesquisas. A adoção de técnicas como, linhagens celulares, culturas de tecidos e organoides, modelagem computacional e matemática estão entre as metodologias comumente aplicadas (Stadnicka-Michalak *et al.*, 2015; Schirmer, 2006). O segundo R se refere à redução (2R). Esta é aplicada quando não é possível substituir os animais durante a pesquisa científica, então deve-se diminuir o número de animais utilizados em protocolos e delineamentos experimentais (Díaz *et al.*, 2021). O terceiro R diz respeito ao refinamento (3R). Devido ao uso de modelo animal ainda ser necessário na pesquisa científica, deve-se refinar a forma como os experimentos são conduzidos, garantindo que os animais sofram o mínimo possível, e isso inclui melhor alojamento, parâmetros hídricos adequados, alimentação regular, procedimentos adequados de anestesia e analgesia (Russell e Burch; Huntingford *et al.*, 2006).

A interação primária entre produtos químicos e formas de vida começa na superfície da célula ou dentro da célula (Bols *et al.*, 2005). Assim, estudos em nível celular são de fundamental importância em ecotoxicologia. Os efeitos de produtos químicos em processos como metabolismo do xenobiótico, danos ao DNA, transporte de membrana e estresse oxidativo, e em funções especializadas, como fagocitose e síntese de proteínas específicas, foram todos avaliados usando linhagens de células de peixes (Schirmer, 2006).

Outros métodos alternativos em potencial, para substituir o uso de peixes juvenis e adultos, seria o uso de linhagens celulares de brânquias para a previsão de toxicidade aguda em peixes (por exemplo, RTgill-W1 17) e o teste de toxicidade de embrião de peixe (OCDE 236). Stadnicka-Michalak *et al.* (2015) mostraram recentemente que testes usando linhagem de células de peixes, combinados com modelos computacionais baseados em mecanismos, poderiam substituir testes usando peixes juvenis, este modelo prevê crescimento reduzido de peixes com base na inibição



do crescimento de células de peixes. Este passo promissor em direção a linhagens e modelos de células de peixes como alternativa ao uso de peixes inteiros para testes de toxicidade crônica é simples, barato e rápido, exigindo apenas dados *in vitro* e ensaios existentes para calibrar o modelo (Lillicrap *et al.*, 2016).

### **1.5. Parâmetros de defesa antioxidante e danos oxidativos avaliados em níveis genético (expressão gênica) e bioquímico**

As moléculas exógenas como os poluentes ambientais orgânicos ou inorgânicos, incluindo aqui o objeto dessa pesquisa (TiO<sub>2</sub>NP), e processos endógenos, como a inflamação e explosão respiratória (*respiratory burst*), provocam a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) levando ao esgotamento de um ou mais antioxidantes e até danos oxidativos (Amado *et al.*, 2009). Quando o estresse oxidativo ocorre, as células tentam neutralizar os efeitos oxidantes e restaurar o equilíbrio redox por ativação ou silenciamento de genes que codificam enzimas defensivas, fatores de transcrição e proteínas estruturais (Birben *et al.*, 2012).

Os fatores de transcrição participam de uma grande família de moléculas que regulam a expressão genética nos organismos pluricelulares (Chen *et al.*, 2020). O Mtf1 é um fator de transcrição, que controla a expressão das metalotioneínas (MTs), além de outros componentes envolvidos na homeostasia dos metais (Zabihihesari *et al.*, 2022). O Mtf1 pode ser ativado por metais ou pelo estresse oxidativo (Tavera-Montañez *et al.*, 2019).

As MTs são proteínas de baixo peso molecular que participam dos processos de detoxificação de metais, pois evitam o estresse oxidativo derivado da exposição a estes elementos, sendo que sua produção é diretamente proporcional à exposição a metais (Jackson *et al.*, 2020). Várias linhas de evidência sustentam o papel protetor das MTs no estresse oxidativo. O primeiro trabalho sobre a atividade de eliminação de espécies reativas de oxigênio das MTs foi publicado por Thronalley e Vasak (1985), mostrando que as MTs purificadas eram um eliminador de radicais hidroxila *in vitro* mais potente do que a glutatona. Outros autores confirmaram esta propriedade e demonstraram MTs não apenas ligam metais, mas também têm a capacidade de eliminar ROS (em ostras) ânion superóxido e óxido nítrico (em peixes) (Figueira *et al.*, 2012; Atif *et al.*, 2006). Além disso, outra linha de estudos mostrou que as MTs são capazes de proteger várias biomoléculas como lipídios e DNA de dano oxidativo (Beg *et al.*, 2015; Atif *et al.*, 2006). Quando ocorre a exposição a metais, a expressão das MTs é regulada em nível transcricional pela *mtf1*, que se liga ao gene das MTs na região promotora para favorecer a sua expressão (Tavera-Montañez *et al.*, 2019). Estudos já demonstraram que as TiO<sub>2</sub> NP ativam o *mtf1*, que é responsável

pela expressão das MTs, que por sua vez participam dos processos de detoxificação de metais (Jackson *et al.*, 2020; Zabihhesari *et al.*, 2022).

O Nrf2 é um fator de transcrição relacionado à defesa celular primária contra os efeitos citotóxicos do estresse oxidativo. Ele desempenha papel importante na regulação de genes antioxidantes e no metabolismo de Fase II em vertebrados (Mugoni *et al.*, 2014). Esse fator de transcrição, que ativa a transcrição gênica por meio de suas interações com elementos de resposta antioxidante/eletrófilos (ARE/EpRE), é um regulador chave da resposta ao estresse oxidativo, influenciando vários processos biológicos, como respiração aeróbica, desenvolvimento embrionário, inflamação e carcinogênese (Timme-Laragy *et al.*, 2012). O Nrf2 é liberado na presença de desequilíbrios redox ou estresse oxidativo, sendo assim, ele se transloca para o núcleo, onde se dimeriza com pequenas proteínas Fibrossarcoma Músculo aponeurótico (MAF) para ativar os genes regulados por elemento de resposta antioxidante (ARE) (Nguyen *et al.*, 2009). Desencadeia a expressão de genes antioxidantes e desintoxicantes, incluindo superóxido dismutase (*sod*), glutathione S-transferase (*gst*), glutamato-cisteína ligase (*gclc*) e Glutathione-dissulfeto redutase (*gsr*) (Shanmugam *et al.*, 2019 & Panossian *et al.*, 2020). Sendo assim, o Nrf2 impulsiona o aumento da expressão gênica de diversas proteínas, envolvidas no sistema antioxidante celular como, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), peroxiredoxina (Prdx) e as pequenas moléculas de tiol, glutathione (GSH) e tioredoxina (Txn) (Mukaigasa *et al.*, 2012).

O estresse oxidativo ocorre quando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) excede a capacidade de defesa antioxidante ou interrompe a sinalização redox, afetando a funcionalidade celular (Jones, 2006). A TiO<sub>2</sub> NP depositada em diferentes órgãos e o contato direto (brônquias e pele) pode gerar ERO, além de produzir radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) que podem reagir com o oxigênio gerando ânions superóxidos que são o substrato da SOD, além disso também podem interromper o sistema antioxidante celular pela inibição da síntese de moléculas antioxidantes (GSH) ou pelo comprometimento das atividades das enzimas antioxidantes, que funcionam para manter o equilíbrio oxidativo (Xiong *et al.*, 2011; Faria *et al.*, 2014). As respostas antioxidantes podem ser caracterizadas por meio da medida da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP), que é um indicador que mede a capacidade de neutralizar os radicais peroxil gerados pela exposição a contaminantes de forma integrada (Amado *et al.*, 2009). Um dos biomarcadores não enzimáticos mais importantes como ferramenta de defesa contra agentes pró-oxidantes é a glutathione reduzida (GSH), um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina (Kang *et al.*, 2021). É uma das primeiras linhas de defesa contra ERO. Com a diminuição da quantidade de GSH e o aumento de glutathione oxidada (GSSG), é ativada a glutathione redutase (GR). Quando os estoques de GSH estão baixos, ocorre a ativação da sua rota

de síntese, onde a glutamato cisteína ligase (GCL) é a enzima responsável pela ligação dos peptídeos constituintes da GSH em uma rota chamada de síntese *de novo* (Da *et al.*, 2022).

Outro biomarcador importante para medir a eficiência do sistema antioxidante em organismos é a atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST) (Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2006), pois ela está envolvida no transporte de compostos reativos que exercem funções antioxidantes indiretas nas células facilitando a eliminação de subprodutos derivados do processo oxidativo (Cantanhede *et al.*, 2021).

Para verificar se os organismos estão sofrendo estresse oxidativo devido à exposição a contaminantes são realizadas medições que permitem detectar danos em biomoléculas essenciais. Um exemplo é a avaliação da peroxidação lipídica (LPO) (Abdalla *et al.*, 2019). Sendo assim, as respostas antioxidantes e os parâmetros de estresse oxidativo, são importantes biomarcadores para análise de exposição e efeitos de poluentes (Loureiro *et al.*, 2023).

Os biomarcadores de estresse oxidativo foram as ferramentas utilizadas no presente estudo para analisar os efeitos tóxicos do TiO<sub>2</sub> NP nos peixes da espécie *Hyphessobrycon heterorhabdus*. Os biomarcadores selecionados são capazes de informar se houve exposição a um xenobiótico, analisando o nível desta condição (biomarcadores de exposição), e elucidando as consequências deletérias (biomarcadores de efeito) (Sogorb *et al.*, 2014). Os biomarcadores foram analisados em duas abordagens distintas (genética e bioquímica) e em dois enfoques experimentais: *in vitro* e *in vivo*, em busca de uma análise mais completa de como este xenobiótico pode afetar o organismo modelo deste estudo.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar se a exposição a nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub> NP), em concentrações ambientalmente realistas para o estuário amazônico, promove respostas bioquímicas e moleculares em *Hyphessobrycon heterorhabdus*, utilizando abordagens experimentais *in vitro* e *in vivo*.

## 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar, *in vitro* em células da linhagem HHE derivada da nadadeira caudal de *H. heterorhabdus*, se a expressão de genes relacionados com a defesa antioxidante (*nrf2*, *gst*, *gsr*, *gclc*) e com o sequestro de metais (*mtf1*, *mt*) é alterada frente a exposição a diferentes concentrações de TiO<sub>2</sub> NP;
- Verificar, *in vivo*, se o sistema de defesa antioxidante (ACAP, GST, GSH, GCL, GR, Catalase) da espécie amazônica *H. heterorhabdus* é alterado em resposta a exposição a diferentes concentrações de TiO<sub>2</sub> NP;
- Analisar, *in vivo*, se a exposição a diferentes concentrações de TiO<sub>2</sub> NP induz danos oxidativos (lipoperoxidação) na espécie amazônica *H. heterorhabdus*.

## 3. Hipótese

A exposição de *H. heterorhabdus* às nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub> NP) em concentrações próximas às do titânio dissolvido encontrada no estuário amazônico não provocam alterações na expressão de genes relacionados ao sequestro de metais, tão pouco na expressão e atividade de enzimas relacionadas ao sistema de defesa antioxidante, não havendo a geração de danos oxidativos.

Tal hipótese é baseada na premissa de que o Titânio é um metal naturalmente encontrado nas águas amazônicas devido a formação geológica local (Schneider *et al.*, 2022). Desta forma, sendo a espécie modelo utilizada natural da região amazônica, a mesma já estaria fisiologicamente adaptada às concentrações testadas.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Análise da dispersão das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> NP

As análises de TiO<sub>2</sub> NP foram realizadas no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (NANOFARM) da Universidade Federal do Pará. Foi realizada a quantificação de distribuição do diâmetro hidrodinâmico de partícula e Índice de polidispersão (PDI).

Para preparar as dispersões estoque de TiO<sub>2</sub> NP foi utilizado óxido de Titânio (IV) rutilo (nanopó, tamanho da partícula <100 nm, 99.5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Uma dispersão de 17 mg / L de TiO<sub>2</sub> NP foi preparada dispersando as nanopartículas em água da osmose reversa reconstituída (Temperatura: 28 °C; pH: 7; Dureza: 0,5 mS), com sonicção (50 W / L, 40 kHz) por 30 min em um sonicador Lavadora Ultrassônica L100 Schuster tipo banho com 42.000 Hz de frequência. As concentrações de exposição utilizadas (0,2, 0,6 e 1 mg/L) foram preparadas por diluição da dispersão em estoque em água da osmose reversa reconstituída. Todas as dispersões foram sonicadas novamente por 30 minutos imediatamente antes da análise. Para a distribuição do diâmetro hidrodinâmico de partícula e PDI foram estimados usando o método de espalhamento dinâmico de luz (DLS) com um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK).

## **4.2. Teste *in vitro***

### **4.2.1. Viabilidade celular**

Células da linhagem HHE derivada de nadadeira caudal de *H. heterorhabdus* (Cardoso *et al.*, em preparação) foram semeadas em placas de 96 poços (5.000 células por poço). Foram adicionados 200 uL de meio DMEM/F12 suplementado com soro fetal bovino (10%) para permitir a proliferação celular por 48h. Após isso, o meio foi retirado e as células foram tratadas com meio de cultivo com diferentes concentrações de TiO<sub>2</sub> NP formando os seguintes grupos: controle (somente células e meio de cultivo), 0,2 mg/L, 0,6 mg/L e 1,0 mg/L de TiO<sub>2</sub> NP. A viabilidade celular foi avaliada após 24h, 48h e 72h de exposição pelo ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolína) (Moraes *et al.*, 2019). O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio) é um dos testes mais utilizados para avaliação da citotoxicidade *in vitro*. Ele avalia a atividade mitocondrial, onde somente células viáveis conseguem converter o sal amarelo MTT em cristais de formazan, de cor púrpura, essa produção de formazan é então quantificada através da leitura da densidade óptica das amostras (Stockert *et al.*, 2018). O ensaio tem ampla utilidade como um ensaio de atividade metabólica celular (Ghasemi *et al.*, 2021).

Após exposição, o meio de tratamento foi removido e 100 uL de meio contendo MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado em cada poço para conversão do MTT em formazan por desidrogenases presentes nas células viáveis durante 3h. Para diluição dos cristais de formazan, o meio com MTT

foi removido e 100 uL de dimetil-sulfóxido (DMSO) foram adicionados por poço. Após 1h, a leitura de absorbância foi realizada a 570 nm no espectrofotômetro Biochrom Asys Expert Plus. As intensidades da absorbância foram transformadas para porcentagem e a absorbância do grupo controle foi definida como 100%. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas técnicas e biológicas.

#### 4.2.2. Expressão gênica

Para avaliação dos níveis transcricionais foi realizada a técnica de transcrição reversa seguida de PCR quantitativa (RT-qPCR). RNA total foi extraído com o kit PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, 12183018A) seguindo as instruções do fabricante. A integridade do RNA (RIN – *RNA Integrity Number*) foi avaliada com o uso do espectrofotômetro NanoVue e gel de agarose 1%. O RNA foi tratado com DNase I (Thermo Fisher Scientific, EN0521) de acordo com as instruções do fabricante. DNA complementar (cDNA) foi sintetizado com uso do kit High Capacity (Thermo Fisher Scientific, 4368814) seguindo as instruções do fabricante. Iniciadores de PCR foram obtidos com base no genoma de *H. heterorhabdus* e estão disponíveis na Tabela 1. 1 microlitro de cDNA (4 ng/uL) foi amplificado usando-se o kit RealQ Plus 2x Master Mix Green, High ROX (Ampliqon, A323402) e 400 nM de cada primer em um volume final de 20 uL. As condições de ciclagem foram: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60° C por 1 minuto. Os níveis de expressão foram detectados no sistema Bio-Rad CFX Maestro. Os níveis transcricionais do gene *ef1a* foram usados como referência. A curva de dissociação foi avaliada para confirmação de amplificação específica. Os dados foram normalizados usando-se o programa Q-Gene (Muller *et al.*, 2002; Simon, 2003).

**Tabela 2.** Iniciadores de PCR usados no presente trabalho.

Gene	Identificação	Sequência
Elongation Factor 1 Alpha Subunit ( <i>ef1a</i> )	HHE_ef1a_F	ATCATCCTGAACCACCTG
	HHE_ef1a_R	ATGGCAGCATCACCAGAC

Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like ( <i>nrf2</i> )	HHE_nrf2_F	CCAATGAGCATCCATTCAGCAC
	HHE_nrf2_R	CTTCAAAAGCAGCAGGAGCAG
Glutathione S- Transferase P ( <i>gst</i> )	HHE_gst_F	GGGCGATGTGGTGCGAC
	HHE_gst_R	ACCTTTTCCTCCTTTCCACAC
Glutamate-Cysteine Ligase, Catalytic Subunit ( <i>gclc</i> )	HHE_gclc_F	AGGTGGAGTACATGCTGGT
	HHE_gclc_R	GGGTTGATCTTTTCGCCTTTTTC
Metal-Regulatory Transcription Factor 1 ( <i>Mtf1</i> )	HHE_mtf1_F	GGGAAGACATTTAACTGTGAATCAGA
	HHE_mtf1_R	TGACTAGCAGCAAAAGCCTTAC
Metallothionein-1 ( <i>mt</i> )	HHE_mt_F	ATGGATCCCTGTGACTGCG
	HHE_mt_R	CACACATCCAGAAGCACAC

---

### 4.3. Teste *in vivo*

#### 4.3.1. Coleta dos peixes, aclimação e manutenção dos organismos

A coleta dos peixes foi realizada em um riacho localizado no Parque Ecológico do Gunma, no município de Santa Bárbara, nordeste do estado do Pará, sob a licença de coleta SISBIO 63470-2. Para a coleta foi utilizada uma rede de mão, tamanho 55 cm com malha de 2 mm entre nós opostos com o esforço amostral de 15 minutos. Em seguida, os animais foram transportados em

recipientes com água do riacho até o Laboratório de Pesquisa e Monitoramento Ambiental Marinho (LAPMAR) da Universidade Federal do Pará para a aclimação.

Os peixes foram aclimatados durante dois meses em aquários com volume total de 36 litros (dimensões 35 cm x 30 cm x 35 cm) com água de osmose reversa reconstituída (Temperatura: 28 °C; pH: 7; Dureza: 0,5 mS), sistema de aeração constante e fotoperíodo 10hrs claro/14hrs escuro (Figura 3).

Foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial TetraMin para peixes tropicais. A cada sete dias foi realizada a limpeza dos aquários para a troca de 20 a 30% com água de osmose reversa reconstituída.

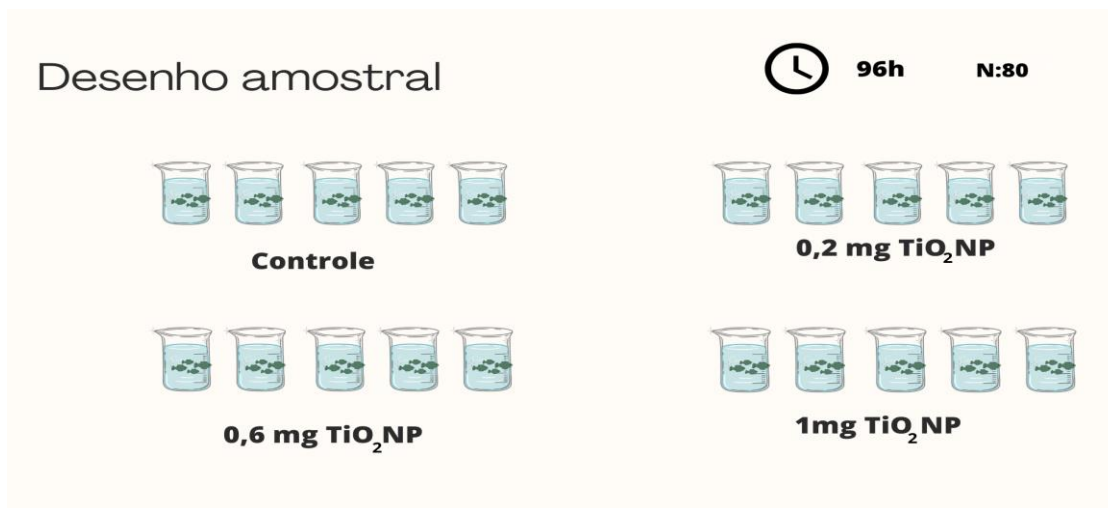


**Figura 3.** Aquários de cultivo de *H. heterorhabdus*. Fonte: Arquivo pessoal.

#### **4.3.2. Teste de toxicidade em peixes adultos de *H. heterorhabdus***

Os peixes, sem distinção de sexo, foram distribuídos em quatro tratamentos experimentais: controle; e três grupos de exposição às TiO<sub>2</sub> NP (0,2 mg/L, 0,6mg/L e 1 mg/L). Cada tratamento foi composto por cinco réplicas com quatro animais em cada béquer (volume total do béquer 1000 mL, volume dos tratamentos por béquer 800 mL), totalizando 80 espécimes. O experimento durou 96h, sendo a alimentação suspensa 24h antes do início do experimento, de acordo com as recomendações das normas de ensaio de toxicidade aguda com peixes da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (ABNT, 2011). Durante o experimento foi mantido o fotoperíodo 14C:10E e aeração constante, em água de osmose reversa reconstituída (Temperatura: 28 °C; pH: 7; Dureza: 0,5 mS) (Figura 4).





**Figura 4.** Desenho amostral da exposição de  $\text{TiO}_2\text{NP}$  em *H. heterorhabdus*.

Ao fim da exposição, os peixes foram crioanestesiados, foi aferido o comprimento total e peso ( $4,5 \pm 2,4$  cm e  $0,806 \pm 0,229$ g, respectivamente) (Figura 5) em tubos do tipo Falcon de 15 ml e armazenados em ultrafreezer a  $-80^\circ\text{C}$  para as análises bioquímicas. Devido ao pequeno tamanho dos animais, as análises bioquímicas foram conduzidas com todo o animal (pool de quatro organismos constituiu uma amostra).



**Figura 5.** Biometria do *H. heterorhabdus*. Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.4. Biomarcadores bioquímicos

Os biomarcadores de exposição analisados foram: Capacidade Antioxidante Total (ACAP), Glutaciona Redutase (GR), Atividade da Catalase (CAT), Concentração da Glutaciona Reduzida (GSH), Atividade da Glutamato Cisteína Ligase (GCL) e Atividade da Glutaciona-S Transferase (GST). Como biomarcador de efeito foi analisada a Lipoperoxidação (LPO) pelo método TBARS;

Para as análises foi utilizado um pool (4 organismos) de peixes inteiros (n =5 por grupo experimental). As amostras foram homogeneizadas em tampão (Tris HCl 100 mM, EDTA 2 mM, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 5 mM) em pH 8,0 numa proporção de 1:4 (peso: volume). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em homogeneizador do tipo Potter e centrifugadas a 20.000 x g, 4 °C, 20 min. Após a centrifugação, os pellets foram descartados e os sobrenadantes retirados, aliquotados e armazenados em ultra-freezer (-80 °C) para posterior análise.

##### 4.4.1. Determinação de proteínas totais

Para a análise de proteínas totais foi utilizado o kit comercial (Doles Ltda, Brazil) baseado no teste Biureto (citrato trissódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21M e sulfato de cobre 0,01M), as leituras foram realizadas em leitor de microplacas multimodal (Victor X3, Perkin Elmer) a 550 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de proteínas/mL.

##### 4.4.2. Determinação da capacidade antioxidante total (ACAP)

A capacidade antioxidante total foi realizada de acordo com o método de Amado *et al.* (2009). Este ensaio mostra a capacidade total da amostra (enzimática e não enzimática) de capturar os radicais peroxil. O princípio deste método é que amostras com maior capacidade antioxidante terão maior interceptação de radicais peroxil. Os radicais peroxil são produzidos por termólise (37°C) do reagente 2'2'-azobis-2- metilpropilamida dihidroclorato (ABAP, 4mM; Sigma-Aldrich) (Winston *et al.*, 1998). As leituras (em triplicata) foram realizadas em leitora de microplaca de fluorescência (485 e 530 para excitação e emissão respectivamente) durante uma hora (Victor X3, Perkin Elmer, USA). O incremento de fluorescência de cada amostra ao longo de uma hora de leitura será plotado e a área sob a reta formada será calculada. A diferença relativa entre as áreas com e sem ABAP foram consideradas como medida da capacidade antioxidante total, onde a maior área significa uma menor capacidade antioxidante, uma vez que uma alta fluorescência foi obtida após adição de ABAP, indicando baixa competência para neutralizar radicais peroxil (Amado *et al.*, 2009). A capacidade antioxidante total foi expressa pelo inverso da área relativa.

#### 4.4.3. Atividade da catalase (CAT)

Foi determinada de acordo com o protocolo de Bainy *et al.* (1996). A diminuição na absorvância foi registrada durante 60 segundos em cubeta contendo uma solução recém preparada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e amostra. A reação foi iniciada com a adição da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a leitura realizada em espectrofotômetro a 240 nm a 30°C. Para que as leituras estivessem dentro de valores corretos de absorvância, as amostras foram diluídas em tampão de homogeneização. Os valores de CAT foram expressos em Unidades de Bergmeyer (U.B.) por miligrama de proteína.

#### 4.4.4. Atividade da Glutathiona Redutase (GR)

A atividade da glutathiona redutase (GR) foi baseada no protocolo descrito por Nagalakshimi e Prasad (2001). O tampão utilizado foi de fosfato de sódio (200 mM [pH 7,4]), glutathiona oxidada (GSSG, 1 mM), e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (0,1 mM) e depois monitorou a diminuição de NADPH absorvância a 340 nm.

#### 4.4.5. Atividade da Glutamato Cisteína Ligase (GCL) e concentração da Glutathiona Reduzida (GSH)

Para a medida de GCL e GSH foi utilizado o protocolo do trabalho de White *et al.* (2003). As leituras foram realizadas em um espectrofluorímetro (Víctor 2, Perkin Elmer) com leitor de placas (472 para excitação e 528 para emissão). Os resultados foram expressos em nmol de GSH e atividade da GCL (nmol/min/mg de proteína).

#### 4.4.6. Atividade da Glutathiona-S Transferase (GST)

O protocolo utilizado para a análise da GST foi baseado no trabalho de Habig e Jakoby (1981), no qual avalia a conjugação da Glutathiona reduzida (GSH, 1 μM) com o substrato 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB, 1 μM), processo catalisado pela enzima GST presente na amostra. As leituras foram realizadas em espectrofluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer) com leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em UGST/mg de proteína que representa a quantidade necessária da enzima para conjugar 1 μMol de CDNB (1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno) /min/mg de proteína, a 25 °C e pH 7,0.

#### 4.4.7. Lipoperoxidação (LPO)

A Lipoperoxidação foi baseada no método fluorimétrico para detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Oakes and Kraak (2003). Este método quantifica um subproduto da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA). No ensaio, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA, 0.8%) em meio ácido (ácido acético 20%) a uma temperatura de 95°C, formando o complexo MDA-TBA<sub>2</sub>, que é detectado pelo fluorímetro utilizando comprimentos de ondas de 515 e 553 nm para emissão e excitação, respectivamente. O hidroxitolueno butilado (BHT) foi utilizado como antioxidante para as amostras e 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como padrão. O Dodecilsulfato de Sódio (SDS, 8.1%) foi utilizado como surfactante e o n-Butanol para separar a fase orgânica da inorgânica. Os resultados foram expressos em nmol MDA/g de tecido úmido.

#### 4.5. Análise Estatística

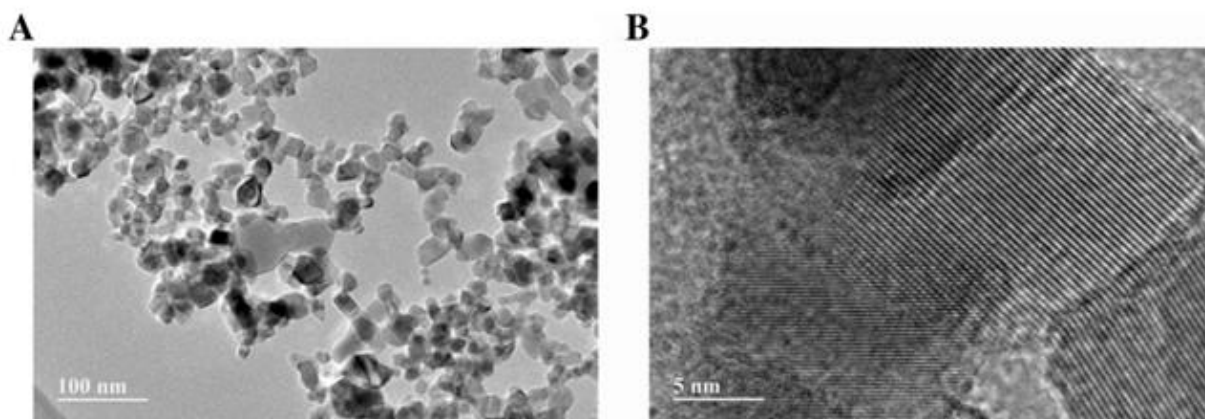
Os pressupostos de normalidade e a homogeneidade dos dados foram testados com os testes Shapiro-Wilks e Levene, respectivamente. A análise de variância (ANOVA - one way) com teste post-hoc de Tukey foram utilizados para verificar diferenças significativas entre os tratamentos para biomarcadores, comprimento total (cm) e peso (g) dos peixes analisados. Para os dados não paramétricos, as análises foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Para comparação entre os grupos do ensaio MTT, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Para comparação dos grupos da expressão dos genes foi aplicado o teste ANOVA. Em ambos os casos, o nível de significância adotado foi de 5%.

### 5. Resultados

#### 5.1. Caracterização e dinâmica das TiO<sub>2</sub> NP em suspensão

Foram utilizados o diâmetro hidrodinâmico (Dh) e índice de polidispersão (PdI) para avaliar o tamanho que as nanopartículas estavam para aplicação. As análises do DLS mostraram que a TiO<sub>2</sub> NP teve um Dh menor (115,9 nm) na água Milli-Q em comparação com a água da osmose reversa (165,94 nm). O PdI é polidisperso, visto que os agregados são diferentes (PdI=0,467 em água da osmose reversa reconstituída e PdI= 0,564 em água Milli-Q).

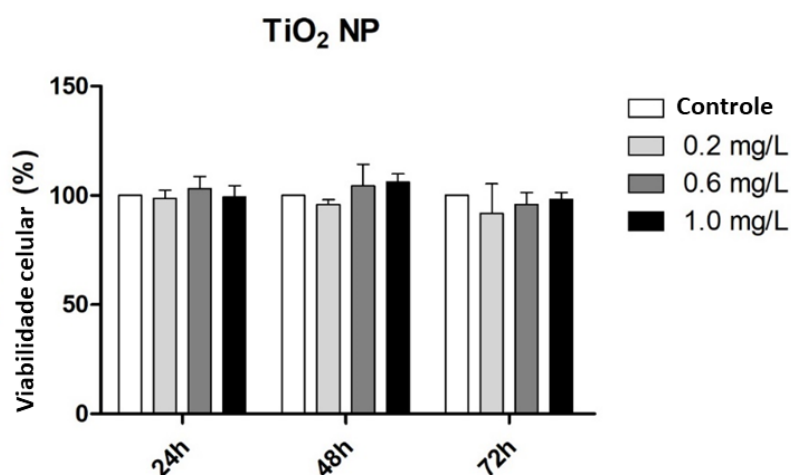
O MET revelou que a TiO<sub>2</sub> NP é esférica, com diâmetro médio de 23,61±2,4 nm (Figura 6 de Amaral *et al.* 2022).



**Figura 6.** A e B Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da  $\text{TiO}_2$  NP (Amaral *et al.*, 2022).

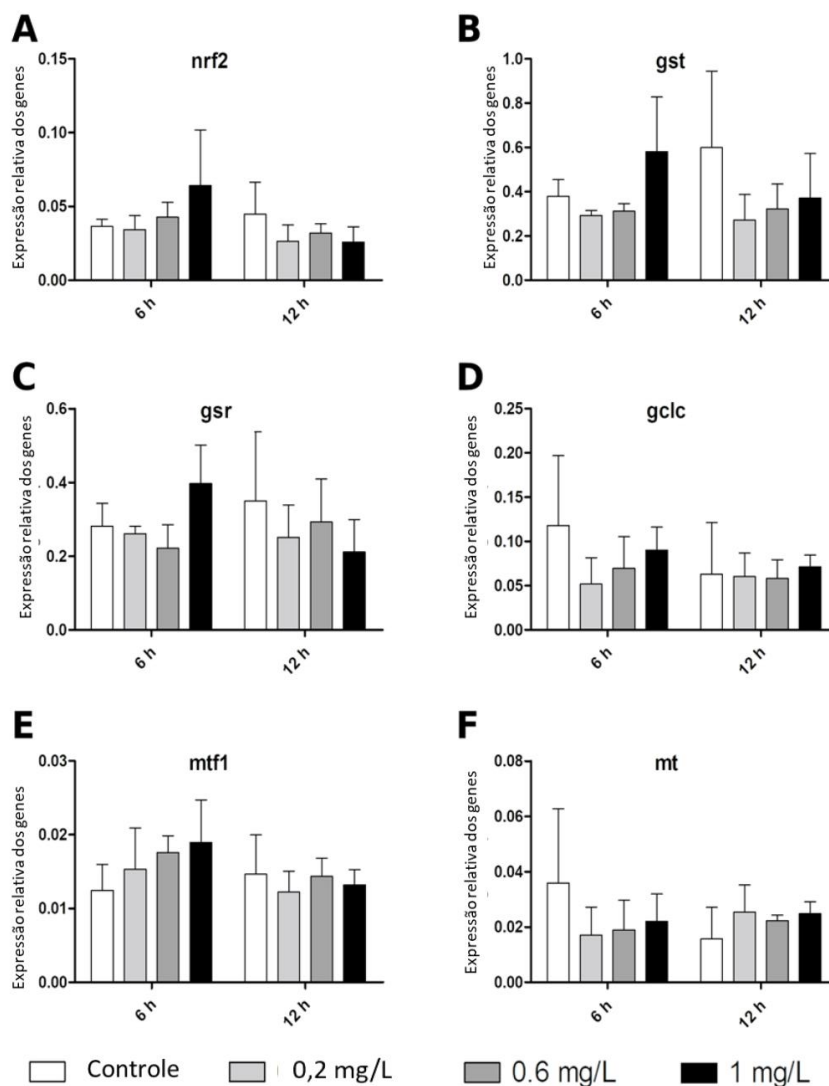
## 5.2. Teste *in vitro*

Para o teste *in vitro*, verificamos que nenhuma das concentrações testadas interferiu na viabilidade celular que permaneceu próxima a 100% em todos os tratamentos ao longo das 72h de exposição (Figura 7).



**Figura 7.** Taxas de sobrevivência da linhagem HHE tratada com  $\text{TiO}_2$  NP em diferentes concentrações e tempos obtidas pelo ensaio MTT.

A expressão gênica tanto dos genes relacionados com a defesa antioxidante (*gst*, *gsr*, *gclc*) quanto com o sequestro de metais (*mtf1*, *mt*) também não apresentou diferenças significativas nem entre os tratamentos nem nos diferentes tempos de exposição (6 e 12h) (Figura 8).



**Figura 8.** Expressão relativa dos genes relacionados com o sistema de defesa antioxidante (*nrf2*, *gsr*, *gclc*, *gst*) e sequestro de metais (*mtf1* e *mt*) em células da linhagem HHEcf tratadas com TiO<sub>2</sub> NP obtida por RT-qPCR. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

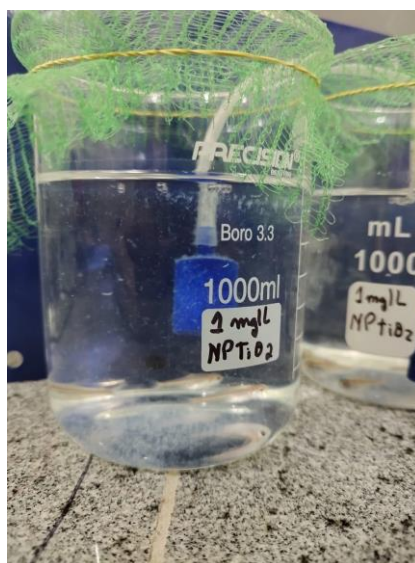
### 5.3. Teste *in vivo*

Dos 80 peixes usados no experimento, não foi verificada diferença entre o comprimento total e o peso médio dos animais nos diferentes tratamentos (Tabela 3), sendo  $p = 0,365$  para o comprimento médio e  $p = 0,179$  para o peso médio.

**Tabela 3.** Parâmetros de comprimento e peso corporal dos espécimes *H. heterorhabdus* nos diferentes tratamentos: controle, 0,2 mg/L, 0,6 mg/L e 1 mg/L de TiO<sub>2</sub> NP (n=78).

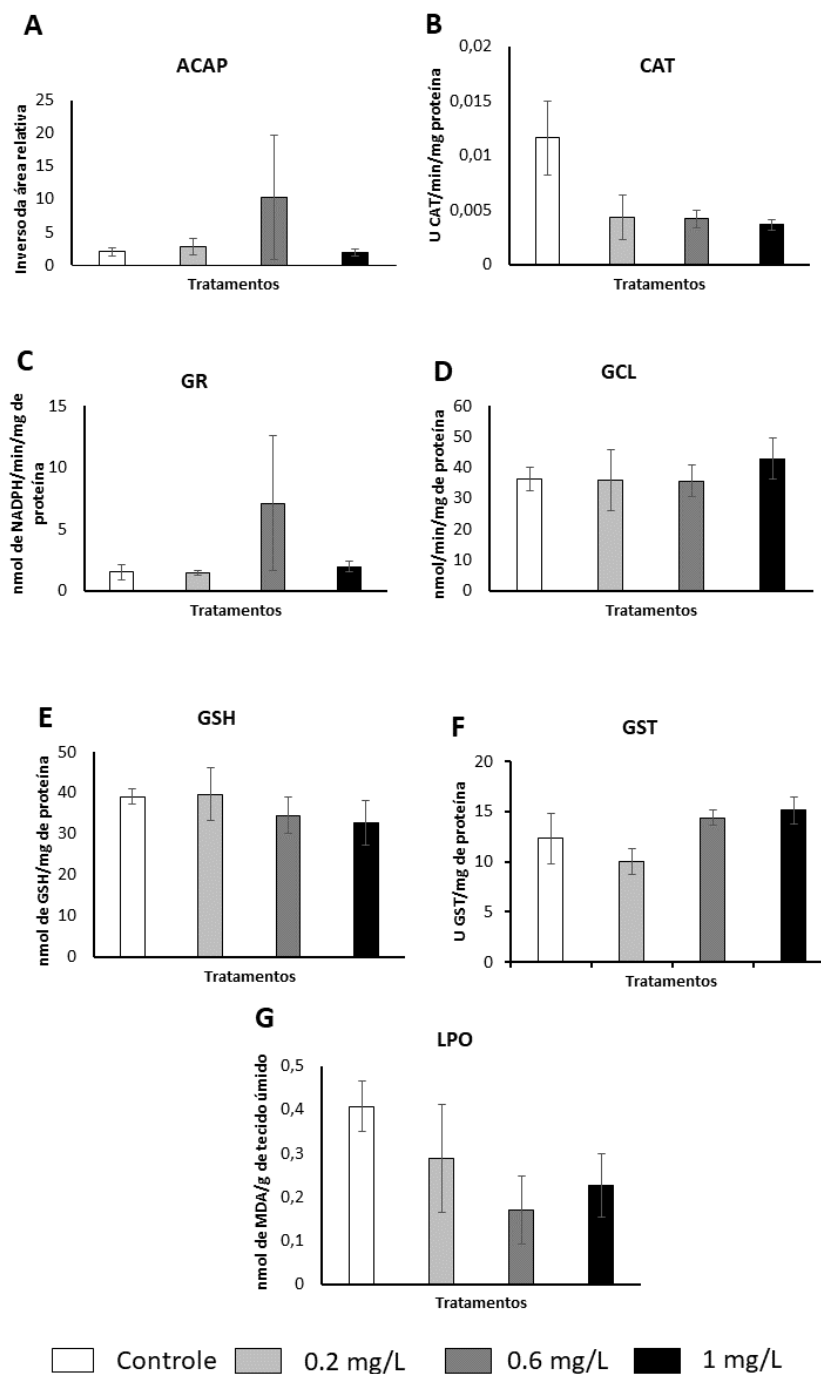
Tratamento	n	CT (mm)				Peso (g)			
		Mín	Máx	Méd	SD	Mín	Máx	Méd	SD
Controle	19	2,5	3,5	2,89	0,26	0,229	0,492	0,36	0,07
0,2 mg/L	20	2,4	3,6	2,97	0,38	0,266	0,778	0,43	0,15
0,6 mg/L	19	2,5	4,5	3,12	0,44	0,318	0,806	0,49	0,13
1 mg/L	20	2,6	3,7	3,05	0,28	0,316	0,699	0,45	0,12

Duas mortes foram registradas antes das 24h de experimento, uma no grupo controle e na concentração 0,6 de TiO<sub>2</sub> NP. Foi possível observar partículas esbranquiçadas dispersas na água e agregado nas pedras porosas nos grupos de maior concentração (1 mg/L de TiO<sub>2</sub> NP) antes das 48h (Figura 9).



**Figura 9.** Becker com peixes no tratamento de 1 mg/L de TiO<sub>2</sub> NP; Início do acúmulo de partículas esbranquiçadas.

Também não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos no estudo *in vivo*. As atividades da GST, GR, CAT, GCL, a concentração de GSH e a capacidade antioxidante total, não apresentaram diferença significativa entre grupos experimentais dentro das 96h de exposição ao TiO<sub>2</sub> NP. Da mesma forma, não foram registradas diferenças no conteúdo de lipídeos peroxidados ao longo das concentrações testadas (Figura 10).



**Figura 10.** Biomarcadores de estresse oxidativo em *H. heterorhabdus*. (A): capacidade antioxidante total; (B): Atividade da catalase; (C): atividade da glutatona redutase; (D): atividade da glutamato cisteína ligase; (E): concentração de glutatona reduzida; (F): Atividade da Glutatona-s-transferase; (G): lipoperoxidação. Valores expressos em média e erro padrão ( $p < 0.05$ ). (n=5).



## 6. Discussão

Este é o primeiro estudo que proporciona informações de duas abordagens distintas, *in vivo* e *in vitro*, para verificar alterações às respostas de biomarcadores bioquímicos e a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, na espécie de peixe nativa *H. heterorhabdus* frente a exposição a TiO<sub>2</sub>NP, em concentrações ambientalmente realistas para ambientes aquáticos amazônicos. Para o estudo *in vitro*, a análise foi realizada em células da linhagem HHE derivada de nadadeira caudal de *H. heterorhabdus*, e para o estudo *in vivo*, foi utilizado o peixe inteiro fornecendo desta forma um panorama geral da resposta desta espécie frente ao xenobiótico em estudo. De forma geral, foi verificado que as concentrações ambientalmente relevantes não afetam a expressão e nem as atividades das enzimas antioxidantes, tão pouco induziram lipoperoxidação. Desta forma, não houve a geração de estresse oxidativo nos peixes dessa espécie.

A ausência de efeitos observados no estudo *in vitro* pode estar relacionada à possibilidade de ter havido agregação de partículas, o que tornaria o TiO<sub>2</sub> NP menos biodisponível. Nas condições ótimas de sonicação, o tamanho da partícula era de ~115,9 nm, um diâmetro hidrodinâmico maior foi observado na água da osmose reversa reconstituída, isso sugere que a amostra de TiO<sub>2</sub> NP consiste em alguns agregados duros que não são facilmente quebrados por ultrassom. Quando suspensas em meio de cultura celular sem nenhum agente dispersante, as TiO<sub>2</sub> NP apresentam pouca dispersão (Ji *et al.*, 2010), e tendem a interagir com os componentes do presente meio de cultura celular antes de qualquer contato celular (Cho *et al.*, 2011). A agregação de NP pode alterar a absorção celular e o perfil de toxicidade das partículas (Ji *et al.*, 2010).

Ji *et al.* (2010) relataram que a TiO<sub>2</sub> NP aumentou seu Dh na presença de meio de cultura celular sem soro, no entanto, a adição de soro fetal bovino (FBS) demonstrou estabilizar as NPs, pois houve pouca alteração no tamanho após a adição de proteínas. Outro trabalho com TiO<sub>2</sub> NP caracterizou em H<sub>2</sub>O, Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) sem soro, RPMI suplementado com 10% de FBS e RPMI suplementado com 1% de albumina sérica bovina (BSA), em geral, NPs que tinham potencial zeta negativo em H<sub>2</sub>O tendiam a formar agregados maiores em meios com 10% de FBS em comparação com RPMI não suplementado ou RPMI com 1% de BSA. Por outro lado, NPs que tinham um potencial zeta positivo em H<sub>2</sub>O tenderam a formar grandes agregados em RPMI não suplementado, e então foram estabilizados pela presença de FBS ou BSA, aqui, a adição de proteínas séricas no meio de cultura celular demonstrou diminuir a agregação em certas situações, provavelmente devido à adsorção de proteínas (Cohen *et al.*, 2014).

Já no experimento *in vivo* o meio de exposição (água da osmose reversa reconstituída), a TiO<sub>2</sub> NP formou agregados devido à ausência de agentes estabilizantes. Nesse ambiente complexo, a agregação de NP é um fenômeno comum, a agregação refere-se à aderência interparticular geralmente irreversível, que leva à formação de aglomerados grandes e de formato irregular (Meakin, 1984; Nichols *et al.*, 2002). A agregação de NP pode levar a resultados inconclusivos e impede experimentos reprodutibilidade alterando a absorção celular e o perfil de toxicidade das partículas (Limbach *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2010).

No experimento *in vivo*, foi verificado que não houve alterações no mecanismo de defesas antioxidantes, visto que os biomarcadores de exposição (ACAP, GCL, GSH, GR e GST) não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. De fato, no estudo *in vivo* o tempo de exposição foi de 96h, um período que, de acordo com nossos resultados de expressão no estudo *in vitro*, já haveria ocorrido uma estabilização das expressões gênicas e, por consequência das reposições de estoques proteicos para lidar com as concentrações testadas. No estudo de Nascimento (2022) que analisou o peixe inteiro, *H. heterorhabdus*, em 1mg/L de Alumínio, elemento extremamente abundante na Amazônia, assim como o Ti (Cantanhede *et al.*, 2021; Schneider *et al.*, 2022) também não foi observado diferenças entre os tratamentos para GST e GSH. Como Al e Ti são elementos majoritários na composição geológica local, é possível que as espécies residentes já tenham mecanismos adaptativos para lidar com as concentrações testadas.

O intuito do presente estudo era demonstrar como a defesa antioxidante de uma espécie abundante nos riachos amazônicos, reage a uma concentração ambientalmente realista de Ti dissolvido, com isso as poucas respostas dos biomarcadores, sugerem que o peixe já possui um aparato antioxidante adaptado para estas concentrações. Outras espécies de peixes amazônicos, como *Cheirocerus goeldii* e *Bryconops caudomaculatus* demonstraram estar adaptadas às condições únicas de concentração de Al, pois nos biomarcadores analisados (ACAP, GST e LPO) não houve a indução de defesas antioxidantes e danos oxidativos (Santos *et al.*, 2023; Cantanhede *et al.*, 2021).

Em estudos realizados com o *D. rerio*, utilizando a mesma concentração de 0,1 mg/L de TiO<sub>2</sub> NP, observaram redução no número cumulativo de ovos, mudança na natação das larvas, alterações nos níveis de GSH e não aumenta a peroxidação lipídica e o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hu *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2021; Faria *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2015). Além disso, o estágio de desenvolvimento avaliado nesses estudos, foi embriolarval, sendo assim, mais sensível à exposição de xenobióticos (Gu *et al.*, 2020). Já em concentrações próximas (10 µg/L; 200 µg/L e 400 µg/L) das testadas no presente estudo e com adultos de *D. rerio*, os estudos

observaram efeitos genotóxicos, provocando danos ao DNA e prejudicando a viabilidade celular, e estresse oxidativo (CAT/SOD) (Mottola *et al.*, 2022; Cunha e Brito-Gitirana, 2020). Estes estudos não testaram concentrações ambientalmente realistas de suas regiões, o *D. rerio* é um peixe nativo dos córregos da região sudeste do Himalaia (Chakraborty *et al.*, 2016), e demonstrou ser sensível às concentrações testadas, diferente da espécie nativa da região, *H. heterorhabdus*.

Nos demais estudos que avaliaram ecotoxicidade da TiO<sub>2</sub> NP, com diferentes espécies de peixes adultos (*Wallago attu*, *Trachinotus carolinus*, *Rhamdia quelen* e *Oncorhynchus mykiss*), utilizando órgãos específicos (células branquiais, sangue, estômago e intestino) em diferentes concentrações (50 mg/L, 1,5, 3,0 µg/L; 0,05, 0,5, 5mg/L; 3,1–50,2 µg L<sup>-1</sup>) foi possível observar que essas concentrações causaram desde efeitos genotóxicos, como danos ao DNA e formação de micronúcleo, estresse oxidativo (ERO/ SOD/ GST/CAT/ ACAP/GSH/ LPO) a sequestro de metais (MTs), nas espécies analisadas (Dubey *et al.*, 2015; Vignardi *et al.*, 2015; Oya-Silva *et al.*, 2021; Zeumer *et al.*, 2020).

No presente estudo, a ausência de efeito visualizado na concentração de 1 mg/L supõe que esta concentração não é suficiente para diminuir as respostas antioxidantes a ponto de causar danos nos lipídios da membrana das células. Sugere-se que os elevados valores observados para a enzima GST e para a concentração da GSH em todos os grupos possam ter favorecido a proteção aos peixes expostos, as respostas são associadas ao tempo de exposição, à concentração do estressante e depende das diferentes espécies de peixes analisadas. A Glutathione ajuda detoxificação dos xenobióticos, fornecendo assim à proteção das membranas celulares de processos envolvidos com o dano oxidativo além disso, permite a manutenção dos grupos sulfidrílicos de várias proteínas no seu formato reduzido, mantendo desta forma a sua função normal (Kang *et al.*, 2021; Da *et al.*, 2022). Já a GST está envolvida no transporte de compostos reativos que exercem funções antioxidantes indiretas nas células, facilitando a eliminação de subprodutos derivados do processo oxidativo (Prohaska, 1980). Além disso, o fato da espécie utilizada no estudo já viver naturalmente exposta as concentrações semelhantes à concentração de TiO<sub>2</sub> dissolvido em estuários Amazônicos, com concentração de 0,13 mg/L no rio Pará e 0,212 mg/L no rio Amazonas (Schneider *et al.*, 2022), pode ter provocado um desenvolvimento nas adaptações fisiológicas, resultando em uma tolerância à toxicidade do metal.

Não foi observada mortalidade dentro das 96h de experimento, porém foi possível observar partículas esbranquiçadas dispersas na água e que foram agregadas nas pedras porosas nos grupos de maior concentração (1 mg/L de TiO<sub>2</sub> NP) antes das 48h, o que pode ter contribuído para diminuir a quantidade de TiO<sub>2</sub> NP biodisponível pelo favorecimento da agregação das partículas. E, de fato, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos expostos em relação ao

biomarcador de efeito (Lipoperoxidação). O mesmo ocorreu com outra espécie de peixe amazônica, *B. caudomaculatus*, no qual, não houve diferença significativa de LPO no fígado, brânquias e músculos em uma exposição às concentrações de 0,3 e 3 mg/L de Al (também ambientalmente realistas) por 48h (Cantanhede *et al.*, 2022). Um outro estudo realizado em um igarapé exposto ao chorume da lixeira pública de Santarém no estado do Pará avaliou os efeitos genotóxicos (técnicas do micronúcleo, anormalidades nucleares eritrocitárias e ensaio cometa) das células sanguíneas e uma análise histopatológica dos danos teciduais de brânquias e fígado em peixes da espécie *H. heterorhabdus* e verificou que os biomarcadores de genotoxicidade não tiveram variação significativa entre os grupos expostos (Pereira, 2019). Ambas as espécies *B. caudomaculatus* e *H. heterorhabdus* são encontradas em riachos, lagos e rios, com uma dieta insetívora e onívora (Silva *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2014). De acordo com o presente estudo pode ser sugerido que os peixes residentes na Amazônia podem estar adaptados fisiologicamente a terem uma maior proteção contra os fatores que possibilitem o aumento de pró-oxidantes permitindo desta forma uma maior tolerância à toxicidade de químicos ambientais biodisponíveis.

### **Considerações Finais**

De forma geral, foi verificado que as concentrações ambientalmente realistas testadas de TiO<sub>2</sub> NP neste estudo não afetaram a expressão e as atividades das enzimas antioxidantes, tão pouco ocasionaram incremento nos danos oxidativos a lipídios em *H. heterorhabdus* em nenhuma das formas de estudo empregadas (*in vitro* e *in vivo*) e em nenhum nível de análise utilizados (bioquímico e molecular). Tais resultados podem sugerir uma adaptação para essas concentrações, pois se trata de um peixe nativo da região amazônica, que naturalmente tem o potencial de ser exposto a concentrações de Ti nos níveis testados. No entanto, novos testes empregando outros tipos celulares para o estudo *in vitro*, a análise órgão específica nos estudos *in vivo*, bem como maiores tempos de exposição em ambas as abordagens são recomendados para a verificação do nível de tolerância da espécie nativa ao dióxido de titânio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, R. P., Kida, B. M. S., Pinheiro, J. P. S., Oliveira, L. F., Martinez, C. B. F., Moreira, R. G., 2019. Exposure to aluminum, aluminum + manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes: Characidae) males. *Comp. Biochem. Physiol. C - Toxicol. Pharmacol.* 215, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.09.004>
- Albuquerque, F. E. A., Minervino, A. H. H., Miranda, M., Herrero-Latorre, C., Júnior, R. A. B., Oliveira, F. L. C., Dias, S. R., Ortolani, E. L., López-Alonso, M. 2019. Toxic and essential trace element concentrations in the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* in the Lower Amazon, Brazil, **Journal of Food Composition and Analysis**, Volume 86, 2020, 103361, ISSN 0889-1575, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103361>.
- Atif, F., Kaur, M., Yousuf, S., and Raisuddin, S. 2006. *In vitro* free radical scavenging activity of hepatic metallothionein induced in an Indian freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-Biological Interactions** 162, 172-180. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.012>
- Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, R. J. L., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxyl radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **Sci. Total Environ.** 407, 2115–2123. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>
- Angélica, R. S., Kahn, H., Paz, S. P. A. 2018. A proposal for bauxite quality control using the combined Rietveld - Le Bail - Internal Standard PXRD method – Part 2: Application to a gibbsitic bauxite from the Paragominas region, northern Brazil, **Minerals Engineering**, Volume 122, Pages 148-155, ISSN 0892-6875, <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2018.03.039>.
- Bar-Ilan, O., Chuang, C. C., Schwahn, Denise J., Yang, S., Joshi, S., Pedersen, J. A., Hamers, R. J., Peterson, R. E., Heideman, W. 2013. TiO<sub>2</sub> Nanoparticle Exposure and Illumination during Zebrafish Development: Mortality at Parts per Billion Concentrations. **Environmental Science & Technology**, 47(9), 4726–4733. doi:10.1021/es304514r
- Bainy, A. C. D., Saito E., Carvalho., P. S. M., Junqueira, V. B. C. 1996. Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology** 34:151-162.
- Besha, A. T., Liu, Y. Fang, C., Bekele, D. N., Naidu. R., 2020. Assessing the interactions between micropollutants and nanoparticles in engineered and natural aquatic environments. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology** 50:2, pages 135-215. <https://doi.org/10.1080/15422119.2016.1260588>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, 5(1), 9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
- Biola-Clier M, Gaillard JC, Rabilloud T, Armengaud J, Carriere, M. 2020. Titanium dioxide nanoparticles alter the cellular phosphoproteome in A549 cells. **Nanomaterials** 10(2):185. <https://doi.org/10.3390/nano10020185>

Bittarello, A. C., Vieira, J. C. S., Braga, C. P., Araújo, W. L. P., Bataglioli, I. C., da Silva, J. M., Buzalaf, M. A. R., Fleuri, L. F., Padilha, P. M. 2019. Characterization of molecular biomarkers of mercury exposure to muscle tissue of *Plagioscion squamosissimus* and *Colossoma macropomum* from the Amazon region. **Food Chemistry**, 276(), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.002>

Bonaventura, G., La Cognata, V., Iemmolo, R., Zimbone, M., Contino, A., Maccarrone, G., Failla, B., Barcellona, M. L., Conforti, F. L., D'Agata, V., Cavallaro, S., 2018. Ag-NPs induce apoptosis, mitochondrial damages and MT3/OSGIN 2 expression changes in an in vitro model of human dental-pulp-stem-cells-derived neurons. **Neuro Toxicology**, 67(), 84–93. doi:10.1016/j.neuro.2018.04.014

Bols, N. C., Dayeh, V. R., Lee, L. E. J., Schirmer, K. 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish: Piscine cell lines in environmental toxicology. In TP Mommsen, TW Moon, eds, **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, Vol 6. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp 43– 84.

Bergamonti, L., Alfieri, I., Franzo, M., Lorenzi, A., Montenero, A., Predieri, G. 2014. Synthesis and characterization of nanocrystalline TiO<sub>2</sub> with application as photoactive coating on stones. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.** 21, 13264–13277.

Beg, M.U., Al-Jandal, N., Al-Subiai, S., Karam, Q. , Husain, S., Butt, S.A., Ali, A., Al-Hasan, E., Al-Dufaileej, S., Al-Husaini, M. 2015. Metallothionein, oxidative stress and trace metals in gills and liver of demersal and pelagic fish species from Kuwait's marine area, **Marine Pollution Bulletin**, Volume 100, Issue 2, Pages 662-672, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.058>.

Canedo, A., Saiki, P., Santos, A. L., Carneiro, K. da S., Souza, A. M. de ., Qualhato, G., Brito, R. da S., Mello-Andrade, F., Rocha, T. L. 2022. Zebrafish (*Danio rerio*) meets bioethics: the 10Rs ethical principles in research. **Ciência Animal Brasileira**, 23, e-70884. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-70884>

Cantanhede, S. M., Carvalho, I. S. C., Hamoy, M., Corrêa, J. A. M., Carvalho, L. M., Barbas, L. A. L., Montag, L. F. A., Amado, L. L. 2021. Evaluation of cardiotoxicity in Amazonian fish *Bryconops caudomaculatus* by acute exposure to aluminium in an acidic environment, **Aquatic Toxicology**, Volume 242, 106044, ISSN 0166-445X, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106044>.

Clemente, Z., Castro, V.L., Jonsson, C.M., Fraceto, L.F., 2012. Ecotoxicology of nano-TiO<sub>2</sub>—an evaluation of its toxicity to organisms of aquatic ecosystems. **Int J Environ Res** 6(1): 33–50. <https://doi.org/10.22059/ijer.2011.470>.

Chakraborty, C., Sharma, A., R., Sharma, G., Lee, S. 2016. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. **Journal of Nanobiotechnology**, 14(1), 65–. doi:10.1186/s12951-016-0217-6

Chen, J., Lei, L., Mo, W., Dong, H., Li, J., Bai, C., Huang, K., Truong, L., Tanguay, R. L., Dong, Q., Huang, C. 2021. Developmental titanium dioxide nanoparticle exposure induces oxidative stress and neurobehavioral changes in zebrafish, **Aquatic Toxicology**, Volume 240. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105990>.

Chen, J., Dong, X., Xin, Y., Zhao, M., 2011. Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. **Aquat. Toxicol.** 101, 493–499.

Chen, G., Lv, W., Xu, Y., Wei, X., Xu, X., Luo, Z. 2020. Functional analysis of MTF-1 and MT promoters and their transcriptional response to zinc (Zn) and copper (Cu) in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*, **Chemosphere**, Volume 246. ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125792>

Clemente, Z., Castro, V.L.S.S., Moura, M.A.M., Jonsson, C.M., Fraceto, L.F. 2014. Toxicity Assessment Of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles In Zebrafish Embryos Under Different Exposure Conditions, **Aquatic Toxicology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.024>

Chileshe, M.N., Syampungani, S., Festin, E.S., Tigabu, M., Daneshvar, A., Od'én, P.C., 2020. Physico-chemical characteristics and heavy metal concentrations of copper mine wastes in Zambia: implications for pollution risk and restoration. **J. Res.** 31, 1283–1293. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-00921-0>.

Covre, W. P., Ramos, S. J., Pereira, W. V. da S., Souza, E. S. de, Martins, G. C., Teixeira, O. M. M., Amarante, C. B., Dias, Y. N., Fernandes, A. R. 2021. Impact of copper mining wastes in the Amazon: Properties and risks to environment and human health. **Journal of Hazardous Materials**, 126688. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.126688

Cho, E. C., Zhang, Q., & Xia, Y. 2011. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. **Nature nanotechnology**, 6(6), 385–391. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.58>

Cohen, J.M., Teeguarden, J.G. & Demokritou, P. 2014. An integrated approach for the in vitro dosimetry of engineered nanomaterials. **Part Fibre Toxicol** 11, 20. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-20>

Chen, J., Lei, L., Mo, W., Dong, H., Li, J., Bai, C., Huang, K., Truong, L., Tanguay, R. L., Dong, Q., Huang, C. 2021. Developmental titanium dioxide nanoparticle exposure induces oxidative stress and neurobehavioral changes in zebrafish, **Aquatic Toxicology**, Volume 240, 105990, ISSN 0166-445X, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105990>.

da Cunha, R. L. D., de Brito-Gitirana, L. 2020. Effects of titanium dioxide nanoparticles on the intestine, liver, and kidney of *Danio rerio*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Volume 203, 111032, ISSN 0147-6513, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111032>.

Da, D., Pan, Z., Zeng, L., Dang, Y., Dang, C., Huang, Y., Shi, D., & Li, H. 2023. Glutamate-cysteine ligase catalytic and its modifier function as novel immunotargets in gastric adenocarcinoma. **Asian journal of surgery**, 46(1), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2022.02.005>

Días, L., Zambrano, E., Flores, M. E., Contreras, M., Crispin, J. C., Alemán, G., Bravo, C., Armenta, A., Valdés, V. J., Tovar, A., Gamba, G., Barrios-Payán, J., Bobadilla, N. A. 2021. Ethical considerations in animal research: The principle of 3R's. **Revista de investigación clínica**; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion. 73(4):199-209. doi:10.24875/ric.20000380

Díaz, A., B., M., Ortíz, H., O., Maldonado, A., J., Pliego, G., C., Morales, S., G., Mendoza, A., B. 2017. Application of nanoelements in plant nutrition and its impact in ecosystems. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, 8(1), 013001–. doi:10.1088/2043-6254/8/1/013001

Diniz, M., S., de Matos, A., P., A., Lourenço, J., Castro, L., Peres, I., Mendonça, E., Picado, A., 2013. Liver Alterations in Two Freshwater Fish Species (*Carassius auratus* and *Danio rerio*) Following Exposure to Different TiO<sub>2</sub> Nanoparticle Concentrations. **Microscopy and Microanalysis**, 19(5), 1131–1140. doi:10.1017/S1431927613013238

Donahue, N. D., Acar, H., Wilhelm, S. 2019. Concepts of nanoparticle cellularuptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. **Advanced DrugDelivery Reviews**, 143, 68–96. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008>

Amaral, D.F., Guerra, V., Almeida, K.L. Signorelli, L. Rocha, T. L., Silva, D. M. 2022. Titanium dioxide nanoparticles as a risk factor for the health of Neotropical tadpoles: a case study of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). **Environ Sci Pollut Res** 29, 50515–50529. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19098-x>

Demin, K.A. Meshalkina, D. A. Volgin, A. D. Yakovlev, O.V. Abreu, M., S. Alekseeva, P., A. Friend, A.J. Lakstygai, A. M. Tamara G. K., Strekalova, Z. A., T. Bao, W. Kalueff, A.V. 2019. Developing zebrafish experimental animal models relevant to schizophrenia, **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Volume 105, Pages 126-133, ISSN 0149-7634, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.07.017>.

Dubey, A., Goswami, M., Yadav, K., Chaudhary, D. 2015. Oxidative Stress and Nano-Toxicity Induced by TiO<sub>2</sub> and ZnO on WAG Cell Line. **PLOS ONE** 10(5): e0127493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127493>

Dwivedi, A. D., Dubey, S. P., Sillanpää, M., Kwon, Y., Lee, C., Varma, R. S. 2015. Fate of engineered nanoparticles: Implications in the environment, **Coordination Chemistry Reviews**, Volume 287, Pages 64-78, ISSN 0010-8545, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.12.014>.

Faria, M., Navas, J. M., Soares, A. M. V. M., Barata, C. 2014. Oxidative stress effects of titanium dioxide nanoparticle aggregates in zebrafish embryos, **Science of The Total Environment**, Volumes 470–471, Pages 379-389, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.055>.

Faria, T. C., Guimarães, K. L. A., Rodrigues, L. R. R., Oliveira, C., & Lima, F. C. T. 2021. A new Hyphessobrycon (Characiformes: Characidae) of the Hyphessobrycon heterorhabdus species-group from the lower Amazon basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 19(1), e200102. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0102>

Fang, Q., Shi, X., Zhang, L., Wang, Q., Wang, X., Guo, Y., Zhou, B. 2015. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the bioavailability, metabolism, and toxicity of pentachlorophenol in zebrafish larvae, **Journal of Hazardous Materials**, Volume 283, Pages 897-904, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.039>.

Figueira, E., Branco, D., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Freitas, R. 2012. Are metallothioneins equally good biomarkers of metal and oxidative stress? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Volume 84, 2012, Pages 185-190, ISSN 0147-6513,



<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.07.012>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651312002357>)

Formoso, P., Muzzalupo, R., Tavano, L., De Filpo, G., Nicoletta, F.P., 2016. Nanotechnology for the environment and medicine. **Mini Rev Med Chem** 16, 668–675

Federici, G. Shaw, B. J. Handy, R.D. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquat Toxicol.** 30;84(4):415-30. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.07.009.

Griffin, S., Masood, M. I., Nasim, M. J., Sarfraz, M., Ebokaiwe, A. P., Schäfer, K.-H., Keck, C. M., Jacob, C. 2018. Natural Nanoparticles: A Particular Matter Inspired by Nature. **Antioxidants.** <https://doi.org/10.3390/antiox7010003>

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. **Environ. Sci. Technol.**, 43: (9216-9222)

Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. **Environ. Pollut.** 181, 287–300

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., Kempson, I. 2021. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **Int J Mol Sci.** 22(23):12827. doi: 10.3390/ijms222312827. PMID: 34884632; PMCID: PMC8657538.

Gu, J., Guo, M., Huang, C., Wang, X., Zhu, Y., Wang, L., Wang, Z., Zhou, L., Fan, D., Shi, L., Ji, G. 2021. Titanium dioxide nanoparticle affects motor behavior, neurodevelopment and axonal growth in zebrafish (*Danio rerio*) larvae, **Science of The Total Environment**, Volume 754. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142315>.

Habig, W. H., Jakoby, W. B. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In: Methods in enzymology. **Academic press**, p. 398-405.

Hao, L., Wang, Z., Xing, B. 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). 21(10), 1459–1466. doi:10.1016/s1001-0742(08)62440-7

Hou, J., Wang, L., Wang, C., Zhang, S., Liu, H., Li, S., Wang, W. 2019. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms, **Journal of Environmental Sciences**, Volume 75, Pages 40-53, ISSN 1001-0742, <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.010>.

Hochella, M. F., Mogk, D. W., Ranville, J., Allen, I. C., Luther, G. W., Marr, L. C., McGrail, B. P., Murayama, M., Qafoku, N. P., Rosso, K. M., Sahai, N., Schroeder, P. A., Vikesland, P., Westerhoff, P., Yang, Y. 2019. Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system. **Science**, 363(6434), eaau8299–. doi:10.1126/science.aau8299

Hu, X., Chen, Q., Jiang, L., Yu, Z., Jiang, D., Yin, D. 2011. Combined effects of titanium dioxide and humic acid on the bioaccumulation of cadmium in Zebrafish, **Environmental Pollution**, Volume 159, Issue 5. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.02.011>

Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandoe, P., Turnbull, J. F. 2006. Current issues in fish welfare. **Journal of Fish Biology**, 68(2), 332-372. doi:10.1111/j.0022-1112.2006.001046.x

ISO, 2004. Occupational ultrafine aerosol exposure characterization and assessment. Draft technical report number 6. ISO/TC146/SC2/WG1 Particle size selective sampling and analysis (workplace air quality).

Jovanović, B. 2015. Review of titanium dioxide nanoparticle phototoxicity: developing a phototoxicity ratio to correct the endpoint values of toxicity tests. **Environ Toxicol Chem** 34(5):1070–1077. <https://doi.org/10.1002/etc.2891>

Jackson, A. C, Liu, J., Vallanat, B., Jones, C., Nelms, M. D., Patlewicz, G., Corton, J. C. 2020. Identification of novel activators of the metal responsive transcription factor (MTF-1) using a gene expression biomarker in a microarray compendium, **Metalomics**, Volume 12, Issue 9, Pages 1400–1415, <https://doi.org/10.1039/d0mt00071j>

Jiang, X., Weise, S., Hafner, M., Röcker, C., Zhang, F., Parak, W. J., & Nienhaus, G. U. 2010. Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. **Journal of the Royal Society, Interface**, 7 Suppl 1(Suppl 1), S5–S13. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0272.focus>

Ji, Z., Jin X, George, S., Xia, T., Meng, H., Wang, X., Suarez, E., Zhang, H., Hoek, E. M. V., Godwin, H., Nel, A. E., Zink, J. I. 2010. Dispersion and stability optimization of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cell culture media. **Environ Sci Technol**; 44(19):7309–7314. doi: 10.1021/es100417s.

Jones D., P. 2006. Redefining oxidative stress. **Antioxid Redox Signal** 2006;8:1865–79. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>

Kaspar J.W., Niture S.K., Jaiswal A.K. 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. **Free Radic Biol Med**;47(9):1304- 9. <http://dx.doi.org/10.1016/j>

Kang, Y. P., Mockabee-Macias, A., Jiang, C., Falzone, A., Prieto-Farigua, N., Stone, E., Harris, I. S., DeNicola, G. M., 2021. Non-canonical Glutamate-Cysteine Ligase Activity Protects against Ferroptosis. **Cell Metab**. 33(1):174-189.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2020.12.007.

Khosravi, K., Hoque, M.E., Dimock, B., Hintelmann, H., Metcalfe, C.D., 2012. A novel approach for determining total titanium from titanium dioxide nanoparticles suspended in water and biosolids by digestion with ammonium persulfate. **Anal. Chim. Acta** 713, 86–91

Kronberg, B. I., Fyfe, W. S., McKinnon, B. J., Couston, J. F., Stilianidi, B., Nash, R. A. 1981. Model for bauxite formation: Paragominas (Brazil). **Chemical Geology**, 3b 311-320.

Kumar, V., Pandita, S., Singh S. G. P., Sharma, A., Khanna, K., Kaur, P., Bali, A.S., Setia, R. 2021. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: a comprehensive review. **Chemosphere**. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127810>.

Le, M., Navas, J. M., Soares, A.M.V.M., Barata, C. 2014. Oxidative stress effects of titanium dioxide nanoparticle aggregates in zebrafish embryos. **Science of The Total Environment**, 470-471(), 379–389. 2. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.055

Lillicrap, A., Belanger, S., Burden, N., Pasquier, D.D., Embry, M.R., Halder, M., Lampi, M.A., Lee, L., Norberg-King, T., Rattner, B.A., Schirmer, K., Thomas, P. 2016. Alternative approaches to vertebrate ecotoxicity tests in the 21st century: A review of developments over the last 2

decades and current status. **Environ Toxicol Chem**, 35: 2637-2646. <https://doi.org/10.1002/etc.3603>

Li, Y., Huang, W., Huang, S., Du, J., Huang, C. 2012. Screening of anti-cancer agent using zebrafish: Comparison with the MTT assay, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Volume 422, Issue 1. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.110>.

Lee, B. C., Kim, K. T., Cho, J. G. 2012. Oxidative stress in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. **Mol. Cell. Toxicol.** 8, 357–366. <https://doi.org/10.1007/s13273-012-0044-2>

León, J., Cotto, M., del C.; Márquez, F., Toxicology of Nanomaterials on Zebrafish. 2019. **American Journal of Engineering and Applied Sciences**, 12(2), 193–203. doi:10.3844/ajeassp.2019.193.203

Lähde, A., Gudmundsdottir, S. S., Joutsensaari, J. Tapper, U., Ruusunen, J., Ihalainen, M. Karhunen, T., Torvela, T., Jokiniemi, J., Järvinen, K., Gíslason, S. R., Briem, H., Gizurásson, S. 2013. *In vitro* evaluation of pulmonary deposition of airborne volcanic ash. **Atmospheric Environment**, Volume 70, Pages 18-27, ISSN 1352-2310, <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.12.048>.

Liu, Y., Zhu, S., Gu, Z., Chen, C., Zhao, Y., 2022. Toxicity of manufactured nanomaterials. **Particuology**, Volume 69, Pages 31-48, ISSN 1674-2001, <https://doi.org/10.1016/j.partic.2021.11.007>.

Lu, Y., Zhang, H., Wang, H., Ma, N., Sun, T., Cui, B. 2021. Humic acid mediated toxicity of faceted TiO<sub>2</sub> nanocrystals to *Daphnia magna*, **Journal of Hazardous Materials**, Volume 416, 126112, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126112>.

Limbach, L. K., Li, Y., Grass, R. N., Brunner, T. J., Hintermann, M. A., Muller, M., Gunther, D., & Stark, W. J. 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. **Environmental science & technology**, 39(23), 9370–9376. <https://doi.org/10.1021/es051043o17>

Lima, F. C. T., Coutinho, D. P. Wosiacki, W. B. 2014. A new Hyphessobrycon (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the middle Amazon basin, Brazil. **Zootaxa**, v. 3872, n. 2, p. 167-179.

Loureiro, S. N., Amado, L. L., Giarrizzo, T. 2023. A multi-tissues comparison of biomarkers in *Serrasalmus rhombeus* (Teleostei: Serrasalminidae) and *Prochilodus nigricans* (Teleostei: Prochilodontidae) from two Amazonian rivers with distinct levels of pollution. **Ecological Indicators**, v. 147, p. 109936.

Meakin, P. 1984. Diffusion-limited aggregation in three dimensions: Results from a new cluster-cluster aggregation model, **Journal of Colloid and Interface Science**, Volume 102, Issue 2, Pages 491-504, ISSN 0021-9797, [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(84\)90252-2](https://doi.org/10.1016/0021-9797(84)90252-2).

Mottola, F., Iovine, C., Santonastaso, M., Carfora, V., Pacifico, S., Rocco, L. 2022. Evaluation of Zebrafish DNA Integrity after Individual and Combined Exposure to TiO<sub>2</sub> Nanoparticles and Lincomycin. **Toxics**, 10, 132. <https://doi.org/10.3390/toxics10030132>

Moraes, C. D. O., Godoi, B. H., Carvalho, I. C. S., Pinto, J. C., Rossato, R. C., Silva, N. S., Soares, C. P. 2019. Genotoxic effects of photodynamic therapy in laryngeal cancer cells – An *in vitro* study. **Experimental Biology and Medicine**, v. 244, n. 3, p. 262–271.

- Mugoni, V., Camporeale, A., Santoro, M., M. 2014. Analysis of Oxidative Stress in Zebrafish Embryos. **Journal of Visualized Experiments**, (89). doi:10.3791/51328
- Mukaigasa, K.; Nguyen, L. T. P. Li, L.; Nakajima, H.; Yamamoto, M.; Kobayashi, M. 2012. Genetic Evidence of an Evolutionarily Conserved Role for Nrf2 in the Protection against Oxidative Stress. **Molecular and Cellular Biology**, 32(21), 4455–4461. doi:10.1128/mcb.00481-12
- Muller P. Y., Janovjak H., Miserez A. R., Dobbie Z. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. **Biotechniques**. 32 1372–1374.
- Nagalakshimi, N, Prasad, M. N.V. 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and metabolism to cooper stress in *Scenedesmus bijugatus*. **Plant Sci** 160:291–299
- Nascimento, Y. J. C., 2022. Uso de biomarcadores na avaliação da toxicidade do alumínio no peixe amazônico *Hyphessobrycon heterorhabdus* (Characidae: Chaciformes). 35f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca) Universidade Federal do Pará. Belém.
- Nichols, G., Byard, S., Bloxham, M. J., Botterill, J., Dawson, N. J., Dennis, A., Diart, V., North, N. C., & Sherwood, J. D. 2002. A review of the terms agglomerate and aggregate with a recommendation for nomenclature used in powder and particle characterization. **Journal of pharmaceutical sciences**, 91(10), 2103–2109. <https://doi.org/10.1002/jps.10191>
- Nunes, S. M., Müller, L., Simioni, C., Ouriques, L. C., Gelesky, M. A., Fattorini, D., Regoli, F., Monserrat, J. M., Lima, J. L. 2020. Impact of different crystalline forms of nTiO<sub>2</sub> on metabolism and arsenic toxicity in *Limnoperna fortunei*, **Science of The Total Environment**, Volume 728, 138318, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138318>.
- Nguyen, T., Nioi, P., and Pickett, C. B. 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **J. Biol. Chem.** 284, 13291–13295
- Ogunsuyi, O. M., Adegoye, E. O., Ogunsuyi, O. I., Alabi, O. A., Alimba, C. G., Bakare, A. A. 2020. Titanium dioxide nanoparticles-induced cytogenotoxicity and alterations in haematological indices of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Toxicology and Industrial Health**. 36(10):807-815. doi:10.1177/0748233720948682
- Oakes, K. D., McMaster, M. E., Pryce, A. C., Munkittrick, K. R., Portt, C. B., Hewitt, L. M., MacLean, D. D., Van Der Kraak, G. J. 2003. Oxidative stress and bioindicators of reproductive function in pulp and paper mill effluent exposed white sucker. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, 74(1), 51–65. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg114>
- Oya-Silva, L. F., Vicari, T., Disner, G. R. Lirola, J. R., Klingelfus, T., Gonçalves, H. L. S. Leite, T. P. B., Calado, S. L. M. Voigt, C. L., de Assis, H. C. S., Cestari, M. M., 2021. Tissue-specific genotoxicity and antioxidant imbalance of titanium dioxide nanoparticles (NPTiO<sub>2</sub>) and inorganic lead (PbII) in a neotropical fish species, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Volume 82, 103551, ISSN 1382-6689, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103551>.
- Park, C. M., Chu, K. H., Her, N., Jang, M., Baalousha, M., Heo, J., Yoon, Y., 2019. Occurrence and Removal of Engineered Nanoparticles in Drinking Water Treatment and Wastewater Treatment Processes. **Separation & Purification Reviews**, 46:3, 255-272, DOI: 10.1080/15422119.2016.1260588

- Panossian, A., Seo, E., Klauck, S., Efferth, T. 2020. Adaptogens in chemobrain (part IV): adaptogenic plants prevent the chemotherapeutics-induced imbalance of redox homeostasis by modulation of expression of genes encoding Nrf2-mediated signaling proteins and antioxidant, metabolizing, detoxifying enzymes in neuroglia cells. **Longhua Chinese Medicine**, North America.
- Pereira, H. C. 2019. Avaliação genotóxica e histológica em peixes (*Hyphessobrycon heterorhabdus*) do igarapé Cararazinho expostos ao chorume da lixeira pública de Santarém – PA. 73 f. Dissertação (Dissertação em Biociências) Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém.
- Pereira, W.V. da S., Teixeira, R.A., Souza, E.S., Moraes, A.L.F., Campos, W.E.O., Amarante, C.B., Martins, G.C., Fernandes, A.R., 2020. Chemical fractionation and bioaccessibility of potentially toxic elements in area of artisanal gold mining in the Amazon. **J. Environ. Manag.** 267, 110644 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110644>.
- Pittol, M., Tomacheski, D., Simões, D. N., Ribeiro, V. F., Santana, R. M. C. 2018. Evaluation of the Toxicity of Silver/Silica and Titanium Dioxide Particles in Mammalian Cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 61 <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160667>.
- Prohaska, J.R., 1980. The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferase. **Biochimica and Biophysica**, Acta. 611: 87 – 98.
- Reeves, J. F., Davies, S. J., Dodd, N. J. F., Jha, A. N. 2008. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. , 640(1-2), 113–122. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.12.010
- Rocco, L., Santonastaso, M., Mottola, F., Costagliola, D., Suero, T., Pacifico, S., Stingo, V., 2015. Genotoxicity assessment of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the teleost *Danio rerio*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Volume 113, Pages 223-230,ISSN 0147-513,<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.012>.
- Russell, W. M. S., Burch, R. L. The Principles of Humane Experimental Technique. special ed ed. [s.l: s.n.].
- Santos, C. C. M., Nauar, A. R., Ferreira, J. A., Montes, C. S., Adolfo, F. R., Leal, G., Reis, G. M., Lapinsky, J., Carvalho, L. M., Amado, L. L. 2023. Multiple anthropogenic influences in the Pará River (Amazonia, Brazil): A spatial-temporal ecotoxicological monitoring in abiotic and biotic compartments, **Chemosphere**, Volume 323, 138090, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138090>.
- Shanmugam, G., Challa, A. K., Devarajan, A., Athmanathan, B., Litovsky, S. H., Krishnamurthy, P., Davidson, C. J., Rajasekaran, N. S. 2019. Exercise Mediated Nrf2 Signaling Protects the Myocardium From Isoproterenol-Induced Pathological Remodeling. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, 6(0), 68–. doi:10.3389/fcvm.2019.00068
- Schneider, A. B., Koschinsky, A., Krause, C. H., Gledhill, M., Carvalho, L. M. 2022. Dynamic behavior of dissolved and soluble titanium along the salinity gradients in the Pará and Amazon estuarine system and associated plume, **Marine Chemistry**, Volume 238, 104067, ISSN 0304-4203, <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2021.104067>.

- Schirmer K. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. **Toxicology**. 2006 Jul 25;224(3):163-83. doi: 10.1016/j.tox.2006.04.042. Epub 2006 May 2. PMID: 16765501.
- Stadnicka-Michalak, J., Schirmer, K., & Ashauer, R. 2015. Toxicology across scales: Cell population growth in vitro predicts reduced fish growth. **Science advances**, 1(7), e1500302. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500302>
- Silva, D. M. A., Oliveira, W. F. S., Santos, J. P., Oliveira, F. J. M. 2019. “Comendo no mesmo prato”: sobreposição de nicho trófico de duas espécies de peixes em riachos da bacia do alto rio Tocantins. **Heringeriana** 13(2): 29–39.
- Silva, C. C., Ferreira, E. J. G., Deus, C. P. 2008. Diet of *Bryconops alburnoides* and *B. caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) in the region affected by Balbina Hydroelectric Dam (Amazon grainage, Brazil). **Neotropical Ichthyology**. 6, 237-242. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252008000200011>
- Silva, S. F., Oliveira, D. C., Pereira, J. P. G., Castro, S. P., Costa, B. N. S., Lima, M. O. 2019. Seasonal variation of mercury in commercial fishes of the Amazon Triple Frontier, Western Amazon Basin, Ecological Indicators, Volume 106, 105549, ISSN 1470-160X, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105549>.
- Simon P. 2003. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. **Bioinformatics** 19 1439–1440. 10.1093/bioinformatics/btg15.
- Singh, P., Chandrasekaran, V., Hardy, B., Wilmes, A., Jennings, P., Exner, T. E. 2021. Temporal transcriptomic alterations of cadmium exposed human iPSC-derived renal proximal tubule-like cells. **Toxicology in Vitro**. doi:10.1016/j.tiv.2021.105229
- Souza, N. H. F., Pereira, W. V. da S., Dias, Y. N., Souza, E. S., Teixeira, R. A., Lima, M. W., Ramos, S. J., Amarante, C. B., Fernandes, A. R., 2020. Environmental and human health risks of arsenic in gold mining areas in the eastern Amazon. **Environ. Pollut.** 265, 114969 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114969>.
- Sogorb, M. A., Estévez, J., Vilanova, E., In: Gupta, R. C. (ed.), 2014. Biomarkers in Toxicology. **Academic Press**. 965–973 pp.
- Stockert J. C., Horobin R. W., Colombo L. L., Blázquez-Castro A. 2018. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochem.**;120:159–167. doi: 10.1016/j.acthis.2018.02.005.
- Tahara, H., Matsuda, S., Yamamoto, Y., Yoshizawa, H., Fujita, M., Katsuoka, Y., Kasahara, T. 2017. High-content image analysis (HCIA) assay has the highest correlation with direct counting cell suspension compared to the ATP, WST-8 and Alamar blue assays for measurement of cytotoxicity. **Journal of pharmacological and toxicological methods**. Vol. 88. Pág. 92-99. DOI10.1016/j.vascn.2017.08.003
- Tang, T., Zhang, Z., Zhu, X. 2019. Toxic Effects of TiO<sub>2</sub> NPs on Zebrafish. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 16(4), 523–. doi:10.3390/ijerph16040523

Tanneberger, K., Knöbel, M., Busser, F. J. M., Sinnige, T. L., Hermens, J. L. M., Schirmer, K. 2013. Predicting Fish Acute Toxicity Using a Fish Gill Cell Line-Based Toxicity Assay. **Environmental Science & Technology**. 47 (2), 1110-1119 DOI: 10.1021/es303505z

Tavera-Montañez C., Hainer S. J., Cangussu D., Gordon S. J. V., Xiao Y., Reyes-Gutierrez P., Imbalzano A. N., Navea J. G., Fazzio T. G., Padilla-Benavides T. 2019. The classic metal-sensing transcription factor Mtf1 promotes myogenesis in response to copper. **FASEB J**. 2019 Dec;33(12):14556-14574. doi: 10.1096/fj.201901606R. PMID: 31690123; PMCID: PMC6894080.

Teixeira, R. A., Pereira, W. V. da S., Souza, E. S. de, Ramos, S. J., Dias, Y. N., Lima, M. W. de, Neto, H. F. S., Oliveira, E. S. de., Fernandes, A. R. 2021. Artisanal gold mining in the eastern Amazon: Environmental and human health risks of mercury from different mining methods. **Chemosphere**, 284, 131220. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.13.

Timme-Laragy, A. R.; Karchner, S. I.; Franks, D. G.; Jenny, M. J.; Harbeitner, R. C.; Goldstone, J. V.; McArthur, A. G.; Hahn, M. E. 2012. Nrf2b, Novel Zebrafish Paralog of Oxidant-responsive Transcription Factor NF-E2-related Factor 2 (NRF2). **Journal of Biological Chemistry**, 287(7), 4609–4627. doi:10.1074/jbc.M111.260125

Thornalley, P.J., and Vašák, M. 1985. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology** 827, 36-44.

Ulrey A.B. 1894. Preliminary descriptions of some new South American Characinidae. **Am Nat**. 28:610–11.

Vignardi, C. P., Hasue, F. M., Sartório, P. V., Cardoso, C. M., Machado, A.S.D., Passos, M. J.A.C.R., Santos, T. C. A., Nucci, J. M., Hewer, T. L. R., Watanabe, I., Gomes, V., Phan, N. V. 2015. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766), **Aquatic Toxicology**, Volume 158, Pages 218-229, ISSN 0166-445X, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.008>.

Wang, X., Li, H., Liu, C., Lu, W., Lu, W., Wu, Y. 2022. A water-soluble turn-on fluorescent probe for rapid discrimination and imaging of Cys/Hcy and GSH in cells and zebrafish through different fluorescent channels. **Dyes and Pigments**, v. 199, p. 110058. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.110058>.

Wang, J., Zhu, X., Zhang, X., Zhao, Z., Liu, H., George, R., Wilson-Rawls, J., Chang, Y., Chen, Y. 2011. Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) reproduction upon chronic exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles, **Chemosphere**, Volume 83, Issue 4, Pages 461-467, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.069>.

White, C.C.; Viernes, H.; Krejsa, C.M.; Botta, D.; Kavanagh, T.J. 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. **Analytical Biochemistry**. 318:175–180.

Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., von Goetz, N. 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. **Environ Sci Technol** 46, 2242–2250. doi/10.1021/es204168d

Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, JR A.J., Fong, J.H., Blanchard, K.A., 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. **Free Radic Biol Med.** 24, 480–93.

Xiong D, Fang T, Yu L, Sima X, Zhu W. 2011. Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. **Sci Total Environ** 2011;409:1444–52.

Yang, Y., Westerhoff, P. 2014. Presence in, and release of, nanomaterials from consumer products, **Nanomater.** - Impacts Cell Biol. Med. Springer, pp. 1–16, <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8739-0>.

Yeo, M. K., Park, H. G. 2012. Gene expression in zebrafish embryos following exposure to Cu-doped TiO<sub>2</sub> and pure TiO<sub>2</sub> nanometer-sized photocatalysts. **Mol. Cell. Toxicol.** 8, 127–137. <https://doi.org/10.1007/s13273-012-0016-6>

Zamek-Gliszczyński, M. J., Hoffmaster, K. A., Nezasa, K. I., Tallman, M. N., Brouwer, K. L. R., 2006. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. **Eur. J. Pharm. Sci.** 27, 447-486. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.12.007>

Zabihihesari, A., Parand, S., Coulthard, A. B., Molnar, A., Hilliker, A. J., Hezai, P. 2022. An in-vivo microfluidic assay reveals cardiac toxicity of heavy metals and the protective effect of metal responsive transcription factor (MTF-1) in *Drosophila* model. **3 Biotech** 12, 279. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03336-7>

Zanandrea, R., Carla D. Bonan, Maria M. Campos, 2020. Zebrafish as a model for inflammation and drug discovery, **Drug Discovery Today**, Volume 25, Issue 12, Pages 2201-2211, ISSN 1359-6446, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.09.036>.

Zee, C., Roberts, D. R., Rancourt, D. G., Slomp, C. P. 2003. Nanogoethite is the dominant reactive oxyhydroxide phase in lake and marine sediments. **Geology**, 31 (11): 993–996. doi: <https://doi.org/10.1130/G19924>.

Zeumer, R., Galhano, V., Monteiro, M. S., Kuehr, S., Knopf, B., Meisterjahn, B., Soares, A. M. V. M., Loureiro, S., Lopes, I., Schlechtriem, C. 2020. Chronic effects of wastewater-borne silver and titanium dioxide nanoparticles on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), **Science of The Total Environment**, Volume 723, 137974, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.137974>.