

Toxicidad diferencial de nanopartículas de Ag y TiO₂: un estudio comparativo en células endoteliales humanas y embriones de pez cebra

Comparative toxicity assessment of Ag and TiO₂ nanoparticles in human endothelial cells and zebrafish embryos

Andrea Cazares Morales,* Marisela Uribe-Ramirez,** Gabriel Luna-Barcenas,***
Hilda Lomelí Buyoli,* Denhi Schnabel-Peraza,* Andrea de Vizcaya-Ruiz*,†

ABSTRACT: This study compares the toxicity of silver nanoparticles (NPs Ag, 20 nm) and titanium dioxide nanoparticles (NPs TiO₂, 30 nm, anatase phase) in HUVEC cells and zebrafish embryos. Characterization through electron microscopy, X-ray diffraction, and UV-vis spectroscopy confirmed their nanostructured dimensions and tendency to aggregate. In biological media, both showed increased hydrodynamic diameters, attributed to a PVP coating that reduces their bio-availability. It was observed that the behavior of the nanoparticles varied depending on the medium in which their stability was assessed, resulting in changes to their particle size. *In vitro*, NPs Ag exhibited higher cytotoxicity, linked to Ag⁺ ion release and oxidative stress. In zebrafish, TiO₂ NPs caused pigmentation loss and reduced survival (83.13% at 25 µg/mL), while Ag NPs showed minimal toxicity despite accumulating in the chorion. This divergence is explained by the PVP coating, which inhibited Ag⁺ release *in vivo* but not in protein-rich cultures. The results reveal model-dependent toxic profiles: Ag NPs pose a higher cellular risk, while TiO₂ NPs affect developmental processes in vertebrates. The study highlights the necessity to integrate physicochemical characterization with multi-model evaluations for accurate nanotoxicological assessments.

KEYWORDS: nanotoxicology, characterization, Ag NPs, TiO₂ NPs, HUVEC, zebrafish.

RESUMEN: Este estudio compara la toxicidad de nanopartículas de plata (Ag NPs, 20 nm) y dióxido de titanio (TiO₂ NPs, 30 nm, fase anatasa) en células HUVEC y embriones de pez cebra. La caracterización, mediante microscopía electrónica, difracción de rayos X y espectroscopía UV-vis, confirmó sus dimensiones nanoestructuradas y su tendencia a agregarse. En medios biológicos, ambas NPs mostraron incrementos en diámetro hidrodinámico, atribuidos a un recubrimiento de PVP, el cual reduce su biodisponibilidad. Se observó que el comportamiento de las NPs varió dependiendo del medio en donde se evaluó su estabilidad, resultando en cambios en su tamaño de partícula. *In vitro*, las NPs de Ag exhibieron mayor citotoxicidad, vinculada con la

Recibido: 10 de junio, 2025. Aceptado: 24 de noviembre, 2025. Publicado: 15 de enero, 2026.

* Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología. Cuernavaca, Morelos, México.

** Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Departamento de Toxicología. Ciudad de México, México.

*** Tecnológico de Monterrey, The Institute of Advanced Materials for Sustainable Manufacturing and The School of Engineering & Sciences. Querétaro, México.

• University of California Irvine, Department of Environmental and Occupational Health, Joe C. Wen School of Population & Public Health. California, EUA.

† Autora de correspondencia: adevizca@uci.edu

potencial liberación de iones Ag^+ y a estrés oxidativo. En el pez cebra, las NPs de TiO_2 causaron pérdida de pigmentación y reducción de supervivencia (83.13% a 25 $\mu\text{g/mL}$), mientras que las de Ag mostraron toxicidad mínima, pese a acumularse en el corion. Esta divergencia se explica por el recubrimiento de PVP, el cual podría estar inhibiendo la liberación de Ag^+ *in vivo*, pero no en cultivos ricos en proteínas. Los resultados revelan perfiles tóxicos modelo-dependientes: las NPs de Ag poseen mayor riesgo celular, mientras que las de TiO_2 afectan procesos de desarrollo en vertebrados. El estudio enfatiza la necesidad de integrar caracterización fisicoquímica y evaluaciones multimodelo para evaluaciones nanotoxicológicas precisas.

PALABRAS CLAVE: nanotoxicología, caracterización, NPs-Ag, NPs- TiO_2 , HUVEC, pez cebra.

Introducción

El desarrollo y la aplicación de nanomateriales han aumentado exponencialmente en las últimas décadas debido a sus propiedades únicas y su potencial uso en sectores como la medicina, la electrónica, la energía y los productos de consumo (Elzein, 2024). No obstante, estas mismas propiedades generan preocupación por su posible toxicidad en organismos vivos, al poder inducir citotoxicidad, estrés oxidante, inflamación, genotoxicidad y alteraciones del desarrollo en una variedad de modelos biológicos, impulsando así el crecimiento de la nanotoxicología como disciplina clave para evaluar los potenciales riesgos asociados con la exposición a nanopartículas (NPs) (Egbuna *et al.*, 2021).

La evaluación adecuada de la toxicidad de las NPs requiere una caracterización detallada de sus propiedades fisicoquímicas, pues parámetros como el tamaño, la forma, la carga superficial y el área específica influyen directamente en su comportamiento biológico (Egbuna *et al.*, 2021; Zielińska *et al.*, 2020; Raval *et al.*, 2018). Aunque algunos fabricantes de NPs proporcionan información básica, estas propiedades pueden verse modificadas por factores como el almacenamiento, el tiempo o el medio de exposición (Mahmoudi, 2021; Raval *et al.*, 2018). Por ello, se vuelve esencial considerar tanto la caracterización en seco, que analiza las propiedades intrínsecas de las NPs, como la caracterización en húmedo, la cual evalúa su comportamiento en medios biológicos, incluyendo estabilidad coloidal, agregación y formación de coronas proteicas (Zielińska *et al.*, 2020; Fadeel, 2022; Li *et al.*, 2020).

Además de comprender las propiedades fisicoquímicas, es fundamental utilizar modelos biológicos que permitan evaluar los efectos tóxicos de manera integral. Los modelos *in vitro*, como cultivos celulares, son útiles para estudiar mecanismos específicos de toxicidad de forma rápida y reproducible. En particular, las células endoteliales humanas (HUVEC) han demostrado ser un sistema representativo, al poder ser una de las primeras vías de contacto con NPs en organismos humanos (Cao *et al.*, 2017). Sin embargo, estos modelos no capturan la complejidad de un organismo completo. En este sentido, los modelos *in vivo* son esenciales para evaluar efectos sistémicos. Entre ellos, el pez cebra (*Danio rerio*) se ha destacado como una alternativa eficiente, ética y económicamente viable. Su alta sensibilidad durante

el desarrollo embrionario, su rápido ciclo reproductivo y su mantenimiento sencillo lo convierten en un modelo robusto y versátil para estudios toxicológicos (Shao *et al.*, 2024; Haque y Ward, 2018). Además, su posición intermedia entre modelos celulares y mamíferos ofrece un equilibrio entre complejidad biológica y practicidad experimental (Macrae y Peterson, 2025; Horzmann y Freeman, 2018). El pez cebra comparte numerosos rasgos biológicos, procesos de desarrollo y aspectos anatómicos y fisiológicos con los humanos. Cerca del 75% de sus genes presentan homología con los del genoma humano, convirtiéndolo en un modelo vertebrado ampliamente utilizado y confiable para estudios toxicológicos (Zhang *et al.*, 2003).

Las NPs de plata (NPs-Ag) y de dióxido de titanio (NPs-TiO₂) son dos de los nanomateriales más empleados en la industria alimentaria y en productos cosméticos (Emamhadi *et al.*, 2020; Manzoor *et al.*, 2024; Schauermann *et al.*, 2015). Las NPs-Ag son ampliamente reconocidas por sus propiedades germicidas y antiinflamatorias, lo cual ha favorecido su uso en productos de higiene personal, textiles y materiales de uso médico (Bar-Ilan *et al.*, 2009; Qiang *et al.*, 2020). Dichas propiedades se asocian principalmente con la liberación gradual de iones Ag⁺ cuando las partículas se encuentran en contacto con soluciones acuosas (Sikder *et al.*, 2018), pudiendo favorecer su disminución de tamaño en medios acuosos. Por otra parte, las NPs-TiO₂ poseen diversas aplicaciones industriales gracias a sus características físicas, mecánicas, ópticas y eléctricas mejoradas. En consecuencia, se emplean como fotocatalizadores, aditivos en alimentos procesados, ingredientes en productos para el hogar, pigmentos en cosméticos y componentes fundamentales de pinturas y protectores solares (Manzoor *et al.*, 2004). El TiO₂ puede presentarse en tres fases cristalinas: rutilo, brookita y anatasa, cada una con propiedades químicas distintas. De estas, la fase anatasa, de alta reactividad y estabilidad, se considera la más tóxica debido a su elevada capacidad fotocatalítica, favoreciendo la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y, con ello, la inducción de estrés oxidativo (Johnston *et al.*, 2009). En medios con alta salinidad tienden a adsorber componentes de medios líquidos sobre su superficie, pudiendo favorecer, en ocasiones, su aglomeración.

A pesar de estos avances, persiste una brecha importante en la integración entre la caracterización completa de las NPs y su evaluación biológica en distintos niveles. Muchos estudios se centran en una sola dimensión, ya sea fisicoquímica o biológica, lo cual limita la comprensión de la relación entre las propiedades de las NPs y sus efectos tóxicos (Fadeel *et al.* 2015, 2022).

En este estudio, se propuso caracterizar de forma integral NPs de TiO₂ y Ag mediante técnicas de caracterización en seco y en húmedo, y evaluar su toxicidad utilizando tanto cultivos celulares como el pez cebra como modelos experimentales. Este enfoque busca llevar a cabo un análisis integral de la toxicidad de las NPs y contribuir a las estrategias de evaluación de riesgo en el campo de la nanotoxicología.

Materiales y métodos

Materiales

Las NPs-Ag (99.99% Ag, 20 nm, con 0.2% de PVP) y las NPs-TiO₂ (99.98% anatasa, 30 nm, con PVP) fueron adquiridas de US Research Nanomaterials, Inc. (EUA). Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se obtuvieron de la colección ATCC (CRL-1730, EUA). La sal marina utilizada para la preparación de agua de embrión (*egg water*) fue Sea Salt Instant Ocean (EUA). Los reactivos empleados incluyeron la mezcla de nutrientes F-12K, heparina y el suplemento para crecimiento de células endoteliales, adquiridos de Sigma-Aldrich (EUA); suero fetal bovino, penicilina-estreptomicina, L-glutamina y antimicótico de Gibco (EUA); y el ensayo de proliferación celular CellTiter 96 AQueous One Solution de Promega (G3582, EUA).

Caracterización en seco

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para la determinación del tamaño y la forma, se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL-7610F en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico de Recubrimientos Avanzados (LIDTRA). Antes del análisis, ambas NPs se dispersaron mediante ultrasonido. Posteriormente, cada dispersión se diluyó 1:100 en 2-propanol y se colocó una gota sobre una placa de silicio. Una vez seca, se recubrió con oro-paladio en vacío. La distribución del tamaño se obtuvo mediante la medición de partículas individuales visibles en las micrografías y de forma manual.

Difracción de rayos-X (DRX)

El análisis se realizó con un difractómetro Rigaku Ultima-IV con cámara de temperatura (Rigaku HT-1500). Los patrones obtenidos se compararon con el PDF Card#21-1272 para TiO₂ y el PDF Card#04-0783 para Ag en la base de datos del *software* Jade 6.

Espectroscopía Raman

Los análisis de Raman se realizaron en un equipo Horiba Labram HR Evolution con un láser He-Ne y una longitud de onda de 632.8 nm.

Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Para el análisis de FTIR, la técnica utilizada fue reflectancia total atenuada (ATR) con punta de diamante a 24 barridos y 4 cm⁻¹ de resolución (PerkinElmer, Spectrum GX).

Espectroscopia UV-Vis

La solución de NPs dispersadas se utilizó para el análisis en un espectrofotómetro Agilent 8453 con un láser de longitud de onda de 200 a 1000 nm.

Caracterización en húmedo

La caracterización de las NPs se realizó en el Departamento de Toxicología de Cinvestav-Unidad Zacatenco. Partiendo de soluciones de 1000 µg/mL de cada NPs en agua destilada, estas fueron dispersadas mediante un ultrasonificador de punta (GEX 130PB) en baño de hielo, aplicando pulsos de 60 s. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL de cada dispersión y se colocó en una celda desechable para la determinación del diámetro hidrodinámico (DH) y el índice de polidispersión (PdI). De manera similar, 1 mL de cada muestra se utilizó para la medición del potencial Z (ZP) en una celda de capilaridad desechable. Todas las mediciones se realizaron utilizando un Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instrument Ltd) y se llevaron a cabo por triplicado. Posteriormente, las NPs se dispersaron y diluyeron hasta alcanzar una concentración final de 100 µg/mL en agua de embrión (medio de mantenimiento para *Danio rerio*) o medio F-12 (medio de cultivo para células HUVEC). Se midieron el DH y el PdI de cada dilución hasta por cuatro días consecutivos. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, en tres experimentos independientes.

Caracterización biológica

Células HUVEC

La línea celular endotelial de cordón umbilical humano (HUVEC, por sus siglas en inglés) se cultivó en medio de cultivo F-12K suplementado con 1 mg/mL de heparina, 1% de suplemento de crecimiento para células endoteliales, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de antimicótico y 20% de suero fetal bovino (SFB). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó cada 48 h, o cada 72 h si la confluencia celular no superaba el 50%. Para los ensayos de citotoxicidad, las células HUVEC se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 12,000 células/cm² en un volumen de 100 µL de medio de cultivo y se incubaron durante 24 h. Las NPs se prepararon como se describió previamente a 5, 15, 25, 50 y 100 µg/mL de NPs-Ag o NPs-TiO₂ en medio de cultivo con 10% de SFB. Más adelante, el medio de cultivo fue descartado y sustituido por 200 µL de la suspensión de NPs, incubándose las células hasta por 24 h para la evaluación de los parámetros de citotoxicidad. Después de 24 h de exposición a NPs, se añadieron 10 µL de CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay a cada pozo y se incubó durante 2 h a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂, protegido de la luz. La absorbancia se midió a 490 nm utilizando un lector de placas Infinite® 200 (TECAN).

Danio rerio

Los peces adultos de *Danio rerio* de tipo salvaje (WT, por sus siglas en inglés, este tipo no tiene una denominación específica, como es habitual cuando no se trata de una línea mutante o transgénica) se obtuvieron del acuario del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, México. Los organismos se mantuvieron en un sistema de cultivo de flujo cerrado a 28 °C, bajo un fotoperiodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad, y fueron alimentados cuatro veces al día. Para

la obtención de embriones, los peces adultos fueron cruzados y los huevos se recuperaron al inicio del siguiente ciclo de luz. Posteriormente, los huevos fueron lavados, separados y cultivados en agua de embrión (preparada con Sea Salt Instant Ocean a una concentración de 60 µg/mL en agua destilada) a 28 °C por 4 h o hasta alcanzar el estadio de esfera. La evaluación de los efectos tóxicos y del desarrollo de la larva (teratogénicos) se realizó siguiendo el protocolo 236 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD 2013) para el ensayo de toxicidad aguda en embriones (*Fish Embryo Toxicity Test*, FET). Los embriones en estadio de esfera se distribuyeron en placas de 48 pozos, con una densidad de 10 embriones por pozo. Los embriones de *Danio rerio* se expusieron a concentraciones de 5, 15, 25, 50 y 100 µg/mL de NPs-Ag o NPs-TiO₂. Las placas fueron incubadas a 28 °C y los embriones fueron monitoreados diariamente hasta las 72 horas post fertilización (hpf) utilizando un estereomicroscopio, midiendo viabilidad, eclosión y anomalías en el desarrollo.

Análisis de resultados

Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado en al menos tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el *software* Prism 10 (GraphPad Software, Inc.). La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para los datos con distribución normal, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni. En caso de datos con distribución no normal, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

Los datos de dosis-respuesta se analizaron mediante regresión lineal. Las concentraciones evaluadas se transformaron en $\log_{10}$ para linearizar la relación entre la concentración de las NPs y la respuesta de la actividad metabólica. El modelo lineal se definió como:

$$Y = aX + b$$

Donde Y representa la respuesta normalizada, X es el $\log_{10}$ (concentración), a es la pendiente y b es la ordenada en el origen. La concentración inhibitoria media (IC₅₀) se calculó resolviendo para X cuando $Y = 50\%$.

$$IC_{50} = 10^{(0.5 - b)/a}$$

Resultados

Caracterización seca de las NPs de Ag y TiO₂

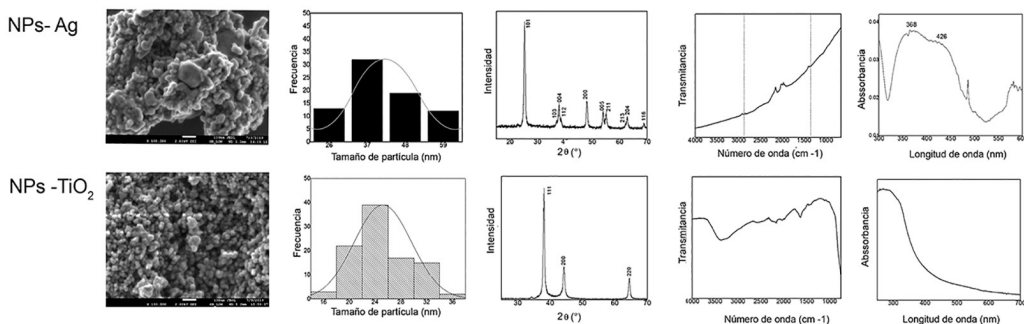
El análisis de la caracterización fisicoquímica en estado seco mostró que tanto las NPs-Ag como las NPs-TiO₂ presentan morfología poliédrica. La distribución de tamaños osciló entre 26 y 59 nm para las NPs-Ag, con un valor predominan-

te en 37 nm, y entre 18 y 36 nm para las NPs-TiO₂, con un máximo en 24 nm (figura 1). Aún después del proceso de dispersión previo a la caracterización, ambas NPs evidenciaron tendencia a aglomerarse. El análisis de DRX confirmó su naturaleza cristalina, revelando que las NPs-Ag corresponden a plata metálica, mientras que las NPs-TiO₂ se encuentran en fase anatasa, uno de los polimorfos de este material (figura 1). El espectro Raman de las NPs-TiO₂ mostró cinco modos activos característicos de la anatasa en 144, 194, 396, 518 y 637 cm⁻¹ (Ohsaka *et al.*, 1978). Asimismo, se detectó una señal a 1014 cm⁻¹ atribuida a la presencia de PVP en la superficie, asociada a fenómenos de fluorescencia.

El análisis FTIR-ATR no evidenció señales definidas en las NPs-Ag, salvo dos bandas de baja intensidad en 2831 y 1372 cm⁻¹, asignadas a los grupos -CH₂ y CH₂-CH, respectivamente, lo que confirma la presencia de PVP. Por su parte, la espectrofotometría UV-Vis respaldó la estructura de ambas NPs: las NPs-Ag exhibieron bandas de absorción con máximos en 368 y 426 nm, relacionadas con el plasmón de resonancia de la plata, aunque el PVP parece interferir en la resolución de la banda a 425 nm. En el caso de las NPs-TiO₂, se registró un único máximo en 282 nm, característico de la fase anatasa (una de las estructuras cristalinas del TiO₂, caracterizada por su alta reactividad y estabilidad en nanopartículas), junto con una banda de energía prohibida de Eg = 3.07 eV (figura 1).

En conjunto, la caracterización fisicoquímica confirmó que las NPs-Ag corresponden a plata metálica y las NPs-TiO₂ a la fase anatasa, ambas con morfología poliédrica y tendencia a la aglomeración; lo cual sugiere que sus mecanismos de acción son la liberación de iones de plata (NPs-Ag) y actividad fotocatalítica (NPs-TiO₂). Asimismo, se confirmó la presencia de PVP en la superficie de las NPs, un factor que puede modificar sus propiedades ópticas y su comportamiento de dispersión. Estos hallazgos son fundamentales para interpretar la biointeracción de las NPs con los modelos biológicos.

Figura 1. Caracterización fisicoquímica de las NPs de Ag y TiO₂.



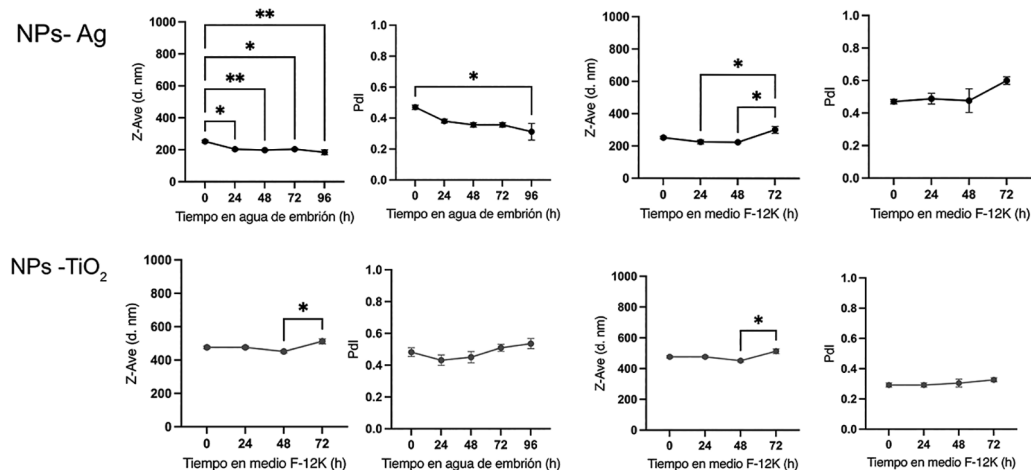
Para cada NP se muestran micrografías de microscopía electrónica de barrido; histogramas de distribución de tamaño; patrón de difracción de rayos X; espectroscopía UV-Vis, espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier y espectro Raman.

Fuente: Elaboración de los autores.

Caracterización húmeda de las NPs de Ag y TiO₂

Se analizó la estabilidad de las NPs en medio F-12 por 72 h y en agua de embrión por 96 h (figura 2). En general, se encontró que el DH de las NPs es de un orden de magnitud mayor que su tamaño de partícula desde el momento en que se introdujeron en los medios biológicos. Durante el transcurso de las mediciones en el medio F-12, el DH de las NPs-Ag y NPs-TiO₂ permanece estable hasta las 48 h, pero a las 72 h se observa un incremento significativo en el tamaño. Por otro lado, en el agua de embrión, las NPs-Ag disminuyeron su DH constantemente durante el transcurso de los 4 días de exposición al agua de embrión (figura 2), lo cual también se observó a las 96 h en su PDI (figura 2). Sin embargo, las NPs-TiO₂ no mostraron cambios significativos en este mismo medio (figura 2). Estos resultados podrían explicarse por la presencia del recubrimiento de PVP, ya que el incremento de tamaño de las NPs al encontrarse en solución puede afectar su biodisponibilidad a las células y el pez cebra.

Figura 2. Caracterización húmeda de las NPs de Ag y TiO₂.



Para cada NP se muestran el DH y el índice de polidispersión en agua de embrión (hasta 96 h) y en medio F-12K (hasta 72 h). Las gráficas muestran el promedio y el error estándar ($n = 3$). La significancia estadística fue determinada por ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Tukey (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$). Fuente: Elaboración de los autores.

Efectos de las NPs de Ag y TiO₂ en modelos en células endoteliales humanas y embriones de pez cebra

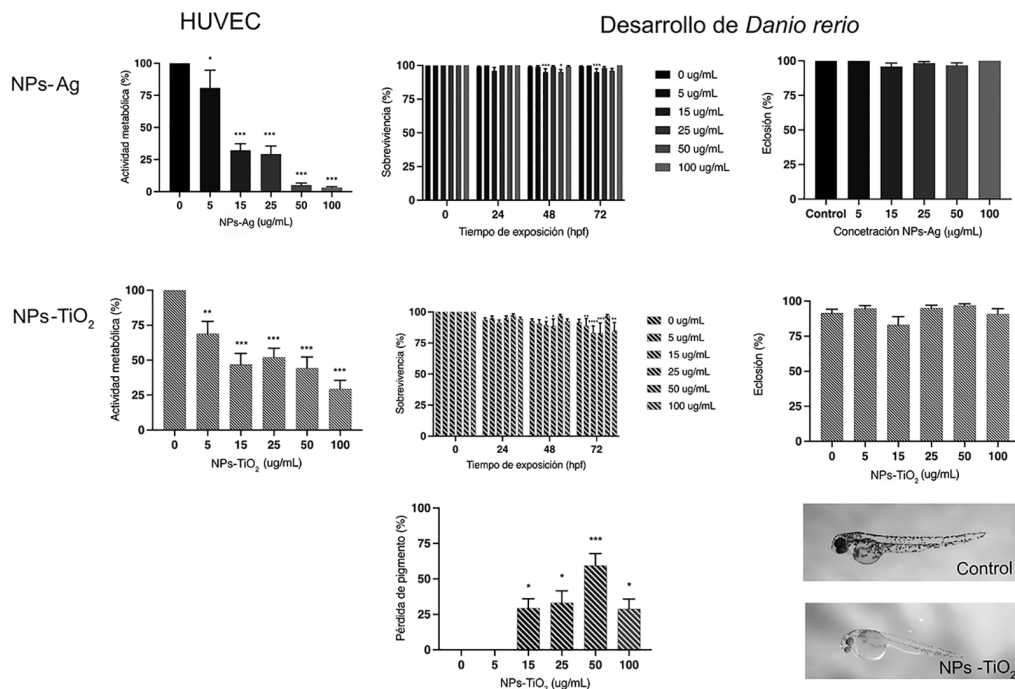
Células HUVEC

El ensayo MTS en células HUVEC reveló citotoxicidad dependiente de la concentración para ambos tipos de NPs, con valores de IC₅₀ calculados a partir del ajuste de regresión lineal. Las NPs-Ag presentaron un IC₅₀ de 11.42 $\mu\text{g/mL}$, mientras que las NPs-TiO₂ mostraron un IC₅₀ más alto de 18.17 $\mu\text{g/mL}$, indicando una mayor potencia citotóxica por parte de las NPs-Ag (figura 3). Las

curvas de respuesta a la dosis mostraron dinámicas distintas: las NPs-Ag provocaron una disminución abrupta en la viabilidad celular a concentraciones $\geq 15 \mu\text{g/mL}$ ($32.33\% \pm 29.39\%$ de viabilidad a $25 \mu\text{g/mL}$), mientras que las NPs-TiO₂ indujeron un descenso progresivo ($52.07\% \pm 44.32\%$ a $25 \mu\text{g/mL}$) (figura 3A). Los datos de viabilidad normalizados confirmaron efectos significativos en todas las concentraciones evaluadas, con citotoxicidad completa ($>95\%$ de reducción) a $100 \mu\text{g/mL}$ en ambos tratamientos (figura 3A). Estos resultados son congruentes con la pendiente más pronunciada y las IC₅₀ más agudas para las NPs-Ag en comparación con las NPs-TiO₂.

Danio rerio

Los embriones y larvas expuestos a las NPs se monitorearon cada 24 horas después de la exposición. La supervivencia de embriones y larvas se determinó por medio de indicadores visuales en estereoscopio, como apariencia transparente, presencia de latido cardíaco y progreso a través de los hitos del desarrollo. Ninguna de las NPs disminuyó la capacidad de eclosión de los embriones expuestos. La supervivencia embrionaria y el desarrollo en embriones de pez cebra mostraron patrones diferenciados tras la exposición a las NPs-Ag y NPs-TiO₂. Aunque las NPs-Ag mostraron una toxicidad general mínima, se detectaron reducciones significativas en la viabilidad a las 48 hpf (15 y $50 \mu\text{g/mL}$) y a las 72 hpf ($15 \mu\text{g/mL}$), a pesar de mantenerse las tasas de supervivencia por encima del 95% durante toda la exposición (figura 3B). Con respecto a las NPs-TiO₂, se encontraron diferencias significativas en la viabilidad dependientes de la concentración a las 48 hpf (15 y $25 \mu\text{g/mL}$) y a las 72 hpf (5 , 15 , 25 y $100 \mu\text{g/mL}$), observándose una disminución en las tasas de supervivencia hasta $83.13\% \pm 32.16\%$ a $25 \mu\text{g/mL}$ y $85.00\% \pm 26.22\%$ a $100 \mu\text{g/mL}$ a las 72 hpf (figura 3). Para ambas NPs, la disminución de la supervivencia coincidió con el momento de la eclosión, resaltando la protección que provee el corion (membrana semipermeable que recubre a los embriones hasta la eclosión). No se identificaron alteraciones del desarrollo en los embriones expuestos a las NPs-Ag; sin embargo, se identificó la acumulación de las NPs en el corion. Las anomalías del desarrollo en embriones expuestos a NPs-TiO₂ presentaron una respuesta no lineal dependiente de la dosis: la pérdida de pigmentación alcanzó su punto máximo de manera significativa a $50 \mu\text{g/mL}$ ($52.73\% \pm 36.55\%$), pero disminuyó a $100 \mu\text{g/mL}$ ($27.78\% \pm 33.33\%$) (figura 3), lo cual sugiere posibles cinéticas de saturación o efectos umbral. Las concentraciones más bajas de NPs-TiO₂ (5 – $25 \mu\text{g/mL}$) mantuvieron una tendencia dosis-dependiente en la reducción de la supervivencia y la pérdida de pigmentación. La acumulación de las NPs en el corion, junto con el tamaño del DH, sugiere que las NPs no pudieron atravesar el corion y alcanzar a los embriones durante esta etapa del desarrollo. Estos hallazgos subrayan la capacidad de las NPs-TiO₂ para alterar la embriogénesis de forma más severa que las NPs-Ag, con una dependencia de la dosis evidente en concentraciones de $50 \mu\text{g/mL}$, a pesar de los efectos atenuados observados en la dosis más alta, implicando mecanismos específicos de acción nanoparticulada que podrían modificarse en niveles altos de exposición.

Figura 3. Efecto de las NPs de Ag y TiO₂ en células HUVEC y en pez cebra.

A) Se muestra el ensayo de MTS para evaluar la actividad metabólica de las células HUVEC después de 24 h de exposición ($n = 4$). B) Se evaluó la supervivencia del pez cebra, la eclosión y la pérdida de pigmento hasta las 72 hpf ($n = 3$) con B) NPs de Ag y C) NPs de TiO₂. La significancia estadística fue determinada por ANOVA de una vía con la prueba *post hoc* de Tukey (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Fuente: Elaboración de los autores.

Discusión

Este estudio explora la utilidad de emplear distintos modelos biológicos para describir la toxicidad de NPs-Ag y NPs-TiO₂. A través del uso de un modelo *in vitro* (células HUVEC) y uno *in vivo* (pez cebra), se obtuvieron hallazgos complementarios relacionados con sus propiedades fisicoquímicas, comportamiento biológico y efectos toxicológicos. Los resultados permiten proponer este trabajo como un estudio comparativo descriptivo que aporta evidencia sobre los efectos diferenciales de las NPs en distintos sistemas biológicos.

De acuerdo con la literatura, ambas NPs pueden llegar a ser tóxicas para distintos organismos (Schaumann *et al.*, 2015). Las NPs-Ag se consideran especialmente tóxicas por su mecanismo de liberación de iones, razón por la cual son valoradas como agentes antimicrobianos, antifúngicos y antivirales (Chakraborty *et al.*, 2016), por lo anterior se esperaba que indujeran efectos severos en ambos modelos. Mientras que las NPs-TiO₂, al ser pasivas o persistentes, se esperaba que no presentaran efectos severos, a pesar de su actividad fotocatalítica.

Tanto las NPs-Ag como las NPs-TiO₂ presentaron morfologías poliédricas y se confirmaron sus dimensiones a escala nanométrica y su naturaleza cristalina. Las NPs-Ag mostraron una estructura de plata metálica, mientras que las NPs-TiO₂ se confirmaron en fase anatasa, como lo demostraron los análisis de DRX y UV-Vis. De acuerdo con la caracterización en seco, se confirma la presencia del recubrimiento de PVP, lo cual podría influir en las interacciones de las NPs en medios biológicos. Es notable que ambas NPs presentaron tendencia a aglomerarse a pesar de los esfuerzos de dispersión, un desafío común en la investigación con NPs que puede afectar su biodisponibilidad y perfil toxicológico (Joudeh y Linke, 2022). Sin embargo, su comportamiento en entornos biológicos varió notablemente según el medio de exposición, lo cual resalta la necesidad de realizar una caracterización específica para cada modelo. Por ejemplo, en el medio de cultivo celular F-12 utilizado para los ensayos *in vitro*, ambas NPs presentaron un aumento en el tamaño, probablemente debido a la formación de coronas proteínicas o agregación, pudiendo influir en la captación celular y la toxicidad. Mientras que las NPs-Ag mostraron disminución del DH dependiente del tiempo en agua de embriones, lo cual sugiere procesos de disolución relevantes para exposiciones acuáticas *in vivo*, las NPs-TiO₂ se mantuvieron más estables, congruentes con su característica de persistencia. Aun así, ambas NPs aumentaron al menos un orden de magnitud en su diámetro al encontrarse en solución en comparación con su tamaño de partícula, lo cual es una característica de la presencia del recubrimiento de PVP y aglomeración, repercutiendo en la disponibilidad de las NPs para interactuar con los organismos. Es importante mencionar que las NPs-TiO₂ a dosis elevadas forman aglomerados que exceden el tamaño permisible de los poros del corion (0.5-0.7 µm), disminuyendo su biodisponibilidad e internalización en comparación con concentraciones más bajas, en las cuales predominan partículas individuales o pequeños agregados. Estos hallazgos, en conjunto, enfatizan que la estabilidad y las interacciones de las NPs dependen en gran medida del medio en el cual se encuentren, reforzando la necesidad de evaluarlas en condiciones que imiten estrechamente cada modelo biológico.

En el modelo celular, los resultados demuestran que las NPs-Ag exhiben una citotoxicidad significativamente mayor que las NPs-TiO₂ en las células HUVEC, con valores de IC₅₀ de 11.42 µg/mL y 18.17 µg/mL, respectivamente. Esta diferencia se atribuye a la capacidad de las Ag-NPs para liberar iones de plata y generar ROS, mecanismos que inducen daño mitocondrial y apoptosis. Por el contrario, las TiO₂-NPs, aunque menos tóxicas, afectaron el metabolismo celular a las concentraciones más altas evaluadas, coincidiendo con lo reportado por Gholinejad *et al.* (2019), en células HUVEC tras 24 h de exposición a NPs-TiO₂ de 10.74-30.41 nm, en las que se vinculó su actividad a estrés oxidativo, inflamación y muerte celular por apoptosis (Gholinejad *et al.*, 2019). La menor reactividad de las NPs-Ag sugiere que el recubrimiento de PVP en nuestras NPs (más pequeñas pero estabilizadas) atenúa la libera-

ción de iones de plata, similar a Shi *et al.* (2014) donde se reportó una reducción del 80% en viabilidad a 2.5 $\mu\text{g/mL}$ con partículas de 65 nm. Este efecto varía según el modelo celular: mientras las HUVEC mostraron viabilidad del 20% a 50 $\mu\text{g/mL}$, en monocitos (THP-1), la viabilidad cayó a < 5% incluso a 10 $\mu\text{g/mL}$, resaltando la importancia de la selección de líneas celulares en estudios toxicológicos. Para las NPs-TiO₂, la toxicidad reportada con partículas de 50 nm (Montiel-Dávalos *et al.*, 2012) contra la ausencia de efectos con tamaños menores (Kukia *et al.*, 2018) subraya el papel crítico del tamaño, la cristalinidad y el tiempo de exposición en su actividad biológica. Además, la mayor toxicidad observada *in vitro* en comparación con el modelo de pez cebra sugiere que los mecanismos sistémicos en organismos completos (como la desintoxicación, la biodistribución y la regulación a nivel de tejido) pueden modular y potencialmente mitigar los efectos de las NPs. Estos hallazgos enfatizan la necesidad de caracterizar rigurosamente las propiedades fisicoquímicas de las NPs (tamaño, recubrimiento, estabilidad coloidal) y estandarizar protocolos experimentales para una evaluación integral de riesgos, particularmente en aplicaciones que involucren tejidos esenciales o exposiciones prolongadas.

Mientras los modelos *in vivo* (como el pez cebra) revelan respuestas sistémicas, impactos en el desarrollo y patrones de biodistribución, los ensayos *in vitro* permiten desentrañar mecanismos moleculares y realizar perfiles utilizando técnicas de alto rendimiento. La dependencia exclusiva de un solo modelo podría subestimar riesgos críticos, siendo recomendable usar más de un tipo celular para discernir la evidencia de las diferencias en sensibilidad entre, por ejemplo, células HUVEC y monocitos THP-1, o la aparente atenuación de efectos en organismos completos debido a mecanismos de detoxificación.

La exposición del pez cebra a NPs-Ag y NPs-TiO₂ no afectó la tasa de eclosión ni la supervivencia embrionaria, lo cual indica que no hay toxicidad durante las etapas tempranas del desarrollo. No obstante, en la literatura se han reportado efectos adversos relevantes en embriones de pez cebra, como alta letalidad y malformaciones asociadas con NPs-Ag en rangos similares de concentración y tamaño (Lee *et al.*, 2012; Qiang *et al.*, 2020). Esta discrepancia podría deberse a la presencia de recubrimientos superficiales en las NPs utilizadas en este estudio. Aunque no se confirmó experimentalmente su presencia, es probable que el uso de polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizante haya influido en la biodisponibilidad del ion plata (Ag⁺), pues se ha descrito que puede formar enlaces coordinados débiles con este ion, generando especies como Ag⁰, Ag-PVP y Ag⁺ libre en solución.

Se ha propuesto que el PVP puede actuar como un acarreador de Ag⁺ lábil, reduciendo así su biodisponibilidad y, en consecuencia, su toxicidad (Romih *et al.*, 2016). De forma similar, Osborne *et al.* (2013) observaron una reducción significativa en la letalidad embrionaria al recubrir las NPs-Ag con citrato o ácido fólvico, promoviendo la acumulación en el corion, lo cual res-

palda la influencia del recubrimiento en los efectos tóxicos observados. Además, la estabilidad de las NPs-Ag está fuertemente influenciada por la salinidad del medio de exposición. En presencia de sales, las NPs tienden a desestabilizarse más rápidamente, favoreciendo la liberación de Ag^+ , que a su vez puede formar especies menos tóxicas como AgCl o Ag_2S (Sikder *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020; Schaumann *et al.*, 2015). Estos factores fisicoquímicos podrían explicar la ausencia de efectos significativos en el desarrollo temprano del pez cebra tras la exposición a NPs-Ag.

La exposición a NPs-TiO₂ comprometió ligeramente la supervivencia larval del pez cebra y generó alteraciones fenotípicas evidentes, tales como pérdida de pigmentación, menor longitud corporal y agrandamiento del saco vitelino, todas ellas características asociadas con el estrés fisiológico y al retraso en el desarrollo. Uno de los mecanismos de toxicidad más ampliamente aceptados para las NPs-TiO₂ es la generación de ROS, resultado de su actividad fotocatalítica. Esta se activa cuando las partículas son expuestas a luz cuya energía excede su banda prohibida, lo cual, en el caso de las NPs empleadas en este estudio, puede lograrse con luz visible (Pant, Park y Park, 2019). Las ROS generadas pueden interferir con múltiples procesos celulares, incluyendo la síntesis de melanina, afectando directamente a los melanocitos y provocando pérdida de coloración en el cuerpo y los ojos (Kim *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2023).

Además, el estrés oxidativo inducido por ROS puede alterar eventos clave del desarrollo temprano, como la somitogénesis y la señalización neurodesarrollativa, traducándose en malformaciones axiales y acortamiento corporal. Esto es consistente con lo reportado por Bar-Ilan *et al.* (2012), quienes observaron crecimiento atrofiado en larvas expuestas a NPs-TiO₂ de aproximadamente 23.3 ± 9.8 nm. Efectos similares concuerdan con lo reportado en otros modelos acuáticos, como *Oryzias latipes* (Paterson *et al.*, 2011), donde se observó embriotoxicidad, acumulación de NPs en el corion, malformaciones y una reducción en la supervivencia embrionaria.

En conjunto, estos resultados evidencian un perfil de toxicidad específico de las NPs-TiO₂, diferenciado del observado para NPs-Ag, reforzando la noción de que la toxicidad de las NPs está determinada no solo por sus propiedades fisicoquímicas, sino también por su interacción con los organismos. Estos hallazgos destacan la importancia de incluir la evaluación de efectos subletales y del desarrollo en la evaluación ecotoxicológica de NPs, especialmente en modelos acuáticos sensibles como el pez cebra.

A pesar de este enfoque integrador, identificamos limitaciones metodológicas. La aglomeración de NPs en medios biológicos y la falta de detección directa del recubrimiento de PVP en estudios *in vivo* destacan desafíos técnicos que podrían sesgar los resultados. Escamilla *et al.* (2019) reportaron que la toxicidad diferencial entre nanopartículas desnudas y recubiertas con PVP no fue significativa, a diferencia de otros recubrimientos, como el PEG, los cuales mostraron efectos atenuadores más marcados. Además, estudios

como el de Dagmara, M. *et al.* 2012 evidencian que el recubrimiento con PVP reduce la liberación de iones metálicos responsables del estrés oxidativo.

Futuras investigaciones están dirigidas a optimizar protocolos de dispersión, incorporar más de un modelo celular y evaluar exposiciones crónicas para reflejar escenarios realistas. Asimismo, la remoción del corión en embriones de pez cebra y el análisis de parámetros conductuales en larvas (p. ej., respuesta a estímulos, natación), como proponen Shao *et al.* (2024) y Chen, Lin y Tseng (2011), aumentarían la sensibilidad y el valor predictivo de este modelo. Debido a las diferencias filogenéticas entre el pez cebra y los humanos, los resultados obtenidos en este modelo no siempre pueden extrapolarse directamente a las toxicidades observadas en condiciones clínicas. Por ello, es necesario continuar investigando para comprender mejor cómo estas diferencias pueden influir en el valor predictivo de los estudios toxicológicos con nanopartículas.

En conjunto, los resultados demuestran que las NPs-Ag y NPs-TiO₂ poseen propiedades fisicoquímicas y que sus efectos toxicológicos son dependientes del modelo experimental utilizado. El uso de diferentes modelos permite una evaluación más integral de la toxicidad de las NPs en función de su complejidad biológica, vías de exposición y relevancia ecológica. Esta estrategia de modelo dual mejora nuestra capacidad para predecir y mitigar los riesgos que plantean las NPs en contextos reales. Este trabajo refuerza el principio de que la seguridad en aplicaciones nanotecnológicas exige estrategias multidisciplinarias, donde la caracterización rigurosa de las NPs y la selección crítica de modelos biológicos sean pilares para anticipar riesgos en la salud humana y en los ecosistemas.

Conclusiones

El aumento del DH (~10× en medios biológicos) explica la menor biodisponibilidad observada *in vivo*. El hecho de que las NPs-Ag redujeran su tamaño en agua de embrión sugiere la disolución progresiva de Ag⁺, pero su acumulación en el corion, sin efectos morfológicos, indica que la agregación limitó su penetración al embrión de pez cebra. Este fenómeno contrasta con su alta citotoxicidad *in vitro*, donde el medio F-12 (rico en proteínas) promovió coronas proteicas que facilitaron la internalización celular. La fase anatasa de las NPs-TiO₂ (confirmada por DRX y UV-Vis) tiene un bandgap de 3.07 eV, compatible con la generación de ROS bajo luz visible. Esto puede explicar la pérdida de pigmentación en las larvas, vinculada con el estrés oxidativo en melanocitos y tejidos en desarrollo. La ausencia de este efecto en HUVEC podría deberse a condiciones de cultivo sin iluminación UV, resaltando la importancia de estandarizar parámetros ambientales en ensayos *in vitro*. Aunque no se confirmó experimentalmente, el PVP declarado por el fabricante podría explicar la estabilidad diferencial de las NPs. En NPs-Ag, el PVP actuaría como quelante de Ag⁺, reduciendo su liberación y toxicidad en pez ce-

bra, concordando con estudios que vinculan recubrimientos poliméricos a menor bioactividad iónica. En NPs-TiO₂, el PVP estabilizaría la fase anatasa, modulando su actividad fotocatalítica y la generación de ROS. El aumento de tamaño en F-12 sugiere la formación de coronas proteicas, las cuales modifican la afinidad por receptores celulares. Esto podría explicar la mayor citotoxicidad de NPs-Ag en HUVEC frente a su inertancia relativa en pez cebra, donde las coronas en agua de embrión (rica en sales) favorecieron la agregación y secuestro en el corion. La relación entre propiedades fisicoquímicas (tamaño, cristalinidad, recubrimiento) y efectos biológicos subraya que la toxicidad de las NPs no es inherente, sino emergente de su interacción con entornos específicos. Este enfoque permite avanzar hacia modelos predictivos que consideren tanto parámetros intrínsecos de las NPs como variables ambientales, optimizando el diseño de nanomateriales seguros.

Contribución de autorías

Andrea Cazares Morales: desarrollo metodológico, minería de datos, análisis e interpretación, redacción del borrador original, revisión y edición final del texto.

Marisela Uribe-Ramírez y Gabriel Luna-Barcenas: desarrollo metodológico análisis e interpretación de los datos.

Hilda Lomelí Buyoli: redacción del borrador original, revisión y edición final del texto.

Denhi Schnabel-Peraza y Andrea de Vizcaya-Ruiz: concepción y diseño del artículo, minería de datos, análisis e interpretación, redacción del borrador original, revisión y edición final del texto.

Referencias

- Bar-Ilan, Ofek, Kacie M. Louis, Sarah P. Yang, Joel A. Pedersen, Robert J. Hamers, Richard E. Peterson y Warren Heideman. (2012). Titanium dioxide nanoparticles produce phototoxicity in the developing zebrafish. *Nanotoxicology*, 6(6): 670-79. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.604438>.
- Cao, Yi, Yu Gong, Liangliang Liu, Yiwei Zhou, Xin Fang, Cao Zhang, Yining Li y Juan Li. (2017). The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an *in vitro* model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. *Journal of Applied Toxicology*. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jat.3470>.
- Chakraborty, Chiranjib, Ashish Ranjan Sharma, Garima Sharma y Sang Soo Lee. (2016). Zebrafish: a complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0217-6>.
- Chen, Te Hao, Chun Yao Lin y Mei Chen Tseng. (2011). Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*). *Marine Pollution Bulletin*, 63(5-12): 303-8. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.017>.

- Dagmara Malina, Agnieszka Sobczak-Kupiec, Zbigniew Wzorek, Zygmunt Kowalski. (2012). Silver nanoparticles synthesis with different concentrations of polyvinylpyrrolidone. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(4): 1527-1534.
- Egbuna, Chukwuebuka, Vijaykumar K. Parmar, Jaison Jeevanandam, Shahira M. Ez-zat, Kingsley C. Patrick-Iwuanyanwu, Charles Oluwaseun Adetunji, Johra Khan *et al.* (2021). Toxicity of nanoparticles in biomedical application: nanotoxicology. *Journal of Toxicology*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/9954443>.
- Elzein, Basma. (2024). Nano revolution: tiny tech, big impact: how nanotechnology is driving SDGs progress. *Heliyon*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31393>.
- Emamhadi, Mohammad Ali, Mansour Sarafraz, Mitra Akbari, Van Nam Thai, Yadolah Fakhri, Nguyen Thi Thuy Linh y Amin Mousavi Khaneghah. (2020). Nanomaterials for food packaging applications: a systematic review. *Food and Chemical Toxicology*, 146(diciembre). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111825>.
- Escamilla-Rivera, V., Solorio-Rodríguez, A., Uribe-Ramírez, M., Lozano, O., Lucas, S., Chagolla-López, A., Winkler, R. y De Vizcaya-Ruiz, A. (2019). Plasma protein adsorption on Fe₃O₄-PEG nanoparticles activates the complement system and induces an inflammatory response. *International Journal of Nanomedicine*, 14(marzo): 2055-2067. <https://doi.org/10.2147/ijn.s192214>.
- Fadeel, Bengt. (2022). Nanomaterial characterization: understanding nano-bio interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier B. V. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.08.095>.
- Fadeel, Bengt, Andrea Fornara, Muhammet S. Toprak y Kunal Bhattacharya. (2015). Keeping it real: the importance of material characterization in nanotoxicology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.178>.
- Gholinejad, Zafar, Mohammad Hasan Khadem Ansari y Yousef Rasmi. (2019). Titanium dioxide nanoparticles induce endothelial cell apoptosis via cell membrane oxidative damage and P38, PI3K/Akt, NF-KB signaling pathways modulation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54(julio): 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.03.008>.
- Haque, Enamul y Alister Ward. (2018). Zebrafish as a model to evaluate nanoparticle toxicity. *Nanomaterials*, 8(7): 561. <https://doi.org/10.3390/nano8070561>.
- Horzmann, Katharine A. y Jennifer L. Freeman. (2018). Making waves: new developments in toxicology with the zebrafish. *Toxicological Sciences*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy044>.
- Johnston, H. J., Hutchison, G. R., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S. y Stone, V. (2009). Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-33>.
- Joudeh, Nadeem y Dirk Linke. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>.

- Kim, M. S., K. M. Louis, J. A. Pedersen, R. J. Hamers, R. E. Peterson y W. Heideman. (2014). Using citrate-functionalized TiO₂ nanoparticles to study the effect of particle size on zebrafish embryo toxicity. *Analyst*, 139(5): 964-72. <https://doi.org/10.1039/c3an01966g>.
- Kukia, Nasim Rahmani, Yousef Rasmi, Ardeshir Abbasi, Nana Koshoridze, Alireza Shirpoor, Giorgi Burjanadze y Ehsan Saboory. (2018). Bio-effects of TiO₂ nanoparticles on human colorectal cancer and umbilical vein endothelial cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(10): 2821-29. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.10.2821>.
- Lee, Kerry J., Lauren M. Browning, Prakash D. Nallathamby, Tanvi Desai, Pavan K. Cherukuri y Xiao Hong Nancy Xu. (2012). *In vivo* quantitative study of sized-dependent transport and toxicity of single silver nanoparticles using zebrafish embryos. *Chemical Research in Toxicology*, 25(5): 1029-46. <https://doi.org/10.1021/tx300021u>.
- Li, Penghui, Min Su, Xiaodan Wang, Xiaoyan Zou, Xia Sun, Junpeng Shi y Hongwu Zhang. (2020). Environmental fate and behavior of silver nanoparticles in natural estuarine systems. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 88(febrero): 248-59. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.09.013>.
- Macrae, Calum A. y Randall T. Peterson. (2025). Zebrafish as a mainstream model for *in vivo* systems pharmacology and toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57: 43-64. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-051421>.
- Mahmoudi, Morteza. (2021). The need for robust characterization of nanomaterials for nanomedicine applications. *Nature Communications. Nature Research*. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25584-6>.
- Manzoor, Qaisar, Arfaa Sajid, Zulfiqar Ali, Arif Nazir, Anam Sajid, Faiza Imtiaz, Shahid Iqbal, Umer Younas, Hamza Arif y Munawar Iqbal. (2024). Toxicity spectrum and detrimental effects of titanium dioxide nanoparticles as an emerging pollutant: a review. *Desalination and Water Treatment*, 317(enero). <https://doi.org/10.1016/j.dwt.2024.100025>.
- Montiel-Dávalos, Angélica, José Luis Ventura-Gallegos, Ernesto Alfaro-Moreno, Elizabeth Soria-Castro, Ethel García-Latorre, José Gerardo Cabañas-Moreno, María del Pilar Ramos-Godínez y Rebeca López-Marure. (2012). TiO₂ nanoparticles induce dysfunction and activation of human endothelial cells. *Chemical Research in Toxicology*, 25(4): 920-30. <https://doi.org/10.1021/tx200551u>.
- OECD. (2013). *Test guideline No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) Test*. Julio, 509-11. <https://doi.org/10.3109/9781841848570-66>.
- Ohsaka, T., Izumi, F. y Fujiki, Y. (1978). Raman spectrum of anatase, TiO₂. *Journal of Raman Spectroscopy*, 7(6): 321-324. <https://doi.org/10.1002/jrs.1250070606>.
- Osborne, Olivia J., Blair D. Johnston, Julian Moger, Mohammed Balousha, Jamie R. Lead, Tetsuhiro Kudoh y Charles R. Tyler. (2013). Effects of particle size and coating on nanoscale Ag and TiO₂ exposure in zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Nanotoxicology*, 7(8): 1315-24. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.737484>.
- Pant, Bishweshwar, Mira Park y Soo Jin Park. (2019). Recent advances in TiO₂ films prepared by sol-gel methods for photocatalytic degradation of organic pollut-

- ants and antibacterial activities. *Coatings*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/coatings9100613>.
- Paterson, Gordon, Jamie M. Ataria, M. Ehsanul Hoque, Darcy C. Burns y Chris D. Metcalfe. (2011). The toxicity of titanium dioxide nanopowder to early life stages of the Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 82(7): 1002-9. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.068>.
- Qiang, Liyuan, Zeinab H. Arabeyyat, Qi Xin, Vesselin N. Paunov, Imogen J. F. Dale, Richard I. Lloyd Mills, Jeanette M. Rotchell y Jinping Cheng. (2020). Silver nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) embryos: uptake, growth and molecular responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051876>.
- Raval, Nidhi, Rahul Maheshwari, Dnyaneshwar Kalyane, Susanne R. Youngren-Ortiz, Mahavir B. Chougule y Rakesh K. Tekade. (2018). Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, 369-400. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8>.
- Romih, Tea, Anita Jemec, Monika Kos, Samo B. Hočevár, Slavko Kralj, Darko Makovec y Damjana Drobne. (2016). The role of PVP in the bioavailability of Ag from the PVP-stabilized Ag nanoparticle suspension. *Environmental Pollution*, 218(noviembre): 957-64. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.044>.
- Schaumann, Gabriele E., Allan Philippe, Mirco Bundschuh, George Metreveli, Sonda Klitzke, Denis Rakcheev, Alexandra Grün *et al.* (2015). Understanding the fate and biological effects of Ag- and TiO₂-nanoparticles in the environment: the quest for advanced analytics and interdisciplinary concepts. *Science of The Total Environment*. Elsevier B. V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.035>.
- Shao, Xinting, Dandan Xiao, Zhaoyi Yang, Lulu Jiang, Yong Li, Ye Wang y Yuling Ding. (2024). Frontier of toxicology studies in zebrafish model. *Journal of Applied Toxicology*. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jat.4543>.
- Shi, Junpeng, Xia Sun, Yi Lin, Xiaoyan Zou, Zhanjun Li, Yanyan Liao, Miaomiao Du y Hongwu Zhang. (2014). Endothelial cell injury and dysfunction induced by silver nanoparticles through oxidative stress via IKK/NF-KB pathways. *Biomaterials*, 35(24): 6657-66. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.093>.
- Sikder, Mithun, Jamie R. Lead, G. Thomas Chandler y Mohammed Baalousha. (2018). A rapid approach for measuring silver nanoparticle concentration and dissolution in seawater by UV-vis. *Science of The Total Environment*, 618(marzo): 597-607. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.055>.
- Zhang, C., Willett, C. y Fremgen, T. (2003). Zebrafish: an animal model for toxicological studies. *Current Protocols in Toxicology*, 17(1). <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0107s17>.
- Zhu, Renfei, Chunlan Liu, Jingyu Wang, Li Zou, Fan Yang, Xia Chi y Jiansheng Zhu. (2023). Nano-TiO₂ aggravates bioaccumulation and developmental neurotoxicity of difenconazole in zebrafish larvae via oxidative stress and apoptosis: protective role of vitamin C. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 251(febrero). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114554>.

Zielińska, Aleksandra, Beatriz Costa, María V. Ferreira, Diogo Miguéis, Jéssica M. S. Louros, Alessandra Durazzo, Massimo Lucarini *et al.* (2020). Nanotoxicology and nanosafety: safety-by-design and testing at a glance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17134657>.