

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

KAROLINE DA SILVA ALVES

**TOXICIDADE EMBRIOLARVAL EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) APÓS  
EXPOSIÇÃO AO PONTO QUÂNTICO ULTRA PEQUENO DE  
NÚCLEO/CASCA DE CdSe/CdS**

MACEIÓ – ALAGOAS

2023

KAROLINE DA SILVA ALVES

**TOXICIDADE EMBRIOLARVAL EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) APÓS  
EXPOSIÇÃO AO PONTO QUÂNTICO ULTRA PEQUENO DE  
NÚCLEO/CASCA DE CdSe/CdS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lázaro Wender Oliveira de Jesus

Co-orientadora: Profa. Dra. Jerusa Maria de OliveirA

MACEIÓ – ALAGOAS

2023

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

A474t Alves, Karoline da Silva  
Toxicidade embrionarval em Zebrafish (*Danio rerio*) após exposição ao ponto quântico ultra pequeno de núcleo/casca de CdSe/CdS / Karoline da Silva Alves. – Maceió, 2023.  
40 f. : il.

Orientador: Lázaro Wender Oliveira de Jesus.

Coorientadora: Jerusa Maria de Oliveira.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: licenciatura) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 35-40.

1. Toxicidade. 2. Peixe-Zebra. 3. Seleneto de cádmio. 4. Sulfeto de cádmio. 5. Nanopartículas. 6. Corantes fluorescentes. I. Título.

CDU: 597.554.3

## Folha de Aprovação

KAROLINE DA SILVA ALVES

### Toxicidade embriolarval em zebrafish (*Danio rerio*) após exposição ao ponto quântico ultra pequeno de núcleo/casca de CdSe/CdS

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à banca examinadora do curso de Ciências Biológicas Licenciatura da Universidade Federal de Alagoas e aprovado em 28 de março de 2023.

Documento assinado digitalmente  
 LAZARO WENDER OLIVEIRA DE JESUS  
Data: 03/04/2023 19:57:21-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Orientador - Prof. Dr. Lázaro Wender Oliveira de Jesus  
Universidade Federal de Alagoas - ICBS

#### Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 ANIELLE CHRISTINE ALMEIDA SILVA  
Data: 04/04/2023 07:55:40-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Examinadora – Profa. Dra. Anielle Christine Almeida Silva  
Universidade Federal de Alagoas- IF

Documento assinado digitalmente  
 LUCAS ANHEZINI DE ARAUJO  
Data: 05/04/2023 17:00:31-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Examinador – Prof. Dr. Lucas Anhezini de Araújo  
Universidade Federal de Alagoas - ICBS

## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO .....</b>	<b>6</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>3. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1 NANOTECNOLOGIA E NANOPARTÍCULAS .....</b>	<b>8</b>
<b>3.2 PONTOS QUÂNTICOS ULTRA PEQUENOS (PQUPS) DE NÚCLEO     E CASCA DE CDSE/CDS .....</b>	<b>10</b>
<b>3.3 ZEBRAFISH COMO SISTEMA MODELO NA AVALIAÇÃO     TOXICOLÓGICA.....</b>	<b>13</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>19</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS PQUPS .....</b>	<b>20</b>
<b>5.2 MANEJO DOS ANIMAIS ADULTOS E COLETA DOS     EMBRIÕES .....</b>	<b>20</b>
<b>5.3 TESTE DE TOXICIDADE EMBRIOLARVAL NO SISTEMA     MODELO ZEBRAFISH .....</b>	<b>21</b>
<b>5.4 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS .....</b>	<b>22</b>
<b>5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>	<b>23</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>36</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS .....</b>	<b>37</b>

## 1. RESUMO

A nanotecnologia é o campo da ciência que lida com o desenvolvimento de estratégias para o rastreamento, detecção, diagnóstico e, eventualmente, terapêuticas com base em partículas na faixa nanométrica. Dentro do extenso grupo de nanopartículas, os pontos quânticos ultra pequenos com núcleo e casca de seleneto de cádmio/sulfeto de cádmio (PQUP CdSe/CdS) apresentam potencial para uso em múltiplas áreas, uma vez que se destacam principalmente em suas propriedades fluorescentes, permitindo o uso como sondas fluorescentes em sistemas biológicos. Utilizando como modelo animal o zebrafish (*Danio rerio*), esse trabalho avaliou a potencial toxicidade embrionária e possíveis alterações morfológicas após a exposição aos PQUP CdSe/CdS nas concentrações de 0,0; 0,1; 1,0; 10,0 e 20,0 µg/mL ao longo de 144 h. Os dados obtidos após a avaliação de parâmetros letais, não letais, morfofisiológicos e morfológicos demonstraram que nas condições experimentais adotadas estas nanopartículas apresentam acentuada toxicidade ao longo do desenvolvimento embrionário do zebrafish, do tipo concentração-dependente. Em conjunto, tais dados chamam atenção para a necessidade de se esclarecer os mecanismos de ação destes pontos quânticos em diferentes órgãos, tecidos e tipos celulares em modelos de animais vertebrados, para uma avaliação toxicológica mais detalhada e identificação de concentrações de uso com menor toxicidade.

**Palavras-chave:** Toxicologia, zebrafish, CdSe, nanopartículas, sondas fluorescentes.

## 2. ABSTRACT

Nanotechnology is the field of science that deals with the development of strategies for tracking, detection, diagnosis and eventually therapeutics based on particles in the nanometer range. Within the extensive group of nanoparticles, ultra-small quantum dots with cadmium selenide/cadmium sulfide (USQD CdSe/CdS) core and have potential for use in multiple areas, since they stand out mainly in their fluorescent properties, allowing use as fluorescent probes in biological systems. Using zebrafish (*Danio rerio*) as animal model, this work evaluated the potential embryolarval toxicity and possible morphometric changes after exposure to USQD CdSe/CdS at concentrations of 0.0; 0.1; 1.0; 10.0 and 20.0 µg/mL over 144 h. The data obtained after the evaluation of lethal, non-lethal, morphophysiological and morphometric parameters showed that in the experimental conditions adopted these nanoparticles present accentuated toxicity during the embryolarval development of zebrafish, with a concentration-dependent pattern. Taken together, these data draw attention to the need to clarify the mechanisms of action of these quantum dots in different organs, tissues and cell types in vertebrate animal models, for a more detailed toxicological evaluation and identification of use concentrations with less toxicity.

**Keywords:** Toxicologia, zebrafish, CdSe, nanopartículas, sondas fluorescentes.

### 3. INTRODUÇÃO

#### 3.1. Nanotecnologia e nanopartículas

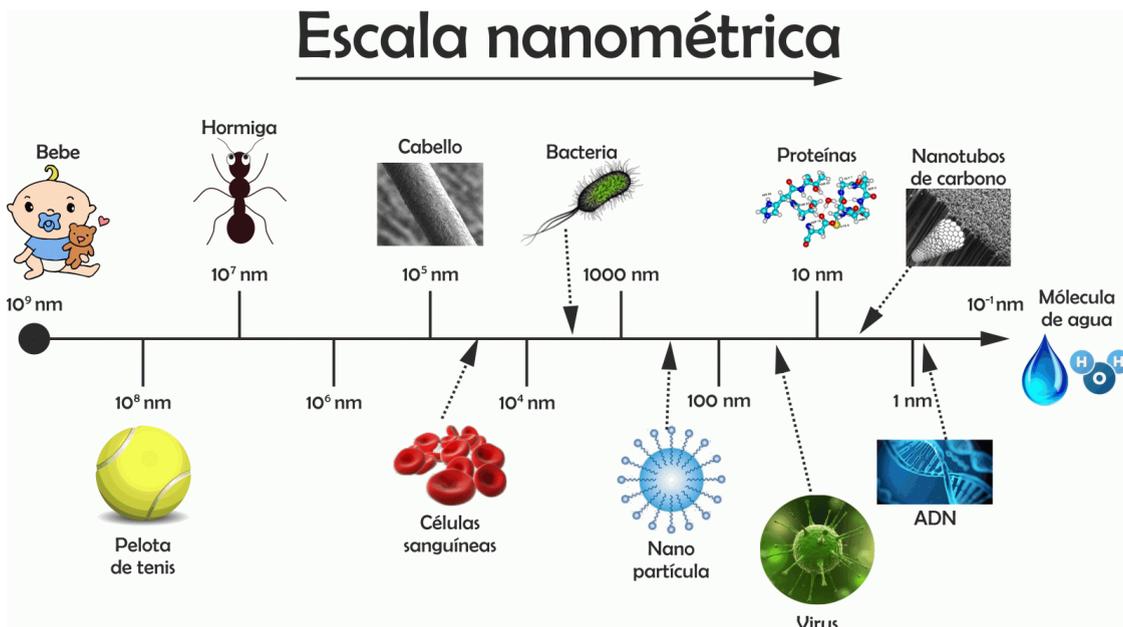
Nos últimos anos, houve um crescimento exponencial da pesquisa e de suas aplicações no campo da Nanociência e da Nanotecnologia (Saraiva et al., 2022). O físico norte-americano Richard Phillips Feynman (1918-1988) elaborou o conceito de nanotecnologia pela primeira vez em uma palestra em 29 de dezembro de 1959. Apesar de não citar precisamente a palavra nanotecnologia, na ocasião o pesquisador já citou sobre a manipulação e controle em escala atômica e rearranjo de átomos (Ciência Hoje, 2007).

A palavra nanotecnologia define-se como o processamento, separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou por uma molécula. Os nanomateriais resultantes, a exemplo das nanopartículas, são caracterizados por partículas com dimensões nanométricas com diferentes características físicas, químicas ou mecânicas, dependendo do material de sua origem (Matea et al., 2017). É importante salientar que a nanotecnologia manipula apenas nanomateriais manufaturados, projetados especificamente em sua escala nanométrica (Gemal; Delgado; Duarte, 2013).

É possível identificar a utilização de nanopartículas nos períodos mais antigos da humanidade devido a processos físicos, químicos e biológicos presentes na natureza. Os alquimistas egípcios usavam o “elixir de longa vida” para ter longevidade em meados de 4000 anos a.C. Esse elixir era formado basicamente por partículas de ouro de 1-100 nm (Rangel; Ferreira, 2009).

Utilizando da nanotecnologia na produção da tinta nanquim, os chineses utilizavam nanopartículas de carvão em solução aquosa. Além disso, na Europa, os vitrais das igrejas medievais possuíam na formação dos vidros, nanopartículas de ouro. A Taça de Licurgus, do século IV d.C., era composta por nanopartículas de ouro e prata. Dessa forma, fica evidenciado que as nanopartículas já estão presentes e sendo utilizadas pela humanidade há milhares de anos (Rangel; Ferreira, 2009).

A Figura 1 apresenta algumas dimensões em diferentes escalas representados em átomos e moléculas, vírus, hemácias e em fios de cabelos. É interessante observar que um fio de cabelo é 10 mil vezes mais grosso que um nanotubo de carbono.



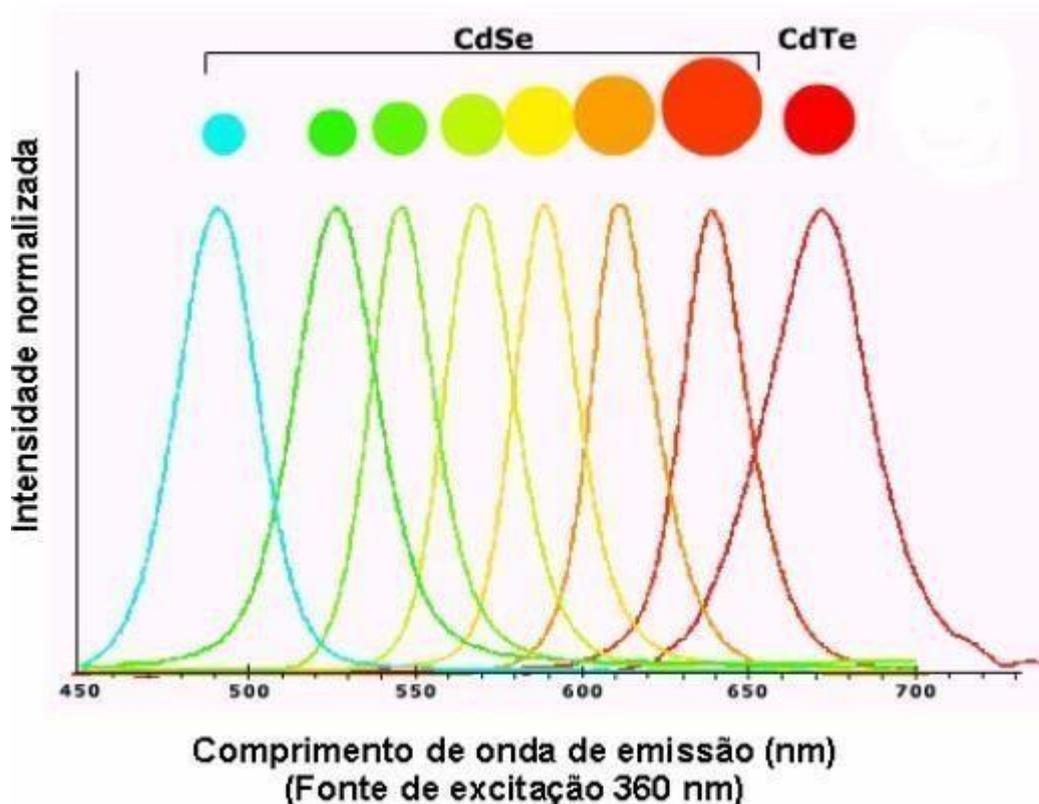
**Figura 1. Tamanho representativo de alguns elementos nas imagens e suas diferentes escalas. Fonte: cienciaesculturaramiro.wordpress.com. Ferreira, V.B (2018).**

A nanotecnologia é uma área da ciência que tem se destacado bastante ao longo dos anos em diversas ramificações por utilizar a matéria numa escala atômica e molecular. Dentre as várias áreas que utilizam esse tipo de tecnologia avançada, destacam-se a medicina, biologia, farmacologia, física, biomedicina, química e engenharia dos materiais (Chan et al., 2002). Dentre as diversas aplicações da nanotecnologia e seus nanomateriais podemos exemplificar a obtenção de imagens biomédicas *in vivo* e localização de células específicas, para elucidar os processos biológicos. (Yang et al., 2007). Além disso, os nanomateriais também podem ser utilizados na localização de alvos biológicos que são analisados através da microscopia de fluorescência (Li, et al., 2019). Na engenharia de materiais, os nanomateriais podem ser utilizados na fabricação de vidros coloridos e na utilização dos nanomateriais em microprocessadores (Gemal; Delgado; Duarte, 2013).

O impacto que os materiais nanoestruturados têm causado na pesquisa biomédica e industrial é profundo, sendo que uma das aplicações mais interessantes são as nanopartículas passíveis de imageamento, principalmente os pontos quânticos semicondutores luminescentes (Silva et al., 2016), os quais compreendem os cristais inorgânicos semicondutores de tamanho nanométrico de nova geração (Reshma; Mohanan, 2019).

### 3.2. Pontos quânticos ultra pequenos (PQUPs) de núcleo e casca de CdSe/CdS

Os pontos quânticos ultra pequenos de núcleo e casca de seleneto de cádmio/sulfeto de cádmio (PQUP CdSe/CdS) são uma categoria de nanopartículas que possuem tamanhos extremamente pequenos ( $\leq 2$  nm), estabilidade de tamanho e intensa luminescência (Jamieson et al. 2007). Os PQUP CdSe/CdS apresentam luminescência no espectro da luz visível e a depender do tamanho é possível sintonizar a cor emitida, variando do azul ao vermelho, como mostrado na figura 2 (Chaves, 2011).

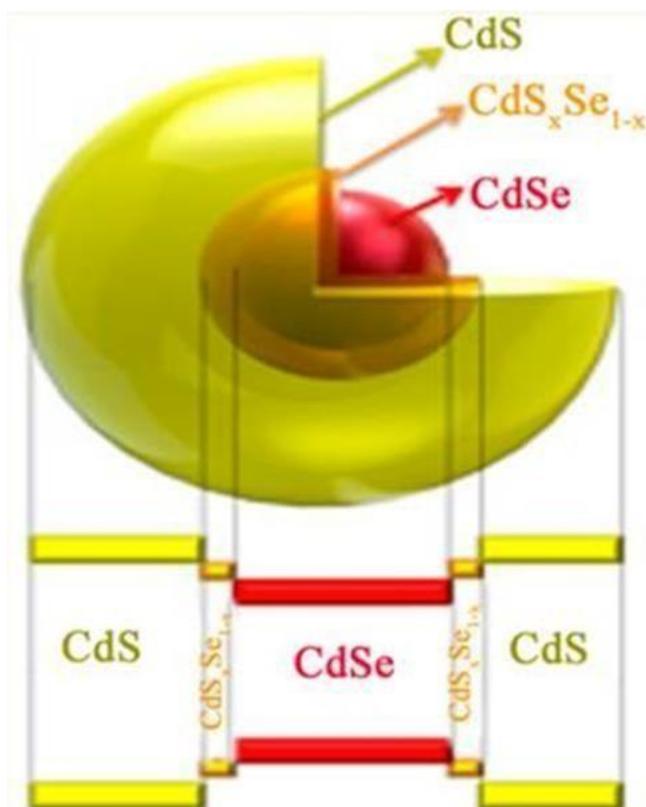


**Figura 2.** Esquema representativo do ponto quântico ultra pequeno com dependência do espectro de emissão com diâmetro da partícula. Fonte: Chaves (2011, p 38)

Os pontos quânticos são úteis como sondas fluorescentes em sistemas biológicos. Todavia, eles são citotóxicos devido à sua composição química. Estudos utilizando os pontos quânticos de tamanho mágico de CdSe evidenciaram o controle da citotoxicidade em decorrência da densidade dos efeitos de superfície. Alterando as concentrações de

selênio (Se) durante sua síntese, os tornaram mais seguros para a utilização como sondas de fluorescência em sistemas biológicos (Silva et al., 2014).

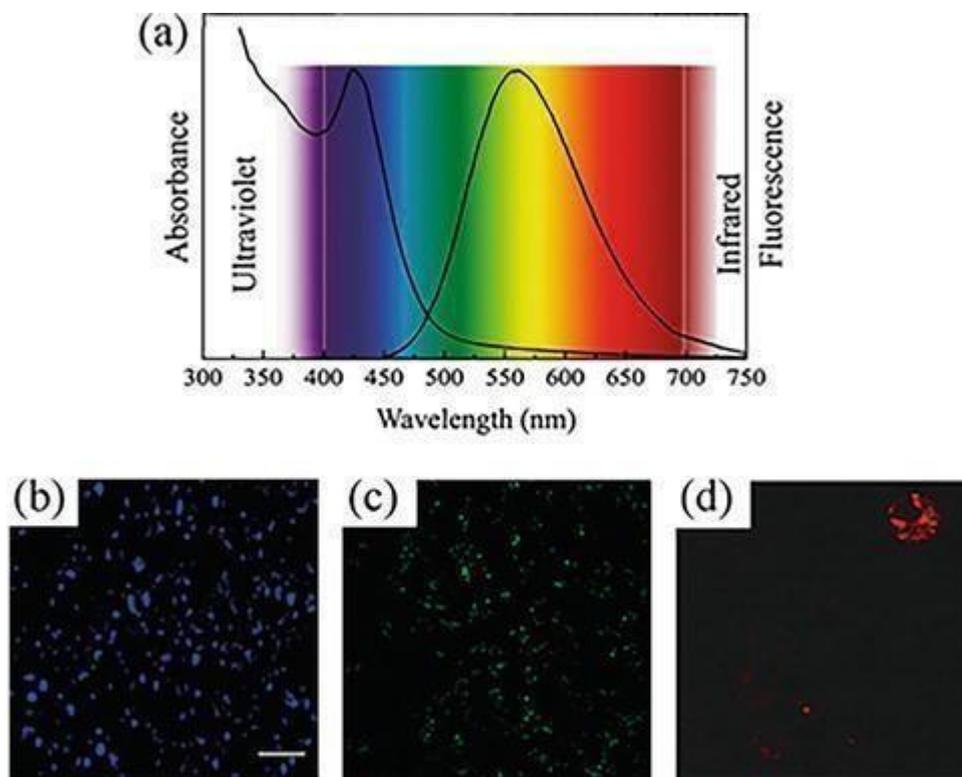
Além disso, Silva et al (2014) demonstraram que ao adicionar uma casca de CdS ao redor dos pontos quânticos de CdSe foi possível identificar uma melhora na intensidade de sua luminescência e na sua biocompatibilidade, como ilustra a figura 3. Outra característica interessante dos pontos quânticos ultra pequenos de cádmio e selênio é a possibilidade de monitorar sua luminescência em função do tempo (Silva, et al., 2018).



**Figura 3. Esquema representativo do ponto quântico ultra pequeno com cobertura e casca de CdSe/CdS e suas camadas. Fonte: Silva et al. (2014).**

Estudos prévios demonstraram que há sucesso na exploração de possíveis terapias para cânceres de mama triplo negativo com ferramentas teranósticas inexploradas, especificamente rastreando três principais alvos tumorais acoplados com pontos quânticos de tamanho mágico de CdSe/CdS em células tumorais (Silva et al., 2014). A

figura 4 ilustra as aplicações dos pontos quânticos de CdSe/CdS bioconjugados e usados como marcação biológica.



**Figura 4. Absorção e espectros de fluorescência dos pontos quânticos de tamanho mágico de CdSe/CdS (a) e imagens de fluorescência em células usando os filtros de detecção azul, verde e vermelho, respectivamente (b), (c) e (d). Fonte: Silva et al. (2022).**

O ponto quântico ultrapequeno de seleneto de cádmio (PQUP CdSe) também possui outras características importantes, tais como propriedades antioxidantes e modulação na resposta inflamatória na artrite reumatóide experimental. Além de serem mais biocompatíveis, possuem alta capacidade de ligação com proteínas, os tornando importantes biomarcadores para sistemas imunológicos com luminescência estável (Saraiva et al., 2022).

A composição química do núcleo do ponto quântico e a composição da camada de cobertura externa são fatores vitais na influência da toxicidade do ponto quântico em termos de propriedades químicas. A evolução da nanotecnologia introduziu novos aspectos da toxicidade do cádmio aplicada a ambientes clínicos. Estudos realizados por Ghaderi et al. (2011) sugerem que a toxicidade do cádmio provém do núcleo e é provável

que contribua significativamente para a toxicidade do ponto quântico em estudos em geral.

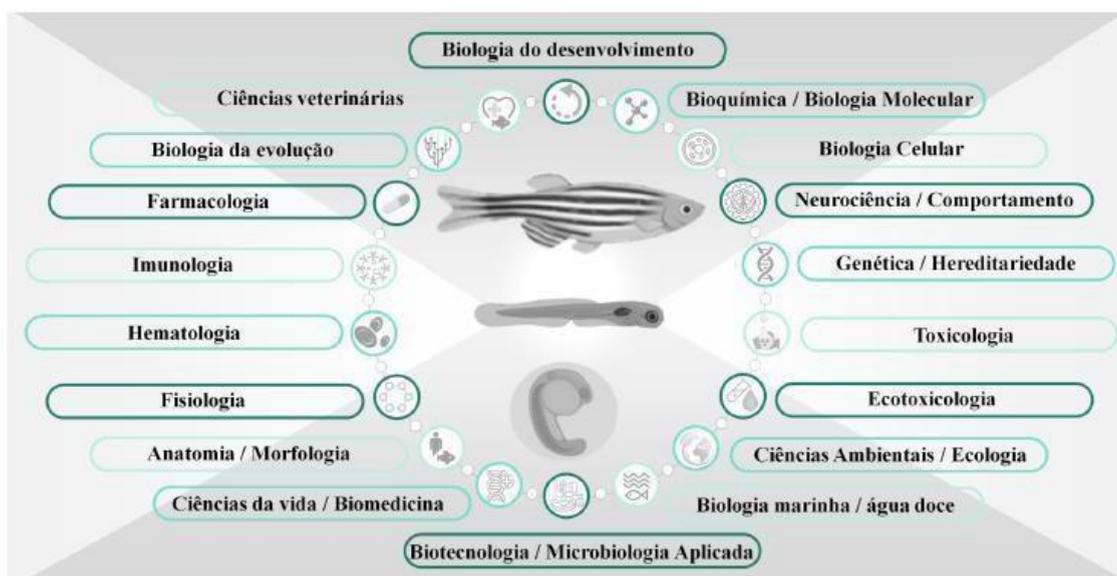
Apesar do potencial de utilização, a toxicidade relacionada aos pontos quânticos ainda é um obstáculo por existirem escassos estudos a respeito, abrindo margem para novas pesquisas experimentais de cunho toxicológico (Rocha et al., 2017). Embora os pontos quânticos de seleneto de cádmio (CdSe) serem os mais usados devido ao seu alto teor de luminescência (Surana, et al., 2014), às consequências em decorrência de suas aplicações ainda são escassas na literatura, sendo essencial a realização de estudos mais aprofundados sobre o tema (Rocha., et al 2017).

O potencial toxicológico do ponto quântico levanta questões quanto a sua aplicação, pois a sua toxicidade está relacionada a diversos fatores, incluindo sua composição química, forma, estrutura e sua concentração (Li, et al., 2019). Estudos anteriores *in vitro* indicam que os pontos quânticos têm a capacidade de induzir citotoxicidade em diferentes linhagens celulares, reduz a viabilidade celular, gera espécies reativas de oxigênio, causa danos no DNA, mitocondrial e morte celular (Duong et al., 2018).

Embora experimentos *in vitro* tenham identificado um certo nível de toxicidade causado pelos pontos quânticos de tamanho mágico de CdSe/ZnS, essas análises não correspondem às interações biológicas que acontecem *in vivo* (Li, et al., 2019). Estudos *in vivo* utilizando embriões de peixes das espécies *Oncorhynchus mykiss*, *Trichogaster leerii* e *Danio rerio* detectaram toxicidade no desenvolvimento embrionário e pós embrionário quando expostos ao ponto quântico de tamanho mágico (MSQDs) de seleneto de cádmio (CdSe) com sulfeto de zinco (ZnS) (Rotomskis et al, 2018).

### **3.3. Zebrafish como sistema modelo para avaliação toxicológica**

O peixe teleósteo *Danio rerio*, conhecido por paulistinha ou zebrafish, é um organismo modelo amplamente utilizado em diversas áreas do campo científico (Figura 5), como na biologia do desenvolvimento, farmacologia, toxicologia, ecotoxicologia, nanomedicina, saúde humana, entre outros, sendo caracterizado assim como um sistema modelo global (Canedo, et al., 2022).



**Figura 5. Algumas áreas da ciência em que o peixe *D. rerio* (zebrafish) tem sido utilizado como modelo animal. Fonte: Canedo et al. (2022).**

O zebrafish é oriundo do sul e sudeste da Ásia e possui propensão por águas rasas e vegetativas. Além disso, o zebrafish também pode ser encontrado em valas, tanques de irrigação artificial e até mesmo riachos. Essa diversidade de habitats do zebrafish possibilita que ele tenha uma alta tolerância em relação às alterações ambientais, visto que esses ambientes possuem diferentes tipos de propriedades físico-químicas (salinidade, temperatura, pH) (Lawrence, 2007).

O zebrafish possui diversas características que o possibilitam ser um animal modelo para estudos em diversas aplicações, dentre elas o seu tamanho, que na fase adulta chega a 40 mm de comprimento. Características como facilidade e baixo custo de manutenção, alta taxa reprodutiva e rápido desenvolvimento também são fatores determinantes para escolha dessa espécie como animal modelo (Kimmeal et al., 1995).

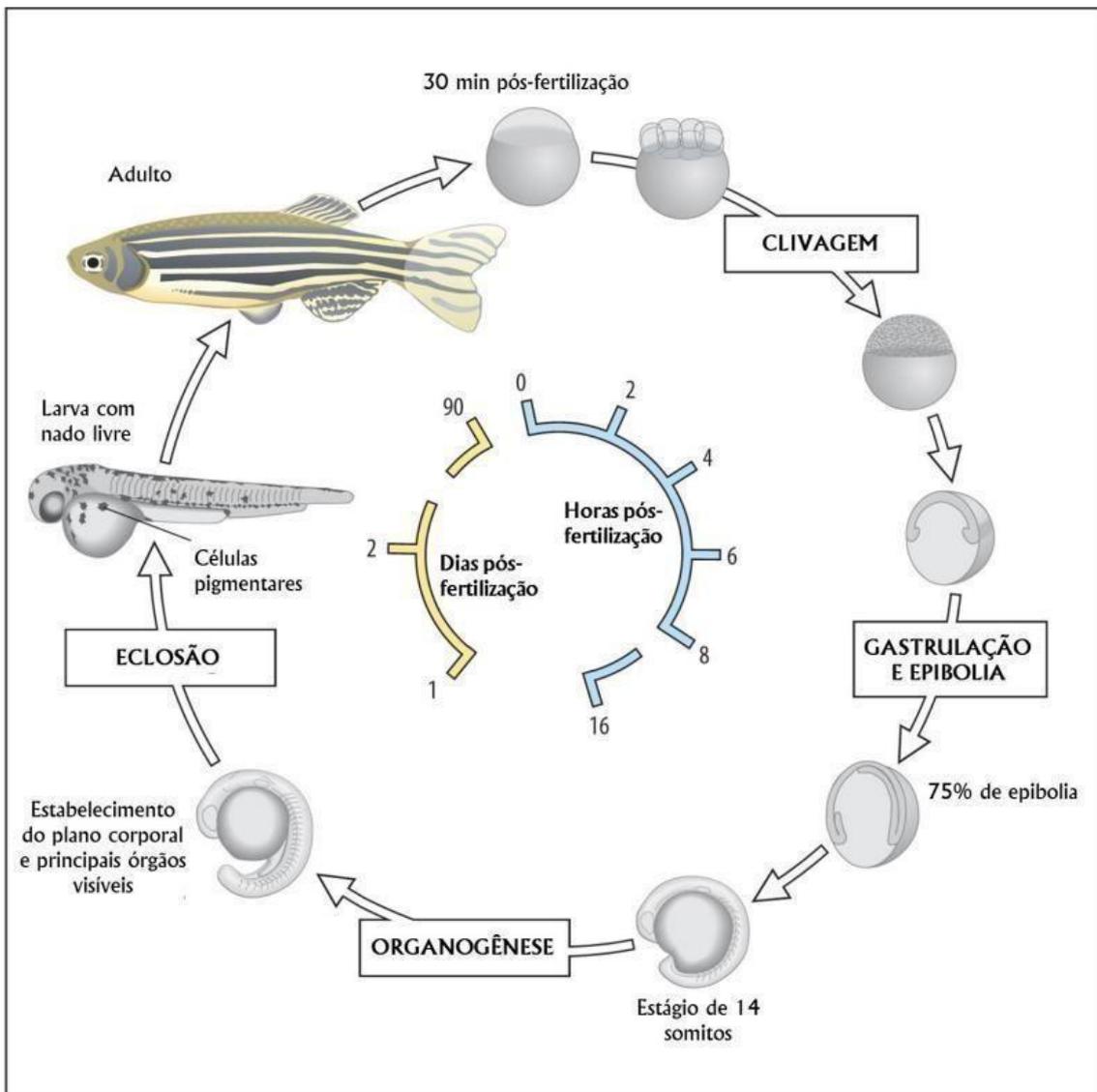
Outras vantagens na utilização do zebrafish é que os embriões são transparentes, sendo desenvolvidos fora do útero, permitindo observação direta. Além disso, possuem um ciclo de vida curto, evoluindo do ovo para a larva entre 48 horas e 72 horas pós fertilização, e atinge a maturidade com cerca de 3 meses de vida, sendo uma característica determinante para a utilização desse animal modelo na investigação de diversas doenças humanas (Canedo, et al., 2022).

Outra característica importante no desenvolvimento do zebrafish é que cada fêmea pode produzir centenas de ovos por semana, sendo um fator determinante no trabalho com amostragens variadas e em grande escala. A partir do sequenciamento do genoma do zebrafish foi verificado que apresenta 70% de semelhança genética com humanos, bem como 84% dos genes que manifestam doenças nos seres humanos apresentam ortólogos em zebrafish.

As larvas e embriões de zebrafish são alternativas em testes de toxicidade, já sendo validado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2013). O teste agudo em embriões de peixes (Test n. 236, FET Test) tem a capacidade de determinar os efeitos tóxicos em diferentes poluentes (nanomateriais, pesticidas, produtos farmacêuticos) (OECD, 2013), como ilustrado na figura 5 (Canedo, et al., 2022).

O zebrafish é relevante em trabalhos que analisam as consequências do estresse sobre o sistema nervoso central e seus resultados das mudanças no comportamento, possuindo destaque em comparação aos roedores, visto que o peixe possui o hormônio cortisol, assim como os humanos, sendo liberados no tecido interrenal em situações que exibem ameaça em relação à vida. No caso dos roedores, produzem a corticosterona em situação de estresse, hormônio presente em pequenas concentrações nos humanos (Escaleira et al., 2017).

A figura 6 apresenta o ciclo de vida do zebrafish, desde os primeiros 30 minutos após a fertilização, até sua fase adulta. Os ovos do zebrafish possuem cerca de 0,7 mm de diâmetro, e após a sua fertilização externa eles apresentam a fase de zigoto, e em seguida ocorrem as clivagens no pólo animal do embrião. Em 5 horas pós fertilização (Tabela 01), acontece o estágio de blástula, fase em que ocorre o desenvolvimento do blastoderma e as clivagens prosseguem até a epibolia. Em seguida, ocorre a fase da gastrulação, consequentemente tem-se a formação das camadas germinativas e dos eixos embrionários (Kimmel et al., 1995). Passadas as primeiras 24 horas pós fertilização, os embriões já possuem todo o plano corporal, incluindo intestino, fígado, rim, coração, cérebro e pâncreas, com embriogênese completa. Durante os primeiros 7 dias pós fertilização, os nutrientes são fornecidos pelo saco vitelínico (Parr et al., 2002).



**Figura 6. Ciclo de vida do zebrafish (*D. rerio*). Fonte: Adaptado de D'Costa; Shepherd (2009).**

É interessante frisar que os estágios embrionários do zebrafish possuem semelhança filogenética com os humanos, em comparação aos peixes adultos. Além disso, o rápido desenvolvimento do zebrafish permite uma comparação ao período gestacional do desenvolvimento embrionário humano, conforme descrito na Tabela 1. O distanciamento evolutivo entre o zebrafish e os humanos não impediu que muitas características anatômicas e fisiológicas fossem conservadas, tais como o cérebro, a barreira hematoencefálica, dentre outras (Parr et al., 2002).

**Tabela 1.** Tabela comparativa entre o desenvolvimento nos estágios iniciais da vida do zebrafish, em ratos e em humanos.

Estágio do desenvolvimento	Zebrafish (horas)	Ratos (dias)	Humanos (dias)
<b>Nidação</b>	NA	6	8-10
<b>Blástula</b>	2-5	3-5	4-6
<b>Formação da pleura neural</b>	10	9,5	17-19
<b>Início da organogênese</b>	10	5	21
<b>Primeiro somito</b>	10-11	9-10	19-21
<b>Formação do tubo neural</b>	18-19	9-12	22-30
<b>Primeiro batimento cardíaco</b>	24	10,2	22
<b>Nascimento/eclosão</b>	48-72	21	253

**Fonte:** Adaptado de Garcia; Noyes; Tanguay (2016). Não se aplica (NA).

Dessa forma, a conservação entre as características de zebrafish e humanos o torna um potencial organismo modelo para diversas análises de processos biológicos e respostas pertinentes acerca de potenciais agentes tóxicos durante o desenvolvimento de mamíferos e também na fase adulta (Parng et al., 2002).

No contexto nanoecotoxicológico, conforme revisão por Rocha et al. (2017), os peixes têm sido usados para avaliar a toxicidade dos pontos quânticos com três abordagens diferentes: avaliação da embriotoxicidade; exposição de peixes adultos aos pontos quânticos via água e dieta ou via injeção intraperitoneal e avaliação de

citotoxicidade *in vitro*. Dentre as espécies de peixes, o zebrafish é o modelo mais estudado. Outro achado deste artigo de revisão é que os estágios embrionário e larval são mais suscetíveis à toxicidade de pontos quânticos quando comparados ao estágio adulto (Rocha et al., 2017).

A endocitose é a principal via de captação de pontos quânticos em células de peixes. Os pontos quânticos e seus produtos de degradação podem ser absorvidos pela dieta ou pelo epitélio branquial, e são acumulados em diversos órgãos, como intestino, fígado e músculo. O intestino foi relatado como o principal órgão para a localização de pontos quânticos em *D. rerio* adulto alimentado com zooplâncton contaminado com polímero de poli revestido com pontos quânticos CdSe/ZnS (Rocha et al., 2017).

Desse modo, torna-se evidente a ascensão dos pontos quânticos na nanotecnologia para o desenvolvimento científico. Apesar de novas pesquisas terem sido executadas com estes nanocristais semicondutores, ainda há carência de informações a respeito de suas aplicações e implicações, especialmente na toxicologia.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar a toxicidade dos pontos quânticos ultra pequenos com núcleo e casca de seleneto de cádmio/sulfeto de cádmio (PQUPs CdSe/CdS) utilizando o sistema modelo zebrafish (*Danio rerio*).

### **4.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a toxicidade embriolarval em zebrafish após exposição aos PQUPs CdSe/CdS por 144 h, pela análise de biomarcadores, letais, não letais, de cardiotoxicidade e neurotoxicidade.
- Avaliar se a exposição aos PQUPs CdSe/CdS por 144 h altera diferentes parâmetros morfométricos nas larvas de zebrafish.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Síntese e Caracterização dos PQUPs de CdSe/CdS**

Para a síntese e caracterização, Nascimento et al (2021) utilizaram pontos quânticos de tamanho mágico de CdSe/CdS com amostras de CdSe7S. O CdSe do núcleo e o CdS da casca tinham 1,59 e 0,83 nm, respectivamente. 12 g de flocos de grafite e 96 g de permanganato de potássio foram misturados em solução ácida sob agitação mecânica constante e reação exotérmica.

A mistura de reação foi aquecida a 100°C por 12 horas e depois resfriada a temperatura ambiente. A solução foi colocada em banho de gelo com adição de 12 ml de peróxido de hidrogênio. O método de purificação foi realizado por centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos com água, etanol e ácido clorídrico, sendo esse processo repetido 4 vezes. O óxido de grafeno foi peneirado e granulado.

Os pontos quânticos de tamanho mágico de CdSe/CdS foram conjugados com a síntese do óxido de grafeno, que foi mantida constante em 18 mg/ml. O dicloreto de etileno (EDC) e o NHS-flouresceína foram utilizados para ativar os grupos carboxílicos presentes na redução do óxido de grafeno. Em seguida, 1 mL da redução do óxido de grafeno foi misturada com as soluções de EDC (480  $\mu$ L) e NHS (480  $\mu$ L).

Essa solução final contendo os precursores foi agitada à temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio por 3 horas. Os pontos quânticos de tamanho mágico de CdSe/CdS não ligados aos nanocompostos foram removidos por gotejamento de álcool etílico até a solução ficar turva, aguardando a decantação e removendo o sobrenadante, contendo os pontos quânticos de tamanho mágico CdSe/CdS não ligados. Os nanocompostos formados foram centrifugados por 5 minutos, e o precipitado foi seco a vácuo em temperatura ambiente por 24 horas.

### **5.2 Manejo dos animais adultos e coleta dos embriões**

Para a manutenção dos adultos de zebrafish, foram utilizados aquários de polietileno com capacidade para até 4 litros, sendo os animais mantidos em até 4 animais por litro em sistema de recirculação de água preenchido com água reconstituída (ISO,

1996), mantida em 26°C, com pH 7,0 e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro.

A alimentação seguiu um cronograma específico, sendo os peixes alimentados 4x ao dia até a saciedade com ração comercial NUTRICONPET, que é caracterizada por ser em flocos e que possui em sua composição Prebióticos, Vitamina C e Cantaxantina. Além disso, os peixes também receberam a cada dois dias alimentação viva com náuplios de artêmia.

Para a coleta dos embriões, machos e fêmeas na proporção de 3:1 foram separados em um aquário para reprodução no fim da tarde, sendo o processo concluído na manhã posterior ao início do ciclo de luz. Após a reprodução, os embriões foram transferidos para uma placa de petri, lavados rapidamente com solução de azul de metileno 0,1% e selecionados por meio de estereomicroscópio. Os embriões viáveis foram separados para o experimento e os não viáveis, descartados. Todo o processo de manejo dos animais e coleta dos embriões foram realizados no Biotério de Peixes do Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LMAA), localizado no Setor de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Alagoas. Todos os procedimentos experimentais adotados neste estudo foram aprovados pela CEUA – UFAL, registrado sob o protocolo nº 19/2021.

### **5.3 Teste de toxicidade embriolarval no sistema modelo zebrafish**

Seguindo as normas da OECD (2013) e parâmetros já determinados na literatura, a avaliação da toxicidade embriolarval foi realizada durante 144 horas (seis dias), sendo iniciada até 3 horas pós fertilização (hpf). Os embriões foram mantidos em placas de 24 poços contendo um embrião por poço em 2 ml de cada tratamento. Os QDUP CdSe/CdS foram dispersos em meio de embrião, sendo testadas quatro concentrações, são elas: 0,1 µg/mL; 1,0 µg/mL; 10,0 µg/mL e 20,0 µg/mL. Foram utilizados dois controles: o controle negativo, onde os embriões foram incubados apenas em água reconstituída; e o controle positivo, onde os animais foram expostos ao meio de embrião contendo 4 mg/L de 3,4 dichloroaniline (DCA), a qual promove uma mortalidade de no mínimo 30%. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo utilizados 20 embriões para cada tratamento, totalizando 120 embriões a cada experimento. As soluções foram preparadas ao início de cada experimento e a exposição se deu de forma semi estática, com as

soluções sendo renovadas a cada 48 horas. As placas foram incubadas em estufa BOD, a 26 °C, no mesmo fotoperíodo já descrito anteriormente.

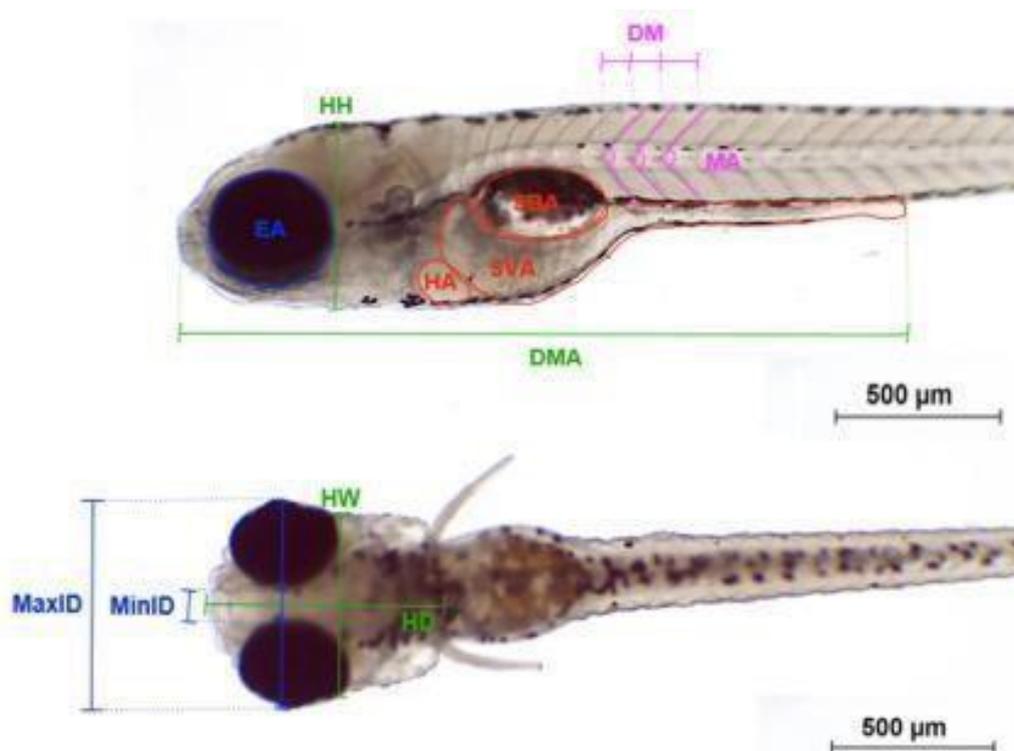
Os parâmetros de avaliação de letalidade incluíram a coagulação do embrião (0h, 24h), cauda não isolada e não formação dos somitos (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h). Os parâmetros não letais incluem a taxa de eclosão (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h), número de movimentos espontâneos por min (24h), número de batimentos cardíacos por min (48h) e pigmentação do embrião. O método de avaliação do batimento cardíaco e movimento espontâneo consiste na visualização do embrião através de microscopia de luz, utilizando um contador que é marcado a cada batimento ou contração do embrião. Os parâmetros de avaliação para os efeitos teratogênicos incluem a presença de escoliose, raquitismo, deformações do vitelo e retardo do crescimento em geral (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h).

Ao final da exposição, os animais foram eutanasiados em solução de 0,1% de benzocaína e a seguir fixador em 4% de paraformaldeído por 24h, sendo a seguir armazenados em álcool 70% para posterior morfometria.

#### **5.4 Análises morfométricas**

Para este fim, as larvas previamente fixadas foram fotografadas dorsal e lateralmente em um microscópio Opticam OPZTS com sistema de captura de imagem Opticam O400S. A seguir, diversos parâmetros morfométricos dos animais foram mensurados com auxílio do software ImageJ, de forma a permitir uma quantificação das alterações morfométricas e sua associação com o mecanismo de ação e toxicidade dos tratamentos utilizados.

Os parâmetros avaliados nas análises morfométricas foram área do olho (AO), área da bexiga natatória (ABN), área do saco pericárdico (ASP), altura (AC), largura (LC) e profundidade da cabeça (PC), distância interocular mínima (DI), distância interocular máxima (DIM) e distância boca-ânus (DBA), conforme observado na Fig. 7, dadas em mm ou mm<sup>3</sup>.



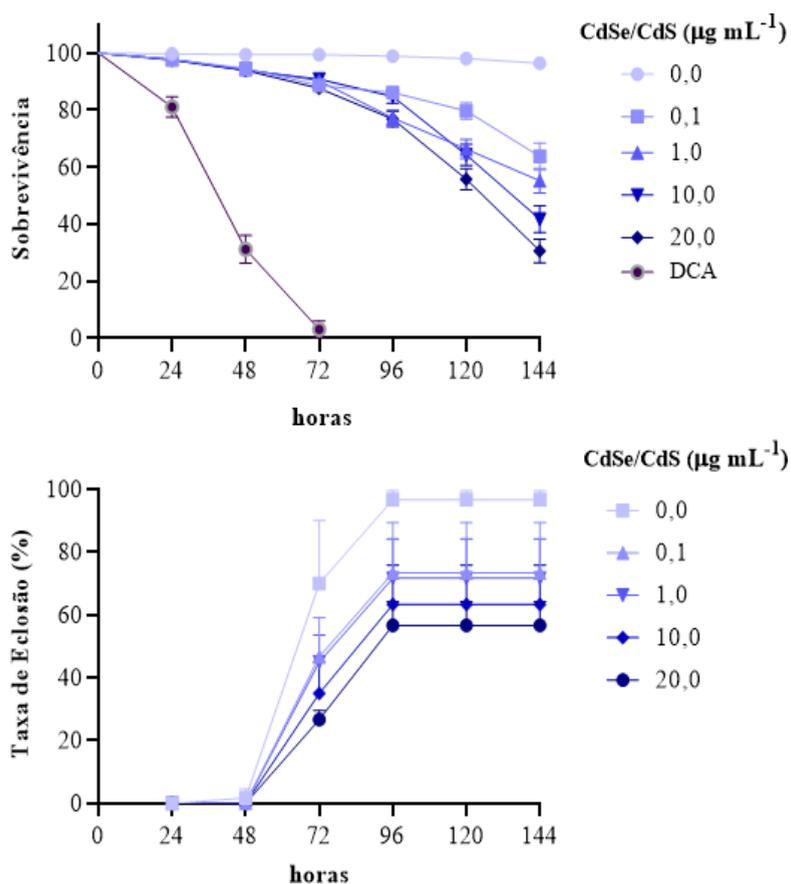
**Figura 7. Parâmetros morfométricos registrados para larvas de zebrafish após 144 h de exposição. Vista lateral e vista dorsal. Fonte: Ribeiro et al. (2020).**

### 5.5 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Graphpad Prisma 8.0. Os dados paramétricos foram submetidos ao teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para análise de comparação entre grupos. A diferença entre grupos foi considerada quando os resultados apresentavam  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

Os embriões de zebrafish expostos ao controle apresentaram uma taxa de sobrevivência próxima a 100%, validando assim o teste de toxicidade embriolarval. Todas as concentrações de PQUPs de CdSe/CdS apresentaram alterações nas taxas de sobrevivência e de eclosão ao longo das 144h (Figura 8A e 8B). Entretanto, os embriões e larvas expostos às concentrações de 10,0 e 20,0  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram as menores taxas de sobrevivência (menor que 40%) e, por consequência, essas mesmas concentrações apresentaram as menores taxas de eclosão em relação ao controle.

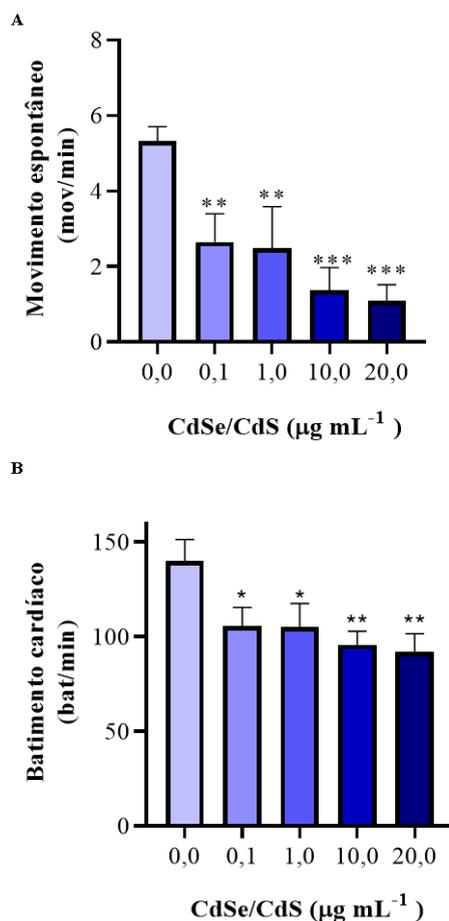


**Figura 8. Análise de sobrevivência (A) e eclosão (B), ao longo do período embriolarval de zebrafish expostos por 144 h aos PQUPs com casca e cobertura CdSe/CdS. Ambos parâmetros foram avaliados a cada 24 h após exposição a 0 (controle negativo), 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , 1,0  $\mu\text{g/mL}$ , 10,0  $\mu\text{g/mL}$  e 20,0  $\mu\text{g/mL}$  de PQUPs e o grupo controle positivo (3,4 mL de DCA). Os valores de  $p$  para os tratamentos de 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ,**

10,0  $\mu\text{g/mL}$  e 20,0  $\mu\text{g/mL}$  em relação ao controle negativo foram de 0.0060, 0.0039, 0.0003 e 0.0002, respectivamente.

Quanto maior a concentração de PQUPs de CdSe/CdS, menor foi a taxa de sobrevivência, conforme evidenciado na Figura 8A. Já no caso da taxa de eclosão (Fig. 8B), quanto menor a concentração, maior foi a taxa de eclosão, quando comparados ao controle negativo. As concentrações de 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , 1,0  $\mu\text{g/mL}$  tiveram as maiores taxas de eclosão, e as concentrações de 10,0 e 20,0  $\mu\text{g/mL}$  as menores taxas, respectivamente.

Todas as concentrações de PQUPs testadas promoveram uma redução no número de movimentos espontâneos (Fig. 9A), indicando a ocorrência de neurotoxicidade, dado que quanto maior a concentração de CdSe/CdS, menor era o número de movimentos espontâneos nos embriões. Ainda, nota-se que as concentrações de 10,0 e 20,0  $\mu\text{g/mL}$  de PQUPs foram as que apresentaram as maiores reduções para este parâmetro (Fig. 9A).



**Figura 9. Frequência de movimentos espontâneos (A) e batimentos cardíacos por minuto (B) ao longo do período embrionário de larvas de zebrafish expostas por 144h aos PQUPs com casca e cobertura CdSe/CdS.** O número de movimentos espontâneos foi aferido com 24h, ao passo que o número de batimentos cardíacos com 28h, após exposição aos seguintes tratamentos: a 0 (controle negativo), 0,1 µg/mL, 1,0 µg/mL, 10,0 µg/mL e 20,0 µg/mL de PQUPs. Os asteriscos representam o nível de significância em comparação às alterações das concentrações ao controle negativo.

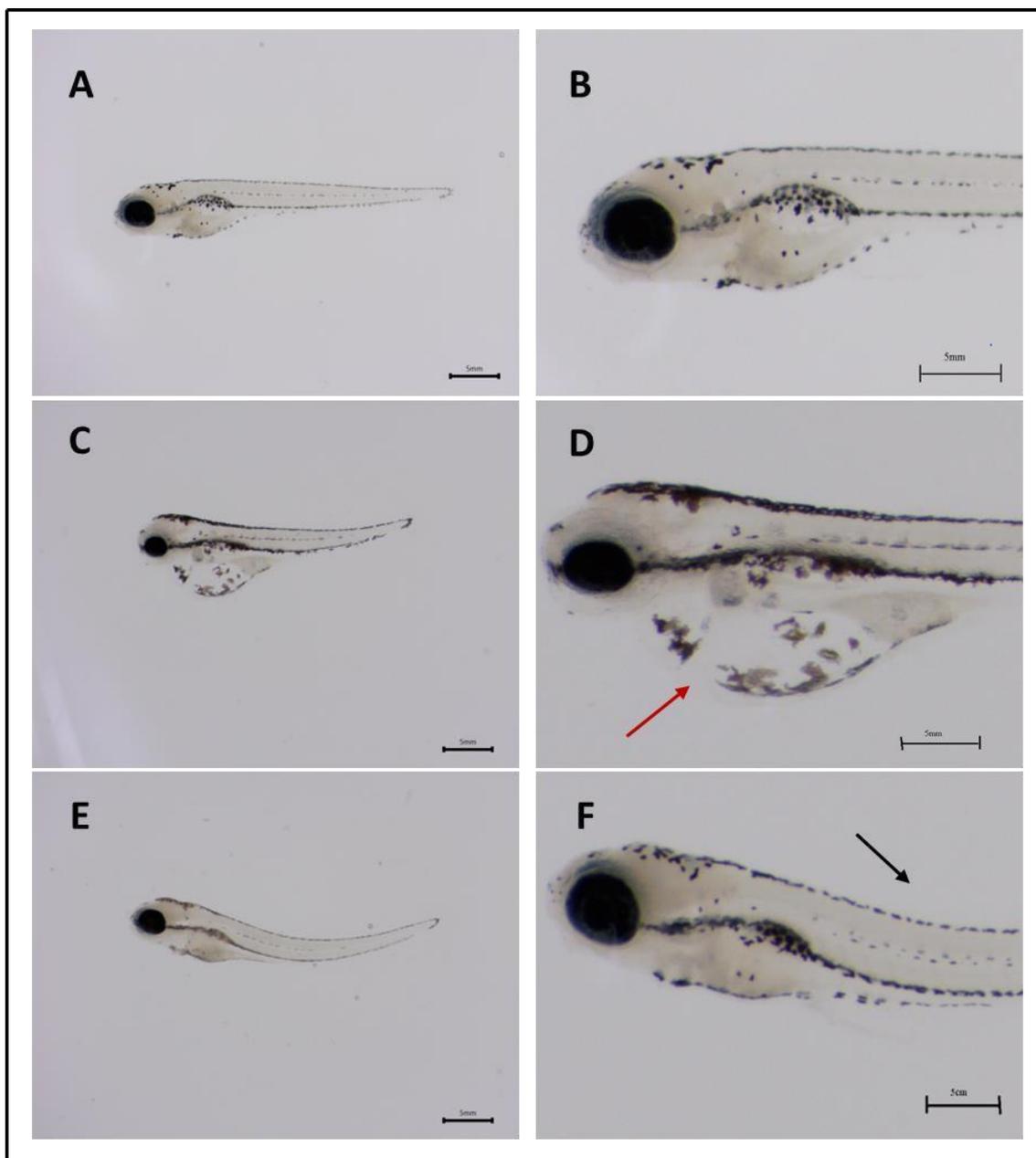
O número de batimentos cardíacos também foi avaliado com 24 h para todas as concentrações de PQUPs de CdSe/CdS e no grupo controle (Fig. 9B). Para todas as concentrações de PQUPs foi observada uma redução na frequência dos batimentos cardíacos, indicando cardiotoxicidade. Porém, as concentrações de 10,0 e 20,0 µg/mL apresentaram as maiores reduções para este parâmetro, assim como observado para a frequência dos movimentos espontâneos. Para os resultados de batimento cardíaco os valores de *p* variaram 0.0140, 0.0129, 0.0025 e 0.0014, respectivamente, do menor para o maior tratamento, quando comparados ao controle negativo.

A partir das análises morfológicas foram identificadas alterações teratogênicas nos embriões e larvas e ao longo das 144 horas de exposição. No grupo controle negativo não se detectou alterações teratogênicas (Tabela 2 e Figura 10A e 10B), porém nos demais grupos expostos aos PQUPs de CdSe/CdS foram identificados uma frequência do tipo concentração-dependente para escoliose (Figura 10C e 10D) e para o edema pericárdico (Figura 10E e 10F), conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 2. Frequência de parâmetros teratogênicos identificados ao longo do período embrionário dos animais expostos por 144h horas aos PQUPs com casca e cobertura CdSe/CdS.**

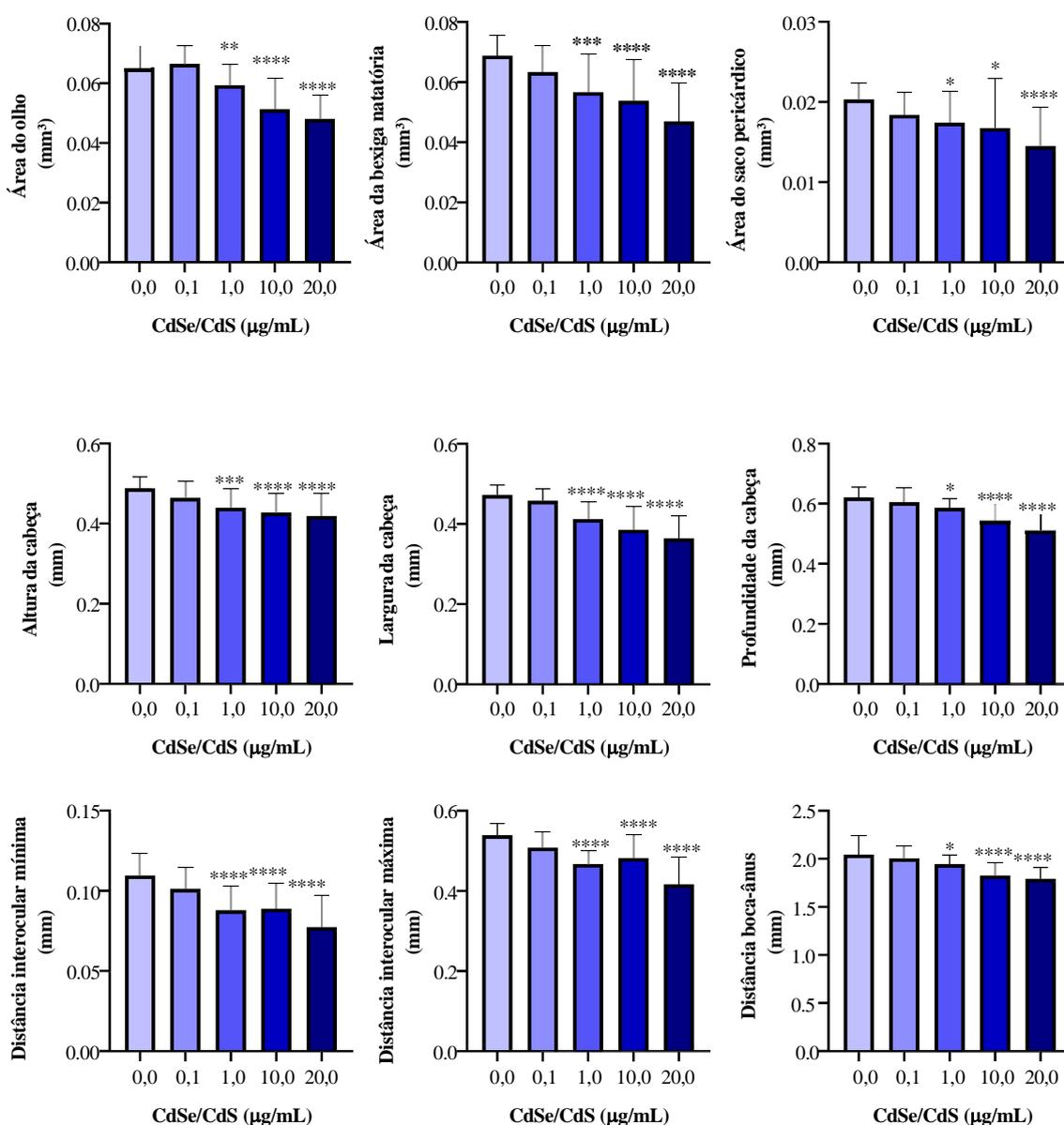
PARÂMETROS TERATOGÊNICOS CdSe/CdS (%)	0,0 µg/mL	0,1 µg/mL	1,0 µg/mL	10,0 µg/mL	20,0 µg/mL
Escoliose	0%	0%	3,3%	6,6%	11,6%
Edema pericárdico	0%	8,3%	16,6%	26,6%	36,6%

O tratamento de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  não induziu a ocorrência de escoliose, mas houve incidências de 8,3% de edema pericárdico (Tabela 2, Figura 10E e 10F) nos espécimes expostos ao PQUPs de CdSe/CdS. Quanto maior a concentração de PQUPs, maior foi a frequência de animais apresentando edema pericárdico e escoliose (Figura 10E e 10F). Os tratamentos de 10,0 e 20,0  $\mu\text{g/mL}$  evidenciaram as maiores frequências em alterações teratogênicas em comparação ao controle negativo (Tabela 2).



**Figura 10. Alterações morfológicas em zebrafish com 144h expostas aos PQUPs de CdSe/CdS na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ . (A) e (B) animal representativo do grupo controle; (C) e (D) animal representativo com saco vitelínico (seta vermelha); (E) e (F) animal representativo com escoliose do tipo cifose (seta preta).**

Não foi observado qualquer tipo de alteração morfométrica nos animais expostos a 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de PQUPs de CdSe/CdS (Tabela 1), enquanto que todas as concentrações acima desta (1,0 a 20,0  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram redução nos diversos parâmetros biométricos avaliados (Figura 11), denotando um padrão do tipo concentração dependente, em comparação ao grupo controle negativo



**Figura 11. Parâmetros morfométricos aferidos em larvas de zebrafish após a exposição por 144 h aos PQUPs com casca e cobertura CdSe/CdS. Parâmetros analisados: (A) área do olho, (B) área da bexiga natatória, (C) área do saco pericárdico, (D) altura da cabeça, (E) largura da cabeça, (F) profundidade da cabeça, (G) distância**

interocular mínima, (H) distância interocular máxima e (I) distância boca-ânus. Os asteriscos em cada concentração representam o nível de significância em comparação às alterações das concentrações ao controle negativo.

Os valores de  $p$  para os tratamentos de 1,0 $\mu$ g/mL, 10,0 $\mu$ g/mL e 20,0 $\mu$ g/mL em relação a área do olho foram de 0.0239, <0.0001 e <0.0001, respectivamente. A concentração de 0,1 $\mu$ g/mL não apresentou alteração. Para a área da bexiga natatória, os valores de  $p$  foram 0.0003 para o tratamento de 1,0 $\mu$ g/mL e <0.0001 para os tratamentos de 10,0 $\mu$ g/mL e 20,0 $\mu$ g/mL. Para a área do saco pericárdico os valores  $p$  foram 0.0491 para o tratamento de 1,0 $\mu$ g/mL, 0.0120 para o tratamento de 10,0  $\mu$ g/mL e <0.0001 para o tratamento de 20,0 $\mu$ g/mL. Em relação a altura da cabeça, os valores de  $p$  foram 0.0002 para a concentração de 1,0 $\mu$ g/mL e <0.0001 para 10,0  $\mu$ g/mL e 20,0  $\mu$ g/mL. A largura da cabeça, distância interocular mínima e máxima possuem o valor de  $p$  <0.0001 nas três maiores concentrações. O valor de  $p$  para a profundidade da cabeça foi de 0.0153 para a concentração de 1,0 $\mu$ g/mL e <0.0001 para os tratamentos de 10,0 $\mu$ g/mL e 20,0 $\mu$ g/mL. A distância boca-ânus possui o valor de  $p$  de 0.0455 para o tratamento de 1,0 $\mu$ g/mL e <0.0001 para os tratamentos de 10,0 $\mu$ g/mL e 20,0 $\mu$ g/mL.

Os parâmetros mais afetados após a exposição a 10,0  $\mu$ g/mL e 20,0  $\mu$ g/mL de QDUP foram a área do olho (AE) e a área do saco pericárdico (ASP) (Figura 10A e 10C).

## 7. DISCUSSÃO

Não há dúvidas sobre a infinidade de benefícios que os pontos quânticos possibilitam à indústria farmacêutica e ciência médica, tais como o diagnóstico médico e terapias gênicas, devido a sua excelente capacidade fotofísica e alta luminescência (Reshma; Mohanan, 2019). Além disso, por apresentar uma alta estabilidade da fluorescência e biocompatibilidade, foi evidenciado que o ponto quântico de tamanho mágico CdSe/CdS (USQDs) é uma ferramenta promissora para diagnóstico do câncer de mama (Silva et al., 2016).

Entretanto, quando novos materiais são associados a metais potencialmente tóxicos, a exemplo do ponto quântico ultra pequeno a base de cádmio (CdSe), uma vez que o cádmio é um elemento químico conhecido por ser extremamente tóxico e cancerígeno, faz-se necessário estudos mais aprofundados sobre seus potenciais efeitos nocivos (Alabary et al., 2015).

Estudos recentes identificaram o impacto na saúde ambiental por nanopartículas de dióxido de titânio e seus efeitos ecotoxicológicos em embriões e larvas de zebrafish, pela análise de diversos biomarcadores, detectando seu potencial tóxico para o desenvolvimento do crânio e reabsorção do saco vitelínico do zebrafish (Mamboungou et al., 2022). Contudo, os dados da interação e toxicidade de nanopartículas compostas por cádmio ainda são escassos na literatura (Mamboungou et al., 2022), evidenciando mais uma vez a necessidade de novos estudos a respeito do ponto quântico ultra pequeno de CdSe/CdS e seus efeitos na biota aquática, uma vez que o ambiente aquático é um dos destinos finais dos nanomateriais.

O presente trabalho analisou os efeitos embriotóxicos e morfométricos dos pontos quânticos ultra pequenos com casca e cobertura de CdSe/CdS (PQUPs de CdSe/CdS) em zebrafish, desde as suas primeiras horas de vida, em seu estágio embrionário, até o seu estágio larval com uma exposição total de 144 h. Foi demonstrado que a exposição a este tipo de PQUPs promove alterações em parâmetros letais e não letais do tipo concentração dependente ao longo do desenvolvimento inicial do zebrafish. Vale salientar que são escassos na literatura informações a respeito da toxicidade do ponto quântico a base de cádmio (CdSe) em modelos animais de vertebrados, evidenciando assim a importância dos achados deste estudo.

Neste estudo, pode-se observar que quanto maior a concentração dos PQUPs de CdSe/CdS, menor foi a taxa de sobrevivência ao longo do desenvolvimento embriolarval do zebrafish. Um estudo utilizando os pontos quânticos de CdSe avaliou a toxicidade no desenvolvimento, e durante as análises foi verificada a sobrevivência embriolarval no zebrafish. Os resultados obtidos indicaram um número insuficiente de larvas que sobreviveram à maior concentração de 200  $\mu\text{M}/\text{mL}$  após 120 horas de exposição. Os embriões de zebrafish expostos às maiores concentrações (125 e 200  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) mostraram aumento de mortalidade após 24 horas de exposição, e as larvas sobreviventes eram 6-10% menores em comparação ao controle (meio de embrião) (King-Heiden et al., 2009). Além disso, King-Heiden et al (2009) salienta sobre a utilidade das larvas do zebrafish como modelo para avaliar os potenciais riscos de exposição de nanomateriais, e como as respostas induzidas por nanopartículas no desenvolvimento do zebrafish fornecem pistas vitais sobre os mecanismos de toxicidade *in vivo*. Apesar de serem concentrações diferentes, o presente estudo também apresentou redução na taxa de sobrevivência nas maiores concentrações (10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 20,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), evidenciando a toxicidade do tipo concentração-dependente do ponto quântico ultra pequeno CdSe/CdS.

Zhanga et al (2012) identificaram redução na taxa de sobrevivência embriolarval do zebrafish utilizando o ponto quântico de CdC e o ponto quântico de CdTe associado ao ácido tioglicólico em diferentes concentrações (0, 100, 200, 300 e 400  $\mu\text{M}$ ), em até 120 horas pós fertilização. A taxa de sobrevivência dos embriões diminuiu de 90% para 0,88% do grupo 400  $\mu\text{M}$ , demonstrando toxicidade para o desenvolvimento do zebrafish com a maior dose do ponto quântico de CdTe associado ao ácido tioglicólico. Porém, a concentração de CdTe de 100  $\mu\text{M}$  ainda apresentou redução de sobrevivência, com mortalidade significativamente alta ( $p < 0,01$ ) em relação ao controle.

Neste estudo, observamos também que quanto maior a concentração dos PQUPs de CdSe/CdS, menor foi a taxa de eclosão dos embriões de zebrafish. Bastos (2016) testou o ponto quântico ultra pequeno de CdSe/CdS e o ponto quântico de tamanho mágico de CdSe/CdS em diferentes concentrações (0, 0.1, 1, 10 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para ambos os pontos quânticos) a fim de verificar a eclosão dos embriões de zebrafish, e identificou alteração na taxa de eclosão do tipo concentração dependente. Concentrações superiores a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do ponto quântico de tamanho mágico e superiores a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o quântico ultra pequeno mostraram diminuição significativa na taxa de eclosão ( $p < 0,01$ ), corroborando com os resultados identificados neste estudo. Além disso, Bastos (2016) salienta que, uma

vez que ambos os pontos quânticos possuem menos de 2nm, ocorre a difusão passiva através dos poros do córion, e eles podem se espalhar uniformemente no embrião.

Um estudo realizado por Zhanga et al (2012) utilizando o ponto quântico de CdTe associado ao ácido tioglicólico também identificaram redução na taxa de eclosão dos embriões de zebrafish em 72 horas pós fertilização. Zhanga et al (2012) também associaram essa diminuição à concentração dependente, pois quanto maior foi a concentração, menor foi a taxa de eclosão. As taxas de eclosão de 200 e 300nM foram de 31,66% e 5,98%, respectivamente, evidenciando atraso no desenvolvimento embrionário e toxicidade significativa ( $p < 0,01$ ). Outro estudo utilizando nanopartículas de Sílica (SiNPs) em embriões de zebrafish também apresentou concentração dependente na taxa de eclosão, pois houve uma forte inibição da eclosão nas maiores concentrações, sobretudo na maior concentração de 200 mg/mL que apresentou taxa de eclosão de apenas 26,67% em comparação ao controle, que apresentou eclosão de 94,72% (Duan et al., 2013).

Pode-se observar que a frequência de movimento espontâneo dos embriões caiu drasticamente, sobretudo nas maiores concentrações de PQUPs de CdSe/CdS testadas (10,0 e 20,0  $\mu\text{g/mL}$ ). As concentrações de 0,1 e 1,0  $\mu\text{g/mL}$  também apresentaram redução no movimento espontâneo, mas não foram tão proeminentes quanto às demais, revelando que a toxicidade dessa nanopartícula está relacionada à concentração utilizada. Quanto maior a concentração, maiores as alterações letais, não letais e morfofisiológicas encontradas. Um estudo utilizando *Caenorhabditis elegans* investigou a neurotoxicidade in vivo de pontos quânticos de CdTe em neurônios motores, e após exposição prolongada a 0,1-1 g/L, foi identificado déficits no desenvolvimento de neurônios motores (Zhao et al., 2015). Além disso, esse mesmo estudo salienta os potenciais riscos do ponto quântico de CdTe no desenvolvimento e função do sistema nervoso em animais. Ribeiro et al. (2020), evidencia que alterações na taxa do movimento espontâneo indicam alterações no desenvolvimento muscular e nervoso dos embriões, que podem ser induzidas por alterações na expressão gênica de proteínas neurais. Li et al (2019) destaca que os pontos quânticos de CdSe possuem dois elementos tóxicos bem conhecidos, o cádmio e o selênio, que podem produzir efeitos nocivos em linhagens celulares e organismos, e que a neurotoxicidade dependente de Cd também está associada a doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson.

Apesar do potencial tóxico dos pontos quânticos ser difícil de ser avaliado devido à escassa literatura (Rocha et al., 2017), sabe-se que a sua toxicidade não é dada apenas pelos seus elementos, mas sim a diversos fatores, tais como sua composição química, tamanho (< 5nm), forma e até mesmo sua estrutura (Li, et al., 2019). A estrutura do ponto quântico utilizado no presente estudo possui um núcleo metalóide composto por seleneto de cádmio, conforme destacado por Ghaderi et al (2011).

Os espécimes de zebrafish expostos aos PQUPs de CdSe/CdS apresentaram bradicardia, sobretudo para as maiores concentrações testadas. Esta alteração no ritmo de batimentos cardíacos indicam uma potencial cardiotoxicidade dos PQUPs CdSe/CdS em zebrafish, o que corrobora com os achados de Li et al., (2019), o qual também detectou cardiotoxicidade em camundongos expostos ao ponto quântico CdSe/ZnS. Neste mesmo estudo, quando os camundongos foram expostos às maiores concentrações deste ponto quântico de CdSe/ZnS, especificamente 2 nmol/kg, também apresentaram indução de dano oxidativo Li et al., (2019), evidenciando a importância de estudos que envolvam a biossegurança dos pontos quânticos e de sua compatibilidade para o sistema cardiovascular. Li et al., (2019) administraram os pontos quânticos de CdSe/ZnS carboxilados em camundongos através da veia da cauda, em dose única, sendo testada concentrações de 2nmol/kg e 20nmol/kg, concentrações maiores em proporção às que foram utilizadas neste estudo. Além disso, Zhanga et al (2012) avaliou os batimentos cardíacos em embriões de zebrafish com 48 horas de exposição ao ponto quântico de CdTe associado ao ácido tioglicólico. Nesse estudo, foi identificado redução na taxa de batimentos, sobretudo nos tratamentos de 25 e 50 nM que reduziram bastante ( $p < 0,05$ ). O estudo também evidencia que as maiores concentrações de 100, 200 e 300 nM tiveram os batimentos reduzidos consideravelmente (27,7; 27,3 e 25,8, respectivamente) em proporção ao controle (31,5) e que esses dados são evidências da toxicidade embrionária altamente significativa desses tratamentos ( $p < 0,01$ ).

Vale ressaltar que estudos relacionados ao metabolismo dos pontos quânticos em espécies de peixes ainda são bem limitados, bem como ainda não existe um consenso ou um comparativo, por assim dizer, no que tange a toxicidade entre todos os tipos de pontos quânticos. Porém, em revisão por Rocha et al. (2017), foram listadas alterações na expressão gênica, mudanças nas atividades de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx).

Além disso, foi identificado que os espécimes expostos aos PQUPs CdSe/CdS por 144h apresentaram dois tipos de alterações teratogênicas: escoliose e o edema pericárdico. Essas malformações levam a prejuízo na qualidade de vida dos espécimes analisados, pois ou as larvas não conseguem se desenvolver e chegar à fase adulta, ou chegando à fase adulta, possuem dificuldade de locomoção e acabam morrendo. Estudos anteriores evidenciam que o ponto quântico CdSe na concentração de 20µg/mL produziu mortalidade nas larvas e embriões de zebrafish, incluindo edema pericárdico, malformação do saco vitelínico e submandibular (King-Heiden et al., 2009). Além disso, larvas de zebrafish expostas ao ponto quântico de CdTe apresentaram vários padrões de malformações em todos os grupos de exposição, sobretudo nas concentrações mais altas, foi mais acentuado (100 e 200 nM). As malformações incluíam manchas oculares e inibição do desenvolvimento da melanina, edema pericárdico e coluna curvada. Esse mesmo estudo associa as deformidades na coluna (escoliose) à formação reduzida de miosina e/ou miótomo necessária para o desenvolvimento saudável do sistema músculo-esquelético (Zhanga et al., 2012). Estudos utilizando a nanopartícula de Sílica (SiNPs) em zebrafish também identificou alterações como edema pericárdico, edema do saco vitelínico e malformação da cabeça em todas as concentrações (25, 50, 100 e 200 mg/mL). Esse estudo também salienta que diferentes nanomateriais levam a diferentes tipos de malformações em embriões de zebrafish (Duan et al., 2013).

O estudo de Bastos (2016) avaliou a toxicidade dos pontos quânticos de tamanho mágico e ultra pequenos de CdSe/CdS durante o desenvolvimento em *Caenorhabditis elegans*, observando alterações morfológicas e anatômicas. Os pontos quânticos de tamanho mágico apresentaram maior toxicidade, sobretudo na concentração de 10 µg/mL, pois as larvas apresentaram um desenvolvimento anormal (Bastos, 2016). Em revisão, Rocha et al. (2017) concluiu que a toxicidade dos pontos quânticos CdSe gera toxicidade aguda ou baixa toxicidade, dependendo do nível de concentração a que as espécies foram expostas (Rocha et al 2017). Logo, quanto maior for a concentração do ponto quântico, maior o nível de toxicidade nos organismos, ocorrendo de forma exponencial. É importante ressaltar que o tempo de exposição é determinante para a toxicidade, pois quanto maior o tempo de exposição dos níveis tróficos e suas diferentes espécies aos pontos quânticos, mais propensos a alterações letais e subletais eles estão (Alabary et al., 2015).

No presente estudo ficou evidenciado que houve redução de todos os parâmetros morfométricos analisados, como a área do olho, área da bexiga natatória e área do saco pericárdico. Tais dados indicam efeitos a ocorrência de alterações morfofisiológicas nos órgãos envolvidos que podem ter implicações para a fisiologia e comprometer o desenvolvimento e sobrevivência dos peixes na natureza. Pereira et al. (2019) identifica um total de 33 alterações morfológicas distintas pela exposição de nanomateriais, e que as alterações no zebrafish por nanomateriais foram agrupadas em 4 padrões de reação: Rp1 (alterações circulatórias), Rp2 (pigmentação e alterações tegumentares), Rp3 (distúrbios músculo-esqueléticos) e Rp4 (alterações no saco vitelínico). Os efeitos teratogênicos observados no zebrafish expostos a nanomateriais inorgânicos induziram principalmente edema pericárdico (18%), seguido de curvatura da coluna vertebral (14%), flexão da cauda (10%), edema do saco vitelínico (9%), ausência ou tamanho irregular dos olhos (7%), entre outras deformidades. Além disso, estudos utilizando o ponto quântico de CdTe apresentou redução no comprimento do corpo do zebrafish a 120 horas pós fertilização. A concentração de 1nM não apresentou toxicidade significativa, ao passo que a concentração de 25 nM apresentou significância estatística ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratados com 50, 100 e 200 nM mostraram toxicidade altamente significativa ( $p < 0,01$ ). Em nosso trabalho, a distância boca-ânus possui o valor de  $p$  de 0.0455 para o tratamento de 1,0 $\mu$ g/mL e  $<0.0001$  para os tratamentos de 10,0 $\mu$ g/mL e 20,0 $\mu$ g/mL.

Ademais, a exposição ao ponto quântico também trouxe problemas relacionados ao nível de teratogenicidade presente nas larvas expostas às maiores concentrações. Todas essas alterações devem chamar nossa atenção para o descarte indevido destes materiais em locais que podem afetar diretamente a vida aquática, atingindo não somente os peixes, mas outros animais de diferentes níveis tróficos e presentes em diferentes ecossistemas aquáticos. Estudos utilizando a mosca das frutas *Drosophila melanogaster* como modelo também identificou efeitos tóxicos e genotóxicos, bem como alterações nos níveis de estresse oxidativo e na expressão de diversos genes relacionados na resposta ao estresse quando expostos ao ponto quântico CdSe (Alabary et al., 2015). Todavia, esse mesmo estudo também relata que os efeitos nocivos a exposição do ponto quântico foi menor, em comparação aos pontos quânticos associados a metais pesados, como cádmio, denotando mais uma vez a necessidade de associações (Alabary et al., 2015).

A natureza, bem como seus recursos, não são ilimitados e necessitam de atenção e cuidados (Ribeiro et al. 2020). O ponto quântico de seleneto de cádmio se apresenta

como uma nanopartícula importante devido à sua aplicabilidade em diversas áreas biomédicas (Silva et al., 2014). Todavia, faz-se necessário que estudos que investiguem seu potencial toxicidade e mecanismo de ação sejam desenvolvidos, para que esta nanopartícula seja utilizada de segura em aplicações biomédicas, bem como para que seu descarte seja realizado de forma adequada, de forma a evitar a contaminação das matrizes ambientais e potenciais riscos à saúde animal e humana. Logo, faz-se necessário a existência de políticas públicas e regulamentações baseadas em dados científicos sobre o descarte adequado dos quantum dots no ambiente aquático, uma vez que são considerados como contaminantes de interesse emergente.

## **8. CONCLUSÃO**

Neste estudo foi evidenciada a toxicidade ao longo do desenvolvimento embriolarval em zebrafish expostos a diferentes concentrações de PQUPs CdSe/CdS, por meio de múltiplos parâmetros letais, não letais e morfofisiológicos. Foram detectadas redução nas taxas de sobrevivência, de eclosão, a ocorrência de bradicardia e neurotoxicidade, bem como de anormalidades teratogênicas, do tipo concentração-dependente neste modelo animal.

## **9. PERSPECTIVAS FUTURAS**

A partir dos dados inéditos aqui expostos, serão realizadas análises complementares para quantificar a atividade de enzimas antioxidantes, bem como análises do rastreamento dos PQUPs de CdSe/CdS nas larvas por meio de microscopia de fluorescência. Também serão realizadas análises de potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão do desta PQUPs em colaboração com a Universidade Federal de Goiás, visando a complementação de dados para a posterior publicação em periódico internacional.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALABARY, M. et al. Assessing potential harmful effects of CdSe quantum dots by using *Drosophila melanogaster* as in vivo model. *Science of the Total Environment*, vol 530-531, pages 66-75; October, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969715301285>. Acesso: 8 fev. 2023.

BASTOS, Victor Alexandre Félix. Avaliação da toxicidade de Quantum Dots de tamanhos mágicos de CdSe/CdS do tipo core shell no modelo animal *C. elegans*. Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho. Dissertação (Mestrado) – Pós graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia, MG, 2016.

CANEDO, Aryelle. et al. Zebrafish (*Danio rerio*) meets bioethics: the 10Rs ethical principles in research. *Brazilian Animal Science*, vol 23, Goiânia; March, 2022. Disponível em: [http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1809-68912022000100202](http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912022000100202). Acesso: 7 jan. 2023.

CHAVES, Claudilene Ribeiro. Síntese, Sinalização e Caracterização dos Pontos Quânticos de CdTe/CdS e CdS/Cd (OH)<sub>2</sub> Para Aplicações Em Sistemas Biológicos. Orientadora: Dra. Patrícia Maria Albuquerque de Farias. Tese (Doutorado) – Programa de pós graduação em ciências de materiais, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, UFPE – 2011. Disponível em: <https://docplayer.com.br/87529224-Sintese-silanizacao-e-caracterizacao-de-pontos-quanticos-de-cdte-cds-e-cds-cd-oh-2-para-aplicacoes-em-sistemas-biologicos.html>. Acesso: 07de abr. 2023.

CHAN, WC. W. et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology*, vol 13, issue 1, pages 40-46; February, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11849956/>. Acesso: 8 fev. 2023.

D’COSTA, Alisson; SHEPHERD, Ian T. Zebrafish Development and Genetics: Introducing Undergraduates to Developmental Biology and Genetics in a Large Introductory Laboratory. *Zebrafish. Class. Mary Ann Liebert, Inc*, vol 6, number 2, pages 169-177; June, 2009.

DUAN, J. et al. Toxic Effects of Silica Nanoparticles on Zebrafish Embryos and Larvae. *Plos one*, vol 8, issue 9, e74606; September, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3776836/>. Acesso: 21 abr 2023.

DUONG, H. D. et al. Effects of CdSe and CdSe/ZnS Core/Shell Quantum Dots on Singlet Oxygen Production and Cell Toxicity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol 18, pages 1568-1576; March, 2018. Disponível em: [ingentaconnect.com/contentone/asp/jnn/2018/00000018/00000003/art00007](http://ingentaconnect.com/contentone/asp/jnn/2018/00000018/00000003/art00007). Acesso: 8 fev. 2023.

ESCALEIRA, Roberta da Costa. O zebrafish (*Danio rerio*): contribuições para a pesquisa biomédica na Marinha do Brasil. *Arq Bras Med Naval*, vol 78(1), páginas 43-48; Setembro, 2017. Disponível em: [redibim.dphdm.mar.mil.br](http://redibim.dphdm.mar.mil.br). Acesso: 8 fev. 2023.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial aplicação em catálise. *Química Nova*, volume 32, n 7, páginas 1860-1870, Bahia-Brasil, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/PgKPCBdBMxgKq65zRk8SLwN/?lang=pt>. Acesso: 03 de abr de 2023.

FERREIRA, V.B. Nanotecnologia e sua importância no contexto brasileiro. In: *E-science e políticas públicas para ciência, tecnologia e inovação no Brasil* [online]. Salvador: EDUFBA, 2018, pp. 97- 106. ISBN: 978-85-232-1865-2. <https://doi.org/10.7476/9788523218652.0007>.

GARCIA, Gloria R.; NOYES, Pamela D.; TANGUAY, Robert L. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacology & therapeutics*, v. 161, p. 11-21, 2016.

GHADERI, Shirin; RAMESH, Bala; SEIFALIAN, M. Alexander. Fluorescence nanoparticles “quantum dots” as drug delivery system and their toxicity: a review. *Journal of Drug Targeting*; August, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20964619/>. Acesso: 8 fev. 2023.

GEMAL, André Luís; DELGADO, Isabella Fernandes; DUARTE, Ana Júlia. Calazans; Vigilância Sanitária e Sociedade: a ousadia de um debate. *Vigil Sanit Debate, Rio De*

*Janeiro*, 1(1); Fevereiro, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3395/vd.v1n1.32>. Acesso: 2 jan. 2023.

ISO 7346-3 (1996) International Standards. Water Quality—Determination of the Acute Lethal Toxicity of Substances to a Freshwater Fish [Brachiodanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-Through Method. <http://www.iso.org>

JAMIESON, T. et al. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, vol 28, ed 31, pages 4717-4732; November, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014296120700539X>. Acesso: 8 fev. 2023.

KING-HEIDEN T,C. et al. Quantum dot nanotoxicity assessment using the zebrafish embryo. *Environ. Sci. Technol.* ed 43, 1605–1611, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2674626/>. Acesso: 20 març, 2023.

KIMMEL, Charles B. et al. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*, vol 203, pages 253-310; July, 1995. Disponível em: <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aja.1002030302>. Acesso: 8 fev. 2023.

LAWRENCE, Christian. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. *Aquaculture*, vol 269, pages 1-20; September, 2007. Disponível em: [researchgate.net/publication/222402017\\_Lawrence\\_C\\_The\\_husbandry\\_of\\_zebrafish\\_Danio\\_rerio\\_A\\_review\\_Aquaculture\\_269\\_1-20](https://researchgate.net/publication/222402017_Lawrence_C_The_husbandry_of_zebrafish_Danio_rerio_A_review_Aquaculture_269_1-20). Acesso: 8 fev. 2023.

LI. L. et al. Cardiotoxicity of Intravenously Administered CdSe/ZnS Quantum Dots in BALB/c Mice. *Frontiers in Pharmacology*, vol 10; October, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31649542/>. Acesso: 8 fev 2023.

MATEA, C. T. et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *International Journal of Nanomedicine*; July, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28814860>. Acesso: 5 jan. 2023.

MAMBOUNGOU, J. et al. Environmental risk of titanium dioxide nanoparticle and cadmium mixture: developmental toxicity assessment in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Nanoparticle Research*, number 186; September, 2022.

NASCIMENTO, R. F. et al. Tuning the Optical and Electrical Properties of rGO-CdSe/CdS Ultrasmall Quantum Dot Nanocomposites. *The Journal of Physical Chemistry*, v 125, pages 6805-6811, March 2021.

PARNG, Chuenlei et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay and drug development technologies*, v. 1, n. 1, p. 41-48, 2002.

PEREIRA et al. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. *Environmental Pollution*. September, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31325757/>. Acesso: 21 abr 2023.

RESHMA, V. G., MOHANAN, P. V. Quantum dots: Applications and safety consequences. *Journal of Luminescence*, vol 205, pages 287-298; January, 2019. Disponível em: [sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022231318313334](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022231318313334). Acesso: 8 fev 2023.

RIBEIRO, R. X. et al. Ecotoxicological assessment of effluents from Brazilian wastewater treatment plants using zebrafish embryotoxicity test: A multibiomarker approach. *Science of the Total Environment*, vol 735; September 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969720325535>. Acesso: 10 fev. 2023.

ROCHA, T. L. et al. Environmental behaviour and ecotoxicity of quantum dots at various trophic levels: A review. *Environment International*, vol 98, pages 1-17; January, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016041201630486X>. Acesso: 3 jan. 2023.

ROTOMSKIS, R. et al. Interaction of carboxylated CdSe/ZnS quantum dots with fish embryos: Towards understanding of nanoparticles toxicity. *Science of the Total Environment*, vol 635, pages 1280-1291; September, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969718313834>. Acesso: 8 fev. 2022.

SANTOS, C. A. Feynman, o profeta da nanotecnologia. *Ciência Hoje*, 2007. Disponível em: <https://cienciahoje.org.br/coluna/feynman-o-profeta-da-nanotecnologia/>. Acesso: 03 de abr. 2023.

SARAIVA, A. L. et al. CdSe magic-sized quantum dots attenuate reactive oxygen species generated by neutrophils and macrophages with implications in experimental arthritis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*; January, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1549963422000259>. Acesso: 8 fev. 2023.

SILVA A. C. A. et al. Biocompatible Magic Sized Quantum Dots: Luminescent Markers and Probes. *State of the Art in Nano-bioimaging*. March, 2018. Disponível em: DOI: 10.5772/intechopen.72841. Acesso: 07 de março, 2023.

SILVA, A. C. A. et al. Biological analysis and imaging applications of CdSe/CdS<sub>x</sub>Se<sub>1-x</sub>/CdS core-shell magic sized quantum dot. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*; January, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26945976/>. Acesso: 8 fev. 2023.

SILVA, A. C. A. et al. Magic Sized Quantum Dots as a Theranostic Tool for Breast Cancer. *Recent Studies & Advances In Breast Cancer*, 2014.

SILVA, A. C. A. et al. Shell Thickness Modulation in Ultrasmall CdSe/CdS<sub>x</sub>Se<sub>1-x</sub>/CdS Core/ Shell Quantum Dots via 1-Thioglycerol. *American Chemical Society*, vol 8, n 2, pages 1913-1922; January, 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn406478f>. Acesso: 8 fev. 2023.

SURANA K. et al. Synthesis, characterization and application of CdSe quantum dots. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol 20, issue 6, pages 4188-4193; November, 2014. Disponível em: [sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1226086X14000574](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1226086X14000574). Acesso: 8 fev. 2023.

TOMA, Henrique E. O mundo NANOMÉTRICO: a dimensão do novo século. *Editores Oficina de Textos*, 2<sup>o</sup> edição, Português, Universidade de São Paulo; 1 de janeiro de 2009.

YANG, R. S. H. et al. Persistent Tissue Kinetics and Redistribution of Nanoparticles, Quantum Dot 705, in Mice: ICP-MS Quantitative Assessment. *Environmental Health*

*Perspectives*, vol 115, number 9; September, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1964885/>. Acesso: 8 fev 2023.

ZHANG et al. Toxicity assessment of zebrafish following exposure to CdTe QDs. *Journal of Hazardous Materials*, pages 413-420, February, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22381373/>. Acesso: 21 abr 2023.

ZHAO et al. Translocation and neurotoxicity of CdTe quantum dots in RMEs motor neurons in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Hazardous Materials*, vol 283, pages 480-489; February, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389414008127>. Acesso: 21 abri 2023.