

---

## EXPOSIÇÃO DE EMBRIÕES DE *DANIO RERIO* A NANO-TiO<sub>2</sub> SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ILUMINAÇÃO

---

Clemente, Z.; Castro, V.L.S.S.; Moura, M.A.M.; Jonsson, C.M.; Fraceto, L.F.

Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança, Embrapa CNPMA, Jaguariúna, SP.  
Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, UNICAMP, Campinas, SP.  
Laboratório da Ciência das Plantas Daninhas, Instituto Biológico, APTA/SAA, Campinas, SP.  
Departamento de Engenharia Ambiental, UNESP, Sorocaba, SP.  
zairaclemente@hotmail.com; vera-lucia.vastro@embrapa.br;  
monica\_moura@biologico.sp.gov.br; claudio.jonsson@embrapa.br; leonardo@sorocaba.unesp.br

**Projeto Componente:** PC6    **Plano de Ação:** PA6

---

### Resumo

As nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO<sub>2</sub>) apresentam propriedades fotocatalíticas que devem ser consideradas na sua avaliação ecotoxicológica. Este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade do nano-TiO<sub>2</sub> em embriões de peixe, sob diferentes condições de iluminação. Embriões de paulistinha (*Danio rerio*) foram expostos a 0, 1, 10 e 100 mg/L de nano-TiO<sub>2</sub> (anatase, 25 nm) sob luz visível ou luz visível e radiação ultravioleta (UV). O nano-TiO<sub>2</sub> apresentou baixa toxicidade aguda em todas as condições testadas, porém após 96 h de exposição o grupo exposto a 100 mg/L com radiação UV apresentou 5% de mortalidade e redução no tamanho das larvas vivas. Observou-se eclosão prematura nos grupos expostos a 10 e 100 mg/L de nano-TiO<sub>2</sub> sem UV. Estes resultados contribuem para compreensão dos efeitos ecotoxicológicos do nano-TiO<sub>2</sub> e indicam que a condição de iluminação influencia tais efeitos.

**Palavras-chave:** nanoecotoxicologia, dióxido de titânio, peixe, ultravioleta.

---

### Introdução

Nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO<sub>2</sub>) estão entre as mais utilizadas pela nanotecnologia. Sua crescente produção e utilização levaram a diversos estudos para avaliação da sua toxicidade. Apesar de terem sido consideradas como de baixa ou nenhuma toxicidade por diversos estudos, recentes trabalhos tem indicado que a inclusão de radiação ultravioleta (UV) nos bioensaios altera os parâmetros de toxicidade do nano-TiO<sub>2</sub> (MARCONE et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

O nano-TiO<sub>2</sub> possui propriedades fotocatalíticas, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) capazes de danificar moléculas biológicas; este tem sido o mecanismo de toxicidade mais discutido para o nano-TiO<sub>2</sub> (NOGUEIRA; JARDIM, 1998).

O ensaio com embriões de peixes tem sido proposto como alternativa ao teste agudo com peixes adultos. Dentre as vantagens da utilização do embrião de paulistinha (*Danio rerio*) para avaliações ecotoxicológicas estão o número

superior de ovos por postura, o rápido desenvolvimento, a perfeita transparência de seus ovos, e o grande volume de informação já disponível sobre o seu desenvolvimento, além do reduzido espaço e volume de solução necessário para realização do teste (BRAUNBECK; LAMMER, 2006).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do nano-TiO<sub>2</sub> em embriões de paulistinha, sob diferentes condições de iluminação.

---

### Materiais e métodos

Embriões (n=20/grupo) de *D. rerio* com 1 h pós-fecundação foram expostos durante 96 h a diferentes concentrações de nano-TiO<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, 25nm, 100% anatase): 0, 1, 10 e 100 mg/L; sob duas condições de iluminação: luz visível com ou sem radiação ultravioleta (UV). A exposição ocorreu em placas de poliestireno de 24 poços, sendo os embriões mantidos individualmente em um volume de 2 ml de suspensão, a 26°C. As suspensões foram totalmente renovadas a cada 24h, sendo

preparadas a partir de uma solução estoque de nano-TiO<sub>2</sub> em água Milli Q (1 g/L), sonicada durante 10 min (Sonicador Cole Parmer 600 W/L). A exposição à luz visível e à radiação UV acompanhou o ciclo claro de um fotoperíodo de 16/8h (claro/escuro). A luz visível foi estabelecida através de lâmpadas fluorescentes Phillips 40W, instaladas no teto do laboratório. Para estabelecimento da radiação UV, foram utilizadas duas lâmpadas UVA340 Q-Panel, mantidas a 80 cm de distância. Medidas da radiação UV foram feitas através de espectroradiômetro Ocean Optics USB 2000+RAD e a dose de exposição UV foi 1.45 J/cm<sup>2</sup>/h (97% UVA e 0.06% UVB).

Os embriões/larvas foram observados a cada 24 h através de esteromicroscópio Optika SMZ2LED. Ao final do período de exposição, as larvas vivas foram fotografadas em aumento de 2x e mediu-se seu comprimento total através do software Optika View Version 7.1.1.5, previamente calibrado através de uma lâmina com régua milimetrada.

A taxa de eclosão no dia 2 e a taxa de alteração de equilíbrio no dia 4 foram analisadas através do Teste Qui-quadrado. O comprimento total das larvas foi analisado através de ANOVA de duas vias, consideraram-se os fatores condição de iluminação, concentração e a interação entre eles, seguido de teste F para contrastes. Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5%.

## Resultados e discussão

O nano-TiO<sub>2</sub> adere ao córion formando uma camada externa branca que dificulta a visualização completa do embrião, por isso não foi possível determinar a ocorrência de malformações. Nas primeiras 72 h de exposição não houve mortalidade em nenhum grupo, corroborando com a literatura, que relata não haver alteração na sobrevivência e ocorrência de malformações em embriões de peixes expostos a nano-TiO<sub>2</sub> (ZHU et al., 2008; PATERSON et al., 2011; JOVANOVIĆ et al., 2011; MA et al., 2012). No quarto dia, porém, houve 5% de mortalidade das larvas no grupo exposto a 100 mg/L de nano-TiO<sub>2</sub> com UV e nenhuma morte nos demais grupos. A eclosão das larvas teve início no segundo dia de exposição, mas a taxa de eclosão (Fig. 1) variou entre os grupos ( $p=0.0015$ ), sendo maior nos grupos expostos a 10 mg/L (47%) e 100 mg/L (36%) sem UV. A taxa de eclosão nos grupos expostos sob UV foi menor do que nos respectivos grupos expostos sem UV.

Todos os indivíduos eclodiram até o terceiro dia. Estes resultados indicam que a exposição ao nano-TiO<sub>2</sub> acelera a eclosão dos embriões e se assemelham aos de outros autores que também relataram haver eclosão prematura de embriões de medaka (*Oryzias latipes*) expostos a concentrações crescentes de nano-TiO<sub>2</sub>. Os dados sugerem que esse efeito possa estar relacionado ao bloqueio dos poros do córion pelo nano-TiO<sub>2</sub>, dificultando assim a respiração e excreção de metabólitos (JOVANOVIĆ et al., 2011).

Após a eclosão, foi observada alteração de equilíbrio nas larvas em todos os grupos, mas não houve relação com o tipo de exposição ( $p=0.2$ ). Cerca de 12% dos indivíduos do grupo controle apresentaram alteração de equilíbrio.

A análise estatística revelou a ocorrência de interação entre a condição de iluminação e a concentração de nano-TiO<sub>2</sub> para a variável comprimento total das larvas (Fig. 2). Observou-se que após 96 h de exposição, para cada concentração testada, as larvas expostas ao nano-TiO<sub>2</sub> com UV foram estatisticamente menores do que as dos respectivos grupos expostos sem UV. Não houve diferença entre os grupos controles. A comparação entre os grupos expostos sem UV não revelou diferença significativa entre os mesmos, enquanto que nos tratamentos com UV houve diferença significativa apenas em relação às larvas expostas a 100 mg/L, que apresentaram-se menores.

As alterações observadas podem estar relacionadas a efeitos diretos ou indiretos do nano-TiO<sub>2</sub>, como indução de estresse oxidativo. Análises complementares serão realizadas para caracterizar as nanopartículas em suspensão e avaliar possíveis alterações bioquímicas nas larvas.

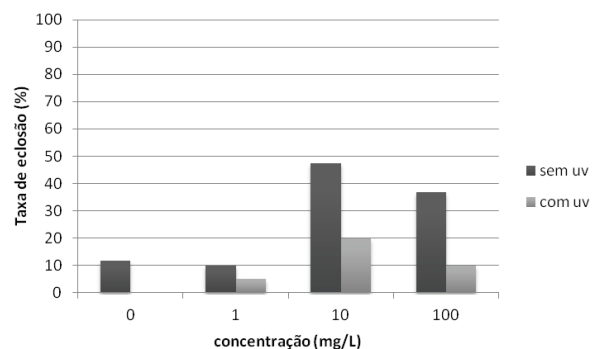


Fig. 1. Taxa de eclosão de embriões no segundo dia de exposição a nano-TiO<sub>2</sub> com e sem radiação ultravioleta (UV).

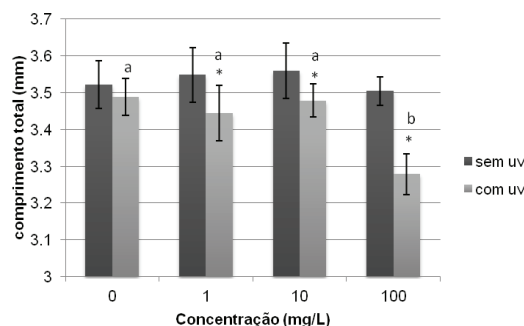


Fig. 2. Comprimento total (média  $\pm$  desvio padrão) de larvas após 96 h de exposição à nano-TiO<sub>2</sub> com e sem radiação ultravioleta (UV). \* indica diferença significativa entre grupos sem e com UV, para cada concentração. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos expostos com UV.

## Conclusões

O nano-TiO<sub>2</sub> apresenta baixa toxicidade aguda para embriões e larvas de *Danio rerio*. A exposição sob radiação UV elevou a taxa de mortalidade no tratamento 100 mg/L, mas não foi possível determinar a CL<sub>50-96h</sub>. Efeitos subletais foram observados, havendo eclosão prematura das larvas expostas a 10 e 100 mg/L de nano-TiO<sub>2</sub> sem UV e menor desenvolvimento naquelas expostas a nano-TiO<sub>2</sub> com UV.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes, Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa e FAPESP.

## Referências

BRAUNBECK, T.; LAMMER, E.. Fish Embryo Toxicity Assays (UBA contract number 203 85 422). Umwelt Bundes Amt., 2006.

JOVANOVIĆ, B.; ANASTASOVA, L.; ROWE, E.W.; ZHANG, Y.; CLAPP, A.R.; PALIC, D. Effects of nanosized titanium dioxide on innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.74, n. 4, p. 675-683, 2011.

MA, H.; BRENNAN, A.; DIAMOND, S.A. Phototoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles under solar radiation to two aquatic species: *Daphnia magna*

and Japanese medaka. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 31, n.7, p. 1621–1629, 2012.

MARCONE, G.P.S.; OLIVEIRA, A.C.; ALMEIDA, G., UMBUZEIRO, G.A., JARDIM, W.F.. Ecotoxicity of TiO<sub>2</sub> to *Daphnia similis* under irradiation. *Journal of Hazard Material*, v. 211–212, p. 436–42, 2012.

NOGUEIRA, R.F.P.; JARDIM, W.F.. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. *Química Nova*, v. 21, n. 1, p. 69-72, 1998.

PATERSON, G.; ATARIA, J.M.; HOQUE, M.E.; BURNS, D.C.; METCALFE, C.D.. The toxicity of titanium dioxide nanopowder to early life stages of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, v. 82, p. 1002–1009, 2011.

ZHANG, J.; WAGES, M.; COX, S.B.; et al. Effect of titanium dioxide nanomaterials and ultraviolet light coexposure on African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 31, n.1, p. 176–83, 2012.

ZHU, X.; ZHU, L.; DUAN, Z.; QI, R.; LI, Y.; LANG, Y.. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 43, p. 278-284, 2008.