



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIELA CRUZ ALVES

**Ecotoxicidade de Nanopartículas em Linhagens Celulares
de peixe-zebra: Uma Revisão Bibliográfica**

Londrina - Paraná

2025

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIELA CRUZ ALVES

Ecotoxicidade de Nanopartículas em Linhagens Celulares de peixe-zebra: Uma Revisão Bibliográfica

Trabalho de monografia apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Claudia Bueno dos Reis Martinez

Coorientadora: Caroline Santos

Londrina – Paraná

2025

Prof^a. Dr^a. Claudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dr^a. Juliana Mara Serpeloni
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dr^a. Caroline Santos
Universidade Estadual de Londrina

Suplente: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina

Dedico este trabalho aos meus pais,
Silvana e Rafael, pelo apoio incondicional,
pela fé em mim e por serem minha inspiração
em cada passo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que me ama incondicionalmente e foi minha fonte de força, coragem e fé ao longo dessa jornada.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Prof^a Dr^a Claudia Bueno dos Reis Martinez, por sua excelência como profissional e orientadora, e por toda a dedicação e apoio que me proporcionou ao longo desse processo. Também sou profundamente grata à minha coorientadora, Caroline Santos, pela paciência em me auxiliar em cada momento de dificuldade e por exercer um trabalho admirável e inspirador.

Sou grata à Prof^a. Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha por abrir as portas do Laboratório de Ecofisiologia Animal e por ter me inspirado a buscar esta área e ser uma excelente profissional.

Agradeço à Prof^a Dr^a Juliana Mara Serpeloni por aceitar o convite para integrar a minha banca avaliadora.

Meu sincero agradecimento a todos os companheiros do laboratório que me acolheram e sempre me ofereceram ajuda: Vanessa, Willian, Carol, Milena, Raquel, Letícia e Wagner.

Um agradecimento especial à Sarah, minha companheira de laboratório e um verdadeiro presente de Deus, por sua amizade, apoio e por tornar essa jornada mais leve e especial.

Aos meus pais, Silvana e Rafael, minha eterna gratidão por tanto amor, por serem meu alicerce, meu suporte e por sempre me incentivarem a buscar o caminho dos estudos. Vocês são a base de tudo que conquistei.

À minha irmã Rafaela, por estar sempre ao meu lado, mesmo a quilômetros de distância, incentivando-me na área acadêmica e me aconselhando nos momentos mais difíceis, minha mais profunda gratidão e amor.

Agradeço ao CNPq pelo financiamento para que eu pudesse me dedicar exclusivamente a este trabalho.

A todos vocês, minha jornada só foi possível graças à força, ao apoio e à inspiração que me ofereceram. Muito obrigada!

ALVES, Gabriela. **Toxicidade de Nanopartículas em Linhagens Celulares de peixe-zebra: Uma Revisão Bibliográfica**. 2025. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

RESUMO

O crescimento populacional intensificou a produção agrícola para atender à demanda por alimentos, levando ao uso indiscriminado de agrotóxicos, que alteram o equilíbrio dos ecossistemas ao atingir ambientes naturais. Nesse cenário, a nanotecnologia possibilitou o desenvolvimento de nanomateriais, estruturas em escala nanométrica com amplas aplicações, incluindo a otimização do uso de compostos agroquímicos na agricultura. No entanto, esses compostos frequentemente alcançam corpos d'água, onde estão sujeitos a transformação, adsorção e interação com outros contaminantes. O peixe-zebra (*Danio rerio*) tem sido amplamente utilizado em estudos ecotoxicológicos devido à sua fácil manutenção laboratorial e versatilidade experimental. Contudo, cresce o debate sobre alternativas que substituam o uso de animais em pesquisas, com destaque para o uso de linhagens celulares derivadas de peixes. Este trabalho aborda estudos nas áreas de ecotoxicologia, nanotecnologia e agricultura, destacando a eficácia das linhagens celulares de peixe-zebra na avaliação da toxicidade de nanomateriais. A metodologia deste trabalho foi baseada na aplicação de critérios específicos, ao todo foram selecionados 28 artigos enquanto teses de doutorado e capítulos de livros foram excluídos. Esses estudos mostraram resultados consistentes quando comparados a testes realizados em organismos *in vivo*, reforçando o potencial das linhagens celulares como uma alternativa promissora para reduzir o uso de animais em experimentos.

Palavras-chave: Pesticidas. Linhagens celulares de peixe. Peixe-zebra. *In vitro*. Nanomaterial. Nanotoxicologia.

ALVES, Gabriela. **Toxicity of Nanoparticles in Zebrafish Cell Lines: A Literature Review**. 2025. 40f. Undergraduate Thesis (Bachelor's Degree in Biological Sciences) State University of Londrina, Londrina. 2025.

ABSTRACT

Population growth has intensified agricultural production to meet the demand for food, leading to the indiscriminate use of pesticides, which disrupt ecosystem balance by affecting natural environments. In this context, nanotechnology has enabled the development of nanomaterials—nanoscale structures with broad applications, including the optimization of agrochemical use in agriculture. However, these compounds often reach water bodies, where they undergo transformation, adsorption, and interaction with other contaminants. The zebrafish (*Danio rerio*) has been widely used in ecotoxicological studies due to its easy laboratory maintenance and experimental versatility. However, there is growing debate about alternatives to replace the use of animals in research, with particular emphasis on fish-derived cell lines. This study explores research in the fields of ecotoxicology, nanotechnology, and agriculture, highlighting the effectiveness of zebrafish cell lines in assessing nanomaterial toxicity. The methodology of this study was based on the application of specific criteria, resulting in the selection of 28 articles, while doctoral theses and book chapters were excluded. These studies demonstrated consistent results when compared to tests conducted on *in vivo* organisms, reinforcing the potential of cell lines as a promising alternative to reduce animal use in experiments.

Keywords: Pesticides. Fish cell lines. Zebrafish. *In vitro*. Nanomaterial. Nanotoxicology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
3. METODOLOGIA	12
4. NANOTECNOLOGIA	18
4.1 NANOPESTICIDAS: CONCEITO E APLICALÇÕES	19
5. NANOTOXICIDADE	21
6. POR QUE O PEIXE-ZEBRA?	23
7. LINHAGEM CELULAR	24
8. BIOMARCADORES PARA AVALIAR A TOXICIDADE DOS NANOMATERIAIS	28
8.1 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	28
8.2 BIOMARCADORES DE CITOTOXICIDADE	29
8.3 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE	29
9. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
APÊNDICE	36

1 INTRODUÇÃO

A agricultura desempenha um papel fundamental na segurança alimentar global e no quesito econômico. A atividade agrícola no Brasil se intensificou em meados dos séculos XIX e centralizou em regiões do país onde o uso é mais abundante, especialmente nas regiões Centro-Oeste, Sul, e na chamada região do Matopiba (MORAES, 2019).

De acordo com o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), em 2020 o PIB do Agronegócio contribuiu 7,2% para o PIB nacional, e nos dois últimos trimestres de 2023 o PIB do agronegócio correspondeu a 23,8% do PIB nacional, evidenciando a relevância do setor para a economia brasileira (CEPEA/ESALQ/USP).

A crescente demanda pela produção de alimentos resultou na monocultura em larga escala e conseqüentemente no uso generalizado de agrotóxicos. Apesar dos benefícios para o setor agrícola, como o controle de pragas e a fertilização, estes compostos agroquímicos quando mal manejados são capazes de alterar o equilíbrio de um ecossistema e propiciar a sua contaminação. Nesse sentido surge a necessidade de estudos que tornem as práticas agrícolas menos prejudiciais (WANG, 2022).

O desenvolvimento da nanotecnologia possibilitou a elaboração de compostos com alta rentabilidade em escalas nanométricas, os nanomateriais. Estas estruturas apresentam diversas aplicações em diferentes áreas, como a agricultura, medicina e biotecnologia (GONZÁLES, 2023).

Os nanopesticidas são compostos considerados promissores no setor agrícola por melhorar a entrega e eficácia dos ingredientes ativos agindo como “nanocarreadores”, objetivando uma liberação lenta, e gradual. No entanto, estes compostos também estão suscetíveis a entrar no ambiente e interagir com outros contaminantes. Por isso é necessário compreender o mecanismo de ação de tais materiais, a fim de entender os possíveis impactos e diminuir, ou evitar, a toxicidade nos sistemas bióticos que não são o alvo deles (TRAN, 2024).

A ecotoxicologia passou a utilizar modelos biológicos para avaliar os efeitos tóxicos de contaminantes, para isso o peixe-zebra (*Danio rerio*) mostrou ser um ótimo modelo *in vivo* para esses testes, por apresentar compatibilidade com o genoma humano, características fisiológicas semelhantes à dos mamíferos, alta taxa de

fecundidade e tempo de desenvolvimento reprodutivo relativamente curto. Além disso, seu tamanho pequeno permite fácil manuseio e menores custos para testes laboratoriais (ZHAO, 2024).

Porém, a utilização de animais em pesquisas levantou questionamentos éticos e com isso o surgimento de princípios para preservar o bem estar animal. O princípio dos 3 R's tem como objetivo substituir de forma total ou parcial a utilização de animais para fins científicos (CANEDO, 2021). Diante disso os ensaios *in vitro* são uma ótima alternativa por obter funções celulares muito semelhantes ao estado *in vivo* de um organismo, e assim fornecer informações como reprodução, crescimento, e viabilidade, com rapidez na obtenção de resultados, menor custo e redução na produção de resíduos (BOLS, 2005; GOSWAMI, 2022).

As culturas celulares *in vitro* podem ser culturas de células primárias e culturas permanentes, ou linhagens celulares. As culturas primárias são derivadas de tecidos ou órgãos de um animal, e utilizadas por um tempo limitado, até que a senescência celular ocorra. Quando o subcultivo dessas culturas é realizado, a linhagem pode continuar a ser propagada repetindo o ciclo de aumento do número de células por proliferação celular (BOLS, 2005).

A linhagem celular derivada de peixes foi estabelecida como uma metodologia promissora por apresentar melhor adaptação em condições de variações de temperatura e hipóxia, permitindo assim o cultivo das células por períodos mais longos e se tornando uma ótima ferramenta para estudos de toxicologia ambiental (GOSWAMI, 2022).

Diante disso, o cenário de crescente impacto ambiental causado pelo uso intensivo de agrotóxicos, somado ao avanço da nanotecnologia e a aplicação de nanomateriais no setor agrícola, destacam a urgência em compreender seus efeitos potenciais sobre o ambiente e os organismos não-alvo. O uso de linhagens celulares derivadas de peixes, como o peixe-zebra, surge como uma ferramenta valiosa para avaliar os impactos ecotoxicológicos desses compostos. Assim o objetivo desta revisão bibliográfica é analisar e compilar evidências científicas disponíveis sobre a toxicidade de nanomaterias em linhagens celulares de peixes, buscando como foco a espécie *Danio rerio*, a fim de comparar os artigos entre si e suas abordagens.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Compilar estudos científicos nas áreas da ecotoxicologia, nanotecnologia e agricultura, destacando o uso de linhagens celulares de peixe-zebra para avaliação da toxicidade dos nanomateriais, proporcionando assim uma base de conhecimento para direcionar futuras pesquisas.

Objetivos específicos

- Analisar as aplicações dos nanomateriais e suas versatilidades;
- Compilar os resultados dos nanomateriais e sua toxicidade em linhagens celulares de peixe-zebra;
- Identificar na literatura estudos que investiguem o uso de linhagens do peixe-zebra na avaliação de toxicidade de nanomateriais;
- Identificar lacunas e limitações nos estudos revisados a respeito das áreas da nanotecnologia e ecotoxicologia;
- Sugerir diferentes abordagens para melhorar os estudos de toxicidade visando diminuir o uso de animais inteiros.

3 METODOLOGIA

O trabalho consistiu em uma revisão bibliográfica de artigos científicos publicados no período compreendido entre os anos de 2007 a 2024, a fim de delimitar a quantidade de estudos analisados e garantir a relevância das informações. As consultas foram realizadas nas principais bases de dados como Scopus, SciELO, PubMed, e Google Scholar que forneceram informações relevantes e pertinentes ao tema. Para a pesquisa, foram utilizadas as palavras-chave, como “pesticides AND fish cell lines AND zebrafish AND *in vitro* AND nanomaterial AND nanotoxicology”. Além disso, foram considerados critérios específicos, como o período de publicação dos artigos (2007 a 2024), os parâmetros relacionados à nanotoxicidade, nanopartículas testadas, justificativa para as concentrações empregadas, tipo de cultura celular, linhagem celular analisada, e os principais resultados obtidos. Foram descartados capítulos de revista e teses de doutorado. Aplicando os critérios, 28 artigos foram

selecionados para compor este estudo, entre eles revisões bibliográficas (**Tabela 1**) e pesquisas experimentais (**Tabela 2**).

Tabela 1- Artigos de revisão bibliográfica.

Referência	Ano	Objetivo	Tipo de Estudo
Zhao, W., Chen, Y., Hu, N., Long, D., & Cao, Y. The uses of zebrafish (<i>Danio rerio</i>) as an in vivo model for toxicological studies: A review based on bibliometrics.	2024	Revisar o uso de zebrafish como modelo in vivo para estudos toxicológicos.	Revisão bibliográfica
Chávez-Hernández, J. A., Velarde-Salcedo, A. J., Navarro-Tovar, G., & Gonzalez, C. Safe nanomaterials: from their use, application, and disposal to regulations	2024	Discutir as aplicações, comportamento e o impacto tóxico de nanomateriais em humanos, animais e meio ambiente.	Revisão bibliográfica
Nguyen, T. v., Kumar, A., & Trang, P. N. The use of fish cell lines as in-vitro ecotoxicological tools: A cellular solution to aquaculture sustainability.	2024	Avaliar o uso de linhagens celulares de peixes como ferramentas ecotoxicológicas.	Revisão bibliográfica
Chávez-Hernández, J. A., Velarde-Salcedo, A. J., Navarro-Tovar, G., & Gonzalez, C. Safe nanomaterials: from their use, application, and disposal to regulations.	2024	Discutir segurança e regulamentação de nanomateriais.	Revisão bibliográfica
Sajjad, H., Sajjad, A., Haya, R. T., Khan, M. M., & Zia, M. Copper oxide nanoparticles: In vitro and in vivo toxicity, mechanisms of action and factors influencing their toxicology.	2023	Analisar e discutir os mecanismos de toxicidade de nanopartículas de cobre em modelos in vivo e in vitro.	Revisão bibliográfica

Referência	Ano	Objetivo	Tipo de Estudo
El-Kady, Maha M. et al. Nanomaterials: A comprehensive review of applications, toxicity, impact, and fate to environment.	2023	Explorar as aplicações, toxicidade, e impactos ambientais dos os nanomateriais.	Revisão bibliográfica
Goswami, M., Yashwanth, B. S., Trudeau, V., & Lakra, W. S. Role and relevance of fish cell lines in advanced in vitro.	2022	Revisar o papel e a importância das linhagens celulares de peixes na pesquisa in vitro avançada.	Revisão bibliográfica
Wang, D., Saleh, N. B., Byro, A., et al. Nano-enabled pesticides for sustainable agriculture and global food security.	2022	Investigar pesticidas nanoestruturados para segurança alimentar.	Revisão bibliográfica
Katoch, S., & Patial, V. Zebrafish: An emerging model system to study liver diseases and related drug discovery.	2021	Explorar o uso do peixe-zebra em estudos de doenças hepáticas	Revisão bibliográfica
Grillo, R., Fraceto, L. F., Amorim, M. J. B., et al. Ecotoxicological and regulatory aspects of environmental sustainability of nanopesticides	2021	Discutir aspectos regulatórios e ecotoxicológicos de nanopesticidas.	Revisão bibliográfica
Singh, A., Dhiman, N., Kar, A. K., et al. Advances in controlled release pesticide formulations: Prospects to safer integrated pest management and sustainable agriculture.	2020	Explorar avanços em formulações de pesticidas de liberação controlada.	Revisão bibliográfica
Usman, M., Farooq, M., Wakeel, A., et al. Nanotechnology in agriculture: Current status,	2020	Examinar desafios e oportunidades da nanotecnologia na agricultura.	Revisão bibliográfica

challenges and future opportunities.

Referência	Ano	Objetivo	Tipo de Estudo
Kah, M., Kookana, R. S., Gogos, A., et al. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues.	2018	Avaliar nanopesticidas e nanofertilizantes comparados a análogos convencionais.	Revisão bibliográfica
Chhipa, H. et al. Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture.	2017	Revisar o desenvolvimento de nanofertilizantes e nanopesticidas e suas aplicações em sistemas de cultivo	Revisão Bibliográfica
Fako, V. E., & Furgeson, D. Y. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity.	2009	Investigar peixe-zebra como modelo preditivo para nanotoxicidade.	Revisão bibliográfica
Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, <i>Danio rerio</i> .	2008	Estudar comportamento e ecologia do peixe-zebra.	Revisão bibliográfica

Fonte: Própria autora

Tabela 2- Artigos de pesquisa experimental.

Referência	Ano	Tipo de linhagem	Objetivo	Tipo de estudo
Morozesk, M., Franqui, L. S., Pinheiro, F. C., et al. Effects of multiwalled carbon nanotubes co-exposure with cadmium on zebrafish cell line: Metal uptake and accumulation, oxidative	2020	ZFL (ZebraFish Liver)	Analisar efeitos de nanotubos de carbono e cádmio em linhagens celulares de peixes.	Pesquisa experimental

stress,
genotoxicity
and cell cycle.

Referência	Ano	Tipo de linhagem	Objetivo	Tipo de estudo
Lungu-Mitea, S., Oskarsson, A., & Lundqvist, J. Development of an oxidative stress <i>in vitro</i> assay in zebrafish (Danio rerio) cell lines.	2018	ZFL (ZebraFish Liver) ZF4 (ZebraFish Embryonic Fibroblast) Pac2(ZebraFish Fibroblast Cells)	Desenvolver ensaio de estresse oxidativo em linhagens celulares de peixe-zebra	Pesquisa experimental
Morozesk, M., Franqui, L. S., Mansano, A. S., et al. Interactions of oxidized multiwalled carbon nanotube with cadmium on zebrafish cell line: The influence of two co-exposure protocols on <i>in vitro</i> toxicity tests.	2018	ZFL (ZebraFish Liver)	Estudar interações de nanotubos de carbono e cádmio em linhagens de peixe-zebra	Pesquisa experimental
Nambi, KS Nathiga et al. Effects of nicotine on zebrafish: a comparative response between a newly established gill cell line and whole gills.	2017	DrG (Danio rerio Gill)	Avaliar os efeitos do tabagismo nos peixes-zebra, comparando as respostas entre uma nova linha celular de brânquias estabelecida e as brânquias inteiras.	Pesquisa experimental

Referência	Ano	Tipo de linhagem	Objetivo	Tipo de estudo
George, S., Gardner, H., Seng, E. K., et al. Differential effect of solar light in increasing the toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles to a fish cell line and titanium dioxide nanoparticles to a fish cell line and zebrafish embryos.	2014	BF-2	Examinar efeitos da luz solar na toxicidade de nanopartículas em linhagens celulares de peixe-zebra.	Pesquisa experimental
Taju, G., Abdul Majeed, S., Nambi, K. S. N., et al. In vitro cytotoxic, genotoxic and oxidative stress of cypermethrin on five fish cell lines.	2014	IEG (Indian Etroplus Gill); CB (Catla Brain); ICG (Labeo catla); LRG (Labeo rohita); CSG (Channa Striatus Gill)	Estudar toxicidade citotóxica e genotóxica de pesticidas em cinco linhagens celulares.	Pesquisa experimental
Marabini, Laura; Caló, Rossella; Fucile, Serena. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2).	2011	RTG-2 (Rainbow Trout Gonad-2)	Investigar os efeitos genotóxicos de quatro congêneres específicos de bifenilos policlorados (PCBs) — PCB 153, 138, 101 e 118, em uma linha celular de peixe (RTG-2).	Pesquisa experimental

Referência	Ano	Tipo de linhagem	Objetivo	Tipo de estudo
KURITA, Kayoko; SAKAI, Noriyoshi. Functionally distinctive testicular cell lines of zebrafish to support male germ cell development.	2004	ZtA6 (ZebraFish tumor-like hypertrophied testis)	Caracterizar linhas celulares testiculares de peixe-zebra com funções distintas no suporte ao desenvolvimento de células germinativas masculinas.	Pesquisa experimental

Fonte: Própria autora.

4 NANOTECNOLOGIA

A história da nanotecnologia ganhou destaque em 1959, quando o físico Richard Feynman propôs a ideia de manipular diretamente átomos, para sintetizar materiais pela primeira vez. Desde então, os investimentos em pesquisas voltadas para o desenvolvimento da nanotecnologia têm crescido significativamente (HERNÁNDEZ, 2023).

Entre 1997 e 2005 o financiamento de pesquisas na área da nanotecnologia, aumentou de 432 milhões de dólares para 4100 milhões. Hoje em dia, este número aumentou substancialmente. Durante a pandemia em 2020, o mercado mundial de nanomateriais foi avaliado em 7,1 bilhões de dólares e chegará a 12,1 bilhões em 2026, com crescimento anual de 9,7% (HERNÁNDEZ, 2023; EL-KADY, 2023).

Com este alto investimento de pesquisas na área da nanotecnologia, surgiu a possibilidade da manipulação e análise de objetos em escalas com dimensões entre 1 e 100nm, os nanomateriais (NMs). No entanto este tamanho pode ser considerado limitado ou arbitrário, e a manipulação desses objetos pode ocorrer em tamanhos maiores (TRAN, 2023).

Os nanomateriais podem ser classificados com base na sua morfologia, composição química, dimensão, uniformidade e aglomeração. Por apresentar ampla diversidade em propriedades físico-químicas, são aplicados em diferentes áreas como medicina (SUN, 2024), biotecnologia (SONG, 2013), agricultura (ZHANG, 2023), e entre outros.





Com base em suas composições químicas os nanomateriais são classificados em nanomateriais à base de carbono, como nanotubos de carbono (**Figura 1**) (MOROZESK, 2018); nanomateriais metálicos em escala nanométrica, como ouro, prata (GEORGE, 2012), e óxidos metálicos, como o dióxido de titânio (GEORGE, 2014); e dendrímeros, que são polímeros com cavidades internas capazes inserir outras moléculas, como no caso de alguns medicamentos (KOLHE, 2006); (GAO, 2010).

Com base em sua morfologia, os nanomateriais assumem formas como nanotubos, nanofios, nanoesferas e nanocápsulas (**Figura 2**). Polímeros biodegradáveis, como lipídeos e proteínas podem funcionar como nanocápsulas,

nanoesferas e nanohidrogéis. A zeína, por exemplo é um tipo de polímero natural, e a principal proteína de reserva no milho, e devido a sua natureza hidrofóbica, com solubilidade variável, permite ser utilizada como nanocápsula (FRACETO 2018). Quitosana, celulose e polilactídeo são outros exemplos de polímeros naturais comuns utilizados na fabricação de nanocápsulas, nanoesferas e nanohidrogéis (WANG 2022).

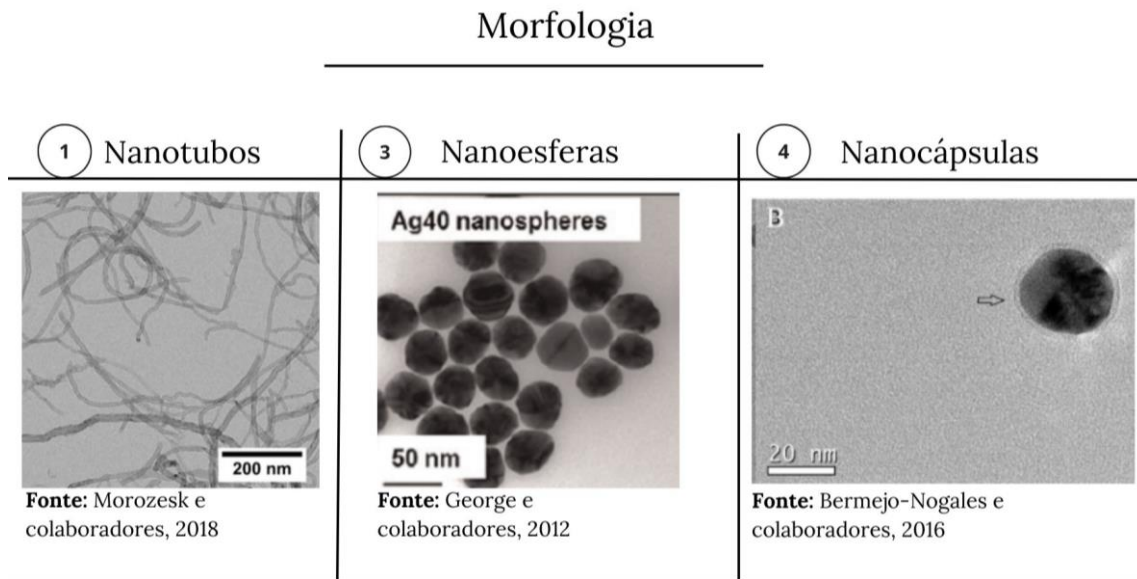
Essa versatilidade reflete em diversos setores da economia, e tem se mostrado promissor no setor agrícola ao aumentar a eficiência dos insumos, e oferecer soluções para problemas ambientais e do agronegócio, além de contribuir para a melhoria da produtividade e segurança alimentar (USMAN 2020).

Figura 1- Classificação quanto à composição química dos nanomateriais.

<u>Composição química</u>		
1	2	3
Metálicos	À base de carbono	Dendrímeros
 ouro	 nanotubos de carbono	 polímeros com cavidades internas
 prata		

Fonte: Própria autora.

Figura 2- Classificação quanto à morfologia dos nanomateriais.



Fonte: Própria autora.

4.1 NANOPESTICIDAS: CONCEITO E APLICAÇÕES

As práticas agrícolas convencionais utilizam pesticidas em sua forma pura ou a granel, esse método resulta na perda significativa dos produtos devido à processos como lixiviação, volatilização e adsorção. Essa dissipação frequente exige reaplicações constantes para garantir o controle de pragas e como consequência, há um aumento na quantidade de compostos livres no ambiente, o que favorece sua entrada nos ecossistemas terrestres e aquáticos (USMAN, 2020).

Esses ambientes, normalmente equilibrados entre os diferentes níveis tróficos, acabam sofrendo impactos com a entrada de pesticidas como a contaminação da água, aumento da resistência de patógenos, bioacumulação em organismos não alvos e maior exposição humana por meio da cadeia alimentar (SINGH, 2020; ZHANG, 2022).

A nanotecnologia tem proporcionado avanços sustentáveis, como o desenvolvimento de nanopesticidas e nanofertilizantes. O conceito por trás dessas inovações está na melhora da entrega e eficácia dos ingredientes ativos por meio de

formulações em escala nanométrica, algo não proporcionado com o uso de pesticidas comumente utilizados (SINGH 2020).

Segundo SINGH (2020), o termo “nanopesticidas” refere-se a sistemas de liberação controlada, nos quais os compostos ativos estão encapsulados em nanocarreadores, geralmente biodegradáveis. Esses nanocarreadores podem ser compostos por nanopartículas “moles”, feitas de polímeros e lipídios sólidos, ou por nanopartículas de sílica, consideradas “duras” (KAH, 2018).

Segundo Wang (2022) e colaboradores, com base em uma revisão de artigos, os materiais encapsulados são, na maioria das vezes, compostos ativos convencionais, como o inseticida “avermectina” e óleos essenciais, derivados de plantas, e também herbicidas, como “atrazina” e “glifosato”. O pesticida atrazina, não nanoencapsulado, gerou respostas variadas ao estresse oxidativo em diferentes linhagens celulares de peixe-zebra (LUNGU, 2018). Esse estudo indica que o uso da atrazina em sua forma convencional pode causar toxicidade significativa em organismos aquáticos que não são o alvo do composto, como peixes, anfíbios e bivalves.

De acordo com artigos de revisão, como o de GRILLO (2021), os nanopesticidas apresentam diferentes formulações, mas compartilham os mesmos objetivos: aumentar a solubilidade aparente de compostos ativos pouco solúveis e liberar esses compostos de forma lenta e gradual, evitando sua degradação prematura. A formulação depende das propriedades do composto ativo, das condições de aplicação e dos objetivos específicos para o controle de pragas.

5 NANOTOXICIDADE

Estudos ainda buscam entender a toxicidade do uso dos nanopesticidas, em sistemas bióticos que não são o alvo principal, como plantas, animais microrganismos, e humanos (TRAN, 2024). Muitos estudos demonstram preocupação em relação ao uso de nanopartículas na agricultura, e em como esses nanomateriais podem influenciar nos ecossistemas aquáticos, visto que este é o destino final da maioria dos

resíduos agroquímicos e industriais (ZHAO, 2021; USMAN, 2020; ZHANG, 2022; MARTINEZ, 2021).

A aplicação generalizada desses compostos resulta na liberação no ambiente natural e, uma vez liberados, estão suscetíveis a sofrer transformações, influenciando o seu destino, transporte, acumulação e toxicidade (YANG, 2023). A entrada desses compostos pode ocorrer através de diferentes fontes de emissão, pontuais ou difusas (**Figura 3**). Exemplo de fontes pontuais são descarte de esgoto, industrial e doméstico, barragens de rejeitos, e criação de gado. Já as fontes difusas são aquelas em que os compostos são liberados em uma vasta área, facilitando a lixiviação desses elementos, pela chuva, e permitindo a entrada em águas naturais superficiais e subterrâneas (SODRÉ, 2012).

A toxicidade de cada nanomaterial pode variar de acordo as suas propriedades individuais (tamanho, estrutura, composição química) combinada a outros compostos presentes nos ambientes, resultando em uma mistura complexa (GAO 2010; MARTINEZ, 2021). Esses fenômenos de “coexposição” ainda são pouco explorados na literatura, mas um exemplo relevante são os nanotubos de carbono, que podem interagir com metais pesados funcionando assim como transportadores desses metais. Aliado ao seu tamanho reduzido e alta reatividade, eles podem facilitar a absorção dos contaminantes pelos animais através das membranas celulares, causando toxicidade (COSTA, 2018; MOROZESK, 2018).

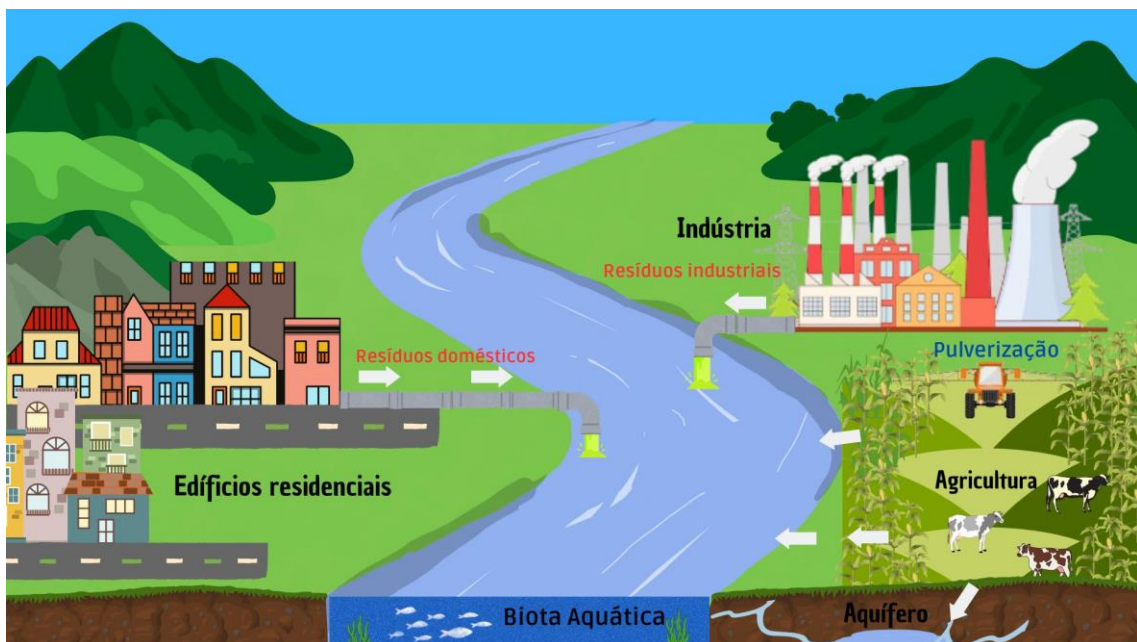
Outro exemplo mostra que a exposição simultânea a nanotubos de carbono em células hepáticas de peixe-zebra (ZFL) a concentrações de 0 a 100 µg/mL e cádmio a concentrações de 5 a 15 µg/mL, levou a uma redução significativa da viabilidade celular, indicando um efeito sinérgico causado pela interação entre os materiais (MOROZESK, 2018).

George (2012), expos embriões de peixe-zebra e uma linhagem de células epiteliais de truta arco-íris (RT-W1) a diferentes tipos de nanopartículas de prata (Ag), em concentrações de 0 a 25 µg/mL, entre elas nanoplacas, nanofios e nanoesferas. Ao expor os embriões de peixe-zebra a essas nanopartículas houve um aumento na falha de eclosão ou mortalidade embrionária. Porém, as nanoplacas de prata apresentaram um nível maior de toxicidade em comparação com as outras nanopartículas testadas, levando a uma taxa de mortalidade de 100% em uma dose de 10 µg/mL.

Portanto, observa-se que, a toxicidade de nanomateriais pode ser prejudicial e apresentar resultados deletérios em diferentes abordagens, tanto *in vitro* (linhagens celulares) quanto *in vivo* (embriões), e em diferentes fases de desenvolvimento, adulta e embrionária, evidenciando sua abrangência de toxicidade.

Esses impactos evidenciam a ampla gama de efeitos que os nanomateriais podem exercer sobre sistemas biológicos, variando conforme suas propriedades e interações ambientais. Além disso, a capacidade de interação desses materiais com contaminantes ressalta a importância de avaliar os efeitos em organismos diretamente expostos e em ecossistemas aquáticos como um todo (TRAN, 2024).

Figura 3- Representação esquemática da entrada de compostos no ambiente aquático através de fontes artificiais. Fontes pontuais em vermelho e fonte difusa em azul.



Fonte: Própria autora

6. POR QUE O PEIXE-ZEBRA?

Alguns modelos de pequenos mamíferos como roedores são muito utilizados em estudos toxicológicos devido a homologia com o genoma humano, porém estabelecer e manter modelos de mamíferos em laboratório, é frequentemente caro e demorado (FAKO 2009). Além disso, a publicação do livro “The principles of humane experimental technique” por Russel e Burch, trouxe como pauta a necessidade da substituição por animais, e a incorporação do princípio dos 3R’s (CANEDO 2021).

Nesse contexto o peixe-zebra surgiu como modelo alternativo promissor para estudos toxicológicos (**Figura 4**). Em 1965, pesquisadores apresentaram resultados relevantes ao utilizarem o peixe-zebra como modelo e testarem a toxicidade do sulfato de zinco (SKIDMORE 1965).

Em 1970 George Streisinger e seu grupo de pesquisa, produziu com sucesso diploides homozigotos do peixe-zebra, permitindo uma análise genética mais detalhada. Comparando com o genoma humano, cerca de 70% dos genes do peixe-zebra apresentaram compatibilidade (FAKO 2009; ZHAO 2024). Essa compatibilidade genética, aliada aos princípios dos 3R's, consolidou o peixe-zebra como um modelo ideal para estudos de toxicidade.

Além das vantagens científicas o peixe-zebra, apresenta características práticas que o torna um excelente modelo biológico. É um peixe de tamanho pequeno, variando entre 3-5 cm de comprimento, de fácil manutenção laboratorial, baixo custo, e alta taxa de reprodução, sendo capaz de fertilizar entre 200-300 ovos a cada ciclo. Ademais, seu rápido desenvolvimento e curto período de maturação sexual (3-5 meses) permitem a obtenção de resultados em um curto período de tempo (CANEDO 2021; ZHAO, 2024).

Quando exposto a compostos químicos, o peixe-zebra demonstra respostas fisiológicas semelhantes às de mamíferos, como a indução de enzimas metabolizadoras e o estresse oxidativo (FAKO, 2009).

Portanto, devido à sua compatibilidade genética, versatilidade experimental, e vantagens científicas o peixe-zebra é reconhecido como um modelo biológico eficiente para estudar os efeitos toxicológicos nos animais que não são alvo de compostos agroquímicos e também os possíveis efeitos nos seres humanos, que também estão suscetíveis a esses compostos.

Figura 4- Modelo adulto de peixe-zebra.



Fonte: Jornal da USP (2018).

7 LINHAGEM CELULAR

A utilização de animais na pesquisa tem sido tema de discussões, especialmente em relação ao elevado número e ao sofrimento causado a eles. Neste contexto, surge então a crescente necessidade de reduzir, refinar e substituir o uso de modelos *in vivo*, baseada nos princípios dos 3R's (SILVA 2015; CANEDO, 2023).

Uma das alternativas reconhecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA, é a realização de testes *in vitro*. Experimentos *in vitro* são muito utilizados na área da toxicologia, buscando avaliar mecanismos de captação e a sensibilidade celular a agentes químicos e físicos. O uso de cultura celulares *in vitro* permite a geração de respostas celulares a estressores ambientais sem a utilização de animais, poupando complicações éticas e logísticas laboratoriais relacionadas à manutenção dos mesmos (NGUYEN 2024).

Entre as vantagens para o estudo da ecotoxicologia, destacam-se a eficiência na reprodução, rapidez na obtenção de resultados em comparação ao uso de animais, menor custo, capacidade de manipular sistematicamente as condições experimentais, e a redução na produção de resíduos (BOLS, 2005).

No entanto, como qualquer método de estudo, também apresenta limitações. Uma das principais dificuldades está no estabelecimento de culturas celulares, que exige condições assépticas rigorosas. As culturas celulares crescem em um tempo mais lento do que os contaminantes comuns como fungos, leveduras, bactérias e vírus, por isso é imprescindível o manejo das células em ambientes controlados e estéreis (FRESHNEY 2010).

As culturas celulares são derivadas de tecidos/órgãos que por meio da desagregação enzimática ou mecânica, originam células dispersas. Existe uma diversidade de tecidos e órgãos utilizados para a confecção de linhagens, cada um atendendo a propósitos específicos (NGUYEN, 2024).

Segundo Nguyen e outros (2024), existem dois tipos de culturas celulares, as culturas celulares primárias e as culturas permanentes ou linhagens celulares estabelecidas. As culturas celulares primárias são células isoladas diretamente de tecidos ou órgãos, cultivadas por um curto período de tempo, e apresentam similaridades ao modelo *in vivo*, porém alguns desafios são encontrados para isolar e manter células primárias (COSTA, 2028; BOLS, 2005).

Já as linhagens celulares estabelecidas ou imortalizadas, são o subcultivo das culturas celulares primárias, podendo ser subcultivadas em série, criopreservadas e usadas de várias maneiras, elas mantêm as características do tecido ou órgão de onde foram derivadas após 100 gerações em cultura, possibilitando estudos de exposição crônica, diferentemente das culturas primárias, mais comumente usadas para exposições agudas (**Figura 4**) (COSTA, 2018; BOLS, 2005).

Existe uma ampla variedade de linhagens celulares de diferentes espécies que podem ser escolhidas para estudos. Porém, na área da toxicologia, as linhagens de peixe destacam-se como as mais utilizadas (GOSWAM, 2021). Essas linhagens oferecem vantagens específicas em relação às culturas de células de mamíferos, como maior adaptação a variações de temperatura e maior tolerância a condições de hipóxia (FRESHNEY 2010; NGUYEN, 2024).

As linhagens de células de peixes são utilizadas para detectar e quantificar expressão de genes, proteínas e metabólitos que servem como biomarcadores para avaliar uma variedade de poluentes, facilitando a compreensão do impacto nos organismos aquáticos (NGUYEN 2024).

Entre os primeiros avanços na utilização de culturas celulares de peixe está o estabelecimento da linhagem RTG-2 derivada da truta-arco-íris (*Oncorhynchus*

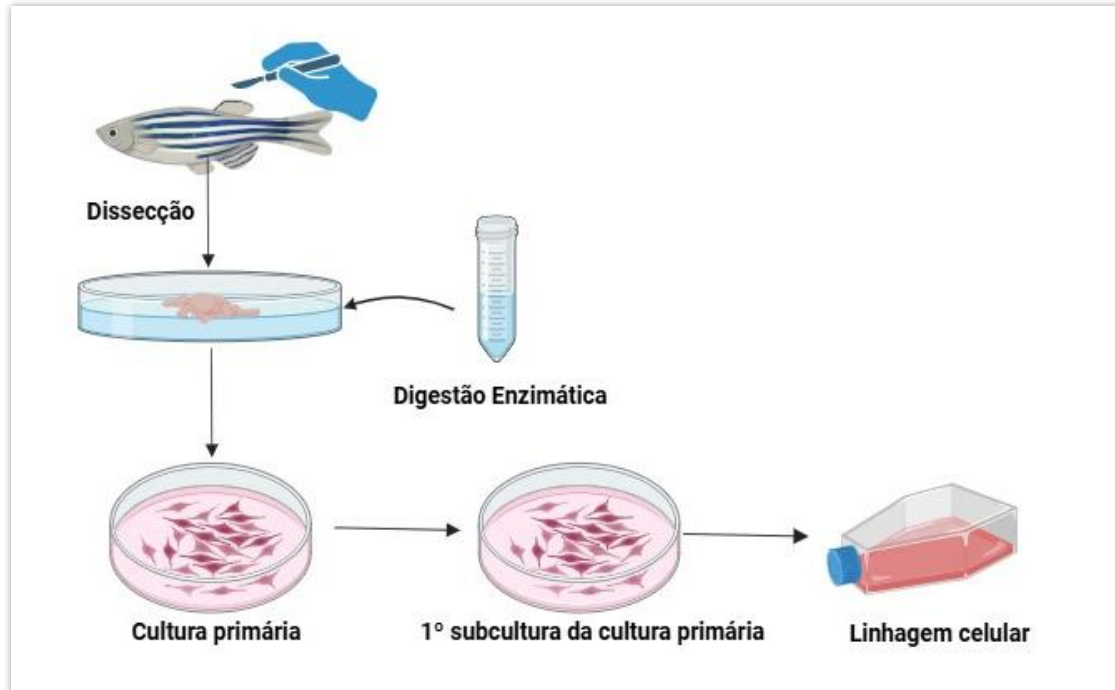
mykiss) (WOLF, 1962). Essa linhagem pioneira foi utilizada em pesquisas toxicológicas e ecotoxicológicas, devido à sua estabilidade genética, ou seja, as células dessa linhagem não sofrem mutações ou alterações espontâneas durante os experimentos, característica essencial para avaliar alterações genéticas causadas por contaminantes ambientais (MARABINI, 2011).

A utilização do tipo linhagem celular irá depender do objetivo do estudo, por exemplo linhagens celulares derivadas do fígado são utilizadas em estudos toxicológicos. Geralmente compostos, convencionais e nanoencapsulados, em exposições agudas e crônicas comprometem a função dos hepatócitos pela danificação das principais organelas celulares como as mitocôndrias, e o retículo endoplasmático, levando ao estresse oxidativo, e conseqüentemente, a morte celular (**Figura 5**). Exemplo dessas linhagens são a RTL-W1 da truta arco-íris e ZFL do peixe-zebra (MOROZESK 2018; COSTA, 2012; KATOCH 2020).

Estudos que investigam a função endócrina e reprodutiva frequentemente utilizam linhagens celulares derivadas de tecidos gonadais (KURITA, 2009). Já as linhagens celulares originadas dos rins são amplamente empregadas em pesquisas voltadas para respostas imunológicas e fisiologia renal (STACHURA, 2009). Por outro lado, células derivadas de brânquias são utilizadas em estudos que buscam compreender a osmorregulação e toxicologia respiratória (GEORGE, 2012; NAMBI, 2017).

Com o passar dos anos e estudos desenvolvidos, diversas vantagens foram identificadas ao utilizar a linhagem celular da espécie *Danio rerio*, popularmente conhecida como peixe-zebra. Entre essas podemos ressaltar a alta compatibilidade genética com o genoma humano, e a capacidade de demonstrar respostas fisiológicas semelhantes aos mamíferos quando expostos a xenobióticos. Com isso, passaram a ser também, uma opção para os estudos de toxicidade (FAKO, 2009). No entanto, estudos com linhagens celulares de peixe-zebra expostos a nanomateriais, ainda é limitado e escasso. A diversidade de tecidos usados ressalta a versatilidade do método *in vitro* em abordar amplas questões científicas em vários setores e assim contribuir ainda mais com pesquisas biológicas.

Figura 4 - Processo de estabelecimento de culturas de células de peixe. A figura ilustra as etapas desde a dissecação do tecido do peixe-zebra, passando pela digestão enzimática para obtenção de células, até a cultura primária. O processo inclui a primeira subcultura da cultura primária, culminando no estabelecimento de uma linhagem celular estável.



Fonte: Própria autora

8 BIOMARCADORES PARA AVALIAR A TOXICIDADE DOS NANOMATERIAS

8.1 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

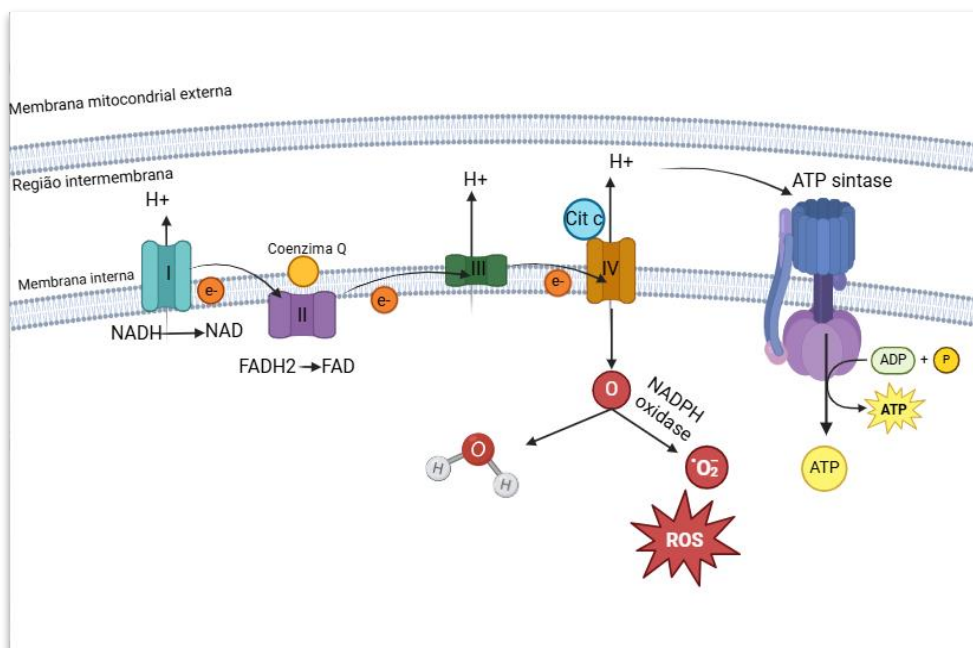
A alta reatividade dos nanomateriais pode afetar os sistemas biológicos por ação direta ou indireta (MEDEIROS 2020), e a avaliação desses impactos é realizada por meio de biomarcadores. Os biomarcadores são alterações biológicas que podem ser avaliadas nos aspectos moleculares, genéticos, bioquímicos, morfológicos e comportamentais. São uma abordagem eficiente nos estudos de ecotoxicologia porque podem gerar respostas em curto espaço de tempo nos organismos quando expostos a situações de estresse (FREIRE, 2008).

Entre os biomarcadores avaliados em linhagens celulares de peixe-zebra podemos citar o estresse oxidativo. Modesto e autores (2010) destacam que espécies

reativas de oxigênio (EROs), como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH), são produtos naturais do metabolismo aeróbio (**Figura 5**). Porém são caracterizadas por serem moléculas altamente reativas, e o aumento da concentração intracelular dessas moléculas devido à exposição a nanomateriais pode desencadear o estresse oxidativo causando inativação enzimática, danos no material genético, e morte celular.

Estudos recentes como o de Lungu e colaboradores (2018), demonstraram que monitorar a resposta ao estresse oxidativo em linhagens celulares de hepatócitos (ZFL), fibroblastos embrionários (ZF4) e fibroblastos (PAC2) são eficazes para avaliar a toxicidade de seis compostos (atrazina, deltametrina, diazinona, diurão, metazacoloro, terbutilazina). O estudo mostrou que o fator de transcrição Nrf2 responsável por ativar genes que codificam enzimas antioxidantes, apresentou variações entre as linhagens celulares. Além disso, entre os seis compostos avaliados, quatro demonstraram aumentar significativamente a atividade de Nrf2. Em outro estudo, Taju e colaboradores (2014), mostraram ainda que linhagens celulares de peixes podem ser usadas para estudar o estresse oxidativo avaliando os níveis de enzimas antioxidantes como glutathiona reduzida total (GSH), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (TAJU, 2014; LUNGU, 2018).

Figura 5- Ilustração esquemática da produção de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias.



Fonte: Própria autora

8.2 BIOMARCADORES DE CITOTOXICIDADE

Outros ensaios, comumente usados para avaliar a toxicidade, são os de viabilidade celular. Em um estudo, Geppert e colaboradores (2021), mostraram a redução da viabilidade celular em células intestinais de peixe quando expostas a nanopartículas de cobre.

Outra nanopartícula metálica que merece atenção é a de titânio, George e outros (2014) relataram respostas de citotoxicidade mediadas pelo estresse oxidativo em células da nadadeira caudal do peixe *Lepomis macrochirus* (BF2), expostas a nanopartículas de titânio. Da mesma forma, Nogales e colaboradores (2016) descreveram que nanopartículas de prata (AgNPs), em concentrações de 20 µg/ml, reduziram significativamente a viabilidade de células de hepatoma de peixe (PLHC-1), causando disfunção mitocondrial e lisossomal. Além disso, Morozesk (2018) observou que a viabilidade celular de hepatócitos de peixe-zebra (ZFL) diminuiu após tratamento com nanotubos de carbono, reforçando a relevância de biomarcadores na investigação de impactos tóxicos causados por nanomateriais em organismos aquáticos.

8.3 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE

Outro biomarcador utilizado em análises toxicológicas é o teste genotóxico que avalia a porcentagem de danos ao DNA. Danos ao material genético causados por agentes tóxicos são geralmente específicos para determinados tecidos e tipos celulares, o que torna essencial o uso de procedimentos que possam identificar esses danos em células individuais (FREIRE, 2008). Nesse contexto, o ensaio do cometa tem se destacado como uma técnica eficaz para avaliações genotóxicas. Esse procedimento baseia-se na lise da membrana celular, seguida pela migração eletroforética do DNA em matriz de agarose em direção ao ânodo, formando uma “cauda” composta por fragmentos de DNA danificados.

Taju e colaboradores (2014) realizaram um experimento em que cinco linhagens celulares de peixe foram expostas ao pesticida cipermetrina por 24 horas.

Os resultados mostraram um aumento proporcional nos danos ao DNA em relação à concentração de cipermetrina (TAJU, 2014; SILVA, 2000).

Com isso, observa-se que a utilização desses biomarcadores obtidos por meio da metodologia *in vitro* contribui significativamente para a compreensão dos efeitos tóxicos de compostos em aspectos citotóxicos, genotóxicos e de estresse oxidativo. Segundo Freire (2008), entre os diversos biomarcadores ecotoxicológicos propostos, aqueles baseados na resposta ao nível molecular e celular, são os que trazem respostas sobre os primeiros sinais de perturbação, por isso são muito importantes na realização do biomonitoramento ambiental.

9 CONCLUSÃO

É evidente os benefícios que a nanotecnologia trouxe na agricultura e em outras áreas, e em como contribui cada vez mais para melhorias na atualidade através da produção de nanomateriais. No entanto, todo composto deve ser estudado e avaliado quanto ao seu potencial impacto. É para isso que a ecotoxicologia serve, a área do estudo que busca entender e avaliar os possíveis riscos da aplicabilidade de produtos químicos/materiais, e em como a aplicação generalizada destes podem interferir nos ecossistemas e nos organismos não-alvo, já que estes acabam obtendo como destino final o ambiente aquático.

O uso de linhagens celulares avançou consideravelmente os estudos ecotoxicológicos fornecendo insights sobre o efeito de nanomateriais, como no caso de nanopartículas, em organismos aquáticos. Evidenciando a necessidade de serem mais exploradas e incentivar o uso desta metodologia nas pesquisas.

A linhagem celular de peixe é uma ferramenta promissora para estudar esses avanços, não só na agricultura, mas na medicina e biotecnologia por exemplo. Embora o peixe-zebra tenha se mostrado um excelente biomonitor e linhagens derivadas dele serem muito utilizadas em outras áreas, os estudos utilizando essas linhagens de células para avaliar os impactos toxicológicos dos nanomateriais, ainda são escassos

na literatura. Nesta revisão bibliográfica apenas 8 artigos de pesquisa experimental abordaram o uso de linhagens celulares de *Danio rerio* para testar nanomateriais/nanopartículas.

Linhagens celulares são sensíveis aos nanomateriais, mostrando resultados de citotoxicidade, genotóxicos, e de estresse oxidativo relevantes. Mesmo as linhagens celulares se mostrando uma metodologia excelente para avaliação da toxicidade, existem desafios e impasses na literatura a respeito do uso destas nos estudos ecotoxicológicos, pela dificuldade em traduzir os resultados *in vitro* e comparar com os cenários *in vivo*, e pelo risco frequente de contaminação da cultura.

REFERÊNCIAS

BERMEJO-NOGALES, Azucena et al. Effects of a silver nanomaterial on cellular organelles and time course of oxidative stress in a fish cell line (PLHC-1). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 190, p. 54-65, 2016.

BOLS, N. C. et al. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. **Biochemistry and molecular biology of fishes**, v. 6, p. 43-84, 2005.

BORBA, João Vitor de et al. Avaliação dos efeitos promovidos pelo estresse agudo e estresse crônico imprevisível sobre o padrão do comportamento exploratório em peixe-zebra. 2023.

CHÁVEZ-HERNÁNDEZ, Jorge Antonio et al. Safe nanomaterials: from their use, application and disposal to regulations. **Nanoscale advances**, 2024.

CHHIPA, Hemraj. Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. **Environmental chemistry letters**, v. 15, p. 15-22, 2017.

FERRERO, M. et al. Characterization of RTG-2 fish cell line by random amplified polymorphic DNA. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 40, n. 1-2, p. 56-64, 1998.

FAKO, Valerie E.; FURGESON, Darin Y. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 6, p. 478-486, 2009.

GEORGE, Saji et al. Differential effect of solar light in increasing the toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles to a fish cell line and zebrafish embryos. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 11, p. 6374-6382, 2014.

GEORGE, Saji et al. Surface defects on plate-shaped silver nanoparticles contribute to its hazard potential in a fish gill cell line and zebrafish embryos. **ACS nano**, v. 6, n. 5, p. 3745-3759, 2012.

GEPPERT, Mark; SIGG, Laura; SCHIRMER, Kristin. Toxicity and translocation of Ag, CuO, ZnO and TiO₂ nanoparticles upon exposure to fish intestinal epithelial cells. **Environmental Science: Nano**, v. 8, n. 8, p. 2249-2260, 2021.

GOSWAMI, M. et al. Role and relevance of fish cell lines in advanced in vitro research. **Molecular Biology Reports**, p. 1-19, 2022.

GRILLO, Renato et al. Ecotoxicological and regulatory aspects of environmental sustainability of nanopesticides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 404, p. 124148, 2021.

KAH, Melanie et al. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. **Nature nanotechnology**, v. 13, n. 8, p. 677-684, 2018.

KATOCH, Swati; PATIAL, Vikram. Zebrafish: An emerging model system to study liver diseases and related drug discovery. **Journal of applied toxicology**, v. 41, n. 1, p. 33-51, 2021.

KOLHE, Parag et al. Preparation, cellular transport, and activity of polyamidoamine-based dendritic nanodevices with a high drug payload. **Biomaterials**, v. 27, n. 4, p. 660-669, 2006.

KURITA, Kayoko; SAKAI, Noriyoshi. Functionally distinctive testicular cell lines of zebrafish to support male germ cell development. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 67, n. 4, p. 430-438, 2004.

LEE, Lucila EJ et al. Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. **Cell biology and toxicology**, v. 9, p. 279-294, 1993.

LUNGU-MITEA, Sebastian; OSKARSSON, Agneta; LUNDQVIST, Johan. Development of an oxidative stress in vitro assay in zebrafish (*Danio rerio*) cell lines. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 12380, 2018.

MARTINEZ, Diego Stéfani T. et al. Daphnia magna and mixture toxicity with nanomaterials—Current status and perspectives in data-driven risk prediction. **Nano Today**, v. 43, p. 101430, 2022.

MARABINI, Laura; CALÒ, Rossella; FUCILE, Serena. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 5, p. 1045-1052, 2011.

MOROZESK, Mariana et al. Interactions of oxidized multiwalled carbon nanotube with cadmium on zebrafish cell line: The influence of two co-exposure protocols on in vitro toxicity tests. **Aquatic Toxicology**, v. 200, p. 136-147, 2018.

MOROZESK, Mariana et al. Effects of multiwalled carbon nanotubes co-exposure with cadmium on zebrafish cell line: metal uptake and accumulation, oxidative stress, genotoxicity and cell cycle. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 202, p. 110892, 2020.

NAMBI, KS Nathiga et al. Effects of nicotine on zebrafish: a comparative response between a newly established gill cell line and whole gills. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 195, p. 68-77, 2017.

NGUYEN, Thao V.; KUMAR, Anu; TRANG, Phan Nguyen. The use of fish cell lines as in-vitro ecotoxicological tools: A cellular solution to aquaculture sustainability. **Aquaculture**, p. 741302, 2024.

NONE. United States Government Accountability Office report on nanotechnology: nanomaterials are widely used in commerce, but EPA faces challenges in regulating risk. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 16, n. 4, p. 525-539, 2010.

RIBEIRO, Ondina Martins et al. O peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo emergente na ecotoxicologia. **Revista de Ciência Elementar**, v. 10, n. 2, 2022.

SAJJAD, Humna et al. Copper oxide nanoparticles: In vitro and in vivo toxicity, mechanisms of action and factors influencing their toxicology. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 271, p. 109682, 2023.

SILVA, Juliana da et al. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 241-245, 2000.

SODRÉ, Fernando Fabríz. Fontes Difusas de Poluição da Água: Características e métodos de controle. **Agricultura**, v. 1, n. 2o, p. 3o, 2012.

SINGH, Amrita et al. Advances in controlled release pesticide formulations: Prospects to safer integrated pest management and sustainable agriculture. **Journal of hazardous materials**, v. 385, p. 121525, 2020.

STACHURA, David L. et al. Zebrafish kidney stromal cell lines support multilineage hematopoiesis. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 114, n. 2, p. 279-289, 2009.

SPENCE, Rowena et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

SONG, Yanchao et al. Parallel comparative studies on the toxic effects of unmodified CdTe quantum dots, gold nanoparticles, and carbon nanodots on live cells as well as green gram sprouts. **Talanta**, v. 116, p. 237-244, 2013.

SUN, Yi-zhen et al. Recent advances in the application of nanomaterials for separation and enrichments of small molecule active ingredients of traditional Chinese medicine. **Microchemical Journal**, v. 207, p. 111827, 2024.

TAJU, G. et al. In vitro cytotoxic, genotoxic and oxidative stress of cypermethrin on five fish cell lines. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 113, p. 15-24, 2014.

USMAN, Muhammad et al. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of the total environment**, v. 721, p. 137778, 2020.

ZHANG, Yueyang; GOSS, Greg G. Nanotechnology in agriculture: Comparison of the toxicity between conventional and nano-based agrochemicals on non-target aquatic species. **Journal of Hazardous Materials**, v. 439, p. 129559, 2022.

ZHAO, Weichao et al. The uses of zebrafish (*Danio rerio*) as an in vivo model for toxicological studies: A review based on bibliometrics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 272, p. 116023, 2024.

WANG, Jiafan et al. Necessity and approach to integrated nanomaterial legislation and governance. **Science of the total environment**, v. 442, p. 56-62, 2013.

WANG, Dengjun et al. Nano-enabled pesticides for sustainable agriculture and global food security. **Nature nanotechnology**, v. 17, n. 4, p. 347-360, 2022.

WOLF, Ken; QUIMBY, M. C. Established eurythermic line of fish cells in vitro. **Science**, v. 135, n. 3508, p. 1065-1066, 1962.

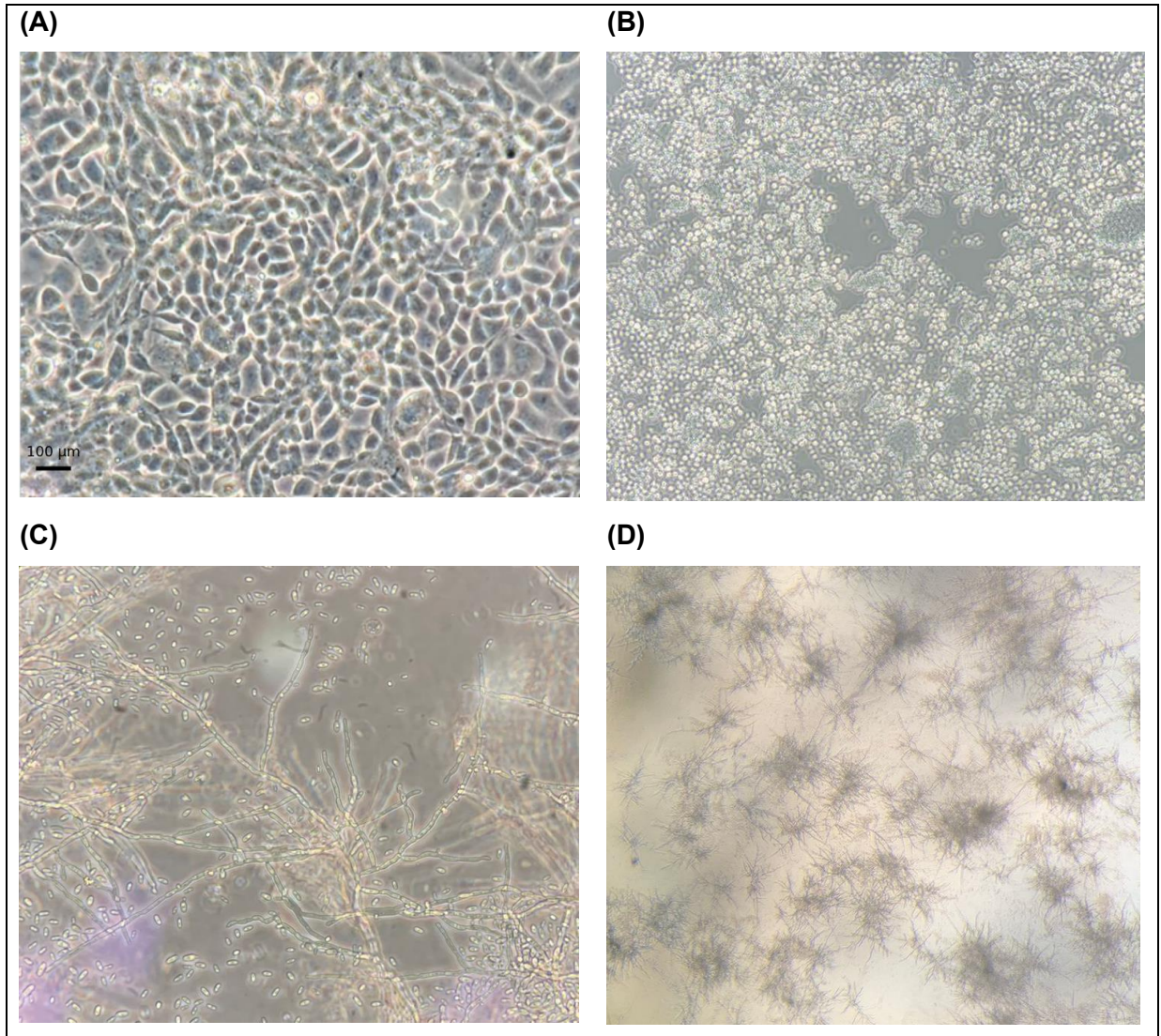
APÊNDICE

Inicialmente o objetivo desse estudo era identificar os efeitos citotóxicos (MTT e Método de exclusão com azul de Tripán), bioquímicos (ERO e CAOT) e genotóxicos (ensaio do cometa alcalino) de um composto orgânico (geraniol) nanoencapsulado na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL). Para isso foi necessário a manutenção da linhagem celular fornecida pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG). O cultivo da linhagem celular ocorreu em frascos de cultura celular de 25 cm², e foram mantidos em uma estufa sem adição de CO₂ e a 28°C. Primeiramente a composição do meio de cultura foi 50% de meio Leibovitz L-15 (Gibco), 40% de meio RPMI 1640 (Gibco) e 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco). No entanto, após situações de contaminação foi adicionada ao meio 1% de penicilina-estreptomicina-anfotericina (Sigma-Aldrich).

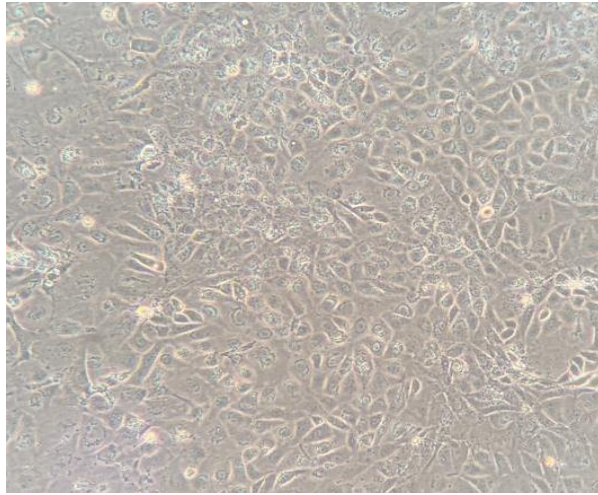
A linhagem celular permanente é caracterizada por apresentar fases de crescimento: fase lag, fase log e fase estacionária, e este período de crescimento dura 72h. Portanto a manutenção do meio foi feita a cada dois dias, e a verificação quanto a morfologia celular, presença ou ausência de contaminação, diariamente. À medida que as células cresceram a densidade aumentava, e para manter o crescimento celular era necessário realizar repiques utilizando tripsina a 0,125%. No entanto, após alguns repiques, foi observada dificuldade no desprendimento dos hepatócitos, o que levou ao aumento da concentração de tripsina para 0,25%.

Durante o experimento, foram enfrentados alguns desafios como contaminações recorrentes por bactérias e fungos, as quais ocorreram em quatro ocasiões. Para mitigar o problema, diversas medidas foram adotadas, incluindo a troca dos filtros HEPA do fluxo laminar, mudança da localização do fluxo laminar, para evitar o fluxo de ar direto, esterilização completa de todos os materiais na autoclave, aquisição de novas pipetas, filtragem dos meios de cultura e da tripsina, além da adição de antibiótico. Embora as contaminações tenham sido amenizadas, outro fator não identificado interferiu no crescimento celular. As células apresentaram um grande número de grânulos (**figura 5 (E)**) e não estavam aderidas ao frasco. Com um número insuficiente de células para a realização das análises, somado a falta de tempo, a conclusão do estudo não foi possível.

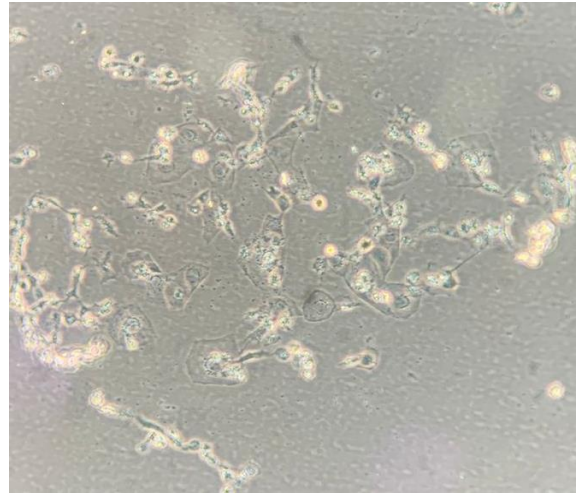
Figura 5- Imagens da linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL). (A) Células aderidas com crescimento normal (aumento de 400x). (B) Células contaminadas com leveduras (aumento de 400x); (C) (aumento de 400x) e (D) (aumento de 100x), células contaminadas com fungos; (E) Células com grânulos (aumento de 400x); (F) Células com crescimento prejudicado e não aderidas (aumento de 400x).



(E)



(F)



Fonte: Própria autora.