



UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
*Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista*



Efeitos de nanopartículas de prata biossintetizadas por *Aspergillus niger* em diferentes níveis tróficos

Bruna Marques Ribeiro

SÃO VICENTE

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

Efeitos de nanopartículas de prata biossintetizadas por *Aspergillus niger* em diferentes níveis tróficos

Bruna Marques Ribeiro

Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni

Coorientadores: Edison Barbieri e Fernando Perina

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

SÃO VICENTE

2020

R484e	Ribeiro, Bruna Marques Efeitos de nanopartículas de prata biossintetizadas por <i>Aspergillus niger</i> em diferentes níveis tróficos / Bruna Marques Ribeiro. -- São Vicente, 2020 57 p. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni Coorientador: Fernando Perina 1. Nanopartículas de prata micogênicas. 2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>. 3. <i>Chrorella vulgaris</i>. 4. <i>Daphnia similis</i>. 5. <i>Danio rerio</i>. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força nas horas difíceis, pelo amor e compreensão, pelo acalanto em cada choro e por me proporcionar estar escrevendo essa dissertação.

Agradeço a meus pais, por todo incentivo emocional e financeiro, pelo amor e educação que sempre me proporcionaram, pela confiança e acima de tudo por acreditarem em mim, nos meus sonhos, e me aceitarem do jeito que sou.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Dr^a Cristiane Angélica Ottoni, por toda paciência e aprendizado que despendeu a mim, por me incentivar a crescer, por saber quando e como me cobrar e por entender minhas limitações e necessidades. Agradeço por ser um exemplo de pessoa e de profissional em minha vida, por ser correta e me mostrar os valores que devem ser seguidos como pesquisadora, mãe e amiga.

Agradeço aos meus coorientadores, Dr. Fernando Perina e Prof. Dr. Edison Barbieri por me ensinar e auxiliar, pela paciência e por acreditarem em meu potencial.

Agradeço à CAPES pelo incentivo financeiro para a execução desse trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros (PPG- BAC) pela oportunidade da formação acadêmica

Agradeço ao Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista (IB-CLP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Pesca, Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMAR) e Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), pelo espaço e equipamentos cedidos.

Agradeço a meus padrinhos e seus filhos, por me darem suporte emocional e amor, por demonstrarem orgulho e sempre defenderem minhas escolhas.

Agradeço à Esther Lima, por me dar colo e me lembrar que o briho do meu olhar refente a esse trabalho existe, que eu me orgulho de ser bióloga, e que as recompensas em se enfrentar momentos de tensão são gigantes. Agradeço por me amar e me acompanhar, por ficar noites em claro secando minhas lágrimas e me auxiliando com esse trabalho.

Agradeço à Vithória Trindade, por ser uma ótima profissional, por entender minhas necessidades, por me ajudar com a execução dos testes e me mostrar que é possível.

Agradeço à Barbara Malange, minha amiga de infância que esteve ao meu lado durante todo o mestrado, que investiu em mim, me auxiliou e nunca deixou de acreditar em mim. Agradeço por sua amizade, seu companheirismo, e por ser uma mulher tão forte e maravilhosa, me servindo de inspiração.

Agradeço a meus amigos da UNESP, principalmente a Ingrid Andrade, Victória Pinheiro, Giulia Terleck, Thais Piola, Samantha Abreu, Vivian Dinamarco, Julia Raquel do Carmo, Marina Marconi, Cindila Bertolucci, Sérgio Alves, Pedro Moura, Murilo Pratezi, Vitor Lopes, Joana Lima, Gabriela Cabrera, Letícia Forato, Claudia Aquaroli, Victória Ulman, Adriana Cortez, Isabella Beverari, Marjorie Jasper, Gabriela Fialho, Alice Lima, Evelyn Mendes, André Costa e André Madeira.

Agradeço a Paulo e Simone Moura Lima, por me mostrarem as oportunidades de biólogos fora da academia, por me apoiarem e me acolherem em sua família.

RESUMO

A utilização de nanopartículas de prata (AgNP) biológicas nos dias atuais é uma alternativa promissora frente as obtidas por via sintética (VS), uma vez que, não geram resíduos em seu processo de síntese e possuem superfície revestida por proteínas que viabilizam sua incorporação em diversos compostos comerciais, sendo os fármacos os de maior destaque. O efeito do descarte de AgNP sintéticas no meio ambiente é atualmente fonte de investigação de diversos grupos de pesquisa, entretanto, são restritas as informações associadas as AgNP biológicas. Diante deste contexto, o presente estudo utilizou a AgNP IBCLP20 biossintetizada pelo fungo *Aspergillus niger* para avaliar a sua ação antimicrobiana e efeito tóxico em ambiente aquático dulcícola utilizando organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos. Nos ensaios antimicrobianos a AgNP IBCLP20 apresentou excelente ação antibacteriana em uma faixa de concentração de 5 a 100 µg/mL e ação antifúngica na faixa de concentração de 20 a 100 µg/mL. A densidade celular da microalga *Chrorella vulgaris*, quando exposta a AgNP IBCLP20 e ao sal precursor AgNO₃, na maior concentração analisada (100 µM/mL) e após 96 horas de incubação, apresentou uma taxa de redução de 34,4% e 85,71%, respectivamente. Nas mesmas condições supracitadas, só foi detectada viabilidade celular da microalga quando exposta a AgNP biológica (65,38%). A letalidade média em *D. silimis* causada pelas AgNP IBCLP20 foi estimada a uma concentração de 4,06 µg/L (2,29 -6,42). , Utilizou-se também, os biomarcadores fisiológicos consumo de oxigênio e excreção de amônia como respostas as alterações no metabolismo no peixe *Danio rerio* exposto AgNP IB-CLP20, AgNP comercial e AgNO₃. A exposição a AgNP IBCLP20 ocasionou aumento significativo (p<0,05) do consumo de oxigênio pelo *D. rerio* de aproximadamente 200% na maior concentração estudada (75 µg/L). A excreção de amônia apresentou um aumento nas concentrações iniciais de exposição, chegando a elevar-se duas vezes quando comparada ao controle, seguida por uma queda nas concentrações mais elevadas. Para AgNP comercial o consumo de O₂ não apresentou diferenças significativas e a excreção de amônia apresentou uma queda em todas as concentrações. Para AgNO₃ o metabolismo apresentou um aumento nas primeiras concentrações chegando a aproximadamente 300% o consumo do controle, seguido por uma queda nas demais concentrações e a excreção de amônia apresentou um decréscimo em todas as concentrações analisadas.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata micogênica; *Klebsiella pneumoniae*; *Trichophyton mentagrophytes*, *Chrorella vulgaris*; *Daphnia similis*, *Danio rerio*.

ABSTRACT

The use of biological silver nanoparticles (AgNP) today is a promising alternative compared to those obtained synthetically (VS), since they do not generate residues in their synthesis process and have a surface coated with proteins that enable their incorporation in several commercial compounds, with drugs being the most prominent. The effect of discarding synthetic AgNP in the environment is currently a source of investigation for several research groups, however, information associated with biological AgNP is restricted. In this context, the present study used the AgNP IBCLP20 biosynthesized by the fungus *Aspergillus niger* to evaluate its antimicrobial action and toxic effect in aquatic dulcicle environment using organisms belonging to different trophic levels. In antimicrobial tests, AgNP IBCLP20 showed excellent antibacterial action in a concentration range of 5 to 100 µg / mL and antifungal action in the concentration range of 20 to 100 µg / mL. The cell density of the microalgae *Chrorella vulgaris*, when exposed to AgNP IBCLP20 and the precursor salt AgNO₃, in the highest concentration analyzed (100 uM / mL) and after 96 hours of incubation, showed a reduction rate of 34.4% and 85.71 %, respectively. Under the same conditions mentioned above, cell viability of the microalgae was only detected when exposed to biological AgNP (65.38%). The average lethality in *D. silimis* caused by AgNP IBCLP20 was estimated at a concentration of 4.06µg/L (2.29 -6.42). , The physiological biomarkers oxygen consumption and ammonia excretion were also used as responses to changes in metabolism in exposed fish *Danio rerio* AgNP IB-CLP20, commercial AgNP and AgNO₃. Exposure to AgNP IBCLP20 caused a significant increase (p <0.05) in oxygen consumption by *D. rerio* of approximately 200% at the highest concentration studied (75µg/L). The excretion of ammonia showed an increase in the initial exposure concentrations, reaching an increase twice when compared to the control, followed by a decrease in the higher concentrations. For commercial AgNP, O₂ consumption did not show significant differences and ammonia excretion decreased in all concentrations. For AgNO₃, metabolism showed an increase in the first concentrations reaching approximately 300% of the control consumption, followed by a drop in the other concentrations and the excretion of ammonia showed a decrease in all the analyzed concentrations.

Key words: Micogenic silver nanoparticles; *Klebsiella pneumoniae*; *Trichophyton mentagrophytes*, *Chrorella vulgaris*; *Daphnia similis*, *Danio rerio*.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract.....	viii
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xi
Lista de Siglas.....	xii
1. Introdução.....	13
2. Revisão Bibliográfica.....	14
2.1. Nanomateriais micogênicos	14
2.2. Nanopartículas de prata	15
2.3. Ecotoxicidade das nanopartículas de prata	16
2.4. Organismos-teste	17
2.4.1. <i>Chlorella vulgaris</i>	17
2.4.2. <i>Daphnia similis</i>	18
2.4.3. <i>Danio rerio</i>	19
3. Objetivo.....	20
3.1. Objetivo geral	20
4. Materiais e métodos	21
4.1. Biossíntese de AgNP	21
4.1.1. Inóculo	21
4.1.2. Biossíntese	21
4.2. Detecção e caracterização das AgNP.....	22
4.2.1. UV-vis (UV-vis)	22
4.2.2. Análise de tamanho de partícula e distribuição das AgNP.....	22
4.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	22
4.3. Utilização das AgNP como agentes antimicrobianos	22
4.3.1. Difusão em disco	22
4.3.2. Determinação de Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fúngica mínima (CFM).....	23
4.4. Ensaio de fitotoxicidade com <i>Chlorella vulgaris</i>	24
4.4.1. Densidade celular	25
4.4.2. Determinação da viabilização celular	25
4.5. Ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	25

4.6.	Ensaio do efeito no metabolismo de rotina em <i>Danio rerio</i>	26
4.7.	Análises Estatísticas.....	27
4.7.1.	Toxicidade aguda.....	27
4.7.2.	Metabolismo de rotina	28
5.	Resultados e Discussão	29
5.1.	Caracterização.....	29
5.2.	Ensaio antimicrobiano	30
5.2.1.	Difusão em disco	30
5.2.2.	Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fúngica mínima (CFM)	31
5.3.	Ensaio de Fitotoxicidade com <i>Chlorella vulgaris</i>	33
5.3.1.	Densidade celular	33
5.3.2.	Viabilidade celular.....	34
5.4.	Ensaio de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia similis</i>	35
5.5.	Ensaio do efeito no metabolismo de rotina em <i>Danio rerio</i>	36
6.	Conclusão.....	42
7.	Referências Bibliográficas	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Cultura da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em meio Bold Basal.	24
Figura 2 - Microscopia de transmissão eletrônica das AgNPs IBCLP20.	29
Figura 3 - Diâmetro do halo de inibição de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (A), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (B), <i>Staphylococcus aureus</i> (C) exposto à diferentes concentrações de AgNP IBCLP20, AgNO ₃ e Estreptomicina.	31
Figura 4 - Efeito da exposição da AgNP IBCLP20 no crescimento celular de <i>Chlorella vulgaris</i>	34
Figura 5 - Densidade celular de <i>C. vulgaris</i> viáveis quando expostas a diferentes concentrações da AgNP IBCLP20 (μM/mL) e ao controle positivo AgNO ₃ (μM/mL) (+) ou início e término de 96 horas de exposição.	35
Figura 6 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com <i>D. similis</i> exposta a diferentes concentrações da AgNP IB-CLP20. As barras de erro correspondem ao desvio padrão. *Diferença Significativa ($p < 0,05$).	36
Figura 7 - Consumo específico de oxigênio (mLO ₂ /g/L/h) (A) e excreção específica de amônia (mg/L/g/h) (B) de indivíduos de <i>D. rerio</i> expostos a diferentes concentrações de AgNO ₃ , AgNP comercial e AgNP IB-CLP20 (μ/L) e seus respectivos desvios padrão. *Diferença Significativa ($p < 0,05$).	37
Figura 8 - Consumo específico de oxigênio (mLO ₂ /g/L/h) (A) e excreção específica de amônia (mg/L/g/h) (B) de indivíduos de <i>D. rerio</i> expostos a diferentes concentrações de AgNO ₃ , AgNP comercial e AgNP IB-CLP20 (μ/L) e seus respectivos desvios padrão. *Diferença Significativa ($p < 0,05$).	37
Figura 9 - Média do consumo específico de oxigênio (mLO ₂ /g/L/h) (A) e excreção específica de amônia (mg/L/g/h) (B) de 6 indivíduos de <i>D. rerio</i> expostos a diferentes concentrações de AgNP IBCLP20 (μ/L) e seus respectivos desvios padrão.	38
Figura 10 - Média do consumo específico de oxigênio (mLO ₂ /g/L/h) (A) e excreção específica de amônia (mg/L/g/h) (B) de 6 indivíduos de <i>D. rerio</i> expostos a diferentes concentrações de comercial (μ/L) e seus respectivos desvios padrão.	38
Figura 11 - Média do consumo específico de oxigênio (mLO ₂ /g/L/h) (A) e excreção específica de amônia (mg/L/g/h) (B) de 6 indivíduos de <i>D. rerio</i> expostos a diferentes concentrações de AgNO ₃ (μ/L) e seus respectivos desvios padrão.	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Fungos filamentosos biossintetizadores de nanopartículas metálicas	15
Tabela 2 - Caracterização da AgNP IBCLP20	29
Tabela 3 - Concentrações mínimas inibitórias (CIMs) das AgNPs IB-CLP20 em <i>Aspergillus niger</i> (IPT295), <i>Penicillium funiculosum</i> (IPT423), <i>Fusarium oxysporum</i> (IPT330), <i>Aspergillus fumigatus</i> (IPT728), <i>Aspergillus parasiticus</i> (IPT729), <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (IPT311)	33

LISTA DE SIGLAS

AgNP- Nanopartícula de Prata

BDA- Batata Dextrose Agar

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CFM- Concentração Fúngica Mínima

IB-CLP- Instituto de Biociências- Câmpus Litoral Paulista

IPT- Instituto de Pesquisa Tecnológica

PDI- Índice de Polidispersão

SPR- Ressonância Plasmônica Superficial

MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEA- Ágar Extrato Malte

MGLP- Malte glicose extrato de levedura Peptona

NP- Nanopartícula

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas de prata (AgNP) possuem vasta aplicação em diversas áreas industriais e ambientais. Geralmente, são três fatores principais necessários para a síntese de AgNP, incluindo a presença de íons de prata, agentes redutores e reagentes de revestimento. Muito embora a síntese de AgNP seja bem estabelecida por métodos químicos, os mesmos ainda apresentam custo elevado na produção e geram resíduos tóxicos que representam um elevado risco ao meio ambiente. Deste modo, nos dias atuais, os processos de síntese de nanopartículas que não afetem o meio ambiente é um ponto amplamente discutido na nanotecnologia.

A tendência atual destaca a utilização de recursos biológicos como fontes redutoras de metais. As bactérias, fungos, algas e plantas são organismos descritos como biossintetizadores de nanomateriais metálicos (RAHMAN *et al.*, 2019). Dentre os organismos supracitados, os fungos são considerados promissores devido apresentarem fácil manipulação, baixo custo na produção, não gerarem resíduos tóxicos no processo de síntese e apresentarem facilidade na operação de ampliação de escala. Muito embora a obtenção de AgNP por via biológica possa diminuir o risco de contaminação, uma vez que, não são gerados resíduos tóxicos durante o processo de síntese, os riscos decorrentes da liberação destas AgNP no meio ambiente precisam ser melhor estudados, principalmente devido às transformações no ambiente que modificam suas propriedades, assim como, a toxicidade (JORGE DE SOUZA *et al.*, 2019).

Os potenciais riscos para sistemas aquáticos são em sua grande maioria conduzidos em estudos que utilizam AgNP sintéticas. Estudos de amplo espectro demonstraram que as AgNP sintéticas e Ag^+ são tóxicos para os organismos dos ecossistemas aquáticos, incluindo bactérias, micro e macro algas, plantas aquáticas, crustáceos e peixes (TAYEMEH *et al.*, 2020). Diante deste contexto, a fim de ampliar o conhecimento a respeito do efeito da AgNP biológica ICBLC20, o presente estudo avaliou sua ação antimicrobiana e potenciais efeitos tóxicos em organismos de ambiente aquático dulcícola pertencentes a diferentes níveis tróficos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nanomateriais micogênicos

Nanomateriais têm sido amplamente utilizados no mercado e o interesse sobre suas propriedades continua crescendo, esse cenário se dá a vasta aplicação que esses materiais podem assumir. Suas propriedades diferem de átomos individuais, moléculas ou materiais macroscópicos e, quando seu tamanho é compreendido entre 1 e 100 nanômetros, são classificados como nanopartículas (NPs) (LÓPEZ-SERRANO *et al.*, 2014; BOVERHOF *et al.*, 2015; HULKOTI *et al.*, 2014; NOWACK e BUCHELI, 2007; SUN *et al.*, 2017).

A caracterização das NPs é essencial para garantir a qualidade e segurança de sua utilização, existe uma ampla variabilidade de tamanho, carga e dispersão das NPs de uma mesma constituição química, que geralmente é desconhecida em diferentes condições experimentais. Essas medidas são comumente avaliadas por espalhamento dinâmico luz (“Dynamic Ligth Scattering-DLS”), espectroscopia ótica e microscopia eletrônica (SAPSFORD *et al.*, 2011; POWERS *et al.*, 2006).

Sua síntese pode ser realizada por diferentes métodos, podendo ser químicos, físicos ou biológicos. Os métodos biológicos prometem ser uma alternativa simples, ecológica e de baixo custo quando comparado aos os outros métodos, que demandam uma elevada utilização de energia, instrumentação complexa, e utilização de reagentes químicos, muitas vezes tóxicos (OTTONI *et al.*, 2017; MOANEZI *et al.*, 2014; JIRAVOVA *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2020).

Diversos microrganismos são capazes de biossintetizar NPs metálicas, porém as biossintetizadas por fungos filamentosos apresentam vantagens sobre as demais (SIMÕES *et al.* 2020). Fungos filamentosos (Ff) são resistentes à metais e possuem a capacidade de bioacumulação, o que proporciona a síntese de diferentes NPs (Tabela 1). Eles secretam enzimas e outras proteínas de fácil manipulação em uma proporção maior que os demais microrganismos (OTTONI *et al.*, 2014), proporcionando uma biossíntese extracelular de rápida purificação e com melhor manipulação. Os Ff resistem à pressão de fluxo, agitação e outras condições necessárias para ampliação de escala de produção, suas nanopartículas são agentes antibacterianos inorgânicos seguros que demonstraram exibir uma forte toxicidade para uma ampla gama de microrganismos e baixa toxicidade para humanos (MUNDARAGI *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Fungos filamentosos biossintetizadores de nanopartículas metálicas

Fungo	Nanopartícula metálica	Referência
<i>Alternaria tenuissima</i>	Óxido de zinco (ZnO)	ABDELHAKIM <i>et al.</i> , 2020
<i>Pleurotus florida</i>	Prata (Ag)	KAUR <i>et al.</i> , 2019
<i>Colletotrichum incarnatum</i>	Prata (Ag)	CHANDANKERE <i>et al.</i> , 2020
<i>Penicillium oxalicum</i>	Prata (Ag)	FEROZE <i>et al.</i> , 2019
<i>Trichoderma spp.</i>	Prata (Ag)	RAMOS <i>et al.</i> , 2020
<i>Periconium sp</i>	Óxido de zinco (ZnO)	GANESAN, 2020
<i>Aspergillus niger</i>	Óxido de ferro (CuO)	CHATTERJEE <i>et al.</i> , 2020
<i>Jahnula aquatica</i>	Ouro (Au)	MOHAMED, 2020
<i>Trichoderma sp</i>	Óxido de cobre (CuO)	SARAVANAKUMAR <i>et al.</i> , 2019
<i>Penicillium citreonigrum</i> <i>Dierckx and</i> <i>Scopulariopsis brumptii</i>	Prata (Ag)	HAMAD, 2019
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Prata (Ag)	OTHMAN <i>et al.</i> , 2019
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	Prata (Ag)	JANAKIRAMAN <i>et al.</i> , 2019
<i>Trichoderma harzianum</i>	Prata (Ag)	GUILGUER-CASAGRANDE <i>et al.</i> , 2019

2.2.Nanopartículas de prata

A prata é conhecida desde a antiguidade como um ótimo agente antimicrobiano (NOMIYA *et al.*, 2004; BALAKUMARAN *et al.*, 2016), porém, apresenta elevada toxicidade, sendo este um dos fatores que desencadearam a sua substituição por antibióticos. Com o aumento da resistência bacteriana e a chegada das “super bactérias” ocorreu a urgência na criação de tecnologias alternativas no combate a estes

microrganismos, nesse momento teve início a ascensão das AgNP (ANFOSSI *et al.*, 2018).

As AgNP são descritas principalmente por sua atividade antimicrobiana, antifúngica e antiviral, destacando-se no desenvolvimento de produtos nanotecnológicos (FABREGA *et al.*, 2009). Estudos recentes ressaltam sua eficiente ação principalmente contra bactérias e fungos recorrentes em infecções (BAKER *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2018; RAHISUDDIN *et al.*, 2015; MOHAN *et al.*, 2014). Por essa razão a produção de itens de higiene, fármacos e cosméticos é cada vez maior (DASARI E HWANG, 2010), levando a uma crescente utilização de produtos contendo prata, que ocasionará na liberação das AgNPs no meio ambiente (LEKAMGE *et al.*, 2018).

Na superfície das AgNP ocorre a liberação de íons que são capazes de alterar os processos biológicos em diversos organismos devido a propriedade químicas, ocorre então a acumulação e consequentemente substituições em processos responsáveis pela regulação do metabolismo celular (BURY, 2009; LIU *et al.*, 2010; LUOMA, 2008).

Apesar da diversidade de potenciais aplicações, os nanomateriais metálicos podem desencadear riscos a saúde humana, causando alterações no metabolismo, na estrutura celular (TIAN *et al.*, 2018) e ao meio ambiente, quando os resíduos são descartados na água e entram em contato com a fauna e flora (KRISHNARAJ *et al.*, 2016; SMÉKALOVÁ *et al.*, 2018).

2.3. Ecotoxicidade das nanopartículas de prata

Fatores como tamanho, forma, características de superfície e taxa de dissolução podem influenciar na interação das AgNP com sistemas biológicos (MATHIAS *et al.*, 2015). Deste modo, no ambiente natural, as AgNP podem sofrer alterações em suas propriedades, transporte e toxicidade, levando à potencialização dos efeitos danosos à biota aquática. Os organismos do ambiente aquático são particularmente vulneráveis a estes contaminantes, uma vez que a absorção pode ser facilitada e acarretar em danos fisiológicos, bem como disfunções celulares (PASCHOALINO *et al.*, 2010). Assim, estudos ecotoxicológicos têm sido realizados para identificar o potencial de toxicidade das AgNPs em diferentes modelos biológicos, como bactérias (RAI *et al.*, 2009), fungos (CARREIRA *et al.*, 2009), invertebrados (SILLER *et al.*, 2013; MANNO *et al.*, 2013;

CHAN & CHIU, 2015; MAZIERO *et al.*, 2016) e peixes (WANG & WANG, 2014; MCGILLICUDDY *et al.*, 2017).

Apesar do pouco conhecimento a cerca das AgNP, os íons de prata são considerados persistentes e altamente tóxicos a diversos organismos aquáticos (FABREGA *et al.*, 2011). No Brasil, a resolução CONAMA (BRASIL, 2009, 2018) indica os valores máximos de prata permitidos em águas de diferentes classes, sendo de 100 µg/L em águas para consumo humano, de 50µg/L em águas para recreação e de 10µg/L como limite de quantificação praticável. Esses valores são estabelecidos apenas para os íons de prata, porém não existem valores delimitados para AgNP. Entretanto, resultados recentes apontam que, em certos casos, as nanopartículas podem ser mais tóxicas que os íons metálicos correspondentes (LI *et al.*, 2015; SAKAMOTO *et al.*, 2015; SHEN *et al.*, 2015; FABREGA *et al.*, 2011; SØRENSEN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017; PAKRASHI *et al.*, 2017; ABRAMENKO *et al.*, 2018).

As AgNP apresentam comportamento complexo em meio aquático e, embora exista a necessidade de conhecer seus efeitos tóxicos, é necessário identificar os fatores que podem alterar sua toxicidade, como tamanho, formato, área superficial, aglomeração, e a pureza (HU *et al.*, 2016; FEKETE-KERTÉSZ *et al.*, 2017). A toxicidades das AgNP sintéticas apresenta diferenças significativas dependendo das espécies-teste, tornando necessário o desenvolvimento de uma distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) que abranja uma vasta gama de espécies e estabeleça concentrações limiares para esse nanomaterial (GARNER *et al.*, 2015; BELANGER *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2014; KWART *et al.*, 2016). Estudos de toxicidade com mais de uma espécie, com diferentes níveis tróficos ou espécies com diferentes estratégias de vida são escassos (LEKAMGE *et al.*, 2018; OTTONI *et al.*, 2020). Entretanto, estudos indicam que o comportamento da prata pode ser diferente em grupos animais distintos, em algas e poliquetas, por exemplo, podem bioacumular mais rapidamente a prata na forma de sal (AgNO₃), enquanto os invertebrados e peixes apresentam maior taxa de bioacumulação na forma de nanopartículas (MCGILLICUDDY *et al.*, 2017).

2.4. Organismos-teste

2.4.1. *Chlorella vulgaris*

A *Chlorella vulgaris* é uma microalga da ordem Chlorococcales, na natureza é encontrada em água doce, salgada e no solo. Esta microalga se reproduz de forma assexuada, por divisão mitótica gerando células idênticas (HOEK *et al.*, 1995).

Esta espécie foi a primeira microalga da ordem Chlorococcales a crescer em ambiente laboratorial e a facilidade de sua manutenção em cultura torna-a um microorganismo ideal. A capacidade fotossintetizante faz do organismo um produtor primário, base de diversas cadeias tróficas, a alteração em sua quantidade ou qualidade acarretaria em o desequilíbrio de um ecossistema como um todo (YAN & PAN, 2002).

Estudos anteriores apontaram a capacidade de *C. vulgaris* em absorver metais, principalmente (SOLDO & BEHRA, 2000; KNAUER *et al.*, 1997). O processo de incorporação de metais consiste na absorção e bioacumulação destes de forma ativa e pode intervir no metabolismo da célula (YAN & PAN, 2002)

2.4.2. *Daphnia similis*

Invertebrados constituem cerca de 95% das espécies do planeta e são cosmopolitas e apresentam abundância populacional, essa é uma das explicações para sua importância em estudos de ecotoxicidade (FOSSI *et al.*, 1998). São consumidores primários, se alimentando de microalgas e matéria orgânica em suspensão (BUIKEMA & SHERBERGER, 1977), e qualquer alteração em sua qualidade ou quantidade pode comprometer nos demais níveis tróficos. Dentre os invertebrados mais utilizados em estudos ecotoxicológicos, os microcrustáceos dulcícolas do gênero *Daphnia* se destacam por apresentarem reprodução assexuada por partenogênese, o que garante organismos-teste geneticamente idênticos e com a mesma sensibilidade a diferentes compostos (DOMINGUES & BERTOLETTI, 2006; COSTA *et al.*, 2017).

A espécie *Daphnia similis* foi escolhida devido a sua alta sensibilidade a poluentes, bem como sua importância como base da cadeia alimentar em ecossistemas de água doce os torna um modelo biológico adequado para ecotoxicologia (LEKAMGE *et al.*, 2018). Pequenas alterações na qualidade e quantidade da população de dafnínidos prejudicam diretamente outras populações de organismos aquáticos, levando a grandes impactos ambientais (MARTINS *et al.*, 2007). Além disso, estudos de exposição de *D. similis* à AgNP têm sido realizados para avaliar a bioacumulação das

NPs nos organismos aquáticos, e identificar as CL50 de AgNP sintéticas de diferentes características (VOLKER *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017).

2.4.3. *Danio rerio*

O *Danio rerio*, popularmente chamado de zebrafish ou paulistinha, é um modelo biológico, amplamente utilizado em bioensaios para avaliação de xenobióticos, dentre eles AgNP (YANG *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2011; PETERSON E MACRAE, 2012; MUTH-KOHNE *et al.*, 2013; OSBORNE *et al.*, 2015).

Os peixes estão geralmente, no nível mais elevado da cadeia trófica e com isso acabam bioacumulando poluentes em sua alimentação, além de serem sensíveis a mudanças ambientais, podendo ser usados como bioindicadores. (LE MOS *et al.*, 2007). Diferente de ensaios em células, os estudos em animais *in-vivo* permitem observar os efeitos das mais diversas exposições a longo prazo, mostrando os danos nos processos de desenvolvimento do animal até que ele se torne adulto (HILL *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2013). É um modelo de rápido desenvolvimento, fácil acesso e cultivo em laboratório, e baixo custo que apresenta alto rendimento (ZHAO *et al.*, 2013). O *D. rerio* apresenta ainda órgãos com similaridades morfológicas aos órgãos humanos, esse fator traz maior interesse na utilização da espécie pela possibilidade de relacionar os danos causados à modelos humanos (LEE *et al.*, 2012).

Os estudos com AgNP realizados em *D. rerio* são majoritariamente realizados em embriões, para avaliar o efeito agudo no desenvolvimento embrionário do peixe (MUTH-KOHNE *et al.*, 2013; OSBORNE *et al.*, 2015.; GUPTA *et al.*, 2016; MASSARKY *et al.*, 2013), os estudos realizados em adultos buscam avaliar a letalidade das AgNPs, os danos histológicos e os danos causados ao material genético, porém não se encontra na literatura estudos sobre os efeitos subletais no metabolismo dos peixes, fator de grande importância, pois pode influenciar diretamente a predação do consumidor secundário (GRIFFITT *et al.*, 2009; BACCHETTA *et al.*, 2016).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo indentificar a ação antimicrobiana e efeito tóxico da AgNP IBCLP20 biossintetizada pelo fungo *Aspergillus niger* em organismos dulcícolas pertencentes a diferentes níveis tróficos.

Para atingir tal objetivo foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar a ação antibacteriana da AgNP IBCLP20 nas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (IPT322), *Staphylococcus aureus* (IPT246) e *Klebsiella pneumoniae* (IPT412);
- b) Avaliar a a ação antifúngica da AgNP IBCLP20 nos fungos *Aspergillus niger* (IPT295), *Penicillium funiculosum* (IPT423), *Fusarium oxysporum* (IPT330), *Aspergillus fumigatus* (IPT728), *Aspergillus parasiticus* (IPT729) e *Trichophyton mentagrophytes* (IPT31);
- c) Avaliar o efeito tóxico da AgNP IBCLP20 em *Chlorella vulgaris* por densidade e viabilidade celular;
- d) Avaliar a toxicidade aguda da AgNP IBCLP20 em *Daphnia similis*;
- e) Avaliar os efeitos da AgNP IBCLP20 no consumo de oxigênio e na excreção de amônia em *Danio rerio* comparando aos efeitos de uma AgNP comercial e do metal precursor AgNO_3 .

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Biossíntese de AgNP

O processo de biossíntese de nanopartículas de prata foi realizado por via extracelular utilizando linhagem *Aspergillus niger* IBCLP20 pertencente a Coleção de Cultura do Instituto de Biociências-Câmpus do Litoral Paulista. A linhagem foi isolada de sedimento marinho proveniente da Baía do Araçá, São Sebastião-SP. A manutenção da linhagem decorreu utilizando meio de cultura MGLP (composição final: 20g/L de extrato de malte, 20g/L de glicose monohidratada, 1g/L de peptona bacteriológica, 15g/L de ágar) sendo mantida a 4 °C.

4.1.1. Inóculo

A partir das placas com meio MGLP inoculadas com a linhagem IB-CLP20, foram retirados discos de 6mm da área periférica da colônia e inseridos na região central de placas contendo meio de cultura Batata Ágar Dextrose (BDA). Após um período de incubação de sete dias à temperatura de 30 °C, as colônias crescidas foram utilizadas como fonte de inóculo para os ensaios.

4.1.2. Biossíntese

O extrato fúngico foi preparado a partir da inserção de 5 discos de 6mm da colônia de IB-CLP20 crescida em BDA em um frasco Erlenmeyer de 125mL contendo 50mL de meio de cultura MGLP (composição final: 3g/L de extrato de malte, 10g/L de glicose, 3g/L de extrato de levedura, 35g/L de peptona bacteriológica). Após 72 horas em condição padrão de agitação de 150 rpm a biomassa crescida foi filtrada e lavada com 300mL de água deionizada estéril. Cerca de 5g de biomassa úmida foi transferida a um novo Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de água deionizada estéril e mantida à agitação de 150 rpm até sua filtração, após 72 horas, realizada em papel filtro Millipore (3µm). O extrato resultante foi transferido a um novo frasco Erlenmeyer de 125mL onde foi adicionada uma solução de 1mL de nitrato de prata (AgNO_3) na concentração 1,0 mM para a realização da biossíntese.

Essa solução foi mantida em ambiente isento de luz à agitação de 150 rpm, por um período de 72 horas. Para o controle o mesmo procedimento foi adotado, contudo, a biomassa foi autoclavada após crescimento em MGLP.

4.2. Detecção e caracterização das AgNP

4.2.1. UV-vis (UV-vis)

A detecção da AgNP foi feita através de um espectrofômetro UV-vis (U-2000 Hitachi) no intervalo de comprimento de onda de 200-800 nm.

4.2.2. Análise de tamanho de partícula e distribuição das AgNP

As características principais para a utilização das NPs foram analisadas no equipamento Dynamic Light Scattering (Zetasizer Nano, ZS90). A determinação do tamanho hidrodinâmico foi realizada por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), a de carga pelo Potencial Zeta (Pz) e a aglomeração pelo índice de polidispersão (PDI).

4.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A caracterização morfológica e medida do diâmetro das AgNP foram realizadas empregando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão eletrônica (LEO 906E, Zeiss, Alemanha). As amostras de AgNP foram depositadas por gotejamento em grade de cobre recoberta com carbono para captura das imagens.

4.3. Utilização das AgNP como agentes antimicrobianos

4.3.1. Difusão em disco

As AgNP biosintetizadas foram testadas para a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco utilizando as bactérias *Klebsiella pneumoniae* (IPT 412), *Pseudomonas aeruginosa* (IPT 322) e *Staphylococcus aureus* (IPT246) cedidas pelo Instituto de Pesquisa Tecnológica Do Estado de São Paulo (IPT). Em placas de petri de 90mm, preenchidas com Ágar Mueller-Hinton, foi adicionado e distribuído de maneira uniforme, o volume de 100µl de cada cultura de bactéria (10⁶cfu/ml). Em quatro pontos

da placa, com o auxílio de um furador, foram criados poços de 4mm de diâmetro. Individualmente, os poços foram preenchidos com 50µl de AgNP, estreptomicina (controle positivo), AgNO₃ (controle positivo) ajustados nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 e 100,0µg/ml e água (controle negativo). As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após este período, foram medidos os diâmetros da zona de inibição. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.2. Determinação de Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fúngica mínima (CFM)

Para o ensaio de determinação das CIMs foi utilizada a metodologia adaptada proposta por Mann e Markham (1998). Suspensões de *Aspergillus niger* (IPT295), *Aspergillus fumigatus* (IPT728), *Aspergillus parasiticus* (IPT729), *Trichophyton mentagrophytes* (IPT311), *Penicillium funiculosum* (IPT423) e *Fusarium oxysporum* (IPT330) cedidas pelo Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo (IPT) foram preparadas com base na ABNT-NBR 14941. Os fungos foram crescidos em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) a 28°C por um período de sete dias. Após este período, foi adicionada sobre a placa 10mL de solução salina com Tween 80. As suspensões foram transferidas para um frasco Falcon e homogeneizadas em uma plataforma agitadora a 30 °C por e 100 rpm por cinco minutos. Na sequência, as suspensões foram filtradas em algodão de vidro. As concentrações das suspensões foram ajustadas com o auxílio de uma Câmara de Neubauer a $1,0 \times 10^5$ esporos·mL⁻¹ em meio Batata dextrose (BD).

Para o ensaio, foi utilizada uma placa de 96 poços estéril onde as colunas de 1-2 foram preenchidas com 200µL de meio BD, as colunas de 3-9 foram preenchidas com 170 µL de inóculo e 20µL de cada *AgNP* com concentração final variando entre 5 a 100µg/mL. As colunas 10-11 foram preenchidas com 170µL de inóculo e 20 µL de AgNO₃ (controle positivo) e clorofenicol (controle positivo), respectivamente, enquanto que, na coluna 12 foi adicionado o volume de 200µL de suspensão de esporos (controle negativo). As placas foram incubadas por 24 horas. Após a incubação, 10µL de solução de resazurina a 0,01% foram adicionados a todos os poços. Após uma segunda incubação de 72 horas a 30 °C foram determinadas as CIMs. As CIMs foram definidas como a menor concentração necessária para impedir o crescimento fúngico, ou seja, mudança da coloração azul para rosa.

O segundo teste foi realizado de acordo com o protocolo adaptado descrito por Abbaszadeh *et al.* (2014) e Li *et al.* (2016) sendo denominado CFM. Foram retirados 10µL de cada poço com ausência de crescimento visível e transferidos para placas que continham meio BDA por um período de sete dias. Após o período de incubação, foi considerado como o fungicida as *AgNP* que inibissem 100% o crescimento do organismo. Para cada *AgNP* foram realizados ensaios em duplicata.

4.4. Ensaio de fitotoxicidade com *Chlorella vulgaris*

A microalga *Chlorella vulgaris* (DC-07) foi cedida pelo Banco de Microrganismos Aidar & Kutner (BMAK) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. A renovação e manutenção da cultura foi realizada utilizando o meio de cultura líquido Bold Basal sob condições controladas de 24 ± 1 °C, iluminado com um fluxo de fótons de aproximadamente $70 \mu\text{mol de fóton m}^{-2}\text{s}^{-1}$, sob um ciclo claro:escuro de 12:12 horas. Diariamente, ocorreu contagem celular com o auxílio de uma Câmara de Neubauer para a construção da curva de crescimento e determinação da fase exponencial.



Figura 1 - Cultura da microalga *Chlorella vulgaris* em meio Bold Basal.

4.4.1. Densidade celular

Os testes de inibição de densidade celular foram realizados em *C. vulgaris*, conduzidos em tubos de ensaio com capacidade de 10mL contendo o inóculo ajustado a densidade celular de $1,0 \times 10^{-4}$ cel.mL⁻¹ em meio de cultura Bold Basal. Foi adicionado a cada tubo uma solução de AgNP IB-CLP20 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100µM/mL e um controle positivo de concentração 10µM/mL de AgNO₃.

A resposta tóxica foi avaliada às 24, 48, 72 e 96 horas após exposição dos compostos por meio da densidade ótica das microalgas em um espectrofotômetro UV-Vis, a absorbância espectrofotométrica indicou um pico de 450nm para a espécie, possibilitando acompanhar o seu crescimento durante o experimento. A incubação total ocorreu em um período de 96 horas, mantendo a temperatura 24±1 ° C. O teste foi realizado em quadruplicata e foi feita uma análise diária do pH da cultura, a fim de manter as condições e não interferir na toxicidade dos compostos ou alterar o crescimento das microalgas.

4.4.2. Determinação da viabilização celular

A viabilidade das células de *C. vulgaris* foi avaliada simultaneamente ao teste de densidade celular, no início e no término do experimento alíquotas de 50µl da amostra de cada tubo de ensaio foram centrifugadas a 5000 rpm durante 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 10µL da solução de vermelho neutro (VN) a 10% para discriminar a integridade da membrana das células. As amostras foram incubadas durante 2 horas a 25°C, conforme descrito (ZETSCHE & MEYSMAN, 2012). Após esse período as membranas celulares das microalgas presentes nas amostras foram analisadas na Câmara de Neubauer, os dados foram expressos como a porcentagem de células viáveis versus a quantidade total de células analisadas.

4.5. Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Para avaliar os efeitos de AgNP IBCLP20 em *D. similis* foram realizados ensaios de toxicidade aguda seguindo o protocolo da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT, NBR; 2009). Cinco organismos neonatos (24 horas de vida) foram introduzidos em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução de exposição de AgNP. As

soluções foram preparadas em água mineral reconstituída, cujo pH foi ajustado para 7,5. As concentrações utilizadas para a exposição dos organismos foram de 0,16; 0,8; 4,0; 20,0 e 100,0 µg/L. Foram preparadas quatro réplicas para cada concentração. O experimento foi conduzido por em câmara BOD com temperatura constante em 25°C±2 e fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro) por um período de 48 horas. Após o período de exposição, os daphnídeos vivos foram contabilizados para a determinação da LC50 – 48h (concentração letal para 50% dos indivíduos em 48 horas de exposição).

4.6. Ensaio do efeito no metabolismo de rotina em *Danio rerio*

O efeito agudo da AgNP no metabolismo de rotina de *D. rerio* foi determinado pela exposição do *Danio rerio* a diferentes concentrações de AgNP IBCLP20; AgNP comercial e AgNO₃. Trinta peixes foram separados aleatoriamente em 5 grupos, com 6 indivíduos cada, os quais foram inseridos em aquários de 5 litros, contendo água filtrada, e com pH de 6,5. Os aquários foram constantemente aerados com temperatura controlada (20 ± 1,0°C). A solução das nanopartículas e AgNO₃ dos aquários foram preparadas 30 minutos antes da inserção dos peixes nas concentrações de 25; 37,5; 50 e 75 µg/L, além dos respectivos controles, por um período de 24 horas.

Antes do início dos experimentos do consumo de oxigênio e excreção de amônia os animais foram mantidos no respirômetro com circulação contínua de água por, pelo menos, 60 minutos, para atenuar o estresse decorrente do manuseio. Em seguida, o fornecimento de água foi suspenso e o respirômetro foi fechado para que o peixe consumisse o oxigênio presente no volume conhecido de água, por um período de uma hora. Os respirômetros foram protegidos por um anteparo para isolar os animais de possíveis movimentações no laboratório. A diferença entre as concentrações de oxigênio e excreção de amônia, determinadas no início e no final do confinamento, representa o consumo do animal, durante o período. Para minimizar o efeito da falta de oxigênio sobre o metabolismo, a duração dos experimentos foi regulada de tal modo que a concentração de oxigênio no final dos experimentos fosse sempre maior do que 70% de sua concentração inicial. O oxigênio dissolvido foi determinado através do método de Winkler e a amônia pelo método de Nessler.

Foram realizadas medições do consumo de oxigênio e excreção de amônia utilizando respirômetros selados. Todos os organismos foram submetidos a medição do

consumo de oxigênio em uma das quatro concentrações (25; 37,5; 50 e 75 µg/L além do controle) de AgNP IBCLP20 .

A diferença entre as concentrações de oxigênio e da amônia determinadas no início e ao final do confinamento foram calculadas, assim com o consumo específico de oxigênio (mLO₂/g/L/h) e excreção específica de amônia (mg/L/g/h). Para tal, será considerado no cálculo o volume do respirômetro, o peso úmido do animal e o tempo de confinamento, como apresentado na equação abaixo.

$$[O_2] = 5600 \times N \text{ S}_2\text{O}_3^{2-} \times \frac{V}{V_o - R}$$

onde:

V = volume de tiosulfato gasto na titulação da amostra (mL);

N S₂O₃²⁻ = normalidade da solução de tiosulfato de sódio;

R = volume de reagentes adicionados antes da liberação do iodo (1 mL)

V_o = volume total da amostra (ou seja, volume do frasco sem tampa)

5600 = metade do volume ocupado por 1/2 mol de oxigênio (mL)

4.7. Análises Estatísticas

4.7.1. Toxicidade aguda

A comparação entre os dados de mortalidade média de *D. similis* nas diferentes concentrações de AgNP foram realizadas por Análise de Variância seguida de teste de Dunnet (nível de significância de 5%) para determinar as concentrações em que o efeito deletério foi significativo. Deste modo, foram determinadas a Concentração de Efeito Observável (CEO) e a Concentração de Efeito Não Observável (CENO) para a substância testada. Além disso, foi calculada a CL50-48h (concentração letal a 50% dos organismos em 48 horas de exposição). O valor de CL50-48h e o intervalo de confiança a 95% foram estimados pelo método de Probitos (ABOU-SETTA *ET AL.*, 1986), com auxílio o programa de computador Probit Method vers. 1.5.

4.7.2. Metabolismo de rotina

Foi realizada a verificação da normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade da Variância pelo teste de Lvene, após esse procedimento, utilizou-se ANOVA no programa R Studio. Os dados foram considerados significativos quando as diferenças apresentadas tiveram $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização

A formação da AgNP IBCLP20 foi inicialmente confirmada por detecção visual da coloração castanha e pelo pico de ressonância plasmônica superficial (SPR) na região compreendida 433 nm no espectro UV-visível. De acordo com a imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Fig. 2) as AgNP IBCLP20 possuem forma esférica. O tamanho das nanopartículas (DLS), a carga (Pz) e Índice de polidispersão (PDI) são apresentados na Tabela 2. Considerando que estas medidas ocorreram mensalmente por um período de 6 meses, a AgNP IBCLP20 apresentou estabilidade, com valor constante para todos os parâmetros analisados.

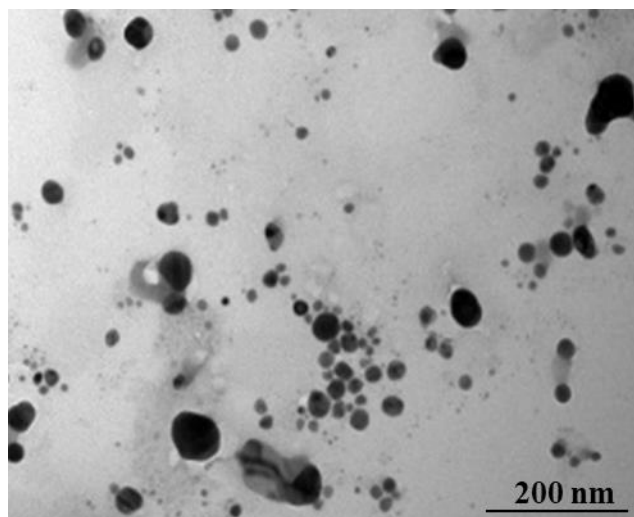


Figura 2 - Microscopia de transmissão eletrônica das AgNPs IBCLP20.

Tabela 2 - Caracterização da AgNP IBCLP20

<i>AgNP</i>	DLS (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI	Absorbância (nm)
IBCLP20	80,5	-38,56	0,215	433

Através da caracterização das NPs é possível identificar fatores como tamanho, morfologia, aglomeração e carga das mesmas, cujas propriedades físico-químicas podem interferir na toxicidade das NPs. Esse processo é então de extrema importância para estudos ecotoxicológicos, pois possibilita o entendimento de mecanismos e o planejamento dos ensaios de toxicidade (HANDY *et al.*, 2008; GIRARDELLO *et al.*,

2016). O tamanho das AgNP e sua área superficial apresentam correlação direta com a dissolução dos nanomateriais, esse fator pode controlar a solubilidade do nanomaterial e influenciar a sua persistência e liberação de íons no meio ambiente (MISRA *et al.*, 2012). O formato das NPs pode influenciar em sua bioacumulação e toxicidade, essa característica delinea a incorporação do material em diferentes organismos (DAI *et al.*, 2015; PAL *et al.*, 2015; ZHAO *et al.* 2013; WANG *et al.*, 2016).

5.2. Ensaio antimicrobiano

5.2.1. Difusão em disco

A AgNP IB-CLP20 foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas utilizadas a partir da concentração de 5µg/mL (Fig. 3). Em comparação com os controles positivos utilizados, a NP apresentou resultado mais eficiente em todas as análises em *Pseudomonas aeruginosa*. Em *Staphylococcus aureus*, apenas a concentração de 5µg/mL obteve diâmetro de inibição menor que o obtido nos controles positivos. A cepa de *Klebsiella pneumoniae* se mostrou menos sensível a AgNP IB-CLP20, entretanto os valores de diâmetros de inibição foram muito próximos aos obtidos nos controles positivos.

A maior eficiência da AgNP IB-CLP20 encontrada em *Pseudomonas aeruginosa* é resultante da melhor ação em bactérias gram-negativas. Essas bactérias apresentam uma camada fina de peptidoglicano comparada com a camada superficial de peptidoglicano das bactérias gram-positivas, que é constituída de polissacarídeos neutros e ácidos, proteínas e ácidos teicóicos. As bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* são gram-positivas, o que dificulta a ação da AgNP, explicando sua menor sensibilidade comparada a cepa gram-negativa (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Após a interação com as cepas, as AgNP podem penetrar as células e causar danos em seu interior. Morrores *et al.* (2005) apontou NPs na membrana e no interior das células bacterianas expostas em testes antimicrobianos. Em casos de interação entre as NPs e a membrana e penetração no interior celular, o DNA da bactéria se compacta e não permite a replicação das cepas (FENG *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012).

Comparando os resultados obtidos no presente estudo com os de Kora & Arunachalam (2012) as AgNP IB-CLP20 apresentaram ação antibacteriana similar a obtida por uma AgNP comercial e, também, a antibióticos existentes no mercado.

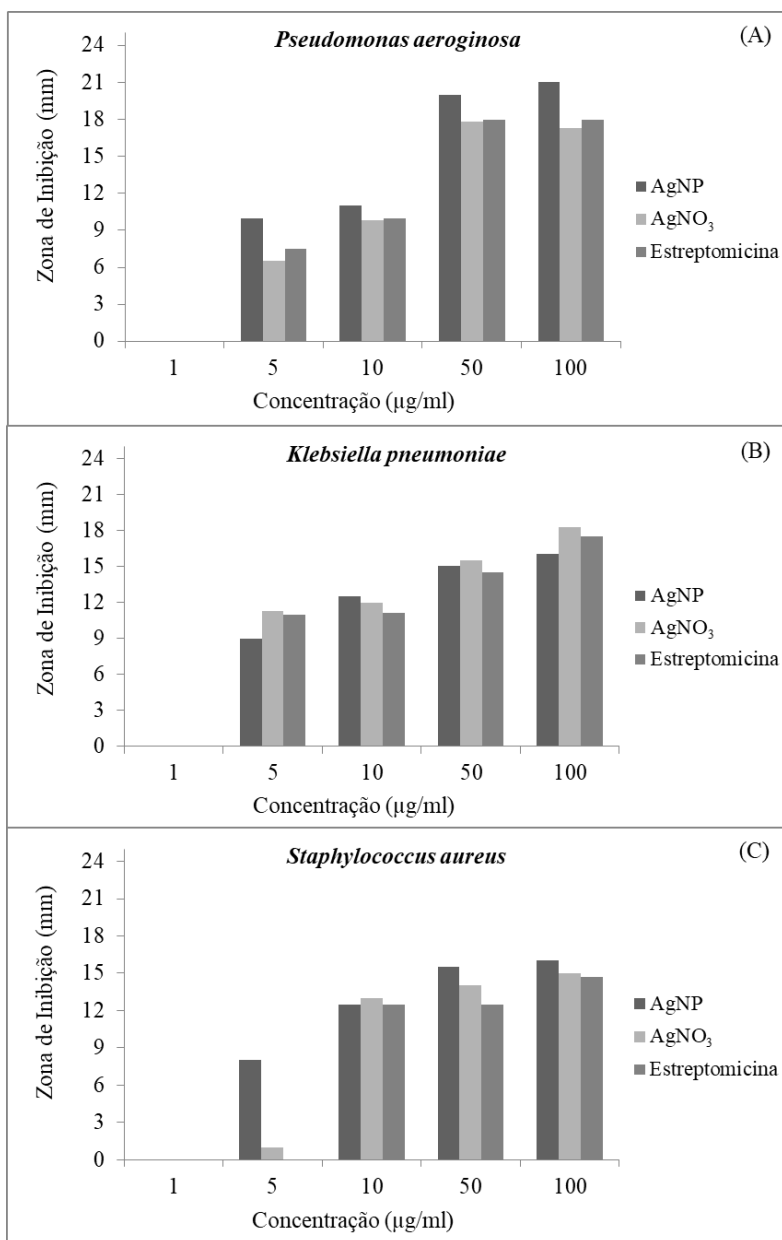


Figura 3 - Diâmetro do halo de inibição de *Pseudomonas aeruginosa* (A), *Klebsiella pneumoniae* (B), *Staphylococcus aureus* (C) exposto à diferentes concentrações de AgNP IBCLP20, AgNO₃ e Estreptomicina.

5.2.2. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fúngica mínima (CFM)

Os presentes resultados demonstraram que os houve inibição em todos os patogênicos testados. As concentrações de inibição apresentaram diferenças muito

baixas de acordo com as espécies (Tabela 3). A menor CIM das AgNPs na concentração de 20µg/mL foi obtida contra *Aspergillus niger*. O crescimento de *Penicillium funiculosum* e *Fusarium oxysporum* foi inibido na CIM subsequente em 30µg/mL. Comparado às espécies de fungos, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* e *Trichophyton mentagrophytes* foram menos sensíveis, com o valor de CIM das AgNPs atingindo 75µg/mL.

A atividade fúngica foi avaliada simultaneamente ao estudo da inibição das AgNPs de prata contra as linhagens testadas. As CMFs obtidas são consideravelmente maiores em comparação com os CIMs, porém houve proporcionalidades entre as linhagens. A ação antifúngica ocorreu a partir da concentração de 30µg/mL para a linhagem *A. niger*, para as linhagens *P. funiculosum* e *F. oxysporum* ação antifúngica ocorreu a partir da concentração de 40µg/mL, e as linhagens *A. fumigatus*, *A. parasiticus* e *T. mentagrophytes* se mostraram novamente menos sensíveis, com concentração necessária para ação antifúngica acima de 100 µg/mL.

As infecções fúngicas são conhecidas por seu difícil tratamento devido à ineficiência dos medicamentos presentes no mercado. Quian *et al.* (2013) observou que a eficácia inibitória e fúngica de AgNP é maior quando comparada a alguns antibióticos utilizados atualmente. Essa alta atividade foi descrita em diversos estudos, esses se concentram na ação das AgNPs contra infecções causadas por fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* (PETICA *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2008; GAJBHIYE *et al.*, 2009; QUIAN *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2012; PANÁECK *et al.*, 2009; RAHISUDDIN *et al.*, 2005). O mecanismo de ação antifúngica das AgNP é considerado multifatorial, ocorrendo devido ao ligamento em grupos sulfúricos nas proteínas da membrana celular e assim causando obstrução dos poros, além da interação com os fosfatos presentes no DNA e atacar enzimas responsáveis pela respiração celular, levando a apoptose (BAKER *et al.*, 2005).

Tabela 3 - Concentrações mínimas inibitórias (CIMs) das AgNPs IB-CLP20 em *Aspergillus niger* (IPT295), *Penicillium funiculosum* (IPT423), *Fusarium oxysporum* (IPT330), *Aspergillus fumigatus* (IPT728), *Aspergillus parasiticus* (IPT729), *Trichophyton mentagrophytes* (IPT311)

	IPT295		IPT728		IPT729		IPT311		IPT423		IPT330	
AgNP [µg/mL]	CIM CFM		CIM CFM		CIM CFM		CIM CFM		CIM	CFM	CIM	CFM
	20	30	30	40	30	40	75		75		75	
							100		100		100	

5.3. Ensaio de Fitotoxicidade com *Chlorella vulgaris*

5.3.1. Densidade celular

A prata iônica é considerada um dos íons mais tóxicos para os organismos aquáticos, existe uma preocupação crescente com os efeitos dos NPs de Ag no ecossistema aquático. Os organismos aquáticos são muito sensíveis aos poluentes, mas o destino e as concentrações dos NP Ag na água ainda são desconhecidos. Os dados mostram que mesmo baixas concentrações de AgNP podem afetar organismos fotossintéticos aquáticos, e o tamanho e a forma das nanopartículas desempenham um papel central na toxicidade do AgNP. A toxicidade do Ag NP não é totalmente atribuível aos íons liberados: muitos estudos mostram que em organismos fotossintéticos os íons de prata e os AgNP causaram efeitos semelhantes, embora os íons de prata fossem freqüentemente ativos em concentrações mais baixas. A toxicidade das AgNP pode ser causada por um mecanismo do tipo cavalo de Tróia, no qual as nanopartículas são internalizadas nas células, onde podem liberar íons de prata.

Os resultados obtidos na análise indicaram que a exposição com AgNP IB-CLP20 induziu um efeito inibitório no crescimento celular de *C. vulgaris* (Fig. 4). Após 24 horas de exposição, já foi possível observar uma redução na densidade celular nas maiores concentrações. A densidade celular da *C. vulgaris* diminuiu em 2% na concentração de AgNP IB-CLP20 de 10µM/mL e em 20% na concentração de 100µM/mL quando comparadas ao controle negativo. Ao fim das 96 horas de exposição, a densidade celular diminuiu 3,5% em 10 µM/mL e 37% em 100 µM/mL em comparação ao controle negativo. A análise da exposição do AgNO₃ nas microalgas mostrou que a concentração de 10 µM/mL foi biocida do início ao fim do experimento.

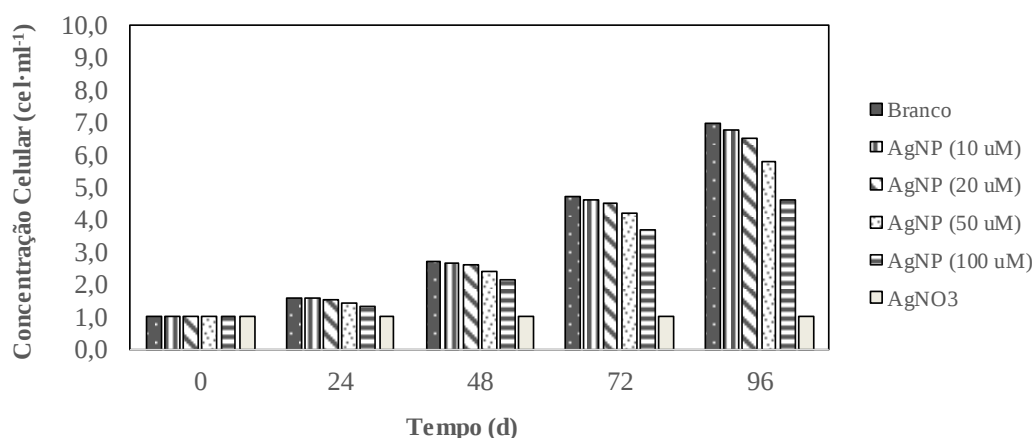


Figura 4 - Efeito da exposição da AgNP IBCLP20 no crescimento celular de *Chlorella vulgaris*.

O pH é um fator de forte influência fisiológica e controla o crescimento em microalgas. É ideal que a espécie *C. vulgaris* seja cultivada com pH entre 5,5 e 8,0, pois há inibição do crescimento quando o meio de cultivo está ácido (< 5.0) (LAU *et al.*, 1994; MAYO & NOIKE, 1994). No presente estudo, o pH meio Bold Basal ficou em 7,18 podendo ser um dos fatores favoráveis para o aumento da densidade celular.

A inibição do crescimento em *C. vulgaris* se dá principalmente pela formação de grandes agregados de células provenientes das AgNP (NAVARRO *et al.*, 2015). Esses agregados são formados porque as AgNPs são capazes de interagir diretamente com a superfície das células microalgais por adsorção nas paredes celulares (HOECKE *et al.*, 2008). Os poros existentes na parede celular das microalgas têm uma espessura variando de 5 a 20nm (NAVARRO *et al.*, 2015), portanto as AgNP IBCLP20 não foram capazes de adentrar as células, porém sua carga favoreceu a adsorção pelas paredes celulares e agiram como agentes de ligação entre as células, formando os agregados (NAVARRO *et al.*, 2015).

5.3.2. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pela presença corante biomarcador Vermelho Neutro nas membranas das células. Os resultados mostraram uma redução significativa nas células viáveis expostas a AgNP IBCLP20 em comparação do grupo controle. Após as 96 horas de exposição houve uma queda de 5% na densidade de células viáveis na concentração de 10 µM/mL e de aproximadamente 40% na concentração de 100 µM/mL em comparação ao controle. A exposição de AgNO₃ na concentração de 10

$\mu\text{M/mL}$ se mostrou tóxica e ao fim do experimento não houve presença de células viáveis (Fig 5).

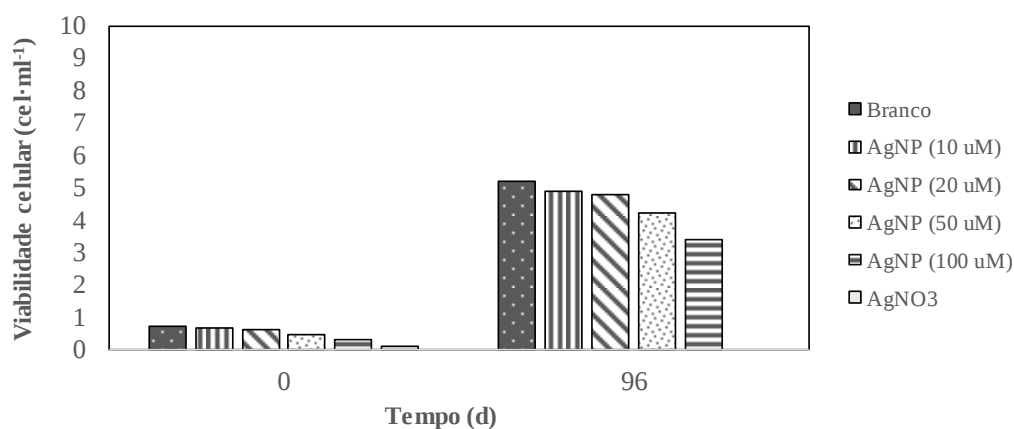


Figura 5 - Densidade celular de *C. vulgaris* viáveis quando expostas a diferentes concentrações da AgNP IBCLP20 ($\mu\text{M/mL}$) e ao controle positivo AgNO₃ ($\mu\text{M/mL}$) (+) ou início e término de 96 horas de exposição.

A viabilidade das células de *C. vulgaris* também foi afetada pela adsorção das AgNPs em sua parede celular, as NPs ligadas a parede não permitiram os processos de nutrição e reprodução das células da microalga, o que levou a apoptose (NAVARRO *et al.*, 2008). Portanto quanto maior a concentração de exposição, maior a quantidade de células afetadas pelas AgNP, ou seja, não viáveis.

5.4. Ensaio de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*

O resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* esta representado na figura 6. Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) a partir da concentração de $4\mu\text{g/L}$, sendo esta a CENO, consequentemente, maior concentração sem efeito (CEO) foi $0,8\mu\text{g/L}$. A CL50-48h estimada foi de $4,06 (2,29 - 6,42)\mu\text{g/L}$, sendo superior ao reportado na literatura para AgNPs sintéticas com as mesmas características, cujos valores variam entre $0,81$ e $2,51\mu\text{g/L}$ (POYNTON *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2012).

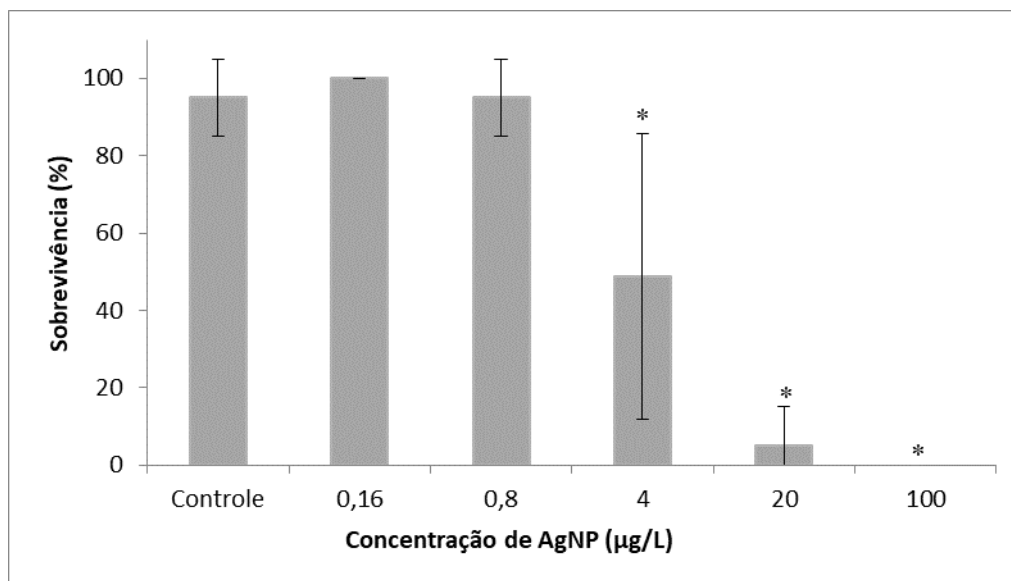


Figura 6 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *D. similis* exposta a diferentes concentrações da AgNP IB-CLP20. As barras de erro correspondem ao desvio padrão. *Diferença Significativa ($p < 0,05$).

Estudos realizados com AgNP sintéticas apontam o efeito das nanopartículas de prata na replicação do DNA, impedindo a mitose celular (CARREIRA *et al.*, 2009) e a indução de poros na parede celular, levando as células a apoptose (LE OUAY & STELLACCI, 2015). As AgNP induzem a produção de espécies reativas de oxigênio, levando a desnaturação de proteínas e danos no DNA (CHOI *et al.*, 2010; KAWATA *et al.*, 2009; ZHAO e WANG, 2011; CHOI e HU, 2008). A prata compete com Na^+ pelos sítios de ligação na enzima Na^+/K^+ ATPase causando a falha imunoregulatória e morte em invertebrados aquáticos (SHEN *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2014; CHARMANTIER e CHARMANTIER-DAURES, 2001; BIANCHINI e WOOD, 2002).

5.5. Ensaio do efeito no metabolismo de rotina em *Danio rerio*

Para uma melhor comparação das toxicidades dos compostos usados, foram gerados gráficos dos testes piloto com as concentrações responsáveis pelo efeito tóxico causado por AgNO_3 e pelas duas variedades de AgNPs. É possível observar que as concentração de ação do AgNO_3 não estavam dentro dos limites limiares das AgNPs, não houve alteração na quantidade de amônia excretada ou no perfil de consumo de oxigênio dos organismos expostos a esses nanomateriais, porém o AgNO_3 demonstrou um efeito tóxico marcado por uma aumento dose-resposta no consumo de oxigênio e

uma diminuição acentuada na excreção de amônia (Fig.7). Por outro lado, nas concentrações onde as *AgNPs* começaram a causar efeitos tóxicos, o AgNO_3 causou letalidade total antes do fim do experimento (Fig. 8).

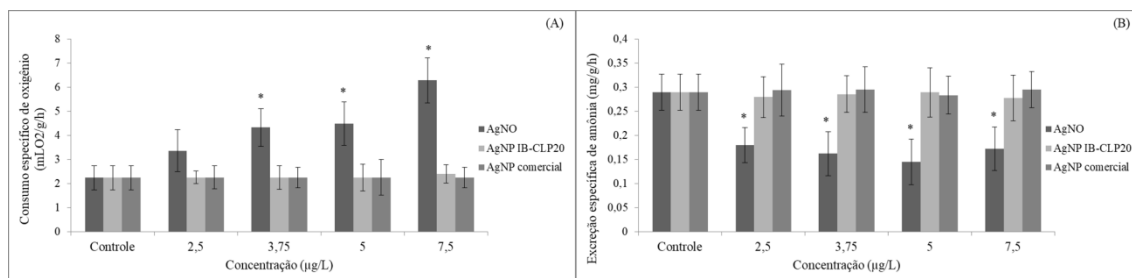


Figura 7 - Consumo específico de oxigênio ($\text{mLO}_2/\text{g/L/h}$) (A) e excreção específica de amônia (mg/L/g/h) (B) de indivíduos de *D. rerio* expostos a diferentes concentrações de AgNO_3 , *AgNP* comercial e *AgNP* IB-CLP20 (μL) e seus respectivos desvios padrão. *Diferença Significativa ($p < 0,05$).

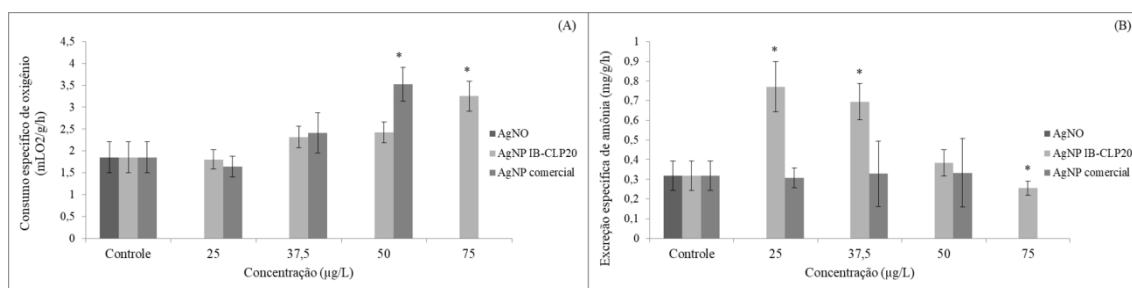


Figura 8 - Consumo específico de oxigênio ($\text{mLO}_2/\text{g/L/h}$) (A) e excreção específica de amônia (mg/L/g/h) (B) de indivíduos de *D. rerio* expostos a diferentes concentrações de AgNO_3 , *AgNP* comercial e *AgNP* IB-CLP20 (μL) e seus respectivos desvios padrão. *Diferença Significativa ($p < 0,05$).

A exposição de diferentes concentrações de *AgNP* IBCLP20 durante 24 horas não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações mais baixas, porém na concentração de $75\mu\text{g/L}$ houve o aumento no consumo específico de oxigênio foi de mais de 62% quando comparado aos indivíduos do grupo controle (Fig. 9A).

Os peixes expostos à *AgNP* IBCLP20 na concentração de $25\mu\text{g/L}$ excretaram o dobro de quantidade de amônia excretada pelos indivíduos do grupo controle, com o aumento das concentrações houve uma queda na excreção. Na concentração $37,5\mu\text{g/L}$ o valor de excreção específica foi de $0,4859\text{mg/L/g/h}$, seguindo pelos valores de $0,2765$ e $0,2305\text{mg/L/g/h}$ nas concentrações de 50 e $75\mu\text{g/L}$ respectivamente (Fig. 9B).

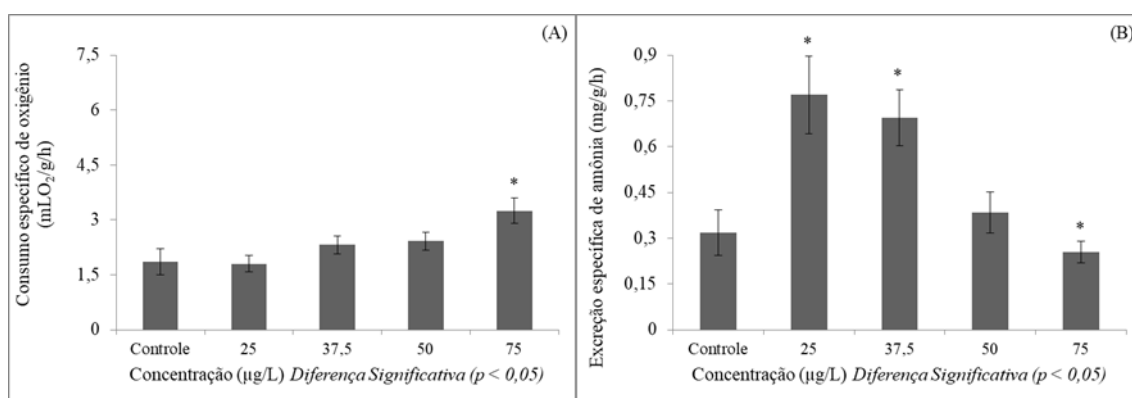


Figura 9 - Média do consumo específico de oxigênio (mLO₂/g/L/h) (A) e excreção específica de amônia (mg/L/g/h) (B) de 6 indivíduos de *D. rerio* expostos a diferentes concentrações de AgNP IBCLP20 (µ/L) e seus respectivos desvios padrão.

A exposição à AgNP comercial gerou um leve aumento gradual no consumo específico de oxigênio nos organismos testados, concentração de 50 µg/L houve um aumento de 2 vezes o valor de consumo dos indivíduos do grupo controle (Fig.10A). Esses indivíduos também apresentaram um pequeno aumento na excreção de amônia com aumento das concentrações, porém as diferenças quando comparadas ao grupo controle, não expressam significância ($p < 0,05$) (Fig. 10B) Na concentração de 75 µg/L os indivíduos chegaram a óbito antes do fim das 24 horas de exposição, não sendo possível a coleta dos dados.

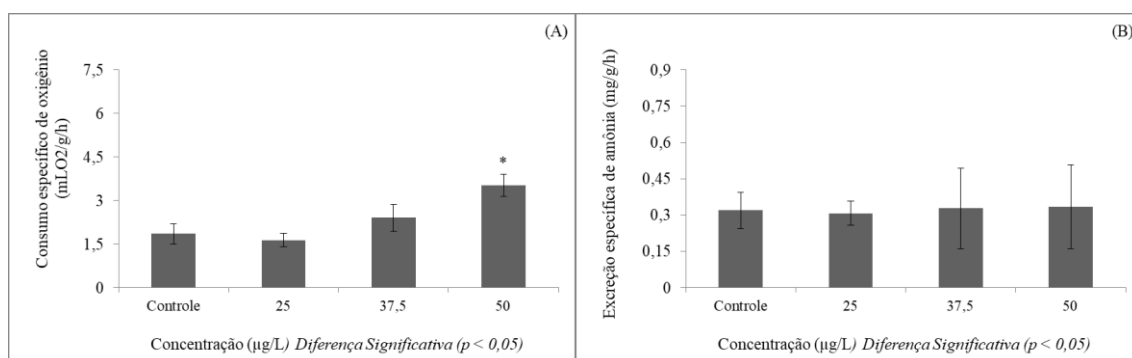


Figura 10 - Média do consumo específico de oxigênio (mLO₂/g/L/h) (A) e excreção específica de amônia (mg/L/g/h) (B) de 6 indivíduos de *D. rerio* expostos a diferentes concentrações de comercial (µ/L) e seus respectivos desvios padrão.

A exposição de *D. rerio* a AgNO₃ causou um aumento no consumo específico de oxigênio. Observou-se um aumento de 40 a 80% na excreção dos grupos expostos as concentrações entre 2,5 e 5 µg/L de AgNO₃ em comparação os indivíduos do grupo

controle (Fig. 11A). A exposição à concentração de 7,5 µg/L levou os indivíduos a excretar cerca de 2,5 vezes mais que os indivíduos do grupo controle.

O decaimento na quantidade de amônia excretada foi notado quando os organismos foram expostos a AgNO₃. Todas as concentrações apresentaram um decréscimo de mais 40% quando comparada à excreção dos indivíduos do grupo controle, porém, os valores se mantiveram constantes (Fig. 11B).

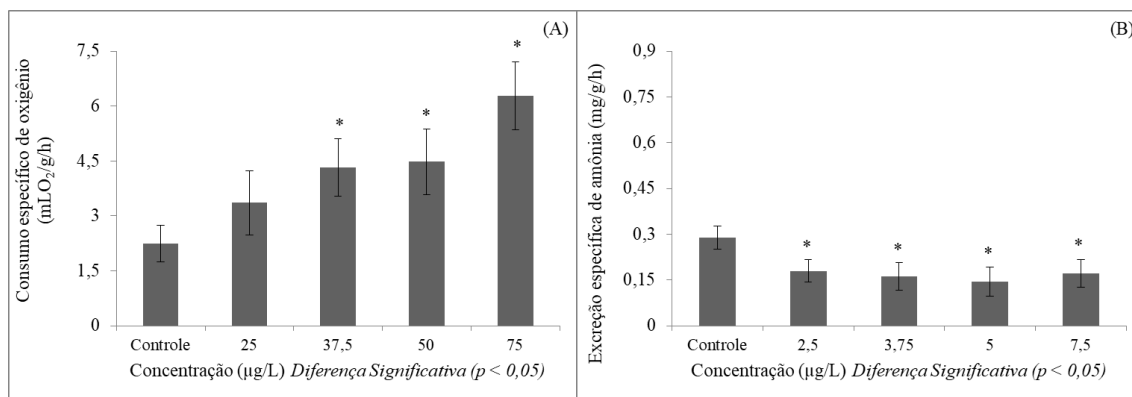


Figura 11 - Média do consumo específico de oxigênio (mLO₂/g/L/h) (A) e excreção específica de amônia (mg/L/g/h) (B) de 6 indivíduos de *D. rerio* expostos a diferentes concentrações de AgNO₃ (µ/L) e seus respectivos desvios padrão.

Os resultados obtidos com *D. rerio* expressam os efeitos do primeiro contato com os agentes expostos, mostrando uma resposta aguda padrão em peixes, as AgNPs e o AgNO₃ afetam processos respiratórios e alteram o metabolismo de *D. rerio*, corroborando com os resultados de Bosisio *et al.* (2017). A exposição de compostos químicos resulta em danos causados as brânquias e alterações respiratória. Alguns estudos assumem que o dano ocorre porque as brânquias são o primeiro alvo dos metais poluentes (TOVELL *et al.*, 1975; DUTHIE, & HUGHES, 1987).

O aumento no consumo específico dos indivíduos expostos as AgNP IB-CLP20 e comercial e ao AgNO₃ mostram uma alteração no metabolismo energético dos peixes, as curvas correspondentes a exposição das duas variedades de AgNP mostram o início de um efeito tóxico nesse metabolismo, o aumento gradual pressupõem um possível comportamento dose resposta em concentrações maiores para AgNPs IB-CLP20, e entre 50 e 75 µg/L para as AgNPs comerciais; já a curva correspondente a exposição de AgNO₃ mostra um aumento inicial e decaimento subsequente, comportamento típico de efeito agudo levando o organismo a alterar o consumo de oxigênio para suprir a

quantidade de energia gasta pelo organismo para garantir seus processos vitais (BARBIERI *et al.*, 2019; BOSISIO *et al.*, 2017).

O aumento no consumo de oxigênio também foi descrito após a exposição de outros nanomateriais em diferentes espécies de peixes (REZENDE *et al.*, 2018; BILBERGE *et al.*, 2010, ver). Bilberg *et al.* (2010) testou o estresse respiratório de *Perca fluviatilis* exposto a AgNP comercial e AgNO₃ e concluiu que o AgNO₃ causa maior dano ao sistema respiratório da espécie, assim como observado nesse estudo.

A diminuição na excreção de amônia quando expostos a concentrações maiores indica uma diminuição do metabolismo proteico. Nos organismos expostos a AgNP comercial e ao AgNO₃ é possível observar essa diminuição, esse fator ocorre pois os agentes expostos causam um efeito agudo e como reação a primeira exposição o metabolismo diminui os gastos energéticos secundários para manter os processos vitais. A exposição à AgNP IB-CLP gerou um efeito dose-resposta na excreção de amônia, a presença do íon de prata no organismo dos peixes gerou danos a proteína Na⁺/K⁺ ATPase, uma vez que esses íons são análogos ao Na⁺ e se ligam aos sítios específicos presentes nas brânquias. Com esse dano a proteína, os peixes entraram em um processo de desregulação da pressão osmótica, aumentando sua excreção (BARBIERI e FERREIRA, 2011; MORGAN *et al.*, 2004; KALBASSI *et al.*, 2011)

Como já relatado em estudos anteriores, o sal AgNO₃ se mostrou mais tóxico que as AgNPs, causando efeitos tóxicos em concentrações dez vezes inferiores (REZENDE *et al.*, 2018; BILBERGE *et al.*, 2010; BOSISIO *et al.* 2017). As AgNP comerciais também apresentaram resultados de maior toxicidade e *D. rerio* em comparação com as AgNPs IB-CLP20, tendo seu efeito tóxico e letal em concentrações menores.

Conforme apresentado anteriormente, a contaminação ambiental por AgNPs sintéticas tem recebido destaque nos últimos anos, o que tem levado a um crescente número de estudos ecotoxicológicos envolvendo essas substâncias. Diferentes grupos de organismos são utilizados em estudos que avaliam o comportamento e a toxicidade das AgNPs, como bactérias, fungos, microcrustáceos e peixes (RAI *et al.*, 2009; CARREIRA *et al.*, 2009; MAZIERO *et al.*, 2016; MCGILLICUDDY *et al.*, 2017). Estudos relacionados ao toxicidade de AgNPs em diferentes níveis tróficos também tem se mostrado de grande importância, em que são avaliados efeitos desde o nível celular e desenvolvimento embrionário, bem como mortalidade dos organismos

(MCGILLICUDDY *et al.*, 2017). Neste sentido, o presente trabalho representa um primeiro passo na identificação de um cenário mais realístico sobre a periculosidade dessa substância para o ambiente aquático, sendo necessários novos ensaios para estreitamento da faixa de concentrações.

6. CONCLUSÃO

As AgNP IB-CLP20 apresentaram ação antimicrobiana para *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*, *A. niger*, *P. funiculosum*, *F. oxysporum*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus* e *T. mentagrophytes*.

As AgNP IBCLP20 também se mostraram ambientalmente mais amigáveis, uma vez que, apresentaram menor toxicidade para os organismos testados quando comparados com estudos em que foram utilizadas AgNPs sintéticas ou o sal precursor.

O efeito inibitório sobre o crescimento da microalga *C. vulgaris* foi observado em concentrações iguais ou superiores a 50 $\mu\text{M/mL}$, bem como para a viabilidade celular analisada (queda acentuada na concentração de 100 $\mu\text{M/mL}$).

Com relação à toxicidade aguda, o valor da CL50-48h estimado para o crustáceo *D. silimis* (4,06 $\mu\text{g/L}$) pode ser mais de quatro vezes superior ao reportados para AgNP comerciais com as mesmas características (variando de 0,81 2,51 $\mu\text{g/L}$).

De forma semelhante, as AgNP IB CLP20 no metabolismo de rotina de *D. rerio* comparado com a AgNP comercial e o sal precursor AgNO_3 se apresentaram menos agressivas. O consumo específico de O_2 dos animais expostos à AgNP IBCLP20 foi semelhante ao dos expostos à AgNP comercial, porém, a excreção de amônia apresentou um decréscimo em todas as concentrações. Em relação ao AgNO_3 (prata na forma iônica) o consumo específico de oxigênio dos animais expostos foi quase três vezes superior. Estas informações, para espécies de diferentes níveis tróficos, serão úteis para o desenvolvimento de uma distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) com intuito de estabelecer concentrações limiares para esse nanomaterial. Diante do apresentado, as AgNP IBCLP20 possuem viabilidade promissora par utilização comercial e, de acordo com este estudo preliminar, apresentam menores danos aos organismos aquáticos em comparação as AgNP sintéticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASZADEH, S., SHARIFZADEH, A., SHOKRI, H., KHOSRAVI, A. R., & ABBASZADEH, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Medicale*, 24(2), e51-e56.
- ABDELHAKIM, H. K., EL-SAYED, E. S. R., & RASHIDI, F. B. (2020). Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles with Antimicrobial, Anticancer, Antioxidant and Photocatalytic Activities by the Endophytic *Alternaria tenuissima*. *Journal of Applied Microbiology*.
- ABOU-SETTA, M.M.; SORRELL, R.W. & CHILDERS, C.C. (1986). A Computer-Program in Basic for Determining Probit and Log-Probit or Logit Correlation for Toxicology and Biology. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 242-249.
- ABRAMENKO, N. B., DEMIDOVA, T. B., ABKHALIMOV, E. V., ERSHOV, B. G., KRYSANOV, E. Y., & KUSTOV, L. M. (2018). Ecotoxicity of different-shaped silver nanoparticles: Case of zebrafish embryos. *Journal of Hazardous Materials*, 347, 89-94.
- ANFOSSI, L., DI NARDO, F., CAVALERA, S., GIOVANNOLI, C., SPANO, G., SPERANSKAYA, E. S., GORYACHEVA, I. Y., BAGGIANI, C., (2018). A lateral flow immunoassay for straightforward determination of fumonisin mycotoxins based on the quenching of the fluorescence of CdSe/ZnS quantum dots by gold and silver nanoparticles. *Microchimica Acta* 185: 94.
- BACCHETTA, C. *et al.* (2016) Toxicological effects induced by silver nanoparticles in zebra fish (*Danio rerio*) and in the bacteria communities living at their surface. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1–7.
- BAKER, C., PRADHAN A., PAKSTIS. L., POCHAN. D. J., SHAH. S. I., Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal Nanoscience and Nanotechnology*, 5, 244-249.
- BALAKUMARAN, M. D, RAMACHANDRAN, R., BALASHANMUGAM, P., MUKESHKUMAR, D. J, KALAICHELVAN, P. T. (2016) Mycosynthesis of

silver and gold nanoparticles: Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. *Microbiology Research Journal*, 182, 8-20.

- BARBIERI, E., & FERREIRA, L. A. A. (2011). Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600® on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(3), 209-214.
- BARBIERI, E., FERRARINI, A. M. T., REZENDE, K. F. O., MARTINEZ, D. S. T., & ALVES, O. L. (2019). Effects of multiwalled carbon nanotubes and carbofuran on metabolism in *Astyanax ribeirae*, a native species. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(1), 417-426.
- BELANGER, S., BARRON, M., CRAIG, P., DYER, S., GALAY-BURGOS, M., HAMER, M., & WHITEHOUSE, P. (2017). Future needs and recommendations in the development of species sensitivity distributions: Estimating toxicity thresholds for aquatic ecological communities and assessing impacts of chemical exposures. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(4), 664-674.
- BIANCHINI, A., & WOOD, C. M. (2003). Mechanism of acute silver toxicity in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(6), 1361-1367.
- BILBERG, K., MALTE, H., WANG, T., & BAATRUP, E. (2010). Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology*, 96(2), 159-165.
- BRASIL (2008). Ministério do Meio Ambiente. Resolução Conama n. 396, de 03 de abril de 2008. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília..
- BRASIL (2009). Ministério do Meio Ambiente. Resolução Conama n. 420, de 28 de dezembro de 2009. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 249, 81-84.
- BOSISIO, F., REZENDE, K. F. O., & BARBIERI, E. (2017). Alterations in the hematological parameters of Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) submitted to different salinities. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 12(2), 146-154.

- BOVERHOF D. R., BRAMANTE C. M., BUTALA J. H., CLANCY S. F., LAFRANCONI M., OESTE J., GORDON S. C., (2015). Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regular Toxicological Pharmacology*, 73(1), 137-150.
- BURY N., (2009). Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management. *Freshwater Biology*, 54(9) 2015.
- CARREIRA, C. M., PEREIRA, C. A., BOMBANA, A. C., JORGE, A. O. C. (2009). Eficácia antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bactérias. Artigo apresentado no XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação—Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos
- CCME (2015). Scientific Criteria Document for the Development of the Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Silver Winnipeg. Winnipeg, MB: Canadian Council of Ministers of the Environment
- CHAN, C. Y. S., & CHIU, J. M. Y. (2015). Chronic effects of coated silver nanoparticles on marine invertebrate larvae: a proof of concept study. *PLoS ONE* 10(7): e0132457.
- CHANDANKERE, R., CHELLIAH, J., SUBBAN, K., SHANADRAHALLI, V. C., PARVEZ, A., ZABED, H. M., QI, X. (2020). Pleiotropic Functions and Biological Potentials of Silver Nanoparticles Synthesized by an Endophytic Fungus. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 95.
- CHARMANTIER, G., & CHARMANTIER-DAURES, M. (2001). Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: the embryonic phase. *American Zoologist*, 41(5), 1078-1089.
- CHATTERJEE, S., MAHANTY, S., DAS, P., CHAUDHURI, P., & DAS, S. (2020). Biofabrication of iron oxide nanoparticles using manglicolous fungus *Aspergillus niger* BSC-1 and removal of Cr (VI) from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 385, 123790.
- CHEN, K., YE, W., CAI, S., HUANG, L., ZHONG, T., CHEN, L., & WANG, X. (2016). Green antimicrobial coating based on quaternised chitosan/organic

- montmorillonite/Ag NPs nanocomposites. *Journal of Experimental Nanoscience*, 11(17), 1360-1371.
- CHOI, J. E., KIM, S., AHN, J. H., YOUN, P., KANG, J. S., PARK, K., & RYU, D. Y. (2010). Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 100(2), 151-159.
- CHOI, O., & HU, Z. (2008). Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science & Technology*, 42(12), 4583-4588.
- COSTA A. M., SILVA V. V., (2017). Estratégias nanotecnológicas para diagnóstico e tratamento do câncer. *Revista Saúde e Meio Ambiente*, 5(2), 1-13.
- DASARI T. P., HWANG H. M., (2010) The effect of humic acids on the cytotoxicity of silver nanoparticles to a natural aquatic bacterial assemblage. *The Science of the Total Environment*, 408(23) 5817–5823.
- DUTHIE, G. G., & HUGHES, G. M. (1987). The effects of reduced gill area and hyperoxia on the oxygen consumption and swimming speed of rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 127(1), 349-354.
- ELECHIGUERRA, J. L., BURT, J. L., MORONES, J. R., CAMACHO-BRAGADO, A., GAO, X., LARA, H. H., & YACAMAN, M. J. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of nanobiotechnology*, 3(1), 6.
- FABREGA, J., LUOMA, S. N., TYLER, C. R., GALLOWAY, T. S., & LEAD, J. R. (2011). Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International*, 37(2), 517-531.
- FEKETE-KERTÉSZ, I., PISZMÁN, D., & MOLNÁR, M. (2017). Particle size and concentration dependent ecotoxicity of nano- and microscale TiO₂ - comparative study by different aquatic test organisms of different trophic levels. *Water Air Soil Pollution*. 228:245
- FEROZE, N., ARSHAD, B., YOUNAS, M., AFRIDI, M. I., SAQIB, S., & AYAZ, A. (2020). Fungal mediated synthesis of silver nanoparticles and evaluation of antibacterial activity. *Microscopy Research and Technique*, 83(1), 72-80.
- FINNEY, D. J. (1952). Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. *Cambridge University Press*, Cambridge.

- GAJBHIYE, M., KESHARWANI, J., INGLE, A., GADE, A., & RAI, M. (2009). Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5(4), 382-386.
- GANESAN, V., HARIRAM, M., VIVEKANANDHAN, S., & MUTHURAMKUMAR, S. (2020). Periconium sp.(endophytic fungi) extract mediated sol-gel synthesis of ZnO nanoparticles for antimicrobial and antioxidant applications. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 105, 104739.
- GARNER, K. L., SUH, S., LENIHAN, H. S., & KELLER, A. A. (2015). Species sensitivity distributions for engineered nanomaterials. *Environmental Science Technology* 49, 5753–5759
- GIRARDELLO, F., LEITE, C. C., BRANCO, C. S., ROESCH-ELY, M., FERNANDES, A. N., SALVADOR, M., & HENRIQUES, J. A. P. (2016). Antioxidant defences and haemocyte internalization in *Limnoperna fortunei* exposed to TiO₂ nanoparticles. *Aquatic Toxicology*, 176, 190-196.;
- GOLTERMAN H. L. (1971). Methods for chemical analysis of fresh waters. *Oxford Edinburgh*, Blackwell, IBP Handbook No. 3.
- GOTTSCHALK, F., SONDERER, T., SCHOLZ, R. W., & NOWACK, B. (2009). Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental Science Technology* 43, 9216–9222.
- GRIFFITT, R. J. *et al.* Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicological Sciences*, v. 107, n. 2, p. 404–415, 2009.
- GUBBINS, E. J., BATTY, L. C., & LEAD, J. R. (2011). Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution*, 159(6), 1551-1559.
- GUILGER-CASAGRANDE, M., GERMANO-COSTA, T., PASQUOTO-STIGLIANI, T., FRACETO, L. F., & DE LIMA, R. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.

- GUPTA, G. S.; DHAWAN, A.; SHANKER, R. (2016) Montmorillonite clay alters toxicity of silver nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryo. *Chemosphere*, 163, 242–251.
- HAMAD, M. T. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles by fungi and their antibacterial activity. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(2), 1015-1024.
- HANDY, R. D., OWEN, R., & VALSAMI-JONES, E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17(5), 315-325.
- HILL A. J., TERAOKA H., HEIDEMAN W., (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), 6–19.
- HOECKE V.,K., SCHAMPHELAERE K. A. C., MEEREN, V. D. P., LUCAS, S., JANSSEN, C. R., (2008). The ecotoxicity of silica nanoparticles to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: importance of surface area. *Environmental Toxicology*, 27, 127–136.
- HOEK C., VAN D., MANN D. G., JAHNS H. M., (1995) Algae: an introduction to Phycology. *Cambridge University Press*, Cambridge. 623.
- HU, X., LI, D., GAO, Y., MU, L., & ZHOU, Q. (2016). Knowledge gaps between nanotoxicological research and nanomaterial safety. *Environment International*, 94, 8-23.
- HULKOTI, N. I., & TARANATH, T. C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes - a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 474-483.
- JANAKIRAMAN, V., GOVINDARAJAN, K., & MAGESH, C. R. (2019). Biosynthesis of Silver Nanoparticles from Endophytic Fungi, and its Cytotoxic Activity. *BioNanoScience*, 9(3), 573-579.
- JIRAVOVA J., TOMANKOVA K. B., HARVANOVA M., MALINA L., MALOHLAVA J., LUHOVA L., PANACEK A., MANISOVA B., KOLAROVA H., (2016). The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro. *Food Chemistry Toxicology*, 96, 50-61.

- JORGE DE SOUZA, T. A., ROSA SOUZA, L. R., FRANCHI, L. P. (2019). Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 691-700.
- KALBASSI M. R., SALARI-JOO H., JOHARI A., (2011). Toxicity of silver nanoparticles in aquatic ecosystems: Salinity as the main cause in reducing toxicity. *Iranian Journal of Toxicology*, 5(1), 436–443.
- KAUR, G., KALIA, A., & SODHI, H. S. (2020). Size controlled, time-efficient biosynthesis of silver nanoparticles from *Pleurotus florida* using ultra-violet, visible range, and microwave radiations. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 50(1), 35-41.
- KHALIL, N. M. (2013). Biogenic silver nanoparticles by *Aspergillus terreus* as a powerful nanoweapon against *Aspergillus fumigatus*. *African Journal of Microbiology Research*, 7(50), 5645-5651
- KIM, K. J., SUNG, W. S., MOON, S. K., CHOI, J. S., KIM, J. G., & LEE, D. G. (2008). Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 18(8), 1482-1484.
- KINNE, O. (1976). Cultivation of marine organisms: water quality management and technology, 6: life-endangering substances. *Marine Ecology*, 3(1,2), 79-99.
- KNAUER K., BEHRA R., SIGG L., (1997). Effects of free Cu² and Zn² ions on growth and metal accumulation in fresh-water algae. *Environmental Toxicology Chemistry*, 16 (2), 220–229.
- KORA, A. J., & ARUNACHALAM, J. (2012). Green fabrication of silver nanoparticles by gum Tragacanth (*Astragalus gummifer*): a dual functional reductant and stabilizer. *Journal of Nanomaterials*, 69.
- KRISHNARAJ C., HARPER S. L., YUN S. I., (2016). In Vivo toxicological assessment of biologically synthesized silver nanoparticles in adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Hazardous Materials*, 301, 480–491.
- KWAK, J. I., CUI, R., NAM, S. H., KIM, S. W., CHAE, Y., & AN, Y. J. (2016). Multispecies toxicity test for silver nanoparticles to derive hazardous

concentration based on species sensitivity distribution for the protection of aquatic ecosystems. *Nanotoxicology* 10, 521–530.

LAU P. S., TAM N. F. Y., WONG, Y. S., (1994). Influence of organic-N source on an algal wastewater treatment system. *Resources, Conservation and Recycling*. 11, 197-208.

LE OUAY, B., STELLACCI, F. (2015). Antibacterial activity of silver nanoparticles: a surface science insight. *Nano Today*, 10(3), 339-354.

LEE K. J., BROWNING L. M., NALLATHAMBY P. D., OSGOOD C., J., (2013) Silver nanoparticles induce developmental stage-specific embryonic phenotypes in zebrafish. *Nanoscale*, 5(23), 11625–36.

LEKAMGE, S., MIRANDA, A. F., ABRAHAM, A., LI, V., SHUKLA, R., BANSAL, V., & NUGEGODA, D. (2018). The Toxicity of Silver Nanoparticles (*AgNPs*) to Three Freshwater Invertebrates With Different Life Strategies: *Hydra vulgaris*, *Daphnia carinata*, and *Paratya australiensis*. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 152.

LEMOS C. T., RÖDEL P. M., TERRA N. R., (2007) River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(3), 391– 401.

LI, G., HE, D., QIAN, Y., GUAN, B., GAO, S., CUI, Y., & WANG, L. (2012). Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 466-476.

LI, L., WU, H., JI, C., VAN GESTEL, C. A., ALLEN, H. E., & PEIJNENBURG, W. J. (2015). A metabolomic study on the responses of daphnia magna exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles. *Ecotoxicology Environmental Safe*. 119, 66–73.

LI, Y., KONG, W., LI, M., LIU, H., ZHAO, X., YANG, S., & YANG, M. (2016). Litsea cubeba essential oil as the potential natural fumigant: Inhibition of *Aspergillus flavus* and AFB1 production in licorice. *Industrial Crops and Products*, 80, 186-193.

- LI, Y., QIN, T., INGLE, T., YAN, J., HE, W., YIN, J. J., & CHEN, T. (2017). Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Archives of Toxicology*, 91(1), 509-519.
- LIMBACH, L. K., BEREITER, R., MÜLLER, E., KREBS, R., GALLI, R., & STARK, W. J. (2008). Removal of oxide nanoparticles in a model wastewater treatment plant: influence of agglomeration and surfactants on clearing efficiency. *Environmental Science & Technology* 42, 5828–5833
- LIU W., ZENG Z., CHEN A., ZENG G., XIAO R., GUO Z., YI F., HUANG Z., HE K., HU L., (2018). Toxicity effects of silver nanoparticles on the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. *Journal Environmental Chemistry and Engnier*, 6(4), 4236-4244.
- LIU, J., & HURT, R. H. (2010). Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental Science & Technology*, 44(6), 2169-2175.
- LÓPEZ-SERRANO A., MOÑOZ-OLIVAS R., SANZ-LANDALUZE J., OLASAGASTI M., RAINIERI S., CÁMARA C., (2014). Comparison of bioconcentration of ionic silver and silver nanoparticles in zebrafish eleutheroembryos. *Environmental Pollution*, 191,207– 14.
- LUOMA, S. N., (2008) Silver nanotechnologies and the environment: Old problems or new challenges? *Woodrow Wilson International Center of Scholars*.
- MANNO, D., SERRA, A., BUCCOLIERI, A., et al. (2013). Silver and carbon nanoparticles toxicity in sea urchin *Paracentrotus lividus* embryos. *BioNanoMaterials*, 14(3-4), 229-238.
- MARTINS, J., TELES, L. O., & VASCONCELOS, V. (2007). Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International*, 33(3), 414-425.
- MASSARSKY, A. *et al.* (2013) Assessment of nanosilver toxicity during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Chemosphere*, 92(1) 59–66.
- MAYO A. W., NOIKE. T., (1994). Response of mixed culturas of *Chlorella vulgaris* e heterotrophic bacteria to varia of pH. *Water Science and Technology*. 30(8), 285-294.

- MAZIERO, J., ROGERO, S. O., ALEMANY, A. (2016). Estudo ecotoxicológico da nanopartícula de prata em *Daphnia similis*. *Journal of Health Sciences Institute*, 34(3), 134-139.
- MCGILLICUDDY, E., MURRAY, I., KAVANAGH, S., MORRISON, L., FOGARTY, A., CORMICAN, M., & MORRIS, D. (2017). Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of the Total Environment*, 575, 231-246.
- MISRA S. K., DYBOWSKA A., BERHANU D., LUOMA S. N., (2012) The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *The Science of the Total Environment*, 438, 225–32.
- MITRANO, D. M., LESHER, E. K., BEDNAR, A., MONSERUD, J., HIGGINS, C. P., & RANVILLE, J. F. (2012). Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1), 115-121.
- MOAZENI, M., SHAHVERDI, A. R., NABILI, M., NOORBAKHSH, F., & REZAIE, S. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles: The reasons for and against *Aspergillus parasiticus*. *Nanomedicine Journal*, 1(4), 267-275.
- MOHAMED, M. A. (2020). Myco-engineered gold nanoparticles from *Jahnula aquatica* coated with ampicillin/amoxicillin and their antibacterial and anticancer activity against cancer cells. *Biotechnology Letters*, 42(1), 151-170.
- MOHAN S., OLUWAFEMI O. S., GEORGE S. C., JAYACHANDRAM V. P., LEWU F. B., SONGCA S. P., KALARIKKAL N., THOMAS S., (2014). Completely green synthesis of dextrose reduced silver nanoparticles, its antimicrobial and sensing properties. *Journal of Carbohydrate Polymer*, 106, 469-474.
- MORGAN T. P, GROSSEL M., PLAYLE R. C., WOOD C. M., (2004). Time course analysis of the mechanism by which silver inhibits active Na⁺ and Cl⁻ uptake in gills of rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 66(1), 55-72.
- MUNDARAGI, A., CHAKRA, P., PRAKASH, O., HOSPET, R., THANGADURAI, D., SANGEETHA, J., & BHAT, S. (2020). Biogenic Nanoparticles for Degradation of Noxious Dyes. *Nanotechnology for Food, Agriculture, and Environment*, 323-350.

- MUTH-KOHNE E., SONNACK L., SCHILCH K., HISCHEN F., (2013) The toxicity of silver nanoparticles to zebrafish embryos increases through sewage treatment processes. *Ecotoxicology*.
- NAVARRO E., WAGNER B., ODZAK N., SIGG L., BEHRA R., (2015). Effects of Differently Coated Silver Nanoparticles on the Photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology*, 49(13), 8041–8047.
- NOMIYA K., YOSHIKAWA A., TSUKAGOSHI K., KASUGA N. C., HIRAKAWA S., WATANABE J. (2004). Synthesis and structural characterization of silver(I), aluminium (III) and cobalt (II) complexes with 4-isopropyltropolone (hinokitiol) showing noteworthy biological activities. Action of silver(I)-oxygen bonding complexes on the antimicrobial activities. *Journal Inorganic Biochemistry*, 98, 46-60.
- NOWACK, B., & BUCHELI, T. D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150(1), 5-22.
- OPPERHULZEN, A., VEIDE, E. W., GOBAS, F. A., LIEM, D. A., STEEN, J., & HUTZINGER, O. (1985). Relationship between bioconcentration in fish and steric factors of hydrophobic chemicals. *Chemosphere*; (United States), 14.
- OSBORNE O. J., LIN S., CHANG C. H., JI Z., YU X., WANG X., (2015) Organ-Specific and size-dependent Ag nanoparticle toxicity in gills and intestines of adult zebrafish. *ACS Nano*, 9(10) 9573–9584.
- OTHMAN, A. M., ELSAYED, M. A., AL-BALAKOCY, N. G., HASSAN, M. M., & ELSHAFEI, A. M. (2019). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles induced by fungal proteins and its application in different biological activities. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 17(1), 8.
- OTTONI, C. A., NETO, M. L., LÉO, P., ORTOLAN, B. D., BARBIERI, E., DE SOUZA, A. O. (2020). Environmental impact of biogenic silver nanoparticles in soil and aquatic organisms. *Chemosphere*, 239, 124698.

- OTTONI C., LIMA L., SANTOS C., LIMA N. (2014). Effect of different carbon sources on decolourisation of an industrial textile dye under alkaline-saline conditions. *Current Microbiology*, 68, 53-58
- OTTONI C.A., SIMÕES M.F., FERNANDES S., dos SANTOS J.G., SILVA E.S., de SOUZA R.F.B., MAIORANO A.E. 2017. Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. *AMB Express*, 7, 31.
- PAKRASHI, S., TAN, C., & WANG, W. X. (2017). Bioaccumulation-based silver nanoparticle toxicity in *Daphnia magna* and maternal impacts. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36, 3359-3366.
- PAL S., TAK, Y. K., SONG J. M., (2015) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(42), 1712–1720.
- PASCHOALINO, M. P., MARCONE, G. P., JARDIM, W. F. (2010). Os nanomateriais e a questão ambiental. *Química Nova*, 33(2), 421-430.
- PETERSON R. T., MACRAE C. A., (2012) Systematic approaches to toxicology in the zebrafish. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52, 433–53.
- PETICA, A., GAVRILIU, S., LUNGU, M., BURUNTEA, N., & PANZARU, C. (2008). Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering: B*, 152(1-3), 22-27.
- POWERS K. W., BROWN S. C., KRISHNA B., SCOTT C. W., MOUDGIL B. M., ROBERTS S., M., (2006) Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicological Sciences*, 90(2), 296–303.
- POYNTON, H. C., LAZORCHAK, J. M., IMPELLITTERI, C. A., BLALOCK, B. J., ROGERS, K., ALLEN, H. J., ... & GOVINDASMAWY, S. (2012). Toxicogenomic responses of nanotoxicity in *Daphnia magna* exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 46(11), 6288-6296.

- PRUCEK R., KVÍTEK L., ZBORIL R., (2018). Culture medium mediated aggregation and recrystallization of silver nanoparticles reduce their toxicity. *Applied Materials Today*, 12, 198-206.
- QIAN, Y., YU, H., HE, D., YANG, H., WANG, W., WAN, X., & WANG, L. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(11), 1613-1619.
- RAHMAN, S., RAHMAN, L., KHALIL, A. T., ALI, N., ZIA, D., ALI, M., SHINWARI, Z. K. (2019). Endophyte-mediated synthesis of silver nanoparticles and their biological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 2551-2569.
- RAHISUDDIN A-T.S.A., KHAN Z., MANZOOR N., (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial and antifungal activities towards Gram-positive, Gram-negative bacterial strains and different species of *Candida* fungus. *Bioprocess in Biosystem Engenier*, 38(9), 1773-1781.
- RAMOS, M. M., MORAIS, E. D. S., SENA, I. D. S., LIMA, A. L., DE OLIVEIRA, F. R., DE FREITAS, C. M., FERREIRA, I. M. (2020). Silver nanoparticle from whole cells of the fungi *Trichoderma* spp. isolated from Brazilian Amazon. *Biotechnology Letters*, 1-11.
- RAI, M., YADAV, A., GADE, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27(1), 76-83.
- REZENDE, K. F. O., BERGAMI, E., ALVES, K. V. B., CORSI, I., & BARBIERI, E. (2018). Titanium dioxide nanoparticles alters routine metabolism and causes histopathological alterations in *Oreochromis niloticus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 44(2), 343-343.
- RIBEIRO, F., GALLEGO-URREA, J. A., JURKSCHAT, K., CROSSLEY, A., HASSELLÖV, M., TAYLOR, C., & LOUREIRO, S. (2014). Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*, 466, 232-241.

- SAKAMOTO, M., HA, J. Y., YONESHIMA, S., KATAOKA, C., TATSUTA, H., & KASHIWADA, S. (2015). Free silver ion as the main cause of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles to cladocerans. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(3), 500-509.
- SAPSFORD K. E., TYNER K. M., DAIR B. J., DESCHAMPS J. R., MEDINTZ I. L., (2011). Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical Chemistry*, 83(12), 4453–4488.
- SARAVANAKUMAR, K., SHANMUGAM, S., VARUKATTU, N. B., MUBARAKALI, D., KATHIRESAN, K., & WANG, M. H. (2019). Biosynthesis and characterization of copper oxide nanoparticles from indigenous fungi and its effect of photothermolysis on human lung carcinoma. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 190, 103-109.
- SHARMA V. K., SAYES C. M., GUO B., PILLAI S., PARSONS J. G., WANG C., YAN B., MA X. (2019). Interactions between silver nanoparticles and other metal nanoparticles under environmentally relevant conditions: A review. *Science Total Enviromental*, 653, 1042-1051.
- SHEN, M. H., ZHOU, X. X., YANG, X. Y., CHAO, J. B., LIU, R., & LIU, J. F. (2015). Exposure medium: key in identifying free Ag⁺ as the exclusive species of silver nanoparticles with acute toxicity to *Daphnia magna*. *Scientific Reports*, 5, 9674.
- SILLER, L., LEMLOH, M. L., PITICHAROENPHUN, S., MENDIS, B. G., HORROCKS, B. R., BRÜMMER, F., MEDAKOVIĆ, D. (2013). Silver nanoparticle toxicity in sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Pollution*, 178: 498-502
- SINGH, A., GAUTAM, P. K., VERMA, A., SINGH, V., SHIVAPRIYA, P. M., SHIVALAKAR, S., SAMANTA, S. K. (2020). Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review. *Biotechnology Reports*, 25, e00427.
- SIRIPATTANAKUL-RATPUKDI, S., & FÜRHACKER, M. (2014). Issues of silver nanoparticles in engineered environmental treatment systems. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(4), 1939.

- SKIDMORE, J. (1970). Respiration and osmoregulation in rainbow trout with gills damaged by zinc sulphate. *Journal of Experimental Biology*, 52(2), 481-494.
- SKIDMORE, J. F. (1964). Toxicity of zinc compounds to aquatic animals, with special reference to fish. *The Quarterly Review of Biology*, 39(3), 227-248.
- SMÉKALOVÁ, M., PANÁČEK A., JANCULA D., MARSÁLEK B., KOLARÍK J., SOEGianto, A., CHARMANTIER-DAURES, M., TRILLES, J. P., & CHARMANTIER, G. (1999). Impact of copper on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicus* (Decapoda). *Journal of Crustacean Biology*, 19(2), 209-223.
- SIMÕES, M.F., OTTONI, C.A., ANTUNES, A. (2020). Biogenic Metal Nanoparticles: A New Approach to Detect Life on Mars?. *Life*, 10(3), 28.
- SOLDO D., BEHRA R., (2000). Long-term effects of copper on the structure of fresh water eriphyton communities and tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology*, 47, 181-189.
- SØRENSEN, S. N., HJORTH, R., DELGADO, C. G., HARTMANN, N. B., & BAUN, A. (2015). Nanoparticle ecotoxicity—physical and/or chemical effects?. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 11(4), 722-724.
- SUN, T. Y., MITRANO, D. M., BORNHÖFT, N. A., SCHERINGER, M., HUNGERBÜHLER, K., & NOWACK, B. (2017). Envisioning nano release dynamics in a changing world: using dynamic probabilistic modeling to assess future environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 51(5), 2854-2863.
- TAYEMEH, M. B., ESMailBEIGI, M., SHIRDEL, I., JOO, H. S., JOHARI, S. A., BANAN, A., NOURANI, H., MASHHADI, H., JAMI, M.J., TABARROK, M. (2020). Perturbation of fatty acid composition, pigments, and growth indices of *Chlorella vulgaris* in response to silver ions and nanoparticles: A new holistic understanding of hidden ecotoxicological aspect of pollutants. *Chemosphere*, 238, 124576.
- TOVELL, P. W. A., HOWES, D., NEWSOME, C. S. (1975). Absorption, metabolism and excretion by goldfish of the anionic detergent sodium lauryl sulphate. *Toxicology*, 4(1), 17-29.

- TUURALA, H., & SOIVIO, A. (1982). Structural and circulatory changes in the secondary lamellae of *Salmo gairdneri* gills after sublethal exposures to dehydroabietic acid and zinc. *Aquatic Toxicology*, 2(1), 21-29.
- USEPA (1985). National Recommended Water Quality Criteria - Aquatic Life Criteria Table. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency
- USEPA (2012). Nanomaterial Case Study: Nanoscale Silver in Disinfectant Spray (Final Report). Washington, DC, EPA/600/R-10/081F: U.S. Environmental Protection Agency
- WANG, J. & WANG, W. X. (2014) Low bioavailability of silver nanoparticles presents trophic toxicity to marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Environmental Science & Technology*, 48(14), 8152-8161
- WEI, L., LU, J., XU, H., PATEL, A., CHEN, Z.-S., & CHEN, G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today* 20, 595–601.
- WESTERS, H. (2001). Fish hatchery management. Bethesda: American Fisheries Society. 733p.
- WINKLER, L. W. (1888). Die bestimmung des im wasser gelösten sauerstoffes. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 21(2), 2843-2854.
- YAN H., PAN G., (2002). Toxicity and bioaccumulation of cooper I three green microalgal species. *Chemosphere*, 49, 471-476.
- YANG L., HO H. Y., ALSHUT R., LEGRADI J., WEISS C., (2009) Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology*, 28(2), 245-253.
- ZETSCHE, E. M. & MEYSMAN, F. J. R., (2012). Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton. *Journal Plankton*, 34, 493–509.
- ZHAO T., CHEN K., GU H., (2013). Investigations on the interactions of proteins with polyampholyte-coated magnetite nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry*, 117(45), 14129–14135.

- ZHAO, C. M., & WANG, W. X. (2011). Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(4), 885-892.
- ZHAO, H. Z., LU, G. H., XIA, J., & JIN, S. G. (2012). Toxicity of nanoscale CuO and ZnO to *Daphnia magna*. *Chemical Research in Chinese Universities*, 28(2), 209-213