UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências
Campus do Litoral Paulista

EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA MICOGÊNICAS E DA COMBINAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE GRAFENO E CÁDMIO SOBRE O METABOLISMO E A ATIVIDADE DE NATAÇÃO DE *Geophagus brasiliensis*.

Pinto Leonidio Hanamulamba

São Vivente – SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências
Campus do Litoral Paulista

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CAMPUS DO LITORAL PAULISTA

EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA MICOGÊNICAS E DA COMBINAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE GRAFENO E CÁDMIO SOBRE O METABOLISMO E A ATIVIDADE DE NATAÇÃO DE *Geophagus brasiliensis*.

Pinto Leonidio Hanamulamba

Orientador: Professor Dr. Edison Barbieri

Programa de Biodiversidade de Ambiente Costeiros IB-CLP

Tese apresentada no Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

São Vicente-SP

2024

H233e

Hanamulamba, Pinto Leonidio
Efeitos das nanopartículas de prata micogênicas e da combinação de nanopartículas de grafeno e cádmio sobre o metabolismo e a atividade de natação de Geophagus brasiliensis. / Pinto Leonidio Hanamulamba. -- São Vicente, 2024
100 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente
Orientador: Edison Barbieri

1. Ecotoxicologia Aquática. 2. Nanomateriais. 3. Metais pesados. 4. Metabolismo. 5. Peixes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

DEDICATÓRIA

Dedico este Trabalho aos meus Filhos, a minha Mãe, a minha querida Esposa e a todos aqueles que de forma incansável sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS por tudo. Em seguida gostaria de agradecer a todos que de forma direta ou indireta estiveram presente desde os primeiros passos para concretização deste trabalho. Muito grato.

Agradeço a minha Mãe “Elizabeth Kaquinda, por sempre me guiar e indicar o caminho certo, a minha família, aos meus filhos e a minha querida esposa, por tudo e muito mais, não foi fácil o ano do começo, mas Ela esteve sempre presente, muito obrigado Matilde Tyaima Hanamulamba.

Ao Professor Doutor Edison Barbieri, muito obrigado, por me acolher no laboratório, logo no primeiro momento que apresentei a preocupação de lá estar. Professor muito grato mesmo pelas exigências e excelente aprendizado. Professor E. Barbieri, excelente Profissional e Ser Humano, que DEUS lhe retribua muita coisa boa, pois sinto que as minhas palavras em texto são insuficientes para lhe agradecer. Excelente Biblioteca VIVA. Muito Grato.

Aproveito o ensejo para agradecer a Coordenação do Curso de Pós-Graduação do Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista “IB-CLP”, por me receber, a Professora Dra. Ana Júlia Fernandes, muito obrigado Professora.

Aos Professores que fizeram parte da Banca da Qualificação, e que com as suas sugestões e correções, contribuíram muito nesse processo do aprendizado. Muito grato.

Agradecer também aos colegas, Luiz, Renata, Guilherme.

Meu Pai, onde quer que estejas e sei que está descansando em Paz, desde muito cedo você nos deixou, nós/eu era muito pequeno senti e sinto muito sua falta, mas a Mãe sempre nos protegeu e nos cuidou, acredito que pediste isso à Ela. Sofri muito quando só mais tarde percebi que partiste com apenas 26 anos de idade. Mas acredito que o Senhor está feliz por nós que sempre acreditamos que daria certo o sonho da formação. Muito obrigado meu PAI (em memória).

Ao Pessoal do Instituto de Pesca em Cananéia, ao Dito, ao Apê, muito obrigado pelo acolhimento.

À TODOS MUITO OBRIGADO!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Câmara de natação do Laboratório do Instituto de Pesca de Cananéia – SP-Brasil.....23

Figura 2 – Box plot para o consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis*, expostos a AgNPs-AT.....25

Figura 3 – Box plot para o consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis*, expostos a $AgNO_3$.....26

Figura 4. Box plot para excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* expostos a AgNPs-AT.....27

Figura 5. Box plot para excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* expostos a $AgNO_3$.....28

Figura 6. Box plot para a capacidade de natação de *Geophagus brasiliensis* expostos a AgNP.....28

Figura 7. Box plot para a capacidade de natação de *Geophagus brasiliensis* expostos a $AgNO_3$.....29

Figura 8: Sonicador utilizado para dispersão de GO no Laboratório do Instituto de Pesca de Cananéia – SP- Brasil.....45

Figura 9: Tanques de manutenção dos espécimes para aclimatação em laboratório após coleta.....47

Figura 10: Balança analítica usada para o peso dos espécimes.....47

Figura 11: Aquários aerados contendo 5 litros de água sob temperaturas controladas e concentrações de nanopartículas e elementos traços.....48

Figura 12: Aquários (5 L) aerados com os espécimes em ambientes pré-definidos com a) e sem b) tratamentos..... 48

Figura 13: Respirômetros com cada um dos espécimes de um determinado tratamento, durante o período de isolamento e adaptação após tempo de exposição.....49

Figura 14: Respirômetros, momento de fechamento para espirometria.....50

Figura 15: Espectrofotômetro para leitura da excreção específica de amônia.....51

Figura 16 (direita): Aparelho para leituras do consumo específico de oxigênio.....51

Figura 17: Consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição em grafeno (mg/L) 53

Figura 18: Excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 24, 48, 72 e 96 de exposição em grafeno (mg/L) 55

Figura 19: Box plot para o consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição em cádmio (mg/L) 57

Figura 20: Excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição em cádmio (mg/L) 59

Figura 21: Box plot para o consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição combinada em cádmio + grafeno (1 mg/L) 61

Figura 22: Excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 96 horas de exposição em cádmio + grafeno (1 mg/L) 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variação do consumo específico de oxigênio e comparação entre exposição única e combinada, com destaque ao percentual de aumento e diminuição de consumo para cada grupo em comparação ao controle.....65

Tabela 2: Variação da excreção específica da amônia e comparação entre exposição única e combinada, com destaque ao percentual de aumento e diminuição de excreção para cada grupo em comparação ao controle.....67

Tabela 3: Comparação do comportamento do consumo de oxigênio e da excreção da amônia na concentração de 1 mg/L entre as exposições únicas e combinadas.....70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância

APA (EPA): Agência de Proteção Ambiental

ERO (ROS): Espécies Reativas de Oxigênio

ETs: Elementos Traços

EUA: Estados Unidos da América

GO: Óxido de Grafeno

MFA (AFM): Microscópio de Força Atómica

MPs: Metais Pesados

MRG: Materiais Relacionados ao Grafeno

NMC: Nano Material de Carbono

NMs: Nano Materiais

NPs: Nano Partículas

NM: Nanopartículas Metálicas

NTC: Nano Tubos de Carbono

rGO: Óxido de Grafeno Reduzido

Sumário

DEDICATÓRIA 4
AGRADECIMENTOS....5
LISTA DE FIGURAS 6
LISTA DE TABELAS....8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 9
INTRODUÇÃO 12
OBJETIVO 16
Objetivos Específicos....16
CAPÍTULO 1 17
RESUMO 18
ABSTRACT....19
1.1. Introdução....20
1. 2. Material e Métodos 23
1.2.1. Biossíntese e caracterização de nanopartículas....23
1.2.2. Coleta e manutenção dos espécimes 23
1.2.3. Efeitos de AgNPs biogênicas no metabolismo de rotina 24
1.2.4. Atividade de natação 25
1.2.5. Análise estatística....26
1.3. Resultados....26
1.3.1. Consumo Específico de Oxigênio....26
1.3.2. Excreção Específica de Amônia....28
1.3.3. Atividade de Natação....30
1.4. Discussões 31
1.5. Conclusões....35
CAPÍTULO 2 36
RESUMO 37
ABSTRACT....39
2. 1. Introdução....41
2.2. Material e Métodos 45
2.2.1. Nanomateriais e oligoelementos 45
2.2.1.1. Grafeno (GO)....45
2.2.1.1.1. Estudos de estabilidade coloidal e morfologia do GO....46
2.2.1.2. Cádmio (Cd) 46
2.2.2. Organismo de teste, coleta e manutenção....46
2.2.3. Ensaios de exposição aguda e desenho experimental....48
2.2.4. Análise da Taxa Metabólica e Excreção de Amônia....50

2.2.5. Análise estatística 51
2.3. Resultados 52
2.3.1. Exposição ao Grafeno 52
2.3.1.1. Consumo específico de oxigênio 52
2.3.1.2. Excreção específica de amônia 54
2.3.2. Exposição ao Cádmio 56
2.3.2.1. Consumo específico de oxigênio 56
2.3.2.2. Excreção específica de amônia 58
2.3.3. Exposição ao Cádmio + Grafeno 60
2.3.3.1. Consumo específico de oxigênio 60
2.3.3.2. Excreção específica de amônia 62
2.4. Discussão 71
2.4.1. Óxido de Grafeno 72
2.4.2. Cádmio 76
2.4.3. Interação entre Cádmio e Óxido de Grafeno 80
2.5. Conclusões e Perspectivas. 85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia tem lentamente, mas profundamente, tomado conta de diferentes indústrias em todo o mundo. Esse ritmo rápido de revolução tecnológica pode ser visto especialmente no mundo desenvolvido, onde os mercados em nanoescala tomaram conta rapidamente na última década. A nanotecnologia não é um conceito novo, pois agora se tornou uma tecnologia de uso geral. Quatro gerações de nanomateriais surgiram na superfície e são usadas em campos científicos interdisciplinares; são nanomontagens ativas e passivas, nanosistemas gerais e nanosistemas moleculares de pequena escala (MALIK; MUHAMMAD; WAHEED, 2023).

O desenvolvimento industrial e o aumento populacional, desencadearam a presença e a persistência de vários contaminantes orgânicos e inorgânicos, representando um risco para o meio ambiente e a saúde humana. Consequentemente, a busca e a aplicação de novas tecnologias para aliviar o desafio da poluição ambiental são urgentes. A nanotecnologia como ciência emergente pode ser empregada em diferentes campos para lidar com compostos persistentes, como pesticidas, solventes clorados, produtos químicos halogenados ou metais pesados (MPs) (DEL PRADO-AUDELO et al., 2021).

Nanotecnologia é a criação, manipulação e uso de materiais na escala de tamanho nanométrico (1 a 100 nm). Nessa escala de tamanho, há diferenças significativas em muitas propriedades de materiais que normalmente não são vistas nos mesmos materiais em escalas maiores (SHAH et al., 2015). Um fator que influencia a toxicidade das nanopartículas é o método de sua produção. Existem três métodos usados para a produção de nanopartículas, são, químico, físico e biológico. A literatura revela que a maioria das pesquisas se concentrou nos métodos químicos e físicos de produção de nanopartículas, mas há alguns estudos sobre os efeitos tóxicos in vivo das nanopartículas produzidas por técnicas biológicas (MIRKATULI; BAGHBANI; YAHYAEI, 2021). O método biológico é considerado o método mais adequado para produção porque é simples e rápido e não libera subprodutos tóxicos no ambiente.

Os nanobiomateriais podem ser sintetizados em diferentes espécies biológicas, desde bactérias até animais, onde a engenharia desses processos para criar materiais de forma controlada é fundamental para alavancar esses processos na ciência dos materiais (RICE e RUDER, 2013). Organismos vivos como bactérias, fungos e plantas têm enorme potencial

para a produção de nanopartículas metálicas. Por outro lado, pesquisadores se voltaram para a síntese biológica devido ao bom controle na distribuição de tamanho das nanopartículas (GHORBANI, 2015). Vários são os relatos existentes sobre a síntese de nanopartículas metálicas a partir de fungos (GHORBANI, 2015), o que tem sido amplamente difundida entre muitos grupos de pesquisa globalmente. Exemplo, nanopartículas de cobre foram sintetizadas e estabilizadas usando *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium waksmanii* isolados do solo, fungos como *Aspergillus sp*., *Fusarium sp*. e *Penicillium sp*. têm sido frequentemente relatados por sua capacidade biosintética de criar nanopartículas de Ag e Au (SHANKAR et al., 2003; VIGNESHWARAN et al., 2007; PHILIP, 2009). Foi encontrada relação direta entre a quantidade de PH, concentração de sal, monodispersidade e tamanho de partícula (HONARY et al., 2012).

A síntese biológica por meio de processos de nanobiotecnologia tem um potencial significativo para impulsionar a produção de nanopartículas sem o uso de produtos químicos agressivos, tóxicos e caros comumente usados em processos físicos e químicos convencionais (SHAH et al., 2015). A seleção cuidadosa do elemento biológico apropriada é necessária para produzir nanopartículas com propriedades bem definidas, como tamanho e morfologia. Suas vantagens fascinantes em estrutura, componente e propriedade únicos promoveriam o desenvolvimento biotecnológico (MA et al., 2016). Mas há que se ter em atenção sobre as formas de seu uso, por exemplo em nanorremediação. As nanopartículas sintéticas (exemplo as AgNPs) estão sendo amplamente utilizadas, mas também podem representar um risco para a saúde pública e o meio ambiente (OTTONI et al., 2020), no entanto, o impacto ambiental desses nanomateriais ainda é pouco compreendido (SILVA et al., 2022).

Alguns compostos relacionados a materiais e reagentes químicos apresentam maior risco ao meio ambiente, e ainda assim são sempre ignorados em nossa vida diária devido à sua influência ser inobservável a olho nu em um curto período (MA et al., 2016). Os metais pesados por exemplo, e seus efeitos da poluição, estão presentes em grande parte dos sistemas fluviais, ambientes costeiros, devido ao escoamento agrícola, resíduos industriais e atividades de mineração (FU e WANG, 2011), tornando-se uma questão de preocupação nas últimas décadas (VINODHINI e NARAYANAN, 2008). Os MPs têm sido amplamente reconhecidos como altamente tóxicos quando dissolvidos e na forma iônica têm efeitos devastadores no equilíbrio ecológico do ambiente receptor e na diversidade de organismos aquáticos (FAROMBI; ADELOWO; AJIMOKO, 2007). Na natureza, os organismos são principalmente

afetados pela influência de longo prazo de baixas concentrações de tóxicos ou suas misturas e acumulação gradual podem levar a alterações morfológicas nos tecidos dos peixes. Os MPs são conhecidos por induzir alterações genéticas, comportamentais, mudanças no metabolismo, inibir a síntese de proteínas e ácidos nucleicos (PRATO; BIANDOLINO; SCARDICCHIO, 2006) resultando em redução substancial nos valores nutritivos dos peixes (SRIVASTAVA e SRIVASTAVA, 2008), uma vez que a mobilização desses MPs para o ecossistema aquático altera a propriedade físico-química da água, o que se torna perigoso para organismos nesses ambientes (GARAI et al., 2021).

O ambiente aquático, onde os peixes vivem, é um equilíbrio ecológico vulnerável e é facilmente interrompido de forma natural ou artificialmente (LIU et al., 2007), em particular, o aumento da atividade humana pode desestabilizá-lo esse ambiente e ameaçar a segurança alimentar humana, por meio de fatores como derramamentos de óleo e emissões de poluentes não manuseadas (MA et al., 2016). A absorção de tóxicos lipofílicos persistentes em peixes ocorre por meio do alimento e por transferência através da superfície do corpo, como notavelmente as guelras, nas quais as taxas de fluxo da maioria dos tóxicos lipossolúveis através delas são rápidas (RANDALL et al., 1998). Alguns peixes são capazes de remodelar reversivelmente sua morfologia branquial pelas exigências de fatores do meio circundante, e as lamelas das guelras são os principais locais de captação de oxigênio em peixes e, em muitas espécies de peixes adultos, também são amplamente responsáveis pelos fluxos ativos e passivos de íons e água para dentro e para fora do animal (NILSSONA; DYMOWSKAB; STECYKA, 2012).

Características relacionadas aos requisitos de energia (por exemplo, taxa metabólica) e desempenho locomotor (escopo aeróbico) variam entre indivíduos da mesma espécie e provavelmente influenciam a vulnerabilidade por meio de uma variedade de mecanismos (HEINO e GODØ, 2002). Fatores ambientais como massa, temperatura, poluentes químicos têm de certa forma uma influência direta na taxa metabólica dos peixes. É sabido que o controle da alimentação influencia o metabolismo, estão interligados e áreas, como nichos ecológicos, o oxigênio é definitivamente um dos mais importantes fatores que influencia o desempenho metabólico (NICA et al., 2023). Por outro lado, na água são facilmente metabolizadas substâncias contendo nitrogênio, que é uma condição vital para a existência de organismos alimentares como os produtores e consequentemente para reprodução de peixes. Ao mesmo tempo, os produtos finais do metabolismo do nitrogênio — amônia, nitritos e

nitratos são sempre excretados do corpo do peixe para o ambiente, aumentando o número total desses compostos dissolvidos na água. Amônia, ânions de nitrito e nitrato são formados durante processos biológicos, têm propriedades tóxicas e são considerados fatores ambientais que podem limitar a produtividade dos peixes (DOLOMATOV et al., 2011)

No entanto, há uma literatura emergente relatando efeitos tóxicos de nanomateriais (NMs) e nanopartículas (NPs) fabricados em peixes, mas a base mecanicista de exposição e os efeitos são mal compreendidos (MARTINEZ et al., 2013, HANDY et al., 2008). Trazemos aqui uma avaliação crítica de algumas das suposições fundamentais em toxicologia de peixes e prováveis mecanismos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de NPs, NMs e MPs em peixes.

OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo investigar os efeitos toxicológicos da exposição única e da coexposição aguda das nanopartículas de prata micogênicas e de nanomateriais à base de grafeno e cádmio no metabolismo de rotina e na atividade de natação da espécie neotropical *Geophagus brasiliensis*, com foco no consumo de oxigênio e na excreção de amônia.

Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos tóxicos das AgNPs micogênicas no metabolismo de rotina e na atividade de natação do *Geophagus brasiliensis* após 24 horas de exposição a diferentes concentrações.
- Avaliar os impactos da exposição aguda a nanopartículas de grafeno, em diferentes concentrações e tempos de exposição, no consumo de oxigênio e na excreção de amônia do *G. brasiliensis*.
- Investigar as alterações no metabolismo de rotina do *G. brasiliensis* resultantes da exposição ao cádmio em diferentes concentrações e tempos de exposição.
- Analisar o efeito combinado do grafeno e do cádmio na intensidade dos impactos sobre o metabolismo de rotina do *G. brasiliensis*, considerando as variações nas concentrações dos contaminantes e nos tempos de exposição.

CAPÍTULO 1

EFEITOS SUBLETAIS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA MICOGÊNICAS NO METABOLISMO DE ROTINA E NA ATIVIDADE DE NATAÇÃO DE *Geophagus brasiliensis*

RESUMO

Nas últimas décadas, as nanopartículas de prata (AgNPs) emergiram como agentes versáteis com ampla aplicabilidade em diversas áreas. Suas propriedades antibacterianas e antifúngicas têm sido amplamente aproveitadas em aplicações que vão desde a purificação de água até o combate a infecções em organismos aquáticos, como peixes. Este estudo visou preencher uma lacuna no conhecimento ao avaliar os efeitos tóxicos das AgNPs micogênicas e do nitrato de prata ($AgNO_3$) em peixes da espécie *Geophagus brasiliensis*, uma espécie de grande importância ecológica e para a pesca artesanal, especialmente nas comunidades ribeirinhas e na piscicultura da região da Mata Atlântica. A avaliação foi realizada após a exposição dos peixes a diferentes concentrações de AgNPs (10, 50, 100 e 1000 µg/L) e AgNO3 (1, 5 e 10 µg/L). Utilizou-se o fungo endófito *Aspergillus tubingensis* para a biossíntese de AgNPs e conduziu-se experimentos em oito grupos, cada um com N=5 indivíduos, incluindo um grupo controle. Os peixes foram mantidos a uma temperatura de 22 (±1) °C, com comprimento e peso médios de 5,0 (±0,42) cm e 4,0 (±0,58) g. Mediu-se o metabolismo de rotina por meio do consumo de oxigênio utilizando o método de Winkler e a excreção de amônia (NH_3) pelo método de Nessler. Além disso, investigamos o impacto das AgNPs e $AgNO_3$ na atividade de natação após 24 horas de exposição. Os dados foram submetidos à análise estatística com teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os resultados indicaram que a concentração de 1000 µg/L de AgNPs resultou na mortalidade de todos os espécimes, impossibilitando a obtenção de dados sobre metabolismo e natação nesse grupo. Observou-se uma ligeira diminuição no consumo de oxigênio nos grupos expostos a AgNPs e $AgNO_3$. Em relação à excreção de amônia, detectou-se uma redução significativa no grupo exposto a 50 µg/L de AgNPs e uma diminuição menos acentuada nos indivíduos expostos a $AgNO_3$, quando comparados ao grupo controle. A atividade de natação revelou-se um indicador eficiente para os efeitos das AgNPs e $AgNO_3$, com diferenças significativas nas concentrações de 50 e 100 µg/L para AgNPs e 5 e 10 µg/L para AgNO3. Os peixes expostos a concentrações mais elevadas apresentaram uma redução significativa no tempo de natação. Concluiu-se que, para a espécie *G. brasiliensis*, tanto a AgNPs, quanto AgNO3 causam alterações no metabolismo de rotina e reduzem significativamente o tempo de natação. Portanto, a atividade de natação destacou-se como um indicador sensível dos efeitos das AgNPs e do $AgNO_3$, Ademais, *G. brasiliensis* pode servir como um bioindicador valioso para avaliar a toxicidade em ecossistemas aquáticos. Os resultados do nosso estudo, vêm contribuir com mais informações e conhecimentos relacionados aos efeitos e impactos das nanopartículas de prata em organismos aquáticos, sobre tudo peixes. Demonstramos também que a espécie neotropical de *G. brasiliensis*, pode de certa forma ser um excelente bioindicador de contaminantes aquáticos nas suas diferentes reações em função as concentrações desses poluentes, e ao mesmo tempo, oferece percepções valiosas para a conservação e gestão de ecossistemas aquáticos, no sentido de que todos os processos dentro desses ecossistemas não devem ser estudados de forma isolada.

Palavras-chave: AgNPs Micogênicas; Metabolismo; Natação, *Geophagus brasiliensis* Cará.

ABSTRACT

In recent decades, silver nanoparticles (AgNPs) have emerged as versatile agents with wide applicability in various fields. Their antibacterial and antifungal properties have been widely utilized in applications ranging from water purification to combating infections in aquatic organisms, such as fish. This study aims to fill a knowledge gap by evaluating the toxic effects of mycogenic AgNPs and silver nitrate ($AgNO_3$) on fish of the species *Geophagus brasiliensis*, a species of great ecological importance and for artisanal fishing, especially in riverside communities and fish farming in the Atlantic Forest region. The evaluation was conducted after exposing the fish to different concentrations of AgNPs (10, 50, 100, and 1000 µg/L) and $AgNO_3$ (1, 5, and 10 µg/L). We used the endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* for the biosynthesis of AgNPs and conducted experiments in eight groups, each with N=5 individuals, including a control group. The fish were kept at a temperature of 22 (±1) °C, with an average length and weight of 5.0 (±0.42) cm and 4.0 (±0.58) g, respectively. Routine metabolism was measured through oxygen consumption using the Winkler method and ammonia (NH3) excretion using the Nessler method. Additionally, we investigated the impact of AgNPs on swimming activity after 24 hours of exposure. The data were subjected to statistical analysis using the non-parametric Kruskal-Wallis test. The results indicated that the concentration of 1000 µg/L of AgNPs resulted in the mortality of all specimens, making it impossible to obtain data on metabolism and swimming in this group. A slight decrease in oxygen consumption was observed in the groups exposed to AgNPs and a more pronounced decrease in the groups exposed to AgNO3. Regarding ammonia excretion, we detected a significant reduction in the group exposed to 50 µg/L of AgNPs and a less pronounced decrease in the individuals exposed to AgNO3 compared to the control group. Swimming activity proved to be an efficient indicator of the effects of AgNPs and AgNO3, with significant differences at concentrations of 50 and 100 µg/L for AgNPs and 5 and 10 µg/L for AgNO3. Fish exposed to higher concentrations showed a significant reduction in swimming time. It was concluded that, for the species *G. brasiliensis*, higher concentrations of AgNPs and AgNO3 cause alterations in routine metabolism and significantly reduce swimming time. Therefore, swimming activity stands out as a sensitive indicator of the effects of AgNPs and AgNO3, while the routine metabolism method proved effective in assessing the toxicity of xenobiotics in aquatic environments. We also demonstrate that the neotropical species, *G. brasiliensis* can serve as a valuable bioindicator for evaluating toxicity in aquatic ecosystems. This study contributes to a more comprehensive understanding of the impacts of silver nanoparticles on aquatic organisms and offers valuable insights for the conservation and management of aquatic ecosystems.

Keywords: Mycogenic AgNPs; Metabolism; Swimming, *Geophagus brasiliensis,* Cará.

1.1. Introdução

Nanopartículas (NPs) são caracterizadas como materiais que têm pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica, com tamanho variando de 1 a 100 nm (STRAMBEANU et al., 2015). Elas podem surgir de forma acidental, como resultado de processos industriais ou naturais (JEEVANANDAM et al., 2018), ou serem produzidas deliberadamente pela indústria para atender a necessidades específicas (MIRANZADEH et al., 2019). As propriedades físicas e químicas das NPs variam dependendo de sua origem e tamanho, e elas podem ter diferentes impactos no meio ambiente (JEEVANANDAM et al., 2018). Essas partículas podem gerar efeitos tanto positivos, como na redução da poluição e na melhoria da saúde ambiental, ao facilitar sistemas de produção com menor consumo de energia ou ajudar na remediação da água e do solo (MARTÍNEZ et al., 2021), quanto negativos, devido à sua capacidade de se acumular nos organismos (MA et al., 2010). Por exemplo, a prata (Ag^{+}) é conhecida por suas propriedades antibacterianas, mas também pode ser tóxica para organismos aquáticos (KLEIVEN; MACKEN; OUGHTON, 2019; OTTONI et al., 2020)

O uso de nanopartículas metálicas (NM) tem recebido crescente destaque, e sua produção é predominantemente realizada por métodos físicos, químicos e biológicos (LIU et al., 2022). Entre essas nanopartículas, as de prata (AgNPs) se destacam por suas propriedades excepcionais, como revestimento, consistência, fragmentação e capacidade antibacteriana, o que tem levado a um aumento exponencial na produção e aplicação em diversas áreas (MANSOUR et al., 2021; LIU et al., 2022; ASSIS et al., 2022). As AgNPs de origem biológica são consideradas uma excelente alternativa de produção devido à simplicidade e segurança de suas operações, baixo custo, abordagem amiga do ambiente e facilidade de escalonamento, tornando-as altamente aplicáveis (VIJAYARAGHAVAN; ASHOKKUMAR, 2017; OTTONI et al., 2020). No entanto, apesar de serem consideradas produtos sustentáveis, ainda faltam de informações sobre seu impacto na saúde humana e no meio ambiente como um todo. Além disso, as pesquisas relacionadas à sua toxicidade nas cadeias alimentares aquáticas ainda são limitadas (KHOSHNAMVAND et al., 2020; WALAA et al., 2021). Segundo MERCED-COLÓN et al. (2020), a produção global de AgNPs está em constante crescimento na indústria de nanotecnologia, devido à sua ampla gama de aplicações. É altamente provável que essas AgNPs entrem nos ecossistemas aquáticos, resultando em

consequências adversas. Portanto, é crucial avaliar os efeitos dessas NPs nesses ambientes, a fim de prevenir possíveis riscos de ingestão ou transferência para seres humanos. As preocupações ambientais associadas ao uso de AgNPs continuam a crescer à medida que essas partículas são liberadas no meio ambiente (NIELSEN et al., 2022). O uso generalizado de AgNPs tem resultado na crescente liberação desses materiais em sistemas aquáticos (LIU et al., 2023). Estudos recentes indicam que o modo de entrada das AgNPs na água exerce um impacto significativo em sua toxicidade e nos riscos ecológicos associados (LIU et al., 2023). Além disso, acredita-se amplamente que esses nanomateriais desencadeiem efeitos tóxicos nos organismos aquáticos por meio da indução de estresse oxidativo (PARK et al., 2022; LIU et al., 2023). Efeitos tóxicos das AgNPs foram documentados em diversas espécies aquáticas, incluindo peixes (ZHAO et al., 2019; JENIFER et al., 2020; FU et al., 2021; SIBIYA et al., 2022), crustáceos (RIBEIRO et al., 2023), algas (KLEIVEN; MACKEN; OUGHTON, 2019; NIKOKHERAD et al., 2022), fitoplâncton e zooplâncton (KHOSHNAMVAND et al., 2020). Embora as AgNPs sejam amplamente utilizadas em produtos comerciais, ainda há lacunas no entendimento dos efeitos biológicos das AgNPs biológicas na embriogênese de peixes e nos mecanismos moleculares subjacentes (ZHAO et al., 2019; KHOSHNAMVAND et al., 2020). Estudos recentes destacam a necessidade de compreender os efeitos das AgNPs nas funções neurais e comportamentais dos peixes, bem como suas implicações ecológicas (FU et al., 2021; SIBIYA et al., 2022)

O *Geophagus brasiliensis*, também conhecido por Cará, um ciclídeo neotropical, desempenha um papel crucial nos ecossistemas aquáticos da América do Sul, abrangendo uma vasta região que vai desde a Amazônia até a bacia do rio Paraná. Essa espécie é reconhecida por sua dieta diversificada, que inclui sedimentos, fitoplâncton, zooplâncton, algas e peixes, potencialmente servindo como um veículo de metais na cadeia alimentar, inclusive para os seres humanos (VEZZONE et al., 2023). Especificamente, os efeitos das AgNPs, especialmente as micogênicas, em peixes ainda são pouco compreendidos, destacando a importância deste estudo com o *Geophagus brasiliensis* para elucidar os efeitos fisiológicos dessas nanopartículas em uma espécie com uma distribuição ampla no Brasil. Nesse contexto, nossa hipótese é que o aumento das concentrações de AgNPs micogênicas resultará em alterações no consumo de oxigênio, na excreção de amônia e na redução da capacidade de natação do *Geophagus brasiliensis*, associados aos seguintes objetivos:

a) Avaliar os efeitos da exposição aguda a nanopartículas de prata micogênicas, em diferentes concentrações e tempos de exposição, no consumo de oxigênio e na excreção de amônia do *G. brasiliensis*.
b) Comparar os efeitos causados pelas AgNPs e $AgNO_3$ às alterações no metabolismo de rotina do *G. brasiliensis* comparando os resultados com um grupo controle.
c) Analisar os impactos da exposição em AgNPs e $AgNO_3$ sobre atividade de natação do *G. brasiliensis*.

1. 2. Material e Métodos

1.2.1. Biossíntese e caracterização de nanopartículas

O fungo endófito *Aspergillus tubingensis* (EN1066, IOC4684), foi utilizado para a biossíntese de AgNPs. De maneira breve, o processo de obtenção das AgNPs ocorreu conforme protocolo proposto por (RODRIGUES *et al.,* 2013).

Após serem cultivados em meio de cultura de batata dextrose ágar (PDA, Himedia #M096) em placas de Petri a 28 °C, as colônias foram fragmentadas em pequenos pedaços e transferidas para um Erlenmeyer de 2 litros com 500 mL de dextrose de batata (PD) caldo (Kasvi #K25-610106). O balão foi mantido a 28°C por 72 h sob agitação em agitador orbital (Marconi MA40, Brasil) a 150 rpm. Em seguida, a biomassa foi filtrada em membrana de polipropileno, lavada com água estéril e incubado com água deionizada estéril (10 g/100 mL) em 2 Erlenmeyer de litro, a 25 °C e 150 rpm, por 72 h. Então, a biomassa foi removida através de uma nova filtração e o extrato aquoso resultante (AE) foi esterilizado usando uma membrana de poliétersulfona de 0,22 μm (Corning # 43111) para remover quaisquer fragmentos de células. A formação dos AgNPs ocorreu pela reação de o AE com AgNO3 estéril em uma concentração final de 1 mM (1 mL de $AgNO_3$ para cada 99 mL de EA). A mistura reacional foi mantida sem luz sob agitação por 96 h (Ribeiro *et al.,* 2023). A concentração de prata nas NPs foi considerada como 1 mM, em comparação com uma curva de calibração padrão preparada com prata. (Rodrigues *et al.,* 2019). A formação de AgNP-AT foi caracterizada por UV-vis espectrofotometria (Agilent – 8453), análise de tamanho por DLS (Nanoplus – Sistemas Particulados), índice de polidispersão (PDI), determinação do potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Zeiss LEO 906 E, de 120 kV) (RIBEIRO *et al.,* 2023), a síntese das nanopartículas foi realizada no laboratório de desenvolvimento e Inovação, Instituto Butantan, SP, Brasil.

1.2.2. Coleta e manutenção dos espécimes

Peixes *Geophagus brasiliensis* foram coletados em um viveiro de cultivo semi controlado em maio de 2023 (em Miracatu, SP, Brasil) e cuidadosamente acondicionados em caixa asséptica até a chegada ao Laboratório do Instituto de Pesca, Cananéia, São Paulo, Brasil. O peso e tamanho dos peixes foram em média 4,0 (±0,58) g e 5,0 (±0,42) cm. Os espécimes utilizados para os estudos, foram juvenis em fase de desenvolvimento. Os peixes foram aclimatados por 10 dias e alimentados diariamente com ração comercial, adequada para

espécie (Nutrigen MPL, Aquavita percentagem de proteínas, gorduras, e etc.), até 24 horas antes de cada experimento. Os espécimes foram selecionados e manuseados conforme os procedimentos experimentais previamente submetidos para a apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IB/CLP e os recomendados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

.

Os experimentos foram realizados em condições estáticas, e as propriedades físico-químicas da água utilizada foram pH = 6,7 ± 0,2, oxigênio dissolvido = 6,4 ± 0,2 mg L^{-1}, dureza entre 46 e 48 mg $CaCO_3$ por L, e condutividade elétrica de 43 ± 2,1 µS cm^{-1} (RIBEIRO *et al.,* 2023).

1.2.3. Efeitos de AgNPs biogênicas no metabolismo de rotina

Para avaliação dos possíveis efeitos causados pela exposição de *G. brasiliensis* em distintas concentrações das AgNPs micogênicas, o metabolismo de rotina foi cuidadosamente analisado pela determinação do consumo de oxigênio e excreção de amônia pelo método de utilização de um respirômetro para cada espécime em sistema fechado (OTTONI *et al.,* 2020; ALVES *et al.,* 2022).

Os peixes foram separados aleatoriamente sem distinção de machos nem femeas, constituídos e um total de oito (8) grupos, cada com cinco (5) espécimes (N=5) incluindo o grupo controle, e expostos em concentrações de 10, 50, 100 e 1000 µg/L de AgNPs por um período de 24 h, e também exposto pelo mesmo período em controle positivo nas concentrações de 1, 5 e 10 µg/L de $AgNO_3$ em temperatura de 22 (± 1) °C. Após 24 h de exposição, os peixes foram transferidos individualmente para os respirômetros (vidro cilíndrico de 800 mL), e aclimatados por 1 h sob um sistema de circulação contínua de água com temperatura de 21 (± 1) °C, para adaptação e amenizar qualquer estresse causado pelo manuseio. Os respirômetros foram mantidos e protegidos por um anteparo em uma sala isolada para abster os animais de possíveis movimentos no laboratório (BARBIERI et al., 2002; BARBIERI e PAES, 2011; RIBEIRO *et al.,* 2023). Após a aclimatação, os respirômetros foram fechados e mantidos em confinamento por 1 h. Em seguida, os respirômetros foram abertos e, para cada animal, foi coletada uma amostra de água para

determinação do consumo de oxigênio e excreção de amônia e posteriormente pesado cada peixe (DAMATO e BARBIERI, 2012).

O oxigênio dissolvido foi determinado pelo método de Winkler (WINKLER, 1888) e a excreção de amônia pelo método proposto por Nessler (FEDERATION, W.E. AND A.P.H. ASSOCIATION, 1999). As concentrações de oxigênio e amônia no início e no final do confinamento foram utilizadas para determinar o consumo específico de oxigênio (mL O_2 g/L/h) e excreção específica de amônia (mg/L/g/h), considerando o volume do respirômetro, o peso de cada animal e o período de confinamento.

1.2.4. Atividade de natação

Com o propósito de avaliar os efeitos da exposição dos peixes às diferentes concentrações das AgNPs (5, 10 e 50 µg/L) na atividade natação, construiu-se um túnel hidrodinâmico no laboratório, cuja estrutura foi baseada em descrições de BRETT (1964) e adaptada para indivíduos de pequeno porte (BARBIERI; NGAN; GOMES, 1998).

O túnel de natação, com volume total de 1,2 L, consistia em uma câmara acoplada a uma caixa d'água para auxiliar na estabilidade da temperatura (Fig. 1). Individualmente, após a exposição, os peixes foram forçados a nadar contra uma corrente produzida por uma hélice conectada a um motor (EIRAS et al.,2022).



Figura 1. Câmara de natação do Laboratório do Instituto de Pesca de Cananéia – SP- Brasil.

Cada peixe pode ajustar sua orientação e movimentar-se dentro da câmara em baixas velocidades de fluxo de água (BARBIERI; NGAN; GOMES, 1998; CAMPOS-GARCIA et al., 2015). A velocidade da corrente foi medida utilizando um medidor de vazão "Venturi", onde a velocidade do fluxo era aumentada gradualmente em 1 cm/s a cada meia hora para que o peixe pudesse manter sua posição. Os peixes foram então forçados a nadar até a exaustão. A exaustão foi determinada quando os peixes diminuíram a distância e o tempo de movimento, não conseguindo mais manter a velocidade de natação em relação ao fluxo de água, sendo arrastados para a extremidade de saída do túnel e permanecendo nessa posição por até 60 segundos (CAMPOS-GARCIA et al., 2015). Este procedimento considerou o tempo total de natação para cada indivíduo após a exposição a determinada concentração de AgNPs, destacando a importância de avaliar a resistência dos peixes ao longo do experimento.

Após todo período de exposição, todo afluente gerado é descartado e os peixes foram submetidos a incineração.

1.2.5. Análise estatística

A distribuição dos dados foi inicialmente avaliada usando um teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Como os dados não seguiram uma distribuição normal, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para determinar diferenças estatisticamente significativas entre as três concentrações estudadas. Além disso, o teste de Dunn foi realizado para examinar mais detalhadamente as diferenças par-a-par entre as concentrações. As diferenças foram consideradas significantes quando $p<0,05$.

1.3. Resultados

Consideramos importante referir que nas concentrações de 1000 µg/L de AgNP e de 100 µg/L de $AgNO_3$ morreram todos os espécimes em menos de 12 horas de exposição, o que impossibilitou a obtenção de dados sobre o metabolismo de rotina (consumo específico de oxigênio e excreção específica de amônia), e da atividade e natação referente a esses grupos.

1.3.1. Consumo Específico de Oxigênio

A exposição do *Geophagus brasiliensis* às nanopartículas de prata micogênicas (AgNPs), em uma concentração de 10 µg/L ou superior, resultou em uma diminuição no consumo específico de oxigênio. Observou-se um aumento leve no consumo no grupo de tratamento com 50 µg/L, de aproximadamente 7%, enquanto na maior concentração estudada

(100 µg/L), houve uma redução média de 21% no consumo de oxigênio em comparação com o controle (Figura 2). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não determinou diferenças estatisticamente significativas entre as três concentrações.

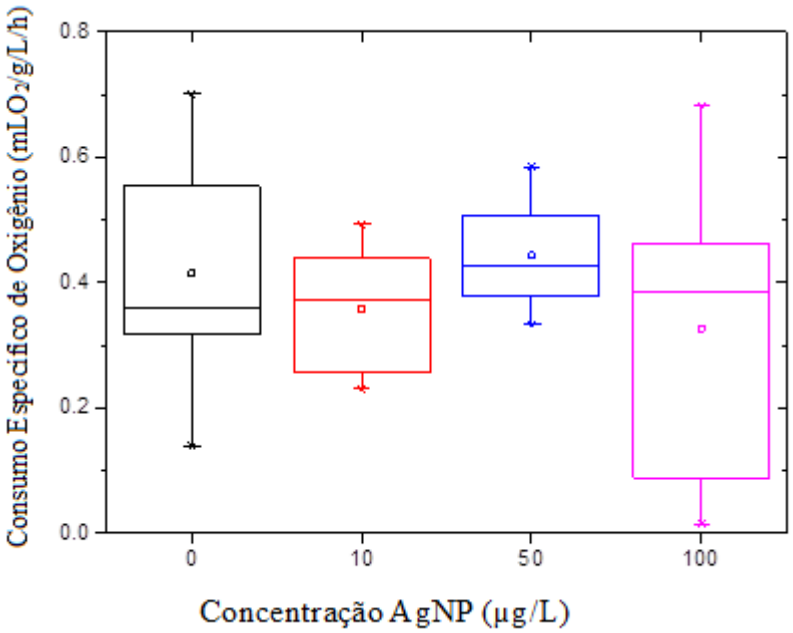


Figura 2 – Box plot para o consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis*, expostos a AgNPs-AT (A). Cada tratamento, comparado ao grupo controle. Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis e seguido pelo teste de Dunn´s, $p < 0,05$ comparado ao controle).

Nas concentrações de 5 e 10 µg/L de AgNO3, observou-se uma diminuição no consumo específico de oxigênio. Na concentração mais elevada (10 µg/L), houve uma redução 54% no consumo de oxigênio em comparação com o controle. O teste de Dunn ($p<0,05$) indicou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para ambas as concentrações (5 e 10 µg/L).

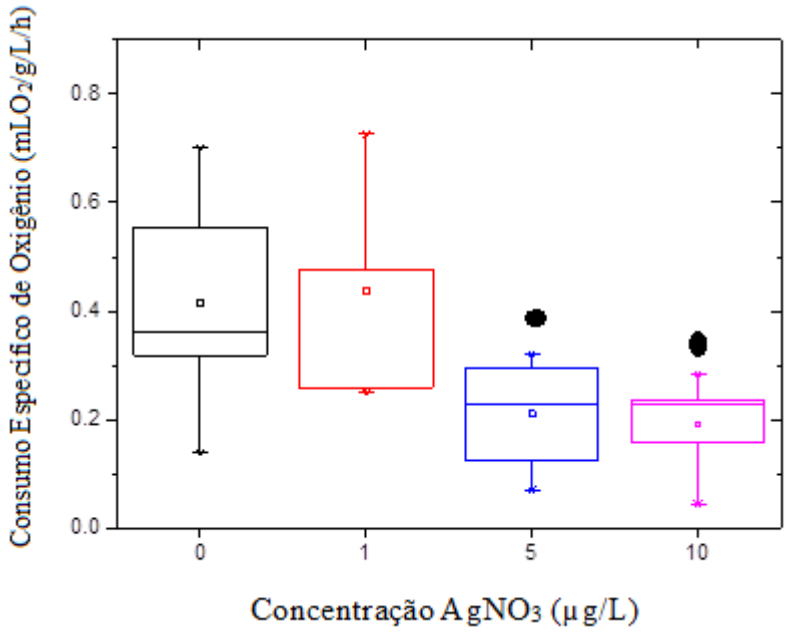


Figura 3 – Box plot para o consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis*, expostos a $AgNO_3$. Cada tratamento, comparado ao grupo controle. Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis e seguido pelo teste de Dunn´s, $p < 0,05$ comparado ao controle). ● indica diferença estatística em relação ao controle.

1.3.2. Excreção Específica de Amônia

Os resultados obtidos para a excreção de amônia em relação ao aumento das concentrações de AgNPs foi evidenciado por uma tendência de diminuição das taxas em relação ao controle. (Fig. 4). O teste de Dunn ($p<0,05$) indicou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para todas as concentrações testadas.

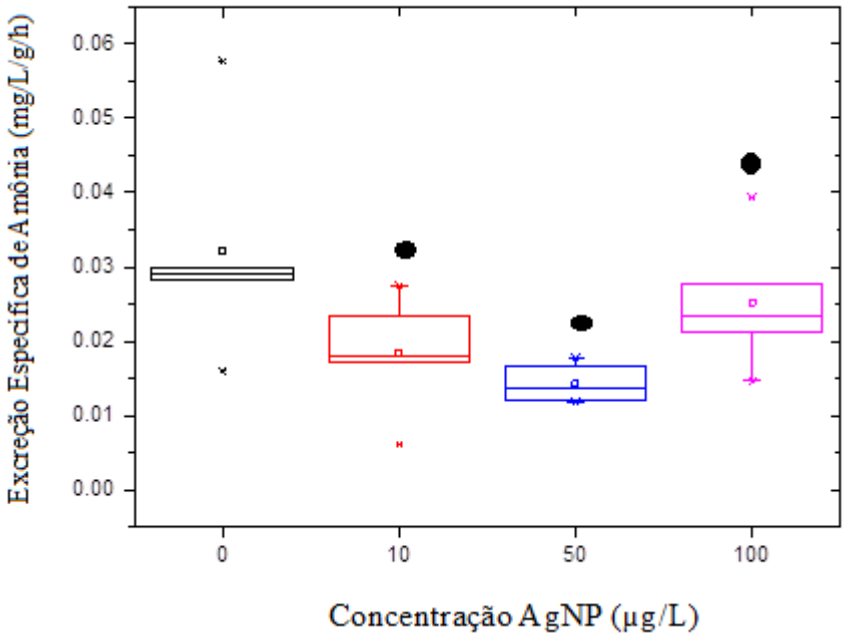


Figura 4. Box plot para excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* expostos a AgNPs-AT em diferentes concentrações. Cada tratamento, comparado ao grupo controle. Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis e seguido pelo teste de Dunn´s, $p < 0,05$ comparado ao controle). ● indica diferença estatística em relação ao controle.

A excreção específica de amônia de peixes expostos ao $AgNO_3$ demonstrou tendência de diminuição das taxas em relação ao controle. (Fig. 5). O teste de Dunn ($p<0,05$) indicou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para todas as concentrações testadas.

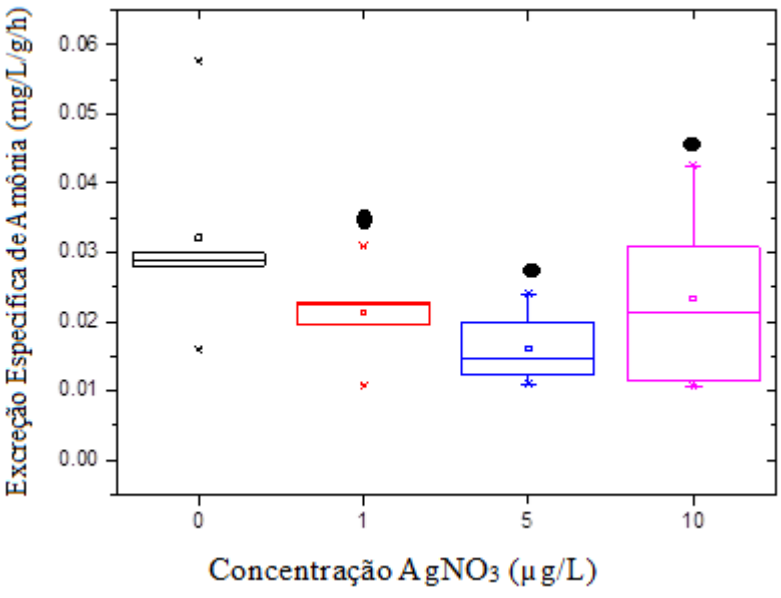


Figura 5. Box plot para excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* expostos a $AgNO_3$ em diferentes concentrações. Cada tratamento, comparado ao grupo controle. Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis e seguido pelo teste de Dunn´s, $p < 0,05$ comparado ao controle). ● indica diferença estatística em relação ao controle.

1.3.3. Atividade de Natação

Os peixes expostos a AgNPs apresentaram uma significativa redução da capacidade de natação. Houve diminuição do tempo de natação até o cansaço de 72% e 74% em relação ao controle nas maiores concentrações estudadas (50 e 100 µg/L). Nas concentrações de 50 e 100 µg/L de AgNPs, o tempo de natação até o cansaço foram estatisticamente diferentes em relação ao controle (Fig. 6).

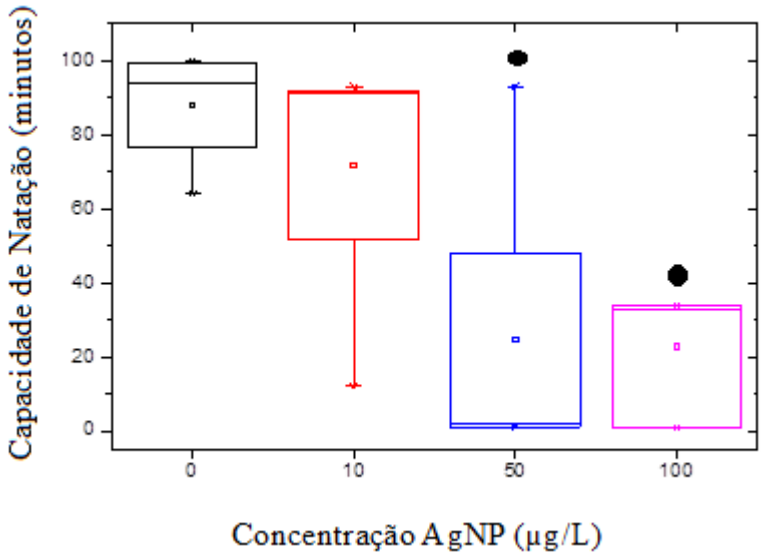


Figura 6. Box plot para a capacidade de natação de *Geophagus brasiliensis* expostos a AgNP em diferentes concentrações. Cada tratamento além do grupo controle com N=5. ● o indica diferença estatística em relação ao controle.

Os resultados obtidos para a capacidade de natação ao aumento das concentrações de $AgNO_3$ foi evidenciado por uma tendência de diminuição do tempo de natação até o cansaço em relação ao controle. Empregando-se o teste estatístico constatou-se que as três concentrações foram estatisticamente diferentes ao controle (Fig. 7).

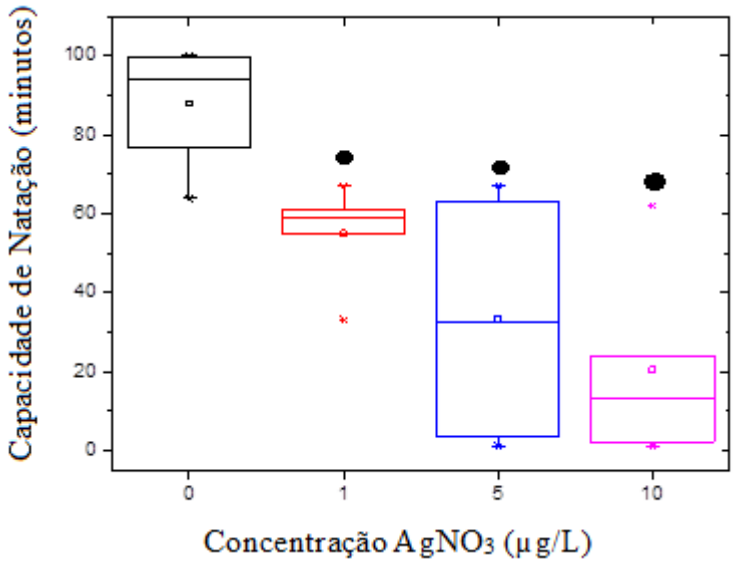


Figura 7. Box plot para a capacidade de natação de *Geophagus brasiliensis* expostos a AgNO3 em diferentes concentrações. Cada tratamento além do grupo controle com N=5. ● indica diferença estatística em relação ao controle.

1.4. Discussões

O *Geophagus brasiliensis* tem sido amplamente utilizado como bioindicador para a avaliação de níveis elevados de elementos traço, incluindo cromo, chumbo e níquel (MORAIS et al., 2016), bem como pesticidas (BARBIERI, 2009) e NPs de grafeno (MEDEIROS et al., 2019), evidenciando sua sensibilidade a esses poluentes. O presente estudo reafirma a eficácia de *G. brasiliensis* como bioindicador ao investigar a toxicidade de nanopartículas de prata (AgNPs) e nitrato de prata (AgNO3), reforçando sua relevância em investigações de ecotoxicologia aquática.

A AgNP biogênica, sintetizada utilizando o fungo endofítico *Aspergillus tubingensis*, emerge como uma alternativa promissora às versões sintéticas devido às suas propriedades antibacterianas e antifúngicas (KHOSHNAMVAND et al., 2020; DA SILVA et al., 2022; AGUIAR et al., 2024). No entanto, nossos resultados mostram que a exposição de *G. brasiliensis* a AgNPs, em determinadas concentrações, impactam negativamente o metabolismo fisiológico dos peixes, afetando consumo de oxigênio e excreção de amônia, e podendo levar à mortalidade, especialmente nas concentrações mais elevadas como a constatada nesse estudo, quando elevou-se a 1 mg/L de AgNPs.

O metabolismo dos peixes é um resultado de processos fisiológicos complexos e integrados, sendo diretamente influenciado pelas condições ambientais (DAMATO e BARBIERI, 2008). As brânquias, que atuam como as principais estruturas respiratórias, são particularmente sensíveis às variáveis ambientais e aos mecanismos de toxicidade associados às AgNPs e ao AgNO3 (REZENDE et al., 2017). A toxicidade observada, especialmente em concentrações elevadas de AgNPs, sugere que os íons de prata liberados podem desempenhar um papel crítico, embora controverso, no grau de toxicidade (LI et al., 2021).

A exposição de organismos aquáticos ao $AgNO_3$ demonstrou efeitos neurotóxicos, comportamentais e metabólicos em estudos anteriores (AGUIAR et al., 2024; JENIFER et al., 2019; MERCED-COLÓN et al., 2020; FU et al., 2021; PARK et al., 2022; SIBIYA et al., 2022). Neste estudo, observamos que concentrações mais elevadas de $AgNO_3$ resultaram em uma diminuição drástica na capacidade de natação de *G. brasiliensis*, atingindo exaustão e fadiga, e comprometendo o desempenho natatório. Essa redução pode ter implicações ecológicas negativas, afetando comportamentos essenciais como forrageamento, evasão de predadores, proteção territorial e migração (DE ANGELIS et al., 2023).

Os órgãos branquiais dos peixes desempenham um papel fundamental como sensores das condições ambientais; no entanto, os mecanismos de toxicidade das nanopartículas de prata (AgNPs) e do nitrato de prata (AgNO3) nessas estruturas ainda são pouco compreendidos. Em particular, a contribuição dos íons de prata liberados para o nível de toxicidade continua a ser um tema controverso (LI et al., 2021). Neste estudo, tanto as AgNPs quanto o AgNO3 tiveram um impacto significativo na resposta fisiológica dos peixes, levando a uma redução no consumo de oxigênio e a alterações na excreção de amônia, possivelmente devido ao comprometimento das brânquias, como registrado por Rezende et al. (2018) quando estudaram efeitos de nanopartículas de Titânio em tilápias.

Estudos recentes demonstraram que a exposição de peixes e crustáceos a níveis subletais de nitrato de prata ($AgNO_3$) pode impactar o comportamento, sugerindo a possibilidade de neurotoxicidade (AGUIAR et al., 2024; RIBEIRO et al., 2023). Este efeito é atribuído ao acúmulo de prata nos organismos, que leva ao aumento do estresse oxidativo e a alterações nas atividades enzimáticas (JENIFER et al., 2019; MERCED-COLÓN et al., 2020; FU et al., 2021; PARK et al., 2022; SIBIYA et al., 2022). No presente estudo, a exposição a concentrações mais elevadas de nanopartículas de prata (AgNPs) (1000 µg/L) resultou na mortalidade de todos os indivíduos do grupo, enquanto outras concentrações causaram uma

diminuição no consumo de oxigênio e na excreção de amônia em *Geophagus brasiliensis,* indicando um impacto negativo na taxa metabólica. O aumento nas concentrações de AgNPs e $AgNO_3$ também promoveu alterações no metabolismo de rotina, afetando potencialmente o comportamento e a sobrevivência dos peixes.

As interações comportamentais causadas por agentes tóxicos são indicadores sensíveis de estresse ambiental e podem fornecer uma indicação inicial do estado de saúde dos peixes (BARBOZA, VIEIRA, & GUILHERMINO, 2018). Normalmente, a capacidade de natação é afetada antes que ocorra a morte, como observado por BARBIERI (2007). No presente estudo, verificou-se que os peixes expostos a concentrações mais elevadas de AgNP experimentaram uma diminuição drástica na capacidade de natação, atingindo um ponto de exaustão e fadiga na concentração de 50 e 100 μg/L. Isso pode ser atribuído aos efeitos adversos das nanopartículas no metabolismo (PLAUT, 2001; BARBIERI, 2007; CAMPOS-GARCIA et al., 2015), comprometendo o desempenho natatório. Essa redução na capacidade de natação pode ter consequências ecológicas negativas, como limitar a capacidade de forrageamento, a evasão de predadores, a proteção territorial e a migração (DE ANGELIS et al., 2023), colocando em risco a sobrevivência dos peixes (EIRAS et al., 2022).

Geralmente, os efeitos dos poluentes na atividade de natação são mais pronunciados nos peixes menores (BARBIERI, NGAN, & GOMES, 1998). De acordo com PANNETIER et al. (2019), a avaliação da toxicidade de poluentes em organismos aquáticos é frequentemente realizada nos primeiros estágios de vida, quando os poluentes induzem efeitos subletais que afetam diretamente as funções fisiológicas (crescimento), ecológicas (comportamento de natação) e metabólicas (metabolização xenobiótica, integridade do DNA). Outro estudo demonstrou uma correlação positiva entre velocidade crítica de natação, atividade rotineira, taxas metabólicas e tamanho corporal dos peixes, onde peixes maiores mostraram maior resistência em ambientes poluídos (PLAUT, 2001). Este padrão foi consistente no presente estudo, uma vez que os espécimes utilizados eram juvenis em fase de crescimento e desenvolvimento. Suas respostas fisiológicas a poluentes ambientais tóxicos e comportamento ecológico permitiram uma avaliação mais efetiva dos impactos dessas nanopartículas no metabolismo de rotina e na atividade de natação.

Peixes são conhecidos por serem sensíveis aos impactos antrópicos e frequentemente utilizados como espécies sentinelas em ambientes aquáticos (BURGOS-ACEVES et al., 2018). Para a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), por exemplo, há uma relação positiva

entre o crescimento e imunidade com a exposição a AgNPs, além da atividade antibacteriana (EL-HOUSEINY et al., 2021; MABROUK et al., 2021; ALY et al., 2023). No entanto, nossos resultados demonstraram que concentrações elevadas ou não controladas de AgNPs podem aumentar os riscos tóxicos para organismos aquáticos, comprometendo as respostas fisiológicas e aumentando a vulnerabilidade. Isso destaca a necessidade de estudos contínuos e uma compreensão detalhada sobre os impactos das AgNPs nos ecossistemas aquáticos.

Pesquisas futuras devem focar em elucidar os mecanismos específicos pelos quais as AgNPs e o AgNO3 afetam as brânquias dos peixes. Estudos de biologia molecular podem ajudar a identificar as vias metabólicas e os processos celulares que são alterados pela presença de íons de prata. É essencial conduzir estudos de exposição de longo prazo para avaliar os efeitos crônicos das AgNPs em peixes. Isso incluiria a monitorização de várias gerações para entender as possíveis implicações reprodutivas e transgeracionais. Futuros estudos devem considerar a variação das condições ambientais, como temperatura, pH e presença de outros poluentes, para entender como esses fatores interagem com as AgNPs e afetam a toxicidade.

Comparar os efeitos das AgNPs em diferentes espécies de peixes pode fornecer insights valiosos sobre a sensibilidade relativa e as respostas adaptativas, contribuindo para uma avaliação mais abrangente dos riscos ecotoxicológicos. Investigar as diferenças nos efeitos tóxicos entre nanopartículas de prata biogênicas e sintéticas pode ajudar a identificar opções mais seguras para uso ambiental e industrial. Ampliar o uso de espécies bioindicadoras como o *Geophagus brasiliensis* em diferentes tipos de ambientes aquáticos pode ajudar a melhorar a monitorização e a gestão da qualidade da água, especialmente em áreas impactadas por atividades antrópicas. Avaliar a interação das AgNPs com outros poluentes, como metais pesados e pesticidas, pode fornecer uma visão mais realista dos impactos ecotoxicológicos em ambientes aquáticos complexos. Pesquisar métodos para reduzir a liberação de nanopartículas de prata no ambiente, bem como técnicas de remediação para ambientes já contaminados, é crucial para minimizar os impactos negativos.

1.5. Conclusões

As AgNPs micogênicas e o $AgNO_3$ alteraram significativamente a taxa metabólica, a excreção de amônia e o tempo de natação de *Geophagus brasiliensis* em comparação com o controle. Estes resultados fornecem informações valiosas para compreender melhor as respostas fisiológicas e comportamentais dessa espécie quando exposta a AgNPs. Este estudo reforça o potencial de *G. brasiliensis* como bioindicador de toxicidade aquática e destaca a necessidade de estudos contínuos e detalhados sobre os impactos das AgNPs nos ecossistemas aquáticos. A avaliação rigorosa das concentrações e dos efeitos dos nanomateriais é crucial para mitigar os riscos ecológicos e garantir a conservação eficaz dos ambientes aquáticos.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE GRAFENO E CÁDMIO NO METABOLISMO DE *Geophagus brasiliensis*: ALTERAÇÕES NO CONSUMO DE OXIGÊNIO E NA EXCREÇÃO DE AMÔNIA

RESUMO

A nanotecnologia tem desempenhado um papel crucial na modernização e, em alguns casos, na transformação de diversos setores tecnológicos e industriais. Contudo, o avanço dessas aplicações acarreta riscos ambientais, especialmente relacionados às etapas de produção e descarte de nanomateriais. Isso sublinha a urgência de desenvolver diretrizes específicas, protocolos experimentais rigorosos e projetos de estudo voltados para a pesquisa ambiental desses materiais, dado que as propriedades únicas dos materiais em nanoescala representam desafios significativos na avaliação toxicológica. A complexidade dos ambientes aquáticos e a coexposição de poluentes, considerando suas características físicas e químicas, indicam que as misturas de contaminantes podem causar impactos mais severos do que os metais isolados. Por esse motivo, ainda existem lacunas significativas no conhecimento sobre as interações e os mecanismos de toxicidade combinada de GO e Cd em organismos aquáticos. Investigar os efeitos toxicológicos da exposição única e da coexposição aguda de nanomateriais à base de grafeno e cádmio no metabolismo de rotina da espécie neotropical *Geophagus brasiliensis*, com foco no consumo de oxigênio e na excreção de amônia foi o objetivo central do estudo. A avaliação foi realizada após a exposição única dos peixes a diferentes concentrações de GO (1, 2,5, 5 e 10 mg/L) e de Cd (0,1, 0,5, 1 e 2 mg/L) e após exposição combinada de Cd + GO nas concentrações (0,1, 0,5, 1 e 2 mg/L de Cd + 1 mg/L de GO), durante quatro distintos períodos, 24, 48, 72 e 96 horas. Experimentos conduzidos em doze (12) grupos, cada um com N=5 indivíduos, incluindo três (3) grupos controle. Os peixes foram mantidos a uma temperatura de 22,5 (±0,5) °C, com comprimento e peso médios de 4,1 (±0,24) cm e 1,24 (±0,32) g. Mediu-se o metabolismo de rotina por meio do consumo de oxigênio utilizando o método de Winkler e a excreção de amônia (NH_3) pelo método de Nessler. Os dados foram submetidos à análise estatística com teste paramétrico One-way-ANOVA, seguido pelo teste de comparações de Tukey, com intervalo de confiança $p < 0,05$ e teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn para detalhar as diferenças entre o grupo controle e as concentrações estudadas. Não houve morte de nenhum dos espécimes. Para os grupos exposto em GO, em relação ao consumo específico de oxigénio, registou-se uma ligeira diminuição em todas as concentrações após 24 e 48 horas de exposição, mas sem diferenças em relação ao controle, após 72h houve um aumento, exceto na concentração de 2,5 mg/L e para os indivíduos exposto por 96h, houve uma tendência de diminuição das duas concentrações mais baixas e um aumento nas demais concentrações, com destaque na mais alta, 10 mg/L que foi de 83% em relação controle. Em relação a excreção específica da amônia, houve uma ligeira diminuição dos indivíduos expostos na concentração mais baixa e um aumento para os indivíduos expostos nas três maiores concentrações, isso no período de 24h, e para os espécimes expostos por 48, 72 e 96h, se registou uma diminuição de excreção muito acentuada em todas as concentrações, atingindo os 78% e com diferença em relação controle, para todos os grupos exceto o da concentração mais baixo exposto por 48h. Para os espécimes expostos ao Cd, referente ao consumo de oxigênio, houve uma tendência de aumento de consumo em todas as concentrações nas exposições de 24, 48 e 72h, exceto na mais baixa por 24 e 72h e uma diminuição acentuada na exposição de 96h em todas as concentrações e com diferenças em relação ao controle. Para excreção da amônia, houve uma diminuição clara e muito acentuada em todos os grupos expostos à todas as concentrações e períodos, tendo atingido os 96%, todos com diferenças em relação ao controle. Os grupos da exposição combinada de Cd + GO, em relação ao consumo de oxigênio, houve uma tendência de aumento acentuado do consumo nas primeiras 24h para todos os grupos e com realce aos das maiores concentrações (1 e 2 mg/L), que atingiram os 135% e 217%, e uma diminuição de consumo com diferenças em todos os grupos expostos nos períodos de 48, 72 e 96h em comparação ao controle. Para a excreção da amônia na coexposição, os resultados mostraram

claramente a tendência de diminuição de excreção para todos os grupos expostos e em todas as concentrações estudadas e tempo de exposição, chagando aos 98% e todas com diferenças significativas em relação ao controle. Concluiu-se que, para a espécie *G. brasiliensis*, o GO, o Cd e a exposição combinada do Cd + GO causam alterações no metabolismo de rotina, está última demostrou ter efeito mais tóxico. No entanto a exposição combinada entre o metal pesado Cd e o nanomaterial G, afetou claramente o metabolismo de rotina dos peixes, onde ao fator dependente do aumento das concentrações do metal e tempo de exposição foram registadas baixas muito acentuadas em relação ao consumo oxigênio e da excreção amônia. *G. brasiliensis*, pode de certa forma ser um excelente bioindicador de contaminantes aquáticos. Esses dados ressaltam a necessidade de mais, estudos, conhecimento e sobre potenciais interações de nanomateriais com contaminantes existentes nos ecossistemas aquáticos e ao mesmo tempo oferece insights valiosos para uma análise crítica, definição dos padrões e avaliação criteriosa dos efeitos isolados e combinados dos NMs e MPs para uma melhor gestão preservação de ecossistemas aquáticos.

Palavra-chave: Grafeno, Cádmio, *Geophagus brasiliensis*, Metabolismo de rotina.

ABSTRACT

Nanotechnology has played a crucial role in the modernization and, in some cases, the transformation of several technological and industrial sectors. However, the advancement of these applications entails environmental risks, especially related to the production and disposal stages of nanomaterials. This highlights the urgency of developing specific guidelines, rigorous experimental protocols and study designs focused on the environmental research of these materials, given that the unique properties of nanoscale materials pose significant challenges in toxicological assessment. The complexity of aquatic environments and the co-exposure of pollutants, considering their physical and chemical characteristics, indicate that mixtures of contaminants can cause more severe impacts than isolated metals. For this reason, there are still significant gaps in knowledge about the interactions and mechanisms of combined toxicity of GO and Cd in aquatic organisms. The main objective of this study was to investigate the toxicological effects of single exposure and acute co-exposure of graphene and cadmium-based nanomaterials on the routine metabolism of the Neotropical species *Geophagus brasiliensis*, focusing on oxygen consumption and ammonia excretion. The evaluation was performed after single exposure of fish to different concentrations of GO (1, 2.5, 5 and 10 mg/L) and Cd (0.1, 0.5, 1 and 2 mg/L) and after combined exposure of Cd + GO at concentrations (0.1, 0.5, 1 and 2 mg/L of Cd + 1 mg/L of GO), for four different periods, 24, 48, 72 and 96 hours. Experiments were conducted in twelve (12) groups, each with N=5 individuals, including three (3) control groups. The fish were kept at a temperature of 22.5 (±0.5) °C, with an average length and weight of 4.1 (±0.24) cm and 1.24 (±0.32) g. Routine metabolism was measured by oxygen consumption using the Winkler method and ammonia (NH_3) excretion by the Nessler method. The data were subjected to statistical analysis with a parametric One-way-ANOVA test, followed by Tukey's comparison test, with a confidence interval of $p < 0.05$ and the nonparametric Kruskal-Wallis test and Dunn's test to detail the differences between the control group and the studied concentrations. There was no death of any of the specimens. For the groups exposed to GO, in relation to specific oxygen consumption, a slight decrease was recorded in all concentrations after 24 and 48 hours of exposure, but with no differences in relation to the control. After 72 hours there was an increase, except in the concentration of 2.5 mg/L and for the individuals exposed for 96 hours, there was a tendency for a decrease in the two lowest concentrations and an increase in the other concentrations, with emphasis on the highest, 10 mg/L, which was 83% in relation to the control. In relation to the specific excretion of ammonia, there was a slight decrease in the individuals exposed to the lowest concentration and an increase for the individuals exposed to the three highest concentrations, in the period of 24 hours. For the specimens exposed for 48, 72 and 96 hours, a very sharp decrease in excretion was recorded in all concentrations, reaching 78% and with a difference in relation to the control, for all groups except the one with the lowest concentration exposed for 48 hours. For the specimens exposed to Cd, regarding oxygen consumption, there was a tendency for increased consumption in all concentrations in the 24, 48 and 72h exposures, except for the lowest for 24 and 72h and a sharp decrease in the 96h exposure in all concentrations and with differences in relation to the control. For ammonia excretion, there was a clear and very sharp decrease in all groups exposed to all concentrations and periods, having reached 96%, all with differences in relation to the control. In the groups of combined exposure of Cd + GO, in relation to oxygen consumption, there was a tendency for a sharp increase in consumption in

the first 24h for all groups and with emphasis on those of the highest concentrations (1 and 2 mg/L), which reached 135% and 217%, and a decrease in consumption with differences in all groups exposed in the periods of 48, 72 and 96h in comparison to the control. For ammonia excretion in co-exposure, the results clearly showed a tendency for decreased excretion for all exposed groups and in all studied concentrations and exposure time, reaching 98% and all with significant differences in relation to the control. It was concluded that, for the species G. brasiliensis, GO, Cd and the combined exposure of Cd + GO cause changes in the routine metabolism, the latter having a more toxic effect. However, the combined exposure between the heavy metal Cd and the nanomaterial G clearly affected the routine metabolism of the fish, where the factor dependent on the increase in metal concentrations and exposure time was recorded very sharp drops in relation to oxygen consumption and ammonia excretion. G. brasiliensis may in some way be an excellent bioindicator of aquatic contaminants. These data highlight the need for more studies, knowledge and potential interactions of nanomaterials with contaminants existing in aquatic ecosystems and at the same time offer valuable insights for a critical analysis, definition of standards and careful evaluation of the isolated and combined effects of NMs and MPs for better management and preservation of aquatic ecosystems.

Keyword: Cadmium, Graphene, *Geophagus brasiliensis*, Routine metabolism.

2. 1. Introdução

A nanotecnologia tem desempenhado um papel crucial na modernização e, em alguns casos, na transformação de diversos setores tecnológicos e industriais, como a tecnologia da informação, segurança interna, medicina, transporte, energia e segurança alimentar. Contudo, o avanço dessas aplicações acarreta riscos ambientais, especialmente relacionados às etapas de produção e descarte de nanomateriais (RIBEIRO et al., 2023). Isso sublinha a urgência de desenvolver diretrizes específicas, protocolos experimentais rigorosos e projetos de estudo voltados para a pesquisa ambiental desses materiais, dado que as propriedades únicas dos materiais em nanoescala representam desafios significativos na avaliação toxicológica (DE MARCHI et al., 2018). O uso de NPs em cosméticos, detergentes, alimentos e outros produtos comerciais está crescendo rapidamente, apesar da limitada compreensão de seus efeitos na saúde humana, no metabolismo dos organismos e na função dos ecossistemas (CEDERVALL et al., 2012; MATTSSON et al., 2014). As nanopartículas projetadas com propriedades específicas, têm efeitos tóxicos potencialmente desconhecidos que podem se disseminar no ambiente, impactando de maneira alarmante plantas e organismos aquáticos, o que pode restringir seu uso seguro (AGUIAR et al., 2024). Assim, a segurança ambiental torna-se um requisito essencial para garantir a aplicação segura dessas tecnologias (GHOSH, 2019). Os nanomateriais estão sendo amplamente utilizados em diversos campos, o que resulta em sua inevitável liberação nos ambientes aquáticos, onde podem exercer efeitos tóxicos sobre os organismos que ali habitam (GUO et al., 2023). Com o aumento na produção e aplicação de nanopartículas (NPs) projetadas, sua descarga no ambiente é cada vez mais frequente (DE OLIVEIRA et al., 2022). Essas NPs liberadas têm o potencial de interagir com contaminantes já presentes, ocasionando efeitos biológicos, como bioacumulação e toxicidade, que ainda não são plenamente compreendidos (DENG et al., 2017).

Os nanomateriais da família do grafeno (NFG), que incluem grafeno puro, óxido de grafeno reduzido (rGO) e óxido de grafeno (GO), apresentam um vasto potencial e são empregados em uma ampla gama de aplicações, aumentando a probabilidade de sua liberação em ambientes aquáticos (ZHAO et al., 2014). Devido às suas propriedades químicas e físicas únicas, os nanomateriais da família do grafeno estão sendo cada vez mais incorporados em diversas áreas da ciência (DE MARCHI et al., 2018). Quando liberados no ambiente, esses materiais tendem a se acumular em sistemas aquáticos, onde podem exercer efeitos toxicológicos em organismos não-alvo (DE MARCHI et al., 2018; ZHAO et al., 2023). Por

exemplo, o grafeno pode ser modificado com grupos funcionais ao ser liberado no ambiente, o que pode alterar seu comportamento e impacto ecotoxicológico (HUANG et al., 2023).

Materiais relacionados ao grafeno (MRG) são considerados entre os mais promissores em termos de aplicações tecnológicas, o que torna sua liberação em ambientes aquáticos altamente provável (KALMAN et al., 2019). A exposição do ambiente, incluindo plantas, ecossistemas e humanos, ao grafeno está aumentando gradativamente, seja de forma acidental ou intencional (DEVASENA; FRANCIS; RAMAPRABHU, 2021). A produção em larga escala de nanomateriais projetados pode exercer uma pressão substancial sobre o meio ambiente, e os ecossistemas aquáticos que são particularmente vulneráveis (DA SILVA et al., 2022). Ainda é necessário aprofundar a avaliação científica sobre a bioacumulação em organismos e a biomagnificação na cadeia alimentar, sendo o fator de bioconcentração um dos parâmetros-chave, geralmente determinado por testes de fluxo desses nanomateriais em peixes (KUEHR; KOSFELD; SCHLECHTRIEM, 2021). Por exemplo, o grafeno, uma vez liberado nos corpos d'água, pode interagir com íons inorgânicos e matéria orgânica natural, resultando em possíveis impactos adversos significativos para o ecossistema (MALHOTRA et al., 2020).

Devido às suas características de superfície, uma vez no ambiente aquático, o grafeno (G) pode atuar como um vetor de transporte de poluentes, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, para organismos aquáticos (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2021). Embora os riscos do cádmio para os organismos aquáticos sejam amplamente reconhecidos, os efeitos dos nanomateriais à base de carbono, como o grafeno, na toxicidade do Cd são raramente abordados (ZHANG et al., 2020). Atualmente, há uma lacuna significativa no entendimento dos efeitos tóxicos combinados de nanomateriais à base de carbono em associação com outros contaminantes (SANCHÍS et al., 2016). Alguns desses nanomateriais têm sido considerados para aplicações em remediação ambiental, como o óxido de grafeno (GO), que tem mostrado potencial para remoção de poluentes. No entanto, os efeitos colaterais decorrentes das interações do GO com poluentes clássicos em ambientes aquáticos permanecem amplamente desconhecidos (DE MELO et al., 2019; WU et al., 2023). Devido às suas propriedades em nanoescala, o GO apresenta alta reatividade, e outros contaminantes presentes no ambiente podem se ligar a ele, influenciando sua toxicidade intrínseca (MEDEIROS et al., 2020).

Entre os metais pesados que mais poluem o ambiente, especialmente os sistemas aquáticos, o cádmio (Cd) se destaca, pela sua toxicidade por ser o Cl_2Cd um sal de referência em estudo de ecotoxicologia (BARBIERI e PAES, 2011). O rápido desenvolvimento industrial e a contínua intensificação das atividades antropogênicas têm levado ao aumento de cádmio em ecossistemas aquáticos, onde é um contaminante de grande preocupação para a pesca e a aquicultura (WANG et al., 2021; PAUL e SMALL, 2021). O cádmio é amplamente reconhecido como um dos metais mais tóxicos no meio ambiente (GARCIA-SANTOS, 2015; BHATTACHARYA, 2020; JU et al., 2020), e sua poluição tem sido uma preocupação global de saúde por décadas (CHOUDHURY et al., 2021). Este metal não possui funções biológicas conhecidas em qualquer forma de vida, sendo notado apenas por seus efeitos tóxicos (GENCHI et al., 2020; PAUL e SMALL, 2021; WANG et al., 2021). O Cd é classificado como o sexto metal mais tóxico, representando um risco significativo para a saúde humana (JIAXIN et al., 2020).

As populações de peixes são suscetíveis a impactos ambientais causados pela introdução de espécies exóticas, resíduos industriais, derramamento de petróleo, pesticidas, herbicidas e poluentes emergentes como nanopartículas, que afetam diretamente a ecologia e a sobrevivência das espécies (AGUIAR et al., 2024). Os efeitos tóxicos dos poluentes nos sistemas bioquímicos e fisiológicos de um organismo podem ser avaliados por meio do estudo do consumo de oxigênio e da excreção de amônia (BARBIERI et al., 2002; BARBIERI et al. 2005; DAMATO e BARBIERI, 2012), entre outras abordagens.

Geophagus brasiliensis, um ciclídeo neotropical com uma ampla distribuição geográfica, desde o estado do Amapá no Brasil até o Rio da Prata (Argentina/Uruguai). *G. brasiliensis* é uma espécie nativa do Brasil com dieta variada é considerada onívora (ANDREATA e TENÓRIO 1997). A família é caracterizada por habitar águas paradas, como lagoas marginais e remansos ao longo das margens dos rios (SILVANO et al. 2001). Os machos tendem a crescer mais rapidamente que as fêmeas, e suas principais características incluem versatilidade, territorialismo e resistência, o que os torna suscetíveis aos efeitos de diversos poluentes (HIDETOSHI, 1984; KULLANDER, 2003; ABELHA E GOULART, 2004; ROCHA ET AL., 2005; DI GIULIO e HINTON, 2008; VOIGT et al., 2015; VEZZONE et al., 2023). No Brasil, *G. brasiliensis* é uma espécie de importante exploração comercial e é um animal ideal para estudar os danos causados pelos efeitos de poluentes, que são frequentemente detectados no ambiente aquático (BARBIERI, 2009).

Os ecossistemas de água doce são especialmente vulneráveis à atividade antrópica, uma vez que recebem uma carga significativa de poluentes, tanto naturais (BARBIERI et al., 2024) quanto xenobióticos, transportados para rios e córregos por diversos processos ambientais (FERRO; FERRARI; EISSA, 2021). Entre os poluentes que mais impactam esses ecossistemas, destacam-se os metais pesados (DAMATO e BARBIERI, 2012; SANTOS et al., 2014). A intensificação das atividades antrópicas, combinada com a falta de compreensão sobre suas consequências, tem promovido contaminações graves por metais pesados em diversos sistemas aquáticos globalmente (PANIGRAHI; PAL; SARKAR, 2024). As fontes naturais desses metais incluem erupções vulcânicas e o intemperismo de rochas, enquanto as fontes antropogênicas abrangem atividades agrícolas e industriais, combustão de combustíveis fósseis, incineração de resíduos, mineração, entre outras (GARAI et al., 2021). A poluição de ecossistemas aquáticos por metais pesados tem se tornado uma preocupação crescente devido à sua toxicidade, persistência no ambiente, potencial de bioacumulação e biomagnificação (BARBIERI et al., 2010; GARAI et al., 2021). A natureza não biodegradável desses metais eleva as preocupações sobre sua acumulação em organismos aquáticos (PANIGRAHI; PAL; SARKAR, 2024).

Estudos têm investigado os efeitos tóxicos e o impacto no metabolismo de rotina, como o consumo de oxigênio e a excreção de amônia, decorrentes da exposição combinada de nanomateriais à base de carbono e metais pesados em organismos aquáticos, incluindo peixes (CAMPOS-GARCIA et al., 2015; MEDEIROS et al., 2020; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2021; JURGELĖNĖ et al., 2022; MAKARAS et al., 2023), crustáceos (WU e CHEN, 2004; LIU et al., 2018; DE MELO et al., 2019; HUANG et al., 2023), moluscos (LI et al., 2021), e algas (WANG et al., 2017; ZHANG et al., 2020). No entanto, esses estudos ainda apresentam lacunas e limitações significativas, sugerindo a necessidade de investigações adicionais para compreender melhor os efeitos combinados desses nanomateriais com metais pesados, dada a complexidade dos ecossistemas aquáticos e dos organismos que os compõem.

A complexidade dos ambientes aquáticos e a coexposição de poluentes, considerando suas características físicas e químicas, indicam que as misturas de contaminantes podem causar impactos mais severos do que os metais isolados (ZHANG et al., 2020). Poucos estudos têm focado na coexposição de nanopartículas como grafeno (GO) associadas ao cádmio (Cd) e seus efeitos no metabolismo de rotina em peixes neotropicais. Por esse motivo,

ainda existem lacunas significativas no conhecimento sobre as interações e os mecanismos de toxicidade combinada de GO e Cd em organismos aquáticos.

Neste estudo, formularam-se as seguintes hipóteses: (1) A exposição a nanopartículas de grafeno, uma vez liberadas em ambientes aquáticos, pode impactar negativamente a taxa metabólica da espécie neotropical *Geophagus brasiliensis*, refletindo-se na diminuição do consumo de oxigênio e na excreção de amônia, dependendo da concentração e do tempo de exposição; (2) A exposição intermitente ao Cd, com concentrações crescentes e tempos prolongados, resultará em alterações significativas no consumo de oxigênio e na excreção de amônia, afetando a taxa metabólica de *G. brasiliensis* de forma proporcional ao nível de exposição; e (3) A coexposição a nanopartículas de grafeno e cádmio potencializará os impactos negativos na taxa metabólica da espécie, sendo esses efeitos mais intensos com o aumento das concentrações e do tempo de exposição, em comparação ao grupo controle.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Nanomateriais e oligoelementos

2.2.1.1. Grafeno (GO)

Nanomateriais e elementos-traço Óxido de grafeno (GO) de camada única foi obtido da Cheap Tubes Inc., Brattleboro, EUA. A dispersão estoque de GO foi preparada em água ultrapura a 1 g/L, em um banho ultrassônico por 30 minutos. No momento do uso, a dispersão foi novamente sonificada por 15 minutos.



Figura 8: Sonicador utilizado para dispersão de GO no Laboratório do Instituto de Pesca de Cananéia – SP-Brasil

2.2.1.1.1. Estudos de estabilidade coloidal e morfologia do GO

A estabilidade coloidal do GO foi estudada simulando as condições dos ensaios de toxicidade. O diâmetro hidrodinâmico foi monitorado em água filtrada durante 24 horas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em um analisador Zetasizer Nano ZS (Malvern). Além disso, a carga superficial (potencial zeta) foi medida por espalhamento de luz eletroforética (ELS) 24 horas após a mistura. As concentrações analisadas foram as mais altas usadas nos testes biológicos (4 μg L−1 de GO, 4 μg L−1 de GO mais 80 μg L−1 de Cd e 4 μg L−1 de GO mais 200 μg L−1 de Zn). Três medições foram realizadas em cada análise de DLS, observando os parâmetros de qualidade, como valores do atenuador, correlogramas, taxas de contagem e variações entre as medições (MEDEIROS, 2020).

A morfologia e topografia do GO foram avaliadas por microscopia de força atômica (AFM). Três microlitros da dispersão de GO (1 mg/L) foram aplicados em uma superfície clivada (porta-amostras) e mantidos em um dessecador por 24 horas. A amostra foi analisada em um Nanoscope IIIa (Digital Instruments), no modo de batimento, com contato intermitente. Uma ponta PPP-CNHR foi usada a 320 KHz (frequência de ressonância) e 42 N/m (constante de força). As imagens foram tratadas no software Gwyddion e as medições foram feitas no software ImageJ.

2.2.1.2. Cádmio (Cd)

O CdCl2 (99,5%, Merck) foi usado como padrão analítico para cádmio. As soluções de estoque foram preparadas em uma proporção de 1:1 em água ultrapura.

2.2.2. Organismo de teste, coleta e manutenção

Quatro grupos de peixes foram expostos por um período de 24, 48, 72 e 96 horas a diferentes concentrações de grafeno (1, 2,5, 5 e 10 mg/L), além de um grupo controle para cada período de exposição.

Um total de setenta e cinco espécimes de *Geophagus brasiliensis* foi coletado em um viveiro de cultivo semi-controlado em maio de 2021 e cuidadosamente transportado em

caixas assépticas até o Laboratório do Instituto de Pesca, em Cananéia, São Paulo, Brasil, onde foram mantidos em tanques de 500 L. O peso médio dos peixes foi de [1,24 ± 0,32] g, com comprimento médio de [4,1 ± 0,24] cm. Os peixes foram aclimatados por um período de sete dias e alimentados diariamente com ração comercial formulada especificamente para a espécie [(Nutrigen MPL, Aquavita), contendo 45% de proteínas, 4% de gorduras, 20% de carbohidratos], até 24 horas antes do início de cada experimento. Todos os espécimes foram selecionados e manuseados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 1993).



Figura 9: Tanques de manutenção dos espécimes para aclimatação em laboratório após coleta, no Laboratório do Instituto de Pesca de Cananéia – SP- Brasil



Figura 10: Balança analítica usada para o peso dos especímes. Instituto de Pesca de Cananéia – SP- Brasil

2.2.3. Ensaios de exposição aguda e desenho experimental

Para os experimentos, a água da torneira foi primeiramente desclorada e, em seguida, filtrada utilizando filtros de éster de celulose com porosidade de 0,25 µm, empregando uma bomba de vácuo. Posteriormente, os peixes foram divididos em grupos de cinco indivíduos cada, os quais foram alocados em aquários contendo 5 litros de água sob condições estáticas. As propriedades físico-químicas da água utilizada foram: pH de 6,7 ± 0,2, oxigênio dissolvido de 6,4 ± 0,2 mg L^{-1}, dureza variando entre 46 e 48 mg $CaCO3\ L^{-1}$ e condutividade elétrica de 43 ± 2,1 µS cm^{-1} (RIBEIRO et al., 2023). Os aquários foram permanentemente aerados, e a temperatura foi mantida controlada em 22,5 ± 0,5 ºC (MEDEIROS et al., 2020).



Figura 11: Aquários aerados contendo 5 litros de água sob temperaturas controladas e concentrações de nanopartículas e elementos traços.

Os peixes foram distribuídos aleatoriamente, sem distinção de sexo, em um total de 15 grupos, cada um contendo cinco espécimes (N=5), incluindo grupos controle para cada tipo de poluente, que foram então submetidos à exposição. Os peixes foram expostos a concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L de Cd, e 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/L de GO, por períodos de 24, 48, 36 e 92 horas. Um grupo controle foi também avaliado, sem a adição das substâncias testadas. Os efeitos da coexposição foram analisados utilizando as mesmas concentrações de Cd (0,1 a 2,0 mg/L) em combinação com 1,0 mg/L de GO, concentração esta que foi selecionada por não apresentar diferenças significativas em comparação ao grupo controle neste estudo (DE MELO et al., 2019; OTTONI et al., 2020; MEDEIROS et al., 2020; ALVES et al., 2022).

a) b)



Figura 12: Aquários (5 L) aerados com os espécimes em ambientes pré-definidos com a) e sem b) tratamentos.

Na coexposição, os metais foram inicialmente adicionados aos aquários, e o GO foi introduzido 15 minutos depois. Finalmente, os peixes foram inseridos nos aquários 30 minutos após a adição do GO.

Após cada período de exposição designado para cada poluente, os peixes foram transferidos individualmente para respirômetros cilíndricos de 800 mL, onde foram aclimatados por 1 hora em um sistema de circulação contínua de água a uma temperatura controlada de 22,1 ± 0,5 ºC. Este procedimento visou minimizar o estresse decorrente do manuseio e promover a adaptação dos animais. Os respirômetros foram mantidos em um ambiente protegido por uma barreira em uma sala isolada, a fim de evitar movimentos indesejados dos peixes durante o experimento (BARBIERI et al., 2002; BARBIERI e PAES, 2011; RIBEIRO et al., 2023). Após a fase de aclimatação, os respirômetros foram fechados e mantidos em confinamento por 1 hora. Em seguida, os respirômetros foram abertos e amostras de água foram coletadas para a determinação do consumo de oxigênio e excreção de amônia. Além disso, cada peixe foi pesado (BARBIERI e DAMATO, 2003; DAMATO e BARBIERI, 2012).

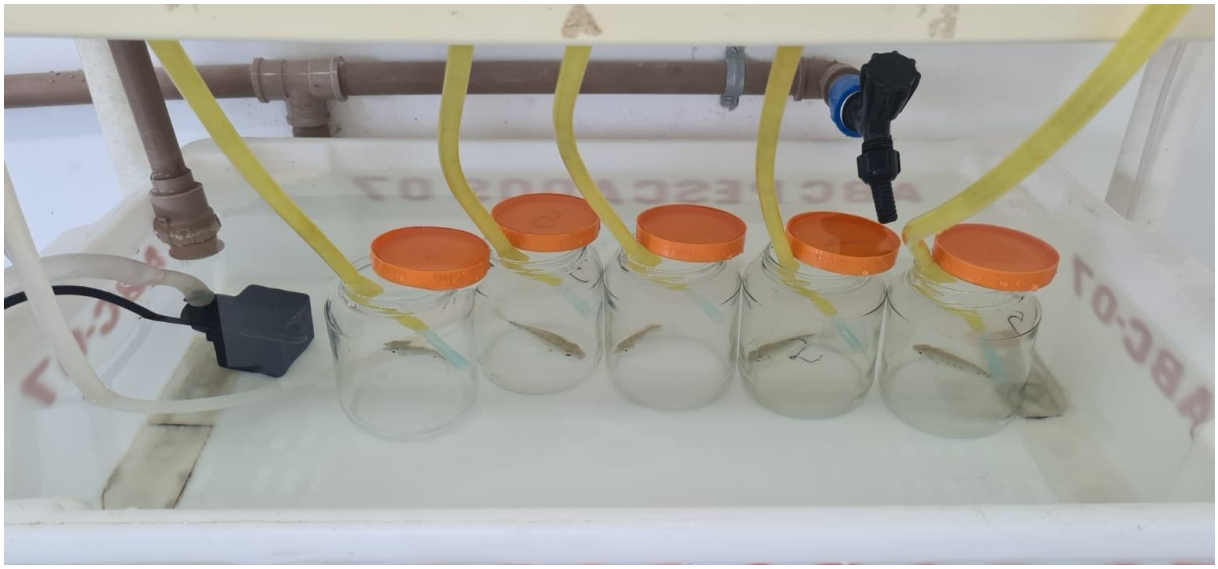


Figura 13: Respirômetros com cada um dos espécimes de um determinado tratamento, durante o período de isolamento e adaptação após tempo de exposição.

2.2.4. Análise da Taxa Metabólica e Excreção de Amônia

Este ensaio foi baseado em sistema fechado de respirometria. Após a exposição nos aquários, os peixes foram inicialmente aclimatados em uma câmara (respirômetro) por 1 hora com circulação contínua de água para atenuar o estresse do manuseio. Em seguida, o fluxo de água foi interrompido e os respirômetros foram selados por 1 hora e meia.

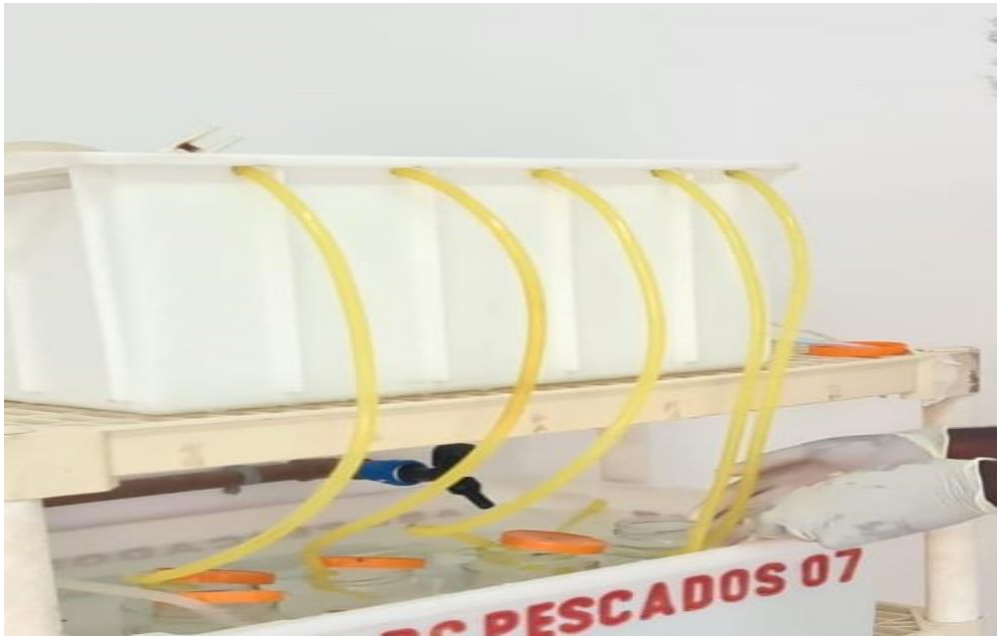


Figura 14: Respirômetros, momento de fechamento para espirometria.

A taxa metabólica ($mLO_2/g/L/h$) e a excreção de amônia (mg/L/g/h) foram quantificadas pela variação nas concentrações de oxigênio e amônia de amostras coletadas antes do fechamento e imediatamente após a abertura dos respirômetros. Estas taxas foram calculadas considerando o volume do respirômetro, o peso úmido do animal e o período de confinamento. O oxigênio dissolvido foi avaliado de acordo com o método proposto por Winkler (Winkler, 1888), e a excreção de amônia foi determinada utilizando o método proposto por Nessler (Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 2021).





Figura 15 (esquerda): Espectrofotômetro para leitura da excreção específica de amônia. Figura 16 (direita): Aparelho para leituras do consumo específico de oxigênio. Instituto de Pesca. Cananéia, São Paulo, Brasil.

2.2.5. Análise estatística

A taxa metabólica e os dados de excreção de amônia foram analisados em relação à distribuição de normalidade e usando os testes de Shapiro-Wilk, respectivamente. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram determinadas usando uma análise de variância unidirecional (ANOVA) como média ± desvio padrão "One-way-ANOVA e seguido pelo teste de comparações de Tukey, com intervalo de confiança $p < 0,05$ comparado cada tratamento ao grupo controle". Finalmente, para os dados que não seguiram uma distribuição normal, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para determinar diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle, o teste de Dunn foi realizado para examinar com mais detalhe as diferenças entre o grupo controle e as três concentrações estudadas onde as diferenças foram consideradas significantes quando $p<0,05$.

2.3. Resultados

2.3.1. Exposição ao Grafeno

2.3.1.1. Consumo específico de oxigênio

O consumo específico de oxigênio de peixes expostos ao Grafeno por 24 horas (Fig. 17*), não foi alterado nas concentrações utilizadas, apesar de uma tendência de diminuição do consumo de oxigênio de 11% e 20% nas concentrações mais baixas (1 e 2,5 mg/L).

Após 48 horas de exposição ao grafeno (GO) o consumo específico de oxigênio, houve uma tendência de diminuição nas três concentrações mais altas (2,5, 5 e 10 mg/L) utilizadas, na ordem dos 12%. 13% e 17 % comparados ao grupo controle (Fig. 17**). No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa (ANOVA, $p<0.05$), indicando apenas uma tendência de diminuição do consumo de oxigênio.

Indivíduos expostos a diferentes concentrações de GO por um período de 72 horas (Fig. 17***) apresentaram um aumento no consumo específico de oxigênio em comparação ao grupo controle, com incrementos de 28% e 12% nas concentrações de 1 e 10 mg/L, respectivamente. No entanto, da mesma forma que os tempos de exposição de 24 e 48 horas, esse aumento não apresentou diferença estatística significativa ao serem comparados ao grupo controle (ANOVA, $p<0,05$).

Após 96 horas de exposição, o consumo específico de oxigênio aumentou em 55% e 83% em relação ao controle, nas concentrações mais altas (5 e 10 mg/L). No entanto, somente na concentração (10 mg/L) houve diferença estatisticamente significativa (ANOVA, Tukey´s, $p<0.05$), (Fig. 17****).

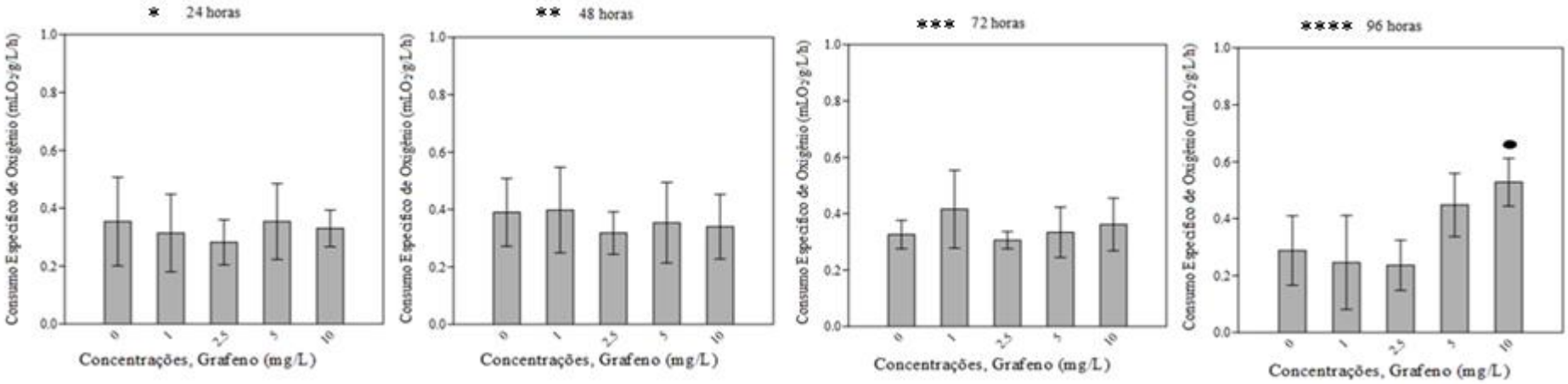


Figura 17* Consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 24 horas de exposição em grafeno (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 17** Consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 48 horas de exposição em grafeno (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 17*** Consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 72 horas de exposição em grafeno (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 17**** Consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 96 horas de exposição em grafeno (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA e seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ comparado ao controle). ● indica diferença estatística em relação ao controle, Barras respectivos desvio padrão.

2.3.1.2. Excreção específica de amônia

Após 24 horas de exposição, foi observada uma redução de 17% na excreção específica de amônia na menor concentração de GO (1 mg/L). Por outro lado, houve um aumento progressivo na excreção com o incremento das concentrações (2,5, 5 e 10 mg/L), registrando aumentos de 27%, 49% e 63%, respectivamente (Fig. 18*). No entanto, essas variações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao grupo controle.

Peixes expostos por 48 horas, a excreção específica de amônia apresentou reduções de 46%, 79%, 67% e 69% nas concentrações de 1, 2,5, 5 e 10 mg/L, respectivamente (Fig. 18**). Houve diferenças estatisticamente entre o grupo controle e os tratamentos nas concentrações de 2,5, 5 e 10 mg/L (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$). Na exposição de 72 horas a diferentes concentrações de GO, houve uma redução significativa na excreção específica de amônia em todos os tratamentos, com a magnitude do efeito aumentando proporcionalmente à concentração utilizada (ver Fig. 18***). Comparado ao controle, o metabolismo dos espécimes foi afetado em todas as concentrações testadas. As reduções percentuais na excreção foram de 61%, 66%, 72% e 78%, da menor à maior concentração. O teste de Tukey ($p<0,05$) confirmou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e cada uma das quatro concentrações.

Após 96 horas de exposição, a excreção específica de amônia diminuiu com o aumento das concentrações, mantendo uma relação inversa entre a concentração de GO e a taxa de excreção (Fig. 18****). Todos os tratamentos apresentaram diferenças em relação ao controle, indicando um impacto substancial no metabolismo dos peixes em todos os grupos expostos. As reduções percentuais observadas foram de 59%, 66%, 66% e 73%, da menor à maior concentração, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas foram evidentes entre o grupo controle e todas as concentrações testadas (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$).

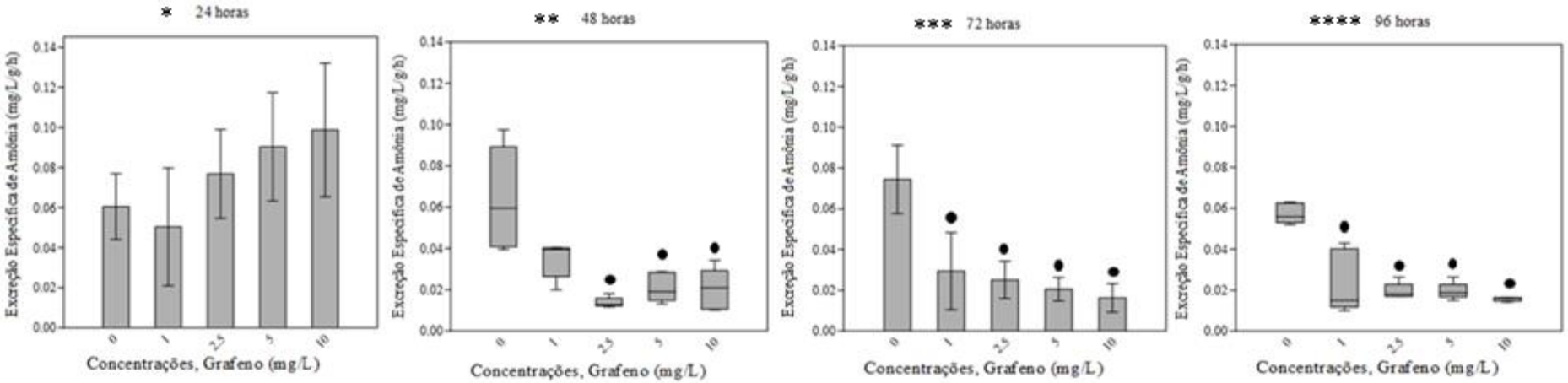


Figura 18* Excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 24 horas de exposição em grafeno (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 18** Box plot para a excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 48 horas de exposição em grafeno (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis e seguido pelo teste de Dunn´s, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 18*** Excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 72 horas de exposição em grafeno (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA e seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 18**** Box plot para a excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 96 horas de exposição em grafeno (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis e seguido pelo teste de Dunn´s, $p < 0,05$ comparado ao controle). ● indica diferença estatística em relação ao controle, Barras respectivos desvio padrão.

2.3.2. Exposição ao Cádmio

2.3.2.1. Consumo específico de oxigênio

Os resultados para os indivíduos expostos a diferentes concentrações de cádmio (Cd) no consumo específico de oxigênio revelaram que, após 24 horas de exposição, apenas o grupo exposto à concentração mais alta (2 mg/L) apresentou uma diferença significativa em comparação ao grupo controle (Fig. 19*). Esse resultado sugere que essa concentração foi suficiente para impactar o metabolismo dos peixes, com uma diferença estatística significativa em relação ao controle (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$). Após 48 horas de exposição, o consumo específico de oxigênio aumentou em 65%, 46%, 55% e 37% nas concentrações de 0,1, 0,5, 1 e 2 mg/L, respectivamente, em comparação ao controle. No entanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas em nenhuma das concentrações analisadas (Kruskal-Wallis, $p>0,05$) (Fig. 19**).

Em relação ao período de 72 horas de exposição, observou-se um aumento no consumo de oxigênio de cerca de 10% na concentração de 0,5 mg/L, 21% em 1 mg/L e 50% em 2 mg/L, em decorrência do aumento das concentrações de Cd. Apesar de uma tendência de aumento, apenas o grupo exposto à concentração de 2 mg/L apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, indicando uma alteração no metabolismo de rotina dos indivíduos expostos (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$) (Fig. 19***).

Após 96 horas de exposição, o consumo específico de oxigênio dos peixes foi afetado em todas as concentrações testadas, comparado ao grupo controle (Fig. 19****). As diferenças foram significativas, com uma redução percentual crescente no consumo de oxigênio à medida que as concentrações aumentaram, resultando em diminuições de 35%, 47%, 43% e 56% nas concentrações de 0,1, 0,5, 1 e 2 mg/L, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas foram confirmadas entre o grupo controle e todas as concentrações testadas (ANOVA, Tukey's, $p<0,05$).

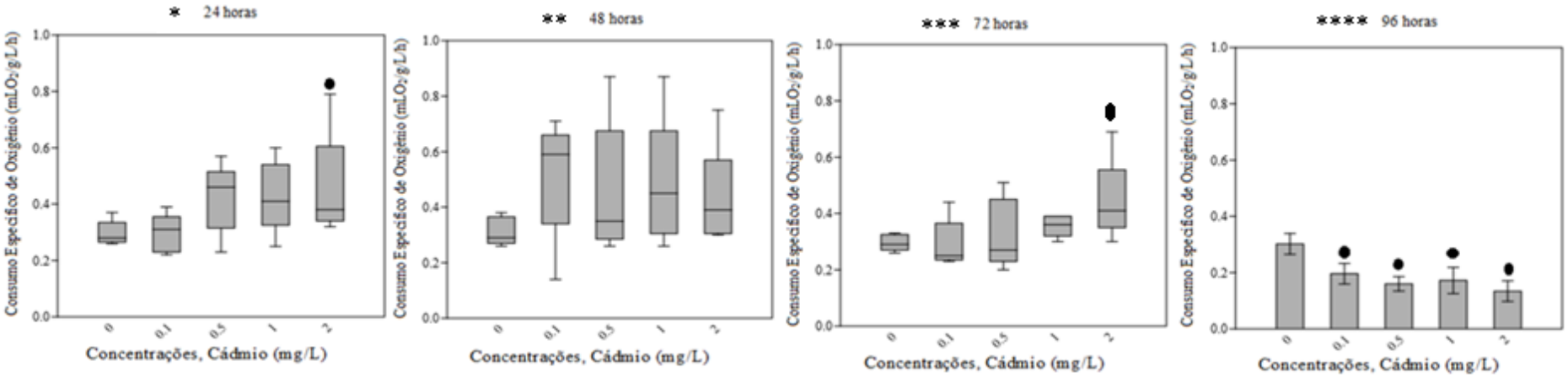


Figura 19* Box plot para o consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 24 horas de exposição em cádmio (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis e seguido pelo teste de Dunn´s, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 19** Box plot para o consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 48 horas de exposição em cádmio (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 19*** Box plot para o consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 72 horas de exposição em cádmio (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis e seguido pelo teste de Dunn´s, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 19**** Consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 96 horas de exposição em cádmio (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA e seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ comparado ao controle). ● indica diferença estatística em relação ao controle, Barras respectivos desvio padrão.

2.3.2.2. Excreção específica de amônia

Os resultados de excreção específica de amônia, após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de Cd, mostraram que todos os tratamentos apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo controle. A excreção de amônia diminuiu em 73%, 76%, 74% e 78% em todos os quatro tratamentos testados, da menor à maior concentração (Fig. 20*), indicando que o metabolismo dos peixes foi afetado pelas concentrações de Cd. Utilizando-se ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ($p<0,05$), confirmou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e cada uma das concentrações testadas (0,1, 0,5, 1 e 2 mg/L). Após 48 horas de exposição, observou-se que todas as concentrações de Cd continuaram a afetar o metabolismo dos peixes em relação à excreção específica de amônia. Todos os tratamentos apresentaram reduções em comparação com o grupo controle, com diminuições de aproximadamente 91% nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 mg/L, e de 72% na concentração de 2 mg/L (Fig. 20**). Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre o controle e cada um dos tratamentos (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$). Peixes expostos por 72 horas, os resultados mostraram que todos os indivíduos nas diferentes concentrações apresentaram alterações no metabolismo, com reduções na excreção de amônia que aumentaram progressivamente: 89%, 93%, 94% e 96%, da concentração mais baixa à mais alta (Fig. 20***). O teste de Dunn's ($p<0,05$) indicou diferenças estatísticas significativas entre o controle e cada um dos tratamentos. Finalmente, após 96 horas de exposição, a excreção específica de amônia também foi significativamente reduzida em todos os tratamentos comparados ao controle (Fig. 20****). A taxa de diminuição foi de 93% nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 mg/L, e de 96% na concentração de 2 mg/L. Diferenças estatisticamente significativas foram confirmadas entre o grupo controle e todas as concentrações testadas (ANOVA, Tukey's, $p<0,05$).

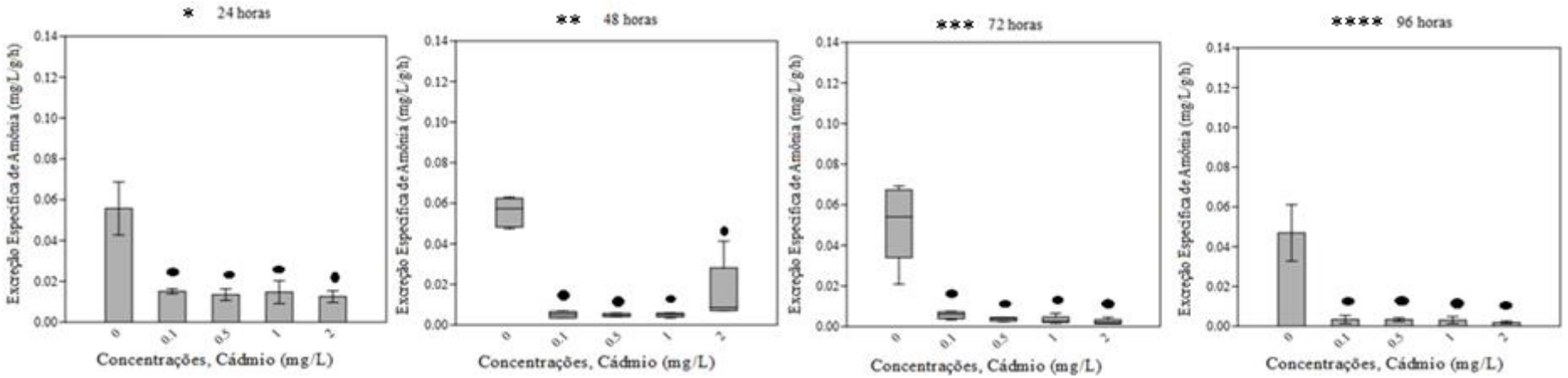


Figura 20* Excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 24 horas de exposição em cádmio (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA, e seguido pelo teste de Tukey $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 20** Box plot para a excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 48 horas de exposição em cádmio (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis e seguido pelo teste de Dunn´s, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 20*** Box plot para excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 72 horas de exposição em cádmio (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis e seguido pelo teste de Dunn´s, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 20**** Excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 96 horas de exposição em cádmio (mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA, e seguido pelo teste de Tukey $p < 0,05$ comparado ao controle). ● indica diferença estatística em relação ao controle, Barras respectivos desvio padrão.

2.3.3. Exposição ao Cádmio + Grafeno

2.3.3.1. Consumo específico de oxigênio

Os resultados referentes ao consumo específico de oxigênio dos grupos expostos a concentrações de Cd + GO (1 mg/L) por 24 horas indicaram um aumento proporcional ao incremento das concentrações (Fig. 21*). Nas concentrações mais baixas (0,1 e 0,5 mg/L de Cd + 1 mg/L de GO), observou-se um aumento de 62% e 65%, enquanto nas concentrações mais elevadas (1 e 2 mg/L de Cd + 1 mg/L de GO), o consumo aumentou em 135% e 217%, respectivamente. (Fig. 21**), onde foram também encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o controle e esses tratamentos (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$). Após 48 horas de exposição, houve uma diminuição no consumo específico de oxigênio quando comparados os grupos de tratamento com o controle, sendo esta redução inversamente proporcional ao aumento das concentrações. Não foram detectadas diferenças significativas nas três concentrações mais baixas, mas a concentração mais alta (2 mg/L de Cd + 1 mg/L de GO. Diferença estatisticamente significativa foi confirmada entre o controle e a concentração mais alta (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$). Os resultados indicaram que após 72 horas de exposição, para a menor concentração (0,1 mg/L de Cd + 1 mg/L de GO), não houve diferença significativa em relação ao controle, com uma diminuição de consumo de apenas 22% (Fig. 21***). No entanto, nas concentrações mais elevadas (0,5, 1 e 2 mg/L de Cd + 1 mg/L de GO), observou-se uma diminuição acentuada no consumo de oxigênio, de 54%, 54% e 53%, respectivamente. O teste paramétrico de Tukey ($p<0,05$) revelou diferença estatisticamente significativa entre o controle e essas três concentrações mais altas. Por fim, após 96 horas de exposição ao Cd + GO, todos os tratamentos apresentaram uma redução significativa no consumo de oxigênio em comparação ao controle, com quedas superiores a 50% (Fig. 21****). As reduções percentuais, da menor para a maior concentração, foram de 53%, 55%, 58% e 67%, indicando resposta no metabolismo de rotina dos peixes. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas para todas as concentrações testadas em relação ao controle (ANOVA, Tukey's, $p<0,05$).

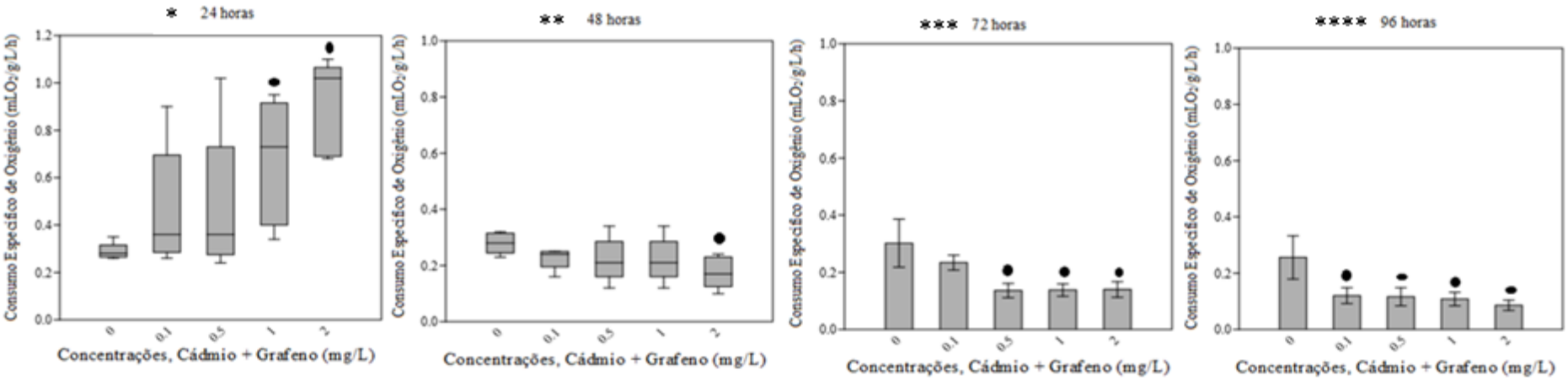


Figura 21* Box plot para o consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 24 horas de exposição em cádmio + grafeno (1 mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis e seguido pelo teste de Dunn´s, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 21** Box plot para o consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 24 horas de exposição em cádmio + grafeno (1 mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como mediana (Kruskal-Wallis e seguido pelo teste de Dunn´s, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 21*** Consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 96 horas de exposição em cádmio + grafeno (1 mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA e seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 21**** Consumo específico de oxigênio para *Geophagus brasiliensis* após 96 horas de exposição em cádmio + grafeno (1 mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA e seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ comparado ao controle). ● indica diferença estatística em relação ao controle, Barras respectivos desvio padrão.

2.3.3.2. Excreção específica de amônia

Para a excreção específica de amônia após 24 horas de exposição, observou-se que o metabolismo dos peixes foi significativamente impactado em todos os grupos experimentais (Fig. 22*). Comparações com o grupo controle mostraram diferenças substanciais em todos os tratamentos, com a diminuição da excreção de amônia sendo mais acentuada na concentração de 0,1 mg/L, onde os percentuais de redução foram de 87%, 82%, 81% e 81% para as concentrações de 0,1, 0,5, 1 e 2 mg/L de Cd + 1 mg/L de GO, respectivamente. O teste de Tukey ($p<0,05$) confirmou diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle para todas as concentrações testadas. Após 48 horas de exposição, verificou-se uma diminuição significativa na excreção específica de amônia, inversamente proporcional ao aumento das concentrações (Fig. 22**). Os resultados indicaram uma redução superior a 90% em todos os tratamentos, com a maior concentração (2 mg/L) alcançando uma diminuição de até 97%. com diferenças estatísticas significativas entre o controle e todas as concentrações testadas (ANOVA, Tukey's, $p<0,05$). No período de 72 horas, as concentrações de Cd + GO continuaram a afetar significativamente o metabolismo dos peixes, resultando em reduções progressivas na excreção de amônia (Fig. 22***). As reduções foram de 92%, 97%, 97% e 98% para as concentrações de 0,1, 0,5, 1 e 2 mg/L, respectivamente. Novamente, as diferenças estatísticas em relação ao controle foram confirmadas para todas as concentrações testadas (ANOVA, Tukey's, $p<0,05$).

Finalmente, após 96 horas de exposição, todos os grupos apresentaram uma significativa diminuição na excreção de amônia em comparação com o grupo controle (Fig. 22****). A redução na excreção foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações, com percentuais superiores a 95% em todos os tratamentos, sugerindo uma diminuição expressiva na atividade metabólica dos peixes. O teste de Tukey ($p<0,05$) confirmou diferenças estatisticamente significativas entre o controle e todos os grupos tratados.

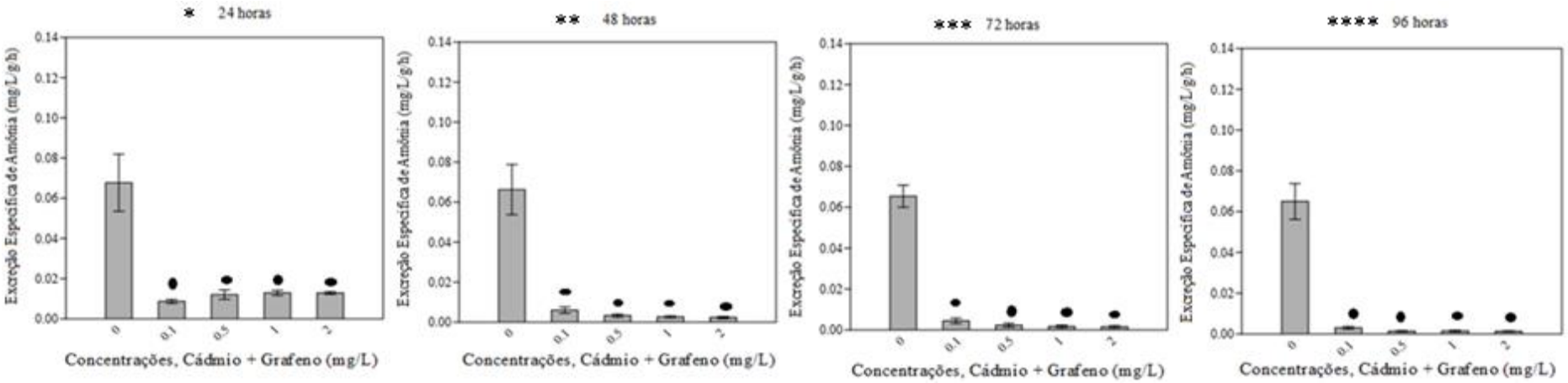


Figura 22* Excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 96 horas de exposição em cádmio + grafeno (1 mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA, e seguido pelo teste de Tukey $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 22** Excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 96 horas de exposição em cádmio + grafeno (1 mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA, e seguido pelo teste de Tukey $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 22*** Excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 96 horas de exposição em cádmio + grafeno (1 mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA, e seguido pelo teste de Tukey $p < 0,05$ comparado ao controle). Figura 22**** Excreção específica de amônia para *Geophagus brasiliensis* após 96 horas de exposição em cádmio + grafeno (1 mg/L). Os experimentos conduzidos em n=5 e os resultados apresentados como média ± desvio padrão (One-way-ANOVA, e seguido pelo teste de Tukey $p < 0,05$ comparado ao controle). ● indica diferença estatística em relação ao controle, Barras respectivos desvio padrão.

Os efeitos da exposição combinada entre Cd + GO, em relação ao consumo específico de oxigênio, ao compararmos os efeitos do GO, Cd e Cd + GO nos mesmos períodos de exposição para cada grupo, os resultados mostraram que em 24 horas para o grupo exposto somente em Cd, apenas a concentração mais alta (2 mg/L) afetou a taxa metabólica dos indivíduos, cujos mesmo atingiram um aumento de consumo de 53%, e para os espécimes exposto em Cd + GO (1 mg/L), verificou-se aumento acentuado do consumo das concentrações mais altas (1 e 2 mg/L + 1 mg/L) na ordem dos 135% e 217% (Fig. 23). No período de 48 horas, não houve diferença estatística significativas para os indivíduos expostos em Cd, mas sim para os postos em exposição combinada, na concentração mais alta, com diminuição de 35% do consumo e com diferença estatística significativa, quando comparado cada grupo ao controle (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$).

Em 72 horas, apesar do aumento do consumo em 50% na maior concentração para o grupo exposto em Cd, o teste estatístico (Kruskal-Wallis, $p>0,05$) demostrou não houver diferença significativas dos grupos em relação controle, mas para os grupos exposto em Cd + GO, prevaleceu a tendência de diminuição de consumo, sobre tudo nas três concentrações mais altas (0,5, 1 e 2 mg/L + 1 mg/L), com diminuição de 54%, 54% e 53%. O mesmo aconteceu com os espécimes colocados tanto em exposição única, como na coexposição no tempo de 96 horas, cujos resultados demonstraram tendência de diminuição consumo em todos tratamentos, que foi proporcional ao aumento das concentrações, onde o teste estatístico (ANOVA, Tukey's, $p<0,05$) destacou a diferença significativa entre cada grupo em relação ao controle, e sugere-se que isto tenha afetado o metabolismo de rotina dos peixes (Tabela 1).

Tabela 1. Variação do consumo específico de oxigênio e comparação entre exposição única e combinada, com destaque ao percentual de aumento e diminuição de consumo para cada grupo em comparação ao controle.

Consumo								
GO								
Concentrações (mg/L)	*Tempo (horas)*							
	24 h	**%**	***48 h***	**%**	***72 h***	**%**	***96 h***	**%**
Controle	0,35 ± 0,15	(100)	0,30 ± 0,26	(100)	0,32 ± 0,21	(100)	0,28 ± 0,32	(100)
1	0,31 ± 0,13	(- 11)	0,40 ± 0,15	(- 2)	0,41 ± 0,15	(+ 28)	0,24 ± 0,17	(- 16)
2,5	0,28 ± 0,08	(- 20)	0,31 ± 0,05	(- 12)	0,30 ± 0,10	(- 3)	0,24 ± 0,09	(- 18)
5	0,35 ± 0,13	(00)	0,33 ± 0,62	(- 13)	0,33 ± 0,05	(+ 3)	0,45 ± 0,13	(+ 55)
10	0,33 ± 0,06	(- 7)	0,35 ± 0,15	(- 17)	0,36 ± 0,66	(+ 12)	0,52 ± 0,54	(+ 83*)
Cd								
Controle	0,30 ± 0,05	(100)	0,16 ± 0,06	(100)	0,29 ± 0,03	(100)	0,35 ± 0,12	(100)
0,1	0,29 ± 0,07	(- 1)	1,04 ± 0,63	(+ 65)	0,47 ± 0,53	(- 2)	0,41 ± 0,45	(- 35*)
0,5	0,42 ± 0,41	(+ 43)	0,40 ± 0,29	(+ 46)	0,30 ± 0,14	(+ 10)	0,24 ± 0,13	(- 47*)
1	0,43 ± 0,13	(+ 44)	0,40 ± 0,29	(+ 55)	0,22 ± 0,12	(+ 21)	0,31 ± 0,09	(- 43*)
2	0,45 ± 0,19	(+ 53*)	0,43 ± 0,18	(+ 37)	0,44 ± 0,14	(+ 50)	0,52 ± 0,04	(- 56*)
Cd + GO (1 mg/L)								
Controle	0,27 ± 0,01	(100)	0,38 ± 0,24	(100)	0,28 ± 0,09	(100)	0,23 ± 0,04	(100)
0,1	0,46 ± 0,26	(+ 62)	0,23 ± 0,04	(- 19)	0,19 ± 0,11	(- 22)	0,06 ± 0,07	(- 53*)
0,5	0,47 ± 0,31	(+ 65)	0,22 ± 0,08	(- 22)	0,14 ± 0,03	(- 54*)	0,14 ± 0,04	(- 55*)
1	0,67 ± 0,26	(+ 135*)	0,22 ± 0,08	(- 22)	0,17 ± 0,06	(- 54*)	0,19 ± 0,00	(- 58*)
2	0,76 ± 0,40	(+ 217*)	0,37 ± 0,45	(- 35*)	0,18 ± 0,04	(- 53*)	0,19 ± 0,01	(- 67*)

* Diferença estatistica significativa em comparação ao grupo controle.

- Testes estatisticos utilizados: [(One-way-ANOVA, Tukey, $p < 0,05$) e (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$)].

(100) Indica o Controle.

(+) Indica o valor percentual do aumento do consumo e da excreção em comparação ao grupo controle.

(-) Indica o valor percentual da redução ou diminuição do consumo e da excreção em comparação ao grupo controle.

Para a excreção específica da amônia, ao compararmos os grupos da exposição única com os da coexposição nas concentrações e períodos testados, em relação os grupos controles, os resultados demostraram uma clara tendência de diminuição de excreção que foi proporcional ao aumento das concentrações em todos os tratamentos em relação a cada controle, uma vez que tanto na exposição única como na exposição combinada, os testes estatísticos (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$) e (ANOVA, Tukey's, $p<0,05$) demostraram diferenças significativas, o que sugeriu claramente que todas as concentrações e tempo exposição tenham afetado o metabolismo dos peixes em relação a excreção da amônia. Onde na exposição única, por exemplo, a diminuição mínima foi de 72% no período de 48 horas e a máxima foi de 96% nos grupos expostos por 72 e 96 horas e nas concentrações mais alta (2 mg/L), e na coexposição, 81% foi percentual mais baixo no período de 24 horas e 98% foi o mais alto, nos períodos de 72 e 96 horas nas maiores concentrações respectivamente (2 mg/L de Cd + 1 mg/L de GO) (Tabela 2).

Tabela 2. Variação da excreção específica da amônia e comparação entre exposição única e combinada, com destaque ao percentual de aumento e diminuição de excreção para cada grupo em comparação ao controle.

Excreção								
GO								
Concentrações (mg/L)	*Tempo (horas)*							
	24 h	**%**	***48 h***	**%**	***72 h***	**%**	***96 h***	**%**
Controle	0,0604 ± 0,0164	(100)	0,0633 ± 0,0258	(100)	0,0729 ± 0,0360	(100)	0,0418 ± 0,0155	(100)
1	0,0503 ± 0,0294	(- 17)	0,0471 ± 0,0324	(- 46)	0,0733 ± 0,0361	(- 61*)	0,0238 ± 0,0152	(- 59*)
2,5	0,0768 ± 0,0222	(+ 27)	0,0117± 0,0052	(- 79*)	0,0195 ± 0,0097	(- 66*)	0,0261 ± 0,0187	(- 66*)
5	0,0902 ± 0,0270	(+ 49)	0,1002 ± 0,0484	(- 67*)	0,0496 ± 0,0270	(- 72*)	0,0156 ± 0,0085	(- 66*)
10	0,0987 ± 0,0333	(+ 63)	0,0462 ± 0,0332	(- 69*)	0,1444 ± 0,0896	(- 78*)	0,1821 ± 0,0531	(- 73*)
Cd								
Controle	0,0040 ± 0,0022	(100)	0,0406 ± 0,0713	(100)	0,0052 ± 0,0027	(100)	0,0057 ± 0,0036	(100)
0,1	0,0111 ± 0,0043	(- 73*)	0,0051 ± 0,0016	(- 91*)	0,0056 ± 0,0017	(- 89*)	0,0036 ± 0,0023	(- 93*)
0,5	0,0090 ± 0,0027	(- 76*)	0,0049 ± 0,0008	(- 91*)	0,0068 ± 0,0035	(- 93*)	0,0036 ± 0,0007	(- 93*)
1	0,0147 ± 0,0056	(- 74*)	0,0050 ± 0,0010	(- 91*)	0,0141 ± 0,0046	(- 94*)	0,0049 ± 0,0024	(- 93*)
2	0,0125 ± 0,0029	(- 78*)	0,0098 ± 0,0034	(- 72*)	0,0229 ± 0,0068	(- 96*)	0,0049 ± 0,0006	(- 96*)
Cd + GO (1 mg/L)								
Controle	0,0084 ± 0,0010	(100)	0,0102 ± 0,0011	(100)	0,0087 ± 0,0034	(100)	0,0069 ± 0,0035	(100)
0,1	0,0079 ± 0,0009	(- 87*)	0,0077 ± 0,0020	(- 91*)	0,0044 ± 0,0015	(- 92*)	0,0063 ± 0,0034	(- 95*)
0,5	0,0112 ± 0,0028	(- 82*)	0,0034 ± 0,0008	(- 95*)	0,0048 ± 0,0039	(- 97*)	0,0065 ± 0,0038	(- 98*)
1	0,0083 ± 0,0046	(- 81*)	0,0043 ± 0,0007	(- 96*)	0,0036 ± 0,0007	(- 97*)	0,0047 ± 0,0018	(- 98*)
2	0,0082 ± 0,0038	(- 81*)	0,0047 ± 0,0022	(- 97*)	0,0063 ± 0,0023	(- 98*)	0,0158 ± 0,0036	(- 98*)

* Diferença estatistica significativa em comparação ao grupo controle.

- Testes estatisticos utilizados: [(One-way-ANOVA, Tukey, $p < 0,05$) e (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$)].

(100) Indica o Controle.

(+) Indica o valor percentual do aumento do consumo e da excreção em comparação ao grupo controle.

(-) Indica o valor percentual da redução ou diminuição do consumo e da excreção em comparação ao grupo controle.

Tanto em exposições únicas de GO e Cd, e em exposição combinada de Cd + GO, ao compararmos o consumo específico de oxigênio para os grupos expostos em 1 mg/L de cada poluente, se observou que para GO durante os quatro períodos de exposição, não houve diferenças significativas de cada grupo em relação controle, e que para o Cd nessas concentrações, apenas os grupos expostos por 96 horas apresentaram diferença e, diminuição da taxa metabólica em até 43%. Na coexposição a intensidade foi maior em todos os períodos de exposição, sendo que notavelmente houve um aumento de 135% do consumo de oxigênio nas primeiras 24 horas e seguida uma diminuição de 22%, 54% e 58% nos períodos sequentes (48h, 72h e 96h) o que se presume ter afetado a taxa metabólica dos peixes. Nas mesmas proporções, para a excreção de amônia, apenas os grupos expostos em GO por 24h e 48 horas não apresentou diferenças significativas em relação ao controle, apesar uma ligeira baixa na excreção na ordem dos 17% e 46%, mas que nos tempos de exposição sequente para GO, Cd e em Cd + GO, os resultados demostraram que todos os grupos foram afetados, uma vez que a excreção diminuiu de forma muito acentuada, atingindo até 98% na exposição combina entre a nanopartícula e o elemento traço para o grupo exposto por maior tempo (96h)o que se presume ter alterado o metabolismo dos peixes em relação a excreção e amônia.

Referindo-se sobre os resultados dos efeitos da exposição combinada entre Cd + GO, em relação ao consumo específico de oxigênio, ao compararmos os efeitos do Cd e Cd + GO nos mesmos períodos de exposição para cada grupo, os resultados mostraram que em 24 horas para o grupo exposto somente em Cd, apenas a concentração mais alta (2 mg/L) afetou a taxa metabólica dos indivíduos, cujos mesmo atingiram um aumento de consumo de 53%, e para os espécimes exposto em Cd + GO (1 mg/L), verificou-se aumento acentuado do consumo das concentrações mais altas (1 e 2 mg/L + 1 mg/L) na ordem dos 135% e 217% (Fig. 25). No período de 48 horas, não houve diferença estatística significativas para os indivíduos expostos em Cd, mas sim para os postos em exposição combinada, na concentração mais alta, com diminuição de 35% do consumo e com diferença estatística significativa, quando comparado cada grupo ao controle (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$).

Em 72 horas, apesar do aumento do consumo em 50% na maior concentração para o grupo exposto em Cd, o teste estatístico (Kruskal-Wallis, $p>0,05$) demostrou não houver diferença significativas dos grupos em relação controle, mas para os grupos exposto em Cd + GO, prevaleceu a tendência de diminuição de consumo, sobretudo nas três concentrações mais altas (0,5, 1 e 2 mg/L + 1 mg/L), com diminuição de 54%, 54% e 53%. O mesmo

aconteceu com os espécimes colocados tanto em exposição única, como na coexposição no tempo de 96 horas, cujos resultados demonstraram tendência de diminuição consumo em todos os tratamentos, que foi proporcional ao aumento das concentrações, onde o teste estatístico (ANOVA, Tukey's, $p<0,05$) destacou a diferença significativa entre cada grupo em relação ao controle, e sugere-se que isto tenha afetado o metabolismo de rotina dos peixes (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação do comportamento do consumo de oxigênio e da excreção da amônia na concentração de 1 mg/L entre as exposições únicas e combinadas.

Consumo

Tempo (horas)	GO Concentrações (mg/L)					Cd Concentrações (mg/L)					Cd + GO (1 mg/L) Concentrações (mg/L)				
	0	**1**	2,5	5	10	0	0,1	0,5	**1**	2	0	0,1	0,5	**1**	2
		± %					± %					± %			
24	100%	- 11	- 20	0	- 7	100%	- 1	+ 43	+ 44	+ 53*	100%	+ 62	+ 65	**+ 135***	+ 217*
48		- 2	- 12	- 13	- 17		+ 65	+ 46	+ 55	+ 37		- 19	- 22	- 22	- 35*
72		+ 28	- 3	+ 3	+ 12		- 2	+ 10	+ 21	+ 50		- 22	- 54*	**- 54***	- 53*
96		- 16	- 18	+ 55	+ 83*		- 35*	- 47*	**- 43***	- 56*		- 53*	- 55*	**- 58***	- 67*

Excreção

Tempo (horas)	GO Concentrações (mg/L)					Cd Concentrações (mg/L)					Cd + GO (1 mg/L) Concentrações (mg/L)				
	0	**1**	2,5	5	10	0	0,1	0,5	**1**	2	0	0,1	0,5	**1**	2
		± %					± %					± %			
24	100%	- 17	+ 27	+ 49	+ 63	100%	- 73*	- 76*	**- 74***	- 78*	100%	- 87*	- 82*	**- 81***	- 81*
48		- 46	- 79*	- 67*	- 69*		- 91*	- 91*	**- 91***	- 72*		- 91*	- 95*	**- 96***	- 97*
72		**- 61***	- 66*	- 72*	- 78*		- 89*	- 93*	**- 94***	- 96*		- 92*	- 97*	**- 97***	- 98*
96		**- 59***	- 66*	- 66*	- 73*		- 93*	- 93*	**- 93***	- 96*		- 95*	- 98*	**- 98***	- 98*

* Diferença estatistica significativa em comparação ao grupo controle.

- Testes estatisticos utilizados: [(One-way-ANOVA, Tukey, $p < 0,05$) e (Kruskal-Wallis, Dunn's, $p<0,05$)].

100% - Indica o Controle.

± % Mais ou menos o valor porcentual de aumento ou diminuição do consumo e de excreção de cada grupo em comparação ao controle.

2.4. Discussão

A maior sensibilidade observada em peixes juvenis é frequentemente atribuída à maior alocação de recursos energéticos voltados para o crescimento e o desenvolvimento sexual. Este fenômeno é bem documentado na literatura científica, uma vez que a fase juvenil representa um período crítico para a formação e a maturação dos sistemas fisiológicos (FERRO; FERRARI; EISSA, 2021). Durante essa fase, a taxa metabólica é amplamente influenciada, pois as funções fisiológicas, incluindo a respiração e a excreção, são particularmente suscetíveis a alterações induzidas por estressores ambientais, como poluentes químicos (PANNETIER et al., 2019). Em função dessa vulnerabilidade, o uso de peixes em estágio juvenil foi estrategicamente escolhido para este estudo, visando uma avaliação mais representativa dos efeitos ecotóxicos.

No presente estudo, os juvenis de *Geophagus brasiliensis* em fase de crescimento e desenvolvimento demonstraram respostas fisiológicas significativas, evidenciadas por alterações nos indicadores de metabolismo, como o consumo de oxigênio e a excreção de amônia. Essas respostas indicam que os juvenis estão em uma fase crítica de adaptação, onde suas funções metabólicas são particularmente sensíveis a interferências externas. A exposição dos espécimes a poluentes, incluindo nanomateriais à base de carbono, como o grafeno (GO), e metais pesados, como o cádmio (Cd), permitiu uma avaliação mais precisa dos impactos desses contaminantes no metabolismo de rotina dos organismos analisados. A análise das mudanças observadas nos parâmetros fisiológicos fornece informações valiosas sobre a ecotoxicologia desses compostos e suas implicações na saúde e no desenvolvimento de populações de peixes. Além disso, o entendimento dessas interações pode contribuir para a formulação de estratégias de conservação e manejo ambiental mais eficazes.

A taxa metabólica de organismos aquáticos representa um potencial bioindicador da liberação de nanomateriais no meio ambiente, incluindo compostos como o grafeno. Este parâmetro fisiológico é particularmente sensível a variações induzidas por poluentes e pode fornecer informações valiosas sobre o estado de saúde dos ecossistemas aquáticos (DE MARCHI et al., 2018). Embora já existam diversas publicações que investigam os efeitos metabólicos de nanomateriais em peixes, a literatura ainda apresenta uma lacuna significativa em relação ao entendimento dos impactos de exposições prolongadas, especialmente além do período de 24 horas (KHOSRAVI-KATULI et al., 2017; DE MARCHI et al., 2018). Essa

carência de dados é preocupante, pois muitos dos efeitos adversos dos nanomateriais podem ser mais pronunciados em exposições prolongadas, refletindo-se em alterações metabólicas que comprometem a sobrevivência e a reprodução das espécies.

A resposta biológica dos organismos aquáticos à exposição a nanomateriais é influenciada por uma série de fatores, incluindo as propriedades físico-químicas dos nanomateriais, a rota de exposição (por exemplo, via água, ingestão ou contato direto) e as características do organismo modelo utilizado nos estudos (ARAÚJO et al., 2024). Enquanto vários estudos têm documentado os efeitos tóxicos das nanopartículas de carbono, como as nanopartículas de grafeno, o conhecimento atual ainda é considerado insuficiente para avaliar de maneira abrangente os riscos associados a esses materiais emergentes (GHOSH, 2019). Em virtude disso, é essencial que pesquisas futuras sejam conduzidas para explorar não apenas a toxicidade aguda, mas também os efeitos crônicos e cumulativos, bem como os mecanismos subjacentes a essas respostas biológicas. Esse entendimento é fundamental para a formulação de diretrizes de segurança e regulamentação para o uso de nanomateriais, assegurando que os impactos ambientais sejam minimizados e a saúde dos ecossistemas aquáticos seja preservada

2.4.1. Óxido de Grafeno

A introdução de óxido de grafeno (GO) em ecossistemas aquáticos é uma preocupação crescente, uma vez que a sua presença se torna cada vez mais comum devido ao aumento das atividades industriais e à liberação de poluentes. Este nanomaterial tem o potencial de criar riscos significativos para organismos aquáticos. A literatura indica que o GO pode ser classificado como um nanomaterial antimicrobiano, dado que suas bordas afiadas têm a capacidade de induzir estresse nas membranas celulares, resultando em danos físicos que podem comprometer a integridade celular bacteriana. A liberação do conteúdo intracelular em organismos como bactérias pode levar à morte celular, além de causar estresse oxidativo, mesmo na ausência de ânions superóxido (MA et al., 2016). Esse fenômeno tem implicações diretas para a saúde dos ecossistemas aquáticos, pois afeta não apenas os organismos individuais, mas também a microbiota, que desempenha um papel fundamental na dinâmica da cadeia trófica.

A avaliação dos efeitos tóxicos de nanomateriais à base de carbono (NMC) apresenta desafios significativos devido à diversidade de características que influenciam sua reatividade

no ambiente aquático. Aspectos como estrutura, distribuição de tamanho, área de superfície, química de superfície, carga, estado de aglomeração e pureza afetam consideravelmente o comportamento e a toxicidade desses materiais (PÉREZ, FARRÉ; BARCELÓ, 2009). A literatura atual sobre este tópico é fragmentária e, frequentemente, carece de uma análise crítica. Assim, é imperativo realizar estudos mais aprofundados que abordem os impactos e padrões de regulamentação associados ao uso de NMC em ambientes aquáticos.

As interações entre nanomateriais e organismos aquáticos podem ser classificadas como externas, como a adsorção na pele ou exoesqueleto, ou internas, via ingestão. Ambas as formas de interação têm o potencial de induzir distúrbios fisiológicos (MESARIČ et al., 2015). Por exemplo, a adsorção de nanopartículas (NPs) nas guelras implica em processos de interação no microambiente que envolvem a camada de muco e outras substâncias. A captação de NPs pelas células epiteliais tende a ocorrer mais frequentemente por mecanismos vesiculares, como a endocitose, do que por meio de transporte ativo ou difusão direta através das membranas celulares (HANDY et al. 2008).

Os efeitos do GO sobre a taxa metabólica do peixe *Geophagus iporangensis* foram significativos. A exposição a 4,0 mg/L resultou em uma redução de 33,3% na taxa metabólica, com diferenças estatisticamente significativas em comparação ao grupo controle nas concentrações de 2,0 e 4,0 mg/L (MEDEIROS et al., 2020). Em nosso estudo com *G. brasiliensis*, observou-se uma tendência semelhante, com reduções no consumo específico de oxigênio de 11%, 20% e 7% nas concentrações de 1, 2,5 e 10 mg/L, respectivamente, corroborando os resultados de MEDEIROS et al. (2020). Além disso, FERNANDES et al. (2018) relataram que a exposição ao GO causou edema e hiperplasia nas brânquias de peixe-zebra (paulistinha), *Danio rerio*, condições que podem impactar negativamente a eficiência nas trocas respiratórias. Segundo BARBIERI et al. (2019), a perda da integridade branquial devido à exposição ao GO pode ser uma explicação para a diminuição da taxa metabólica observada neste estudo.

O GO, ao ser introduzido no ambiente aquático, pode ser reconhecido como um contaminante químico tóxico e possui potencial para induzir genotoxicidade em peixes. Os efeitos nocivos tendem a ser exacerbados com exposições prolongadas a nanomateriais (MA et al., 2016). Embora a toxicidade possa ser detectada em experimentos de curta duração e em altas concentrações, ela é fortemente influenciada pelo tipo de organismo, pelo tempo de

exposição e pelos métodos de preparação do NMC (FREIXA et al., 2018). Portanto, a necessidade de protocolos padronizados de avaliação de riscos é clara, devendo considerar os diversos fatores que influenciam a toxicidade de nanomateriais em ambientes aquáticos.

O GO é um NM de carbono (NMC) que apresenta características de fácil produção e baixo custo, além de propriedades antimicrobianas promissoras (LEE et al., 2022). Estudos como o de CHEN et al. (2016) demonstraram que a exposição ao GO pode induzir estresse oxidativo e toxicidade imunológica em peixes-zebra adultos, onde concentrações de 2, 10 e 20 mg/L resultaram em alterações nas atividades enzimáticas antioxidantes nas células branquiais, indicando um efeito de estresse oxidativo. As brânquias atuam como a primeira linha de defesa dos organismos contra poluentes aquáticos, ativando rapidamente suas respostas em condições adversas. O equilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a eliminação dessas espécies por meio de enzimas antioxidantes é fundamental para a homeostase celular (CHEN et al. 2016b).

A interação entre poluentes e organismos aquáticos é fortemente influenciada pelas propriedades químicas de cada micropoluente. Os NMC atuam como sorventes, alterando a toxicidade original dos contaminantes (FREIXA et al., 2018). Os autores enfatizam a necessidade de investigar os efeitos interativos dos NMC com outros micropoluentes em concentrações ambientalmente relevantes, bem como suas implicações nas comunidades biológicas a longo prazo. Essa análise é crucial, considerando a persistência do acúmulo de GO em ambientes aquáticos, o que exige uma investigação mais robusta sobre as implicações e os impactos dos nanomateriais em organismos aquáticos.

Neste estudo, após a exposição de *G. brasiliensis* ao GO por 48 horas, observou-se uma leve redução no consumo específico de oxigênio de 2%, 12%, 13% e 17% nas concentrações de 1, 2,5, 5 e 10 mg/L, respectivamente, com a redução diretamente proporcional ao aumento das concentrações em comparação ao grupo controle. Esses resultados sugerem que o metabolismo dos peixes não foi significativamente afetado, possivelmente devido às concentrações relativamente baixas em comparação aos estudos mencionados anteriormente. Em investigações anteriores, SOUZA et al. (2019) relataram que a exposição ao GO por 48 horas resultou em danos ao metabolismo antioxidante em *Danio rerio*, que não se recuperaram completamente após 168 horas em água limpa, mesmo com a ativação de mecanismos de recuperação, o que aponta para efeitos tóxicos mais sutis. Um

estudo semelhante com o peixe *Anabas testudineus* corroborou que o GO provoca estresse oxidativo em células e mitocôndrias, reafirmando seus efeitos adversos.

As questões relativas ao uso de diferentes métodos de dispersão para preparar soluções de teste em ensaios de ecotoxicidade precisam ser abordadas (PÉREZ, FARRÉ; BARCELÓ, 2009). Os autores ressaltam a importância da caracterização química dos materiais de teste e a necessidade de cautela em relação aos dados toxicológicos preliminares. As concentrações sugerem que os NMC não são agudamente tóxicos, mas advertências sobre potenciais efeitos subletais e sinérgicos com outros poluentes são fundamentais para uma avaliação abrangente dos riscos. Esses fatores podem ser determinantes na análise da recuperação de organismos após exposições prolongadas.

Embora os nanomateriais tenham aplicações promissoras para a remoção de poluentes do ambiente (WU et al., 2023), também podem causar toxicidade em organismos aquáticos, mesmo na ausência de poluentes (BARBIERI et al., 2018), ou em situações de coexposição em ambientes não poluídos (ALVES et al., 2022). O GO foi identificado como um contaminante químico capaz de induzir genotoxicidade em tilápias, representando um risco significativo para ecossistemas aquáticos (MA et al., 2016). Os resultados deste estudo estão em conformidade com essas observações, onde o GO demonstrou efeitos tóxicos, especialmente nas concentrações mais altas (10 mg/L) e com tempos de exposição prolongados (96 horas). Nesses casos, houve um impacto significativo na taxa metabólica dos peixes, evidenciado por diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle. Além disso, DASMAHAPATRA, DASARI e TCHOUNWOU (2018) relataram que o GO pode induzir mortalidade embrionária e atrasos na eclosão de peixes-zebra (paulistinha), com embriões expostos a 30 μg/L ou mais apresentando mortalidade em até duas horas, enquanto concentrações menores (5 a 25 μg/L) levaram a edemas pericárdico e do saco vitelino.

A amônia, um produto final do catabolismo proteico, é armazenada em altas concentrações nos peixes e, se não for excretada adequadamente, pode ser tóxica. Os mecanismos de excreção de amônia variam entre espécies de peixes e ambientes, envolvendo principalmente a difusão passiva de NH_3, cuja eficiência pode ser influenciada pela química da água nas superfícies das guelras (MARCHAND, 2022). O GO, por sua natureza única, pode modificar as interações químicas e aumentar a concentração de amônia no ambiente

aquático. Assim, além dos efeitos diretos da toxicidade do GO, é crucial considerar as implicações que o mesmo pode ter sobre a excreção de resíduos nitrogenados por organismos aquáticos, uma vez que pode provocar estresse fisiológico adicional e comprometer a saúde dos ecossistemas aquáticos.

O GO representa um novo desafio para a ecotoxicologia aquática, pois seu comportamento e efeitos em organismos aquáticos são complexos e multifacetados. A pesquisa deve se concentrar na padronização de metodologias para a avaliação de riscos associados aos NMC, considerando não apenas a toxicidade aguda, mas também os efeitos subletais e sinérgicos que podem comprometer a saúde dos ecossistemas aquáticos. É imperativo que futuras investigações explorem a relação entre as características do GO, as condições ambientais e os efeitos sobre a biota aquática, visando uma compreensão mais robusta e um gerenciamento eficaz de contaminantes emergentes.

2.4.2. Cádmio

A contaminação por metais pesados, como o cádmio (Cd), tem se tornado uma preocupação crescente devido aos seus efeitos adversos sobre a biota aquática. Estudos demonstram que a exposição ao cádmio não apenas compromete a saúde dos peixes, mas também interfere em processos fisiológicos cruciais, como a atividade da enzima Na^+, K^+-ATPase nas brânquias (DAMATO e BARBIERI, 2012, MEDEIROS et al., 2019). Esta enzima é essencial para a manutenção do equilíbrio osmótico e iônico, desempenhando um papel vital na sobrevivência dos peixes em ambientes aquáticos. Nesse contexto, a variação nas respostas fisiológicas e bioquímicas entre diferentes espécies expostas ao cádmio é um tema amplamente investigado.

A exposição ao cádmio (Cd) e seus efeitos na atividade da enzima Na^+, K^+-ATPase nas brânquias de diferentes espécies de peixes é um fenômeno bem documentado, revelando uma variação significativa nas respostas fisiológicas e bioquímicas em função da espécie e do órgão afetado (BENSON et al., 1988). GAGNEÂ et al. (1990) discutiram que a acumulação de Cd no epitélio branquial poderia ser atribuída ao sequestro do metal por metalotioneínas, que são proteínas de baixo peso molecular induzidas pela presença de cádmio intracelular. Essas metalotioneínas desempenham um papel crucial na detoxificação do metal, oferecendo uma forma de tolerância que permite a sobrevivência de peixes em ambientes com concentrações elevadas de cádmio. O estudo de BATTAGLINI et al. (1993) demonstrou

alterações histológicas e histoquímicas significativas no epitélio branquial de *Carassius auratus*, exposto a 10 mg/L de Cd por um período de 14 dias, ressaltando a severidade das lesões provocadas pela toxicidade desse metal. Além disso, RANDI et al. (1996) relataram mudanças drásticas na estrutura das brânquias de *Macropsobrycon uruguayanae* após 30 dias de exposição ao cádmio, evidenciando o impacto prolongado da toxicidade no tecido branquial.

Diversos autores, como KAMUNDE & WOOD (2004), CLEARWATER et al. (2005), HANDY et al. (2005), BARBIERI et al. (2010), SHAW & HANDY (2011), DAMATO & BARBIERI (2012) e DOI et al. (2012), também contribuíram para a compreensão dos efeitos adversos dos metais pesados em peixes, reforçando a conclusão de que o cádmio provoca danos significativos à saúde dos organismos aquáticos, especialmente em *G. brasiliensis*, conforme os dados obtidos neste estudo. Esses efeitos foram observados no metabolismo energético, levando em consideração tanto as concentrações quanto a duração da exposição.

A pesquisa de HUSSAN et al. (2016) identificou que o cádmio é altamente tóxico, com impactos profundos na respiração de *Labeo catla*, uma vez que as brânquias constituem o principal órgão respiratório e a eficiência respiratória é crucial para todas as vias metabólicas que dependem do suprimento de energia. Danos ao epitélio branquial, induzidos pela toxicidade do cádmio, resultam na redução da área de superfície respiratória, levando a um comprometimento na troca gasosa e, consequentemente, a desconfortos respiratórios.

JEZIERSKA e SARNOWSKI (2002) documentaram uma redução significativa no consumo de oxigênio por *Cyprinus carpio* em concentrações de cádmio de 0,2 mg/L após apenas uma hora de exposição. Essa forte diminuição na taxa de consumo de oxigênio pode ser atribuída à inibição da atividade metabólica ou à interrupção da morfologia histológica normal das brânquias, o que prejudica a difusão gasosa (KALELE & DHANDE, 2005). Em geral, os metais pesados provocam alterações na taxa de respiração dos peixes, sendo mais comum uma queda nas taxas de consumo de oxigênio (DEBOECK; DESMET; BLUST, 1995). Embora JEZIERSKA e SARNOWSKI (2002) tenham observado um leve aumento no consumo de oxigênio por *Cyprinus carpio* em 0,1 mg/L de Cd após uma hora de exposição, o mesmo não se repetiu em 0,2 mg/L, onde o consumo de oxigênio foi significativamente menor em comparação ao controle. HASSAN (2005) sugeriu que a redução do consumo de oxigênio em peixes sob estresse por metais é resultado do acúmulo desses elementos no

epitélio das brânquias, levando a lesões como necrose, espessamento e descolamento do epitélio respiratório. Além disso, os metais podem comprometer a função da superfície respiratória, diminuindo a área de superfície através da atrofia e fusão das lamelas secundárias (SHEREENA & LOGASWAMY, 2008), e aumentando a distância de difusão entre a água e o sangue, dificultando a absorção de oxigênio (AARDT & BOOYSEN, 2004). Esses efeitos foram evidentes em *G. brasiliensis*, onde a exposição ao cádmio resultou em um aumento acentuado do consumo de oxigênio em concentrações elevadas e períodos prolongados de exposição.

As brânquias, sendo as superfícies respiratórias dos peixes, representam o primeiro alvo da contaminação por metais pesados na água. Estudos anteriores associaram a morte de indivíduos expostos a concentrações letais de metais pesados à coagulação do muco nas brânquias, que aumenta a distância de difusão do oxigênio e resulta em morte por asfixia (SPICER & WEBER, 1991). Além das funções de troca gasosa, as brânquias são essenciais para o transporte de íons, equilíbrio ácido-base e excreção de metabólitos, desempenhando um papel fundamental na regulação fisiológica e metabólica (OLSON, 1991; EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005). Embora as brânquias sejam órgãos altamente plásticos capazes de se remodelar para reduzir a área superficial e, assim, diminuir o contato com xenobióticos, essa adaptação pode resultar em perda de eficiência respiratória (NILSSON; DYMOWSKA; STECYK, 2012). A redução na taxa de respiração pode ser um mecanismo fisiológico importante para mitigar a absorção de xenobióticos, evidenciando que a captação de contaminantes está diretamente relacionada ao consumo de oxigênio (YANG et al., 2000). Os resultados obtidos neste estudo indicam que as concentrações de cádmio a que *G. brasiliensis* foi submetido representaram uma fonte de estresse, afetando as enzimas branquiais e, consequentemente, perturbando o equilíbrio osmótico e iônico dos organismos. Esses achados são consistentes com os resultados de DE LA TORRE; SALIBIA; L. FERRARI (1999) em *Cyprinus carpio*. No presente estudo, tanto a taxa metabólica quanto a excreção de amônia dos peixes foram claramente afetadas, apresentando variações de acordo com a dose e o tempo de exposição, evidenciando um aumento e diminuição no consumo de oxigênio e uma redução total na excreção de amônia. Essa resposta sugere implicações ecológicas significativas, uma vez que a exposição ao cádmio limitou funções fisiológicas essenciais nos peixes.

A relação entre as constantes de taxa de absorção de contaminantes e o consumo de oxigênio em peixes é reconhecida independentemente da hidrofobicidade química e da espécie (YANG et al., 2000). As brânquias de peixes expostos a concentrações subletais de metais frequentemente demonstram alterações histológicas, como edema, hemorragia, hiperplasia, hipertrofia, necrose, enrolamento e fusão. Observou-se que tanto o consumo de oxigênio quanto as alterações histopatológicas eram dependentes da dose e do tempo de exposição. Um declínio na captação de oxigênio foi relatado em *Tilapia sparrmanii* após 96 horas de exposição a 10 mg/L de Cd (AARDT & BOOYSEN, 2004). A troca gasosa nas brânquias é um processo rápido, e a ingestão de toxinas por outras vias, como a alimentação, é geralmente considerada menos significativa (RANDALL et al., 1998) para organismos que respiram na água. Tais achados sugerem que a taxa de transferência de contaminantes pode ser estimada a partir da taxa de consumo de oxigênio dos peixes (YANG et al., 2000). O cádmio, um metal pesado tóxico e bioacumulativo, é amplamente reconhecido por causar danos irreversíveis ao sistema imunológico dos peixes, apresentando um risco significativo à saúde de organismos aquáticos (RUÍZ-HIDALGO et al., 2016, JIAXIN et al., 2020). Na presente investigação, que se concentrou na espécie *G. brasiliensis*, observou-se que a exposição ao cádmio em diferentes concentrações impactou negativamente o metabolismo dos peixes, alterando suas taxas metabólicas em comparação ao controle. Por exemplo, peixes de água doce *G. iporangensis* expostos a concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0 mg/L de cádmio mostraram uma redução significativa na taxa metabólica. HUSSAN et al. (2018) corroboraram essa tendência em *Labeo catla* exposto a Cd. Em contrapartida, o presente estudo indicou um aumento na taxa metabólica em concentrações elevadas.

Os metais pesados têm o potencial de se acumular ao longo da cadeia alimentar, representando uma ameaça à vida aquática (KELEPERTZIS, 2014), sendo o cádmio um dos metais biotóxicos que, mesmo em quantidades pequenas, pode impactar a saúde dos peixes e dos humanos que consomem esses organismos (KIM et al., 2007). É de suma importância que os responsáveis pela gestão dos recursos hídricos e dos ecossistemas aquáticos implementem monitoramento e controle rigorosos da poluição, considerando que a presença de cádmio e outros metais pesados pode comprometer a biodiversidade e a saúde ambiental. Portanto, a necessidade de ações efetivas na conservação dos ecossistemas aquáticos é premente, buscando mitigar a contaminação e preservar a qualidade da água, a fim de proteger a fauna aquática e a saúde humana.

2.4.3. Interação entre Cádmio e Óxido de Grafeno

Os experimentos de adsorção mostram que a dispersibilidade de GO em água muda notavelmente após a complexação de íons metálicos e, após a adsorção, a tendência de aglomeração e precipitação é observada. Excelente dispersibilidade de GO e forte tendência de precipitar abrem o caminho para remoção de metais pesados da solução aquosa. A aplicação potencial de GO em química analítica como um sorvente sólido para pré-concentração de elementos traço e na limpeza de poluição por íons de metais pesados resulta de suas capacidades máximas de adsorção que são muito maiores do que aquelas de qualquer um dos sorventes atualmente relatados (SITKO et al., 2013). Outros autores, observaram uma grande capacidade de adsorção de GO a Cd e Zn, com uma maior afinidade ao Cd do que ao Zn. O aumento observado na toxicidade de Cd e Zn pode ser devido à capacidade de adsorção de GO a esses elementos traços (De MELO et al., 2019). A adsorção é um dos processos mais importantes na interação de metais pesados e nanopartículas pré-existentes devido ao seu papel decisivo no comportamento ambiental e biodisponibilidade de contaminantes (DENG et al., 2017; CHEN et al., 2022).

Pesquisas sobre a exposição de peixes e outros organismos aquáticos a nanopartículas de GO, isoladamente ou em combinação com contaminantes metálicos, têm demonstrado que mesmo em concentrações ambientalmente relevantes, essas partículas podem representar riscos significativos à saúde dos organismos (JURGELĖNĖ et al., 2022). O metabolismo de rotina é um parâmetro essencial na avaliação da toxicidade em organismos aquáticos (DE MELO et al., 2019). Embora haja poucas investigações sobre a toxicidade conjunta de nanopartículas e contaminantes, o campo de estudo está em crescimento, e futuras pesquisas são necessárias para melhor compreender os riscos dessa coexposição (DENG et al., 2017).

Resultados de estudos recentes feitos por CHEN et al. (2022), em uma exposição combinada de GO + Cr, para embriões de peixe-zebra (paulistinha) *Danio rerio*, os autores demostraram que o GO promoveu a absorção de cromo (Cr) com múltiplos efeitos. Na presença de GO, o conteúdo de Cr em córions e embriões intra-córions foi aumentado em quatro vezes e 57% respectivamente, em comparação com a exposição única ao Cr^{6+}. Além disso, GO + Cr^{6+} aumentou as taxas de consumo de oxigênio e induziu estresse oxidativo mais sério e perturbou o metabolismo de aminoácidos. Essa realidade em comparação aos resultados do presente estudo entre a exposição única Cd, GO e a coexposição de Cd + GO, observou-se um ponto em comum, visto que na exposição combinada houve um aumento da

taxa metabólica acima dos 100%, nas concentrações mais altas (1 e 2 mg/L Cd + 1 mg/L GO, em 135% e 217%), tendo se registrado diferença significativa em relação ao controle e afetado a taxa metabólica dos peixes.

MEDEIROS et al. (2020) investigaram a exposição do peixe *G. iporangensis* a óxido de grafeno (OG) e cádmio (Cd) por 24 horas, observando uma redução da taxa metabólica de até 33% na concentração mais alta (4,0 mg/L de Cd + 1,0 mg/L de GO). Essa mistura de Cd com GO alterou as taxas metabólicas com a diminuição do consumo de oxigênio em proporção ao aumento das concentrações em 1 e 2 mg/L. Em contraste, no presente estudo, com *G. brasiliensis*, no mesmo período de exposição e nas mesmas concentrações foi observada, a alteração da taxa metabólica muito acentuada com o aumento do consumo em até 135% e 217%. Assim, pode-se atestar que a presença dos nanomateriais associados a outros xenobióticos altera a taxa metabólica revelando comprometimentos do sistema respiratório (MEDEIROS et al. 2020).

A amônia é o produto final do catabolismo proteico em peixes, e sua excreção e a quantidade liberada dependem do estado do animal, das condições ambientais e da espécie (RANDALL e WRIGHT, 1987). Portanto, o aumento do catabolismo proteico fornece energia extra e pode ser uma resposta adaptativa a situações estressantes (PRETTO et al., 2014). Estudos anteriores indicam que a exposição a elementos-traço (ETs), como o cádmio, pode causar danos respiratórios severos em peixes, especialmente nas brânquias, resultando em deficiência respiratória e osmorregulatória (FREIRE et al., 2003). A excreção elevada de amônia, resposta comum ao aumento do catabolismo de aminoácidos, é prejudicada em organismos expostos a concentrações letais de ETs, resultando em lesão branquial e desregulação da excreção de amônia (WU e CHEN, 2004). Este fato permite usar amônia como um biomarcador de atividade metabólica de peixes diante de diferentes poluentes (MEDEIROS et al., 2020). No presente estudo, a combinação de Cd + GO causou uma diminuição na excreção de amônia superior a 80% em todos os grupos expostos, evidenciando que a combinação desses poluentes afeta significativamente o metabolismo de rotina dos peixes.

O próprio GO pode não apresentar efeitos adversos severos, mas quando combinados com tóxicos ambientais (como oligoelementos), os efeitos ecotóxico podem ser intensificados (CAMPOS-GARCIA et al., 2015; DE MELO et al., 2019; MEDEIROS et al., 2020; CHEN et al., 2022). Esse fato vai de acordo os nossos resultados, uma vez que em comparação a

exposição única e combinada, por exemplo, após 48 horas de exposição a Cd e GO, observou-se uma redução do consumo específico de oxigênio em todas as concentrações, mas foi significativa na maior concentração atingindo os 35%, o que se presume ter interferido na taxa metabólica dos peixes, e a excreção de amônia, teve uma redução mais impactante e que foi inversamente proporcional ao aumento das concentrações, sendo que essa diminuição foi na ordem dos 92%, 97%, 97% 98%, a mais acentuada nas concentrações mais elevadas (2 mg/L de Cd + 1 mg/L de GO), em relação ao controle, sugerindo uma diminuição do metabolismo dos peixes. Outrossim, no presente estudo e resultados, se observou também um efeito mais intenso e severo, tanto na diminuição e aumento da taxa metabólica dependendo da concentração e tempo de exposição e uma diminuição geral e muito acentuada da taxa excreção de amônia na exposição combinada entre Cd + GO, atingindo os 98% de redução. Em comparação com a exposição do nanomaterial, a diminuição observada na excreção de amônia pode ser o reflexo de uma perda na capacidade de excretar, provavelmente devido a um efeito do xenobiótico sobre as células envolvidas em atividades excretórias (MEDEIROS et al., 2020), os autores obtiveram um resultado semelhante na exposição combinada entre GO + Zn para o peixe de água doce *G. iporangensis* no período de 24h em concentrações mais altas. BARBIERI et al. (2016), concluíram que os nanotubos de carbono de paredes múltiplas oxidados aumentaram a toxicidade aguda de chumbo em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*.

Outros estudos recentes também destacam a complexidade da toxicidade dos nanomateriais de carbono, especialmente quando combinados a contaminantes em vários organismos aquáticos. Por exemplo, em *Oreochromis niloticus*, a exposição ao carbofurano combinado com nanotubos de carbono reduziu o consumo de oxigênio (CAMPOS-GARCIA et al., 2015, CAMPOS-GARCIA et al., 2016). Em *Carassius auratus*, a exposição ao cádmio e nanotubos de carbono multicamadas causou estresse oxidativo severo (QU et al., 2014). Em *Daphnia magna* exposta a GO + Cu, houve um aumento no acúmulo de Cu e na toxicidade por estresse oxidativo, enquanto a mortalidade aguda não foi alterada (LIU et al., 2018). O comprometimento do metabolismo de *Palaemon pandaliformis* quando exposto a GO combinado com Cd ou Zn (DE MELO et al., 2019). Em microalgas, nanopartículas de GO aumentaram a toxicidade do Cd, enquanto o GO demonstrou uma resposta crescente conforme as concentrações de Cd aumentavam (ZHANG et al., 2020). Em todos os casos, os nanomateriais de carbono intensificaram os efeitos ecotóxico dos contaminantes. Esses resultados corroboram os achados do presente estudo, a coexposição de *G. brasiliensis* a Cd +

GO alterou significativamente o consumo de oxigênio (aumento e principalmente redução) e excreção de amônia (redução geral), com os peixes expostos às concentrações mais altas apresentando uma taxa metabólica visivelmente comprometida, indicando impacto significativo no metabolismo de rotina dos peixes.

Estudos futuros devem continuar investigando as interações entre nanopartículas de carbono e outros poluentes, uma vez que a toxicidade dos nanomateriais é complexa e dependente de muitos fatores, como o tipo de contaminante e as condições de exposição. Nosso estudo sugere que a coexposição ao Cd e GO afeta significativamente o metabolismo de rotina dos peixes, com implicações importantes para a avaliação dos riscos ecotoxicológicos associados a nanomateriais em ambientes aquáticos. Esforços de pesquisa são necessários na determinação analítica de NMC e uma necessidade de definir cenários de exposição. Pesquisas sobre o estabelecimento de estratégias e métodos apropriados de teste de ecotoxicidade devem primeiro definir condições realistas e então testar a ecotoxicidade sob essas condições. O destino e o comportamento dos NMs no ambiente aquático precisam ser considerados, assim como a influência nos processos de agregação e deposição de NMs, e possíveis mudanças na biodisponibilidade de outros tóxicos presentes no mesmo compartimento ambiental (CHEN et al., 2022). Associado aos nossos resultados e observações feitas em outros estudos, muitas são as pesquisas, que envolvem espécies de água doce, mesmos organismos, espécies, nanomateriais e elementos traços, mas sempre há diferenças e semelhanças. Portanto se faz necessária uma análise crítica profunda associada às estratégias e aos métodos padronizados para avaliação e teste de ecotoxicidade. Estudos adicionais sobre materiais bem caracterizados são, portanto, necessários para determinar a segurança dos NTC, bem como seu impacto ambiental.

Resultados de estudos feitos com nanomateriais a base de carbono, sugerem que exposições de organismos aquáticos a esses NMC podem representar um risco de bioacumulação, especialmente para copépodes filtradores (por exemplo, *D. magna*). BARBIERI et al., (2016). Mostraram que as alterações mais severas foram relacionadas aos nanotubos de carbono + Pb e concluíram que os nanotubos de carbono de paredes múltiplas oxidados aumentaram a toxicidade aguda de chumbo em tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*, e que GO adsorve metais pesados e atua como transportadores para seu transporte pode desempenhar um papel decisivo na promoção da bioacumulação de metais pesados. Por exemplo, GO atua como um transportador, aumentando a absorção de Cd em *Microcystis*

aeruginosa (TANG et al., 2015). Além do efeito portador, foi proposto que o GO poderia promover a bioacumulação de metais pesados por outras vias, por exemplo, destruindo a membrana plasmática (DENG et al., 2017; LIU Et al., 2016), aumentando a permeabilidade da membrana celular (LI et al., 2020) ou agindo como um canal iônico devido ao espaço intercamada do GO (GAO et al., 2019b; CHEN et al., 2022).

Embora não tenhamos testado a capacidade de natação após exposição, a inibição por exemplo da atividade de natação, demonstra uma implicação ecológica que de certa forma compromete a vida do organismo aquático, pois, pode tornar o animal fica vulnerável, aos predadores, ao forrageamento e as muitas outras ações fisiológicas indispensáveis para sua sobrevivência. Estudos adicionais sobre materiais bem caracterizados são, portanto, necessários para determinar a segurança dos NTC, bem como seu impacto ambiental. O cádmio é considerado um dos metais pesados mais tóxicos para organismos aquáticos devido à sua alta taxa de bioacumulação. A rica fonte de proteína de alta qualidade, repleta de vitaminas e ácidos graxos ômega-3 incentiva o ser humano a consumir peixes como uma importante fonte de alimento. Então, metais pesados acumulados nos tecidos dos peixes podem ser transferidos diretamente para o corpo humano podendo causar efeitos como aceleramento de várias doenças. Portanto, é necessário discutir as fontes de metais pesados e seus efeitos tóxicos na saúde dos peixes para fazer cumprir a lei e as legislações sobre sua proteção no ambiente aquático e também para saúde de vidas humanas (GARAI et al., 2021).

2.5. Conclusões e Perspectivas.

Métodos químicos e físicos de síntese de AgNPs foram seguidos ao longo de décadas, mas sua formação foi considerada cara e o uso de vários produtos químicos tóxicos para sua síntese torna a síntese biológica a opção mais preferida. Apesar disso, fontes bacterianas, fúngicas e de extratos vegetais podem ser usadas para síntese de AgNPs, esse tipo de formação é muito fácil, confiável e não tóxico por natureza. Diferentes métodos são sugeridos para síntese de AgNPs, o método de síntese biológica tem sido amplamente estudado devido à sua vantagem em controlar o tamanho e a morfologia das partículas de forma muito eficaz. As AgNPs sintetizadas a partir de meios biológicos estão mostrando melhor atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas comparativamente com a síntese química. Concentrando-se em fungos, esses são as fontes ideais na síntese de nanopartículas metálicas devido à sua capacidade de secretar grande quantidade de enzimas. No entanto, a abordagem de síntese verde para a síntese de nanopartículas de prata tem ganhado demanda no campo da nanotecnologia.

Estudos sobre avaliação de segurança de nanomateriais de grafeno continuam sendo realizados, mas ainda pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos dessas nanoprtículas e como no ambiente aquáticos, em diferentes organismos. É sabido que existem lacunas em relação ao conhecimento sobre efeitos de nanopartículas do GO no metabolismo de rotina dos peixes. Nossos resultados nos permite concluir que as nanopartículas de grafeno influenciaram de certa forma nas alterações (aumento e diminuição do consumo de oxigênio e excreção de amônia) do metabolismo de rotina, nas distintas concentrações e tempo de exposição em comparação ao grupo controle. Também sugerem que o GO teve um efeito tóxico, afetou o metabolismo e que os indicadores fisiológicos, consumo de oxigênio e excreção de amônia, confirmaram um padrão fundamental para avaliação dos distúrbios no metabolismo da espécie *G. brasiliensis* durante a exposição em diferentes concentrações de nanopartículas com bases de grafeno em ambientes aquáticos

Os ambientes aquáticos e seus integrantes em específico os peixes, continuam enfrentar enormes desafios relacionados aos constantes impactos causados pelos poluentes, sobretudo os metais pesados em realce o cádmio. O *G. brasiliensis*, com base em sua sensibilidade a metais pesados e sua disponibilidade durante todo o ano nesses ambientes, apesar das análises estatísticas não terem demonstrado diferenças significativas em todas as concentrações e período de exposição, tal como previa-se na hipótese inicial, a espécie pode

ser usada como um bioindicador e organismo de teste para monitorar a poluição por metais em ambientes aquáticos. Sugerimos que nossos resultados são essenciais para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos no processo ecotóxico após a exposição ao Cd e para estratégias de proteção das espécies de peixes em seus habitats.

Estudos sobre a interferência das NPs a base de carbono na toxicidade dos metais, continuam essenciais no sentido de trazer mais esclarecimentos sobre os efeitos da coexposição em ambientes aquáticos complexos. A exposição combinada entre o metal pesado Cd e o nanomaterial GO, afetou claramente o metabolismo de rotina dos peixes, onde o fator dependente do aumento das concentrações do metal e tempo de exposição foram registadas baixas significantes em relação ao consumo oxigênio e da excreção amônia.

Esses dados ressaltam a necessidade de mais estudos, e sobre potenciais interações de nanomateriais com contaminantes existentes nos ecossistemas aquáticos e ao mesmo tempo oferece percepções valiosas para uma análise crítica, definição dos padrões e avaliação criteriosa dos efeitos isolados e combinados dos NMs e MPs para uma melhor gestão e preservação de ecossistemas aquáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDT W.V.; BOOYSEN J. Water hardness and the effects of Cd on oxygen consumption in *Tilapia sparrmanii*. Waster AS, v. 30, n. 1, p. 57–64. 2004.

ABELHA M. C.; GOULART, E. Oportunismo trófico de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae) no' reservatório de Capivari, Estado do Paraná, Brasil. Acta Sci. Biol. Sci, v. 26, p. 37–45. 2004.

ACEVES, M. A. B.; COHEN, A.; SMITH, Y.; FAGGIO, C. MicroRNAs and their role on fish oxidative stress during xenobiotic environmental exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 148, p. 995-1000. 2018.

AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS EUA. Métodos para Medir a Toxicidade Aguda de Efluentes para Organismos de Água Doce e marinhos (quarta ed.), Laboratório de Sistemas de Monitoramento Ambiental, EPA/600/4-90/027. Cincinnati, OH (1993).

AGUIAR, A. T.; OTTONI, C.; SIMÕES, M. F.; ARAÚJO, A.L.S.; BARBIERI, E. Mycogenic silver nanoparticles (from *Penicillium citrinum* IB-CLP11)? their antimicrobial activity and potential toxicity effects on freshwater organisms. Environmental Science-Nano, v. 11, p. 1-10, 2024.

ALVES, K. V. B.; MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, OSWALDO L.; BARBIERI, E. Co-exposure of carbon nanotubes with carbofuran pesticide affects metabolic rate in *Palaemon pandaliformis* (shrimp). Chemosphere, v. 288, p. 132359, 2022.

ARAÚJO, M. J.; VAZQUEZ, M.; LORENZO, L.R.; PIÑEIRO, A. M; FONSECA, E.; MALLO N.; IVONE, P.; QUARATO, M.; BIGORRA-FERRÉ, E.; MATOS, A.; BARREIRO-FELPETO, A.; OUBIÑA, M. V. T. C. S.; BARRERA, P. B; CABALEIRO, S.; VASCONCELOS, V.; ESPIÑA, B.; CAMPOS, A. Diving into the metabolic interactions of titanium dioxide nanoparticles in "*Sparus aurata*" and "*Ruditapes philippinarum*". Environmental Pollution, v. 360. 2024.

BARBIERI, E. Use of metabolism and swimming activity to evaluate the sublethal toxicity of surfactant (LAS-C12) on *Mugil platanus*. Braz. Arch. Biol. Technol., v. 50, p. 101-112. 2007.

BARBIERI, E., FERRARINI, A.M.T., REZENDE, K.F.O. *et al.* Effects of multiwalled carbon nanotubes and carbofuran on metabolism in *Astyanax ribeirae*, a native species. Fish Physiol Biochem, v. 45, p. 417–426. 2019.

BARBIERI, E., NGAN, P. V.; GOMES, V. The effect of SDS, sodium dodecyl sulfate, on the metabolism and swimming capacity of *Cyprinus Carpio*. Rev. Brasil. Biol., v. 58 p. 263–271. 1998.

BARBIERI, E.. Effect of 2,4-D herbicide (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) on oxygen consumption and ammonium excretion of juveniles of *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae). Ecotoxicology (London), v. 18, p. 55-60. 2009.

BARBIERI, E.; CAMPOS-GARCIA, J.; MARTINEZ, D.S.T.; DA SILVA, J.R.M.C.; ALVES, O.L.; REZENDE, K.O.F. Histopathological effects on gills of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) exposed to Pb and carbon nanotubes. Microscopy and Microanalysis, v. 22, n. 6, p. 1162-1169. 2016.

BARBIERI, E.; DE OLIVEIRA, I. R.; SERRALHEIRO, P. C. S. The use of metabolism to evaluate the toxicity of dodecil benzen sodium sulfonate (LAS-C12) on the *Mugil platanus* (mullet) according to the temperature and salinity. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 277, p. 109-127. 2002.

BARBIERI, E.; FERRARINI, A.M.T.; REZENDE, K.F.O.; MARTINEZ, D.S.T.; ALVES, O.L. Effects of multiwalled carbon nanotubes and carbofuran on metabolism in *Astyanax ribeirae*, a native species. Fish physiology and biochemistry, v. 45, p. 417-426. 2019.

BARBIERI, E.; PAES, E. T. The use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the toxicity of cadmium on *Farfantepenaeus paulensis* with respect to salinity. Chemosphere, v. 84, p. 9-16. 2011.

BARBIERI, E; FERRARINI, A. M. T.; REZENDE, K. F. O.; MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, O. L. Effects of multiwalled Carbon Nanotubes and Carbofuran on Metabolism in *Astyanax ribeirae*, a Native Species. Fish Physiology and Biochemistry, v. 44, p. 1-10. 2018.

BARBOZA, L. G. A.; VIEIRA, L. R.; Guilhermino, L. Single and combined effects of microplastics and mercury on juveniles of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*): Changes in behavioural responses and reduction of swimming velocity and resistance time. Environmental Pollution, v. 236, p. 1014-1019. 2018.

BATISTA DE MELO, C. B.; CÔA, F.; ALVES, O. L.; MARTINEZ, D. S. T.; BARBIERI, E. Co-exposure of graphene oxide with trace elements: Effects on acute ecotoxicity and routine metabolism in *Palaemon pandaliformis* (shrimp). Chemosphere, v. 223, p. 157-164, 2019.

BATTAGLINI, P., ANDREOZZI, G., ANTONUCCI, R., ARCAMONE, N., DE GIROLAMO, P., FERRARA, L., GARGIULO, G., The efects of cadmium on the gills of the goldfish *Carassius auratus* L.: metal uptake and histochemical changes. Comp. Biochem. Physiol., v. 104, p. 239-247. 1993.

BENSON, W.H., WATSON, C.F., BAER, K.N., STACKHOUSE, R.A. Response of hematological and biochemical parameters to heavy metals exposure: implications in environmental monitoring. Mar. Environ. Res., v. 24, p. 219-222. 1988.

BEVERIDGE, T.J.; MURRAY, R.G.E. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., v. *141*, p. 876–887. 1980.

BEYERS, D. W.; JAMES, A RICE, J. A.; CLEMENTS, W. H.; HENRY, C. J. Estimating physiological cost of chemical exposure: integrating energetics and stress to quantify toxic effects in fish. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 56, p. 814-822. 1999.

BHATTACHARYA, S. The Role of Probiotics in the Amelioration of Cadmium Toxicity. Biological Trace Element Research. v. 197, p. 440–444. 2020.

BRETT, J.R. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. J. Fish. Res. Board Can., v. 21, p. 1183–1226. 1964.

CALOW, P. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, v. 100, p. 3-6. 1991.

CAMPOS-GARCIA, J.; MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, O. L.; LEONARDO, A. F. G.; BARBIERI, E. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidised multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 111, p. 131-137. 2015.

CAMPOS-GARCIA, J.; MARTINEZ, D. S. T.; REZENDE, K. F. O.; DA SILVA, J. R. M. C.; ALVES, O. L.; BARBIERI, E. Histopathological alterations in the gills of Nile tilapia exposed to carbofuran and multiwalled carbon nanotubes. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 133, p. 481-488, 2016

CEDERVALL, T.; HANSSON, L. A.; LARD, M.; FROHM, B.; LINSE, S. Food Chain Transport of Nanoparticles Affects Behaviour and Fat Metabolism in Fish. PLoS ONE, v. 7. 2012.

CHEN YUMING, JITONG LI, PENG YUAN, ZHINENG WU, ZHAOXIN WANG, WEIDONG WU. Graphene oxide promoted chromium uptake by zebrafish embryos with multiple effects: Adsorption, bioenergetic flux and metabolism. Science of The Total Environment, v. 802, p. 149914. 2022.

COLÓN, J.A.; SUAREZ, D. M.; GUZMÁN, G. M. M.; *et al.* Synthesis of Biocompatible Silver Nanoparticles and Nanotoxicity in Aquatic Ecosystems. MRS Advances, p. 805–813. 2020.

DAMATO, M.; BARBIERI, E. Emprego de uma espécie indicadora sul-americana na determinação da toxicidade aguda para Cobre, Zinco, Níquel e Alumínio. Mundo saúde (Impr.), p. 551-558, 2003.

DAMATO, M.; BARBIERI, E. Study on the acute toxicity and metabolic changes caused by cadmium exposure on the fish *Hyphessobrycon callistus* used as an indicator of environmental health Mundo da Saúde., v. 36, p. 574-581. 2012.

DASARI SHAREENA, THABITHA P. et al. A review on graphene-based nanomaterials in biomedical applications and risks in environment and health. Nano-micro letters, v. 10, p. 1-34, 2018.

DE ANGELIS, C.F.; SOARES, M. P.; MCKENZIE, D. J.; TAYLOR, E. W.; CARDOSO, I. L.; SOUZA, I. C.; WUNDERLIN, A. A.; MONFERRÁN, M. V.; FERNANDES, M. N.; LEITE, C. A. C. Settleable atmospheric particulate matter affects the swimming performance and aerobic metabolic rate of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 271. 2023.

DE BOECK G, DESMET H, BLUST R. The effect of sub lethal levels of copper on oxygen consumption and ammonia Excretion in the common carp *Cyprinus carpio* (L.). Aquat Toxicol v. 32, p. 127–141. 1995.

DE BOECK, G.; VAN DER VEN, K.; MEEUS, W.; BLUST, R. Sublethal copper exposure induces respiratory stress in common and gibel carp but not in rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 144, p. 380-390. 2007.

DE LA TORRE, F., SALIBIÁN, A., and FERRARI, L. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. Environmental Pollution, v. 109, n. 2, p. 277–282. 2000.

DE MARCHI, L.; PRETTI, C.; GABRIEL, B.; MARQUES, P. A. A. P.; FREITAS, R.; NETO, V. An overview of graphene materials: Properties, applications and toxicity on aquatic environments. Science of The Total Environment, v. 631–632, p. 1440-1456. 2018.

DEL PRADO-AUDELO M.L, GARCÍA KERDAN I, ESCUTIA-GUADARRAMA L, REYNA-GONZÁLEZ J.M, MAGAÑA J.J and LEYVA-GÓMEZ G. Nanoremediation: Nanomaterials and Nanotechnologies for Environmental Cleanup. Front. Environ. Sci. 9:793765. 2021.

DENG, R.; LIN, D.; ZHU, L.; MAJUMDAR, S.; WHITE, J. C.; TORRESDEY, J. L. G.; XING, B. Nanoparticle interactions with co-existing contaminants: joint toxicity, bioaccumulation and risk. Nanotoxicology, v. 11, p. 591–612. 2017.

DEVI, V.U. Bioaccumulation and metabolic effects of cadmium on marine fouling dressinid bivalve, *Mytilopsis sallei* (recluz). Arch. Environ. Contam. Toxicol., v. 31, p. 47–53. 1996.

DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. The toxicology of fishes. CRC. 2008.

DOLOMATOV, S.I., SHEKK, P.V., ZUKOW, W. *et al.* Features of nitrogen metabolism in fishes. Rev Fish Biol Fisheries*,* v. 21, p. 733–737. 2011.

EIRAS, O.; IZABEL, M.; DA COSTA, L. S.; BARBIERI, E. Copper II oxide Nanoparticles (CuONPs) Alter Metabolic Markers and Swimming Activity in Zebra-fish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology, v. 257, p. 109343. 2022.

ESPINA, S., SALIBIAÂ N, A., ROSAS, C., SANCHEZ, A., ALCARAZ, G. Acute physiological responses of grass carp *Ctenopharyngodon idella* fingerlings to sublethal concentrations of Cadmium. Acta Toxicol. Argent., v. 3, p. 8-10. 1995.

FAROMBI E.O, ADELOWO O.A, AJIMOKO Y.R. Biomarker of oxidative stress and heavy metal levels as induced by environmental pollution in African cat fish Clarias gariepinus from Nigeria, Ogun river. Int J Environ Res Public Health, v. 4, n. 2, p.158–165. 2007.

FEDERATION, W.E., Association, A.P.H. In: twentieth ed. Clescerl, L.S., Greenberg, A. E., Eaton, A.D. (Eds.), Standard Methods for Examination of Water & Wastewater

(Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater). American Public Health Association (APHA). 1999.

FERNANDES, AMANDA LUCENA, JEFFERSON PATRÍCIO NASCIMENTO, ADELINA PINHEIRO SANTOS, CLASCÍDIA APARECIDA FURTADO, LUIS ALBERTO ROMANO, CARLOS EDUARDO DA ROSA, JOSÉ MARIA MONSERRAT, JULIANE VENTURA-LIMA. Assessment of the effects of graphene exposure in *Danio rerio*: A molecular, biochemical and histological approach to investigating mechanisms of toxicity. Chemosphere, v. 210, p. 458-466. 2018.

FERRO, J. P; FERRARI, L; EISSA, B. L. Acute toxicity of cadmium to freshwater fishes and its relationship with body size and respiratory strategy. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 248, p. 109-109. 2021.

FREIRE, C. A.; CAVASSIN, F.; RODRIGUES, E. N.; TORRES, A. H.; MCNAMARA, J. C. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the *Palaemonidae shrimps*, Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 136, p. 771-778. 2003.

FU F, WANG Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. J Environ Manag, v. 92, p. 407–418. 2011.

FU, C. W.; HORNG, J. L.; TONG, S. K.; CHERNG, B. W.; LIAO, B. K.; LIN, L. Y.; CHOU, M. Y. Exposure to silver impairs learning and social behaviors in adult zebrafish. Journal of Hazardous Materials, v. 403. 2021.

GAGNEÂ, F., MARION, M., DENIZEAU, F. Metal homeostasis and metallothionein induction in *Rainbow trout* hepatocytes exposed to Cadmium. Fund. Appl. Toxicol., v. 14, p. 429-437. 1990.

GARAI, P.; BANERJEE, P.; MONDAL, P.; SAHA, N. C. Effect of heavy metals on fishes: Toxicity and bioaccumulation. J Clin Toxicol. S, 18. 2021.

GARCIA-SANTOS S.; MONTEIRO, S.; MALAKPOUR-KOLBADINEZHAD, S.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; WILSON, J. Effects of Cd injection on osmoregulation and stress indicators in freshwater Nile tilapia, Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology, v. 167, p. 81-89. 2015.

GENCHI G.; SINICROPI, M.S.; LAURIA G.; CAROCCI A.; CATALANO A. The Effects of Cadmium Toxicity. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 17. 2020.

GHORBANI, H. R. Biological and Non-Biological Methods for Fabrication of Copper Nanoparticles. Chemical Engineering Communications, v. 202, n. 11, p. 1463–1467. 2014.

GHOSH, S. Nanomaterials and aquatic toxicity". Nanomaterials Safety: Toxicity And Health Hazards, Berlin, Boston: De Gruyter, p. 215-236. 2019.

GUO, S. N.; ZHENG, J. L.; YUAN, S. S.; ZHU, Q. L.; WU, C. W. Immunosuppressive effects and associated compensatory responses in zebrafish after full life-

cycle exposure to environmentally relevant concentrations of cadmium. Aquatic Toxicology, v. 188, p. 64-71. 2017.

HANDY, R.D., HENRY, T.B., SCOWN, T.M. *et al.* Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis. Ecotoxicology, v. 17, p. 396–409. 2008.

HASSAN B.K. The effect of sub lethal concentration of cadmium on gill and liver of carassian carp *Carassius carassius* (L.). M.Sc. Thesis, college of Agriculture, Basrah University, p. 53. 2005.

HEINO M, GODØ OR. Fisheries-induced selection pressures in the context of sustainable fisheries. Bull. Mar. Sci., v. 70, p. 639–656. 2002

HIDETOSHI, N. Dicionário dos Peixes do Brasil., 1ª Edição, p. 482. 1984.

HONARY, S., BARABADI, A.H., GHARAEI-FATHABAD, E. & NAGHIBII, F. Green synthesis of copper oxide nanoparticles *using Penicillium aurantiogriseum, Penicillium citrinum and Penicillium waksmanii*, Dig J of Nanomater Bios, v. 7, n. 3, p. 999– 1005. 2012.

HUSSAN, A., CHOUDHURY, T.G., AHMED, I., GITA, S., DAS, A., UDIT, U.K., CHAKRABARTI, P.P., MANDAL, R.N. Effect of Mercury and Cadmium on the Oxygen Consumption and Gill Histology of *Labeo catla* (Ham. 1822). Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences, v. 88, n. 2, p. 729-738. 2018.

JEEVANANDAM, J.; BARHOUM, A.; CHAN, Y.; DUFRESNE, A.; DANQUAH, M.K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. Beilstein J. Nanotechnol, v. 9, p. 1050–1074. 2018.

JENIFER, A. A.; MALAIKOZHUNDAN, B.; VIJAYAKUMAR, S. *et al.* Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles (AgNPs) Using Leaf Extract of *Solanum nigrum* and Assessment of Toxicity in Vertebrate and Invertebrate Aquatic Animals. J Clust Sci v. 31, p. 989–1002. 2020.

JEZIERSKA, BARBARA; SARNOWSKI, PIOTR. The effect of mercury, copper and cadmium during single and combined exposure on oxygen consumption of Oncorhynchus mykiss Wal. and *Cyprinus carpio* L. larvae. Fisheries & Aquatic Life, v. 10, n. 1, p. 15-22, 2002.

JIANG, J., OBERDÖRSTER, G. & BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J* Nanopart Res, v. 11, p.77–89. 2009.

JIAXIN, S.; SHENGCHEN, W.; YIRONG, C.; SHUTING, W.; SHU, L. Cadmium exposure induces apoptosis, inflammation and immunosuppression through CYPs activation and antioxidant dysfunction in common carp neutrophils. Fish & Shellfish Immunology, v. 99, p. 284-290. 2020.

JU, Z.; YA, J.; LI, X.; WANG, H.; ZHAO, H. The effects of chronic cadmium exposure on *Bufo gargarizans* larvae: Histopathological impairment, gene expression alteration and fatty acid metabolism disorder in the liver. Aquatic Toxicology, v. 222, 105470. 2020.

JURGELĖNĖ, Z.; MONTVYDIENĖ, D.; ŠEMČUK, S.; STANKEVIČIŪTĖ, M.; SAULIUTĖ, G.; PAŽUSIENĖ, J.; MORKVĖNAS, A.; BUTRIMIENĖ, R.; JOKŠAS, K.; PAKŠTAS, V.; KAZLAUSKIENĖ, N.; KARABANOVAS, V. The impact of co-treatment with graphene oxide and metal mixture on Salmo trutta at early development stages: The sorption capacity and potential toxicity. Science of The Total Environment, v. 838, Part 4. 2022.

KALELE MANISHA P, DHANDE R.R. Toxic effect of copper on the gills of fish *Labeo rohita*. Indian J Environ Sci, v. 9, n. 2, p. 109–111. 2005.

KALMAN, J.; MERINO, C.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; NAVAS, J. M. Usefulness of fish cell lines for the initial characterization of toxicity and cellular fate of graphene-related materials (carbon nanofibers and graphene oxide). Chemosphere, v. 218, p. 347-358. 2019.

KELEPERTZIS, E. Accumulation of heavy metals in agricultural soils of Mediterranean: Insights from Argolida basin, Peloponnese, Greece, Geoderma. v. 221–222, p. 82-90. 2014.

KHOSHNAMVAND, M.; HAO, Z.; FADARE, O.; HANACHI, P.; CHEN, Y.; LIU, J. TOXICITY of biosynthesized silver nanoparticles to aquatic organisms of different trophic levels. Chemosphere, v. 258, p. 127346. 2020.

KLEIVEN, M.; MACKEN, A.; Oughton, D. H. Growth inhibition in Raphidocelis subcapita – Evidence of nanospecific toxicity of silver nanoparticles. Chemosphere, v. 221, p. 785-792. 2019.

KUEHR, S.; KOSFELD, V.; SCHLECHTRIEM, C. Bioaccumulation assessment of nanomaterials using freshwater invertebrate species. Environ Sci Eur 33, v. 9. 2021.

KULLANDER, S. O.; REIS R. E.; FERRARIS JR., C. J. Cichlidae (Cichlids) In: Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil, p. 605–654. 2003.

LEE, J.H.; YOO, H.; AHN, Y.J.; KIM, H.J.; KWON, S.R. Evaluation of the Antimicrobial Effect of Graphene Oxide Fiber on Fish Bacteria for Application in Aquaculture Systems. Materials, v. 15, n. 3, p. 966, 2022.

LI, F.; MENG, X.; WANG, X.; JI, C.; WU, H. Graphene-triphenyl phosphate (TPP) co-exposure in the marine environment: Interference with metabolism and immune regulation in mussel *Mytilus galloprovincialis*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 227. 2021.

LI, Q. Q.; XIANG, Q. Q.; LIAN, L. H.; CHEN, Z. Y.; LUO, X.; DING, C. Z.; CHEN, L. Q. Metabolic profiling of nanosilver toxicity in the gills of common carp. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 222. 2021.

LIU J. G., T. DIETZ, S. R. CARPENTER, C. FOLKE, M. ALBERTI, C. L. REDMAN, S. H. SCHNEIDER, E. OSTROM, A. N. PELL, J. LUBCHENCO, W. W. TAYLOR, Z. Y. OUYANG, P. DEADMAN, T. KRATZ AND W. PROVENCHER. Ambio, v. 36, p. 639. 2007.

LIU S. B., T. Y. H. ZENG, M. HOFMANN, E. BURCOMBE, J. WEI, R. R. JIANG, J. KONG and Y. CHEN. ACS Nano, v. 5, p. 6971. 2011.

LIU, S.; MIAO, L.; LI, B.; SHAN, S.; LI, D.; HOU, J. Long-term effects of Ag NPs on denitrification in sediment: Importance of Ag NPs exposure ways in aquatic Ecosystems. Water Research, v. 242. 2023.

LIU, Y.; CHEN, Q.; LI, Y.; BI, L.; JIN, L.; PENG, R. Toxic Effects of Cadmium on Fish. Toxics, v. 10. 2022.

LIU, Y.; FAN, W.; XU, Z.; PENG, W.; LUO, S. Comparative effects of graphene and graphene oxide on copper toxicity to *Daphnia magna*: Role of surface oxygenic functional groups. Environmental Pollution, v. 236, p. 962-970. 2018.

LIU, Y.; KANG, S.; LI, K.; CHEN, J.; BAE, B.; HWANG, I.; AHN, E. Y.; PARK, Y.; CHUN, K. H.; LEE, J. Ecofriendly and enhanced biogenic synthesis of silver nanoparticles using deep eutectic solvent-based green tea extracts. Journal of Cleaner Production, v. 379, Part 2. 2022.

LUO, W.; WANG, D.; XU, Z.; LIAO, G.; CHEN, D.; HUANG, X.; WANG, Y.; YANG, S.; ZHAO, L.; HUANG, H.; LI, Y.; WEI, W.; LONG, Y.; DU, Z. Effects of cadmium pollution on the safety of rice and fish in a rice-fish coculture system. Environment International, v. 143. 2020.

MA, X.; GEISER-LEE, J.; DENG, Y.; KOLMAKOV, A. Interações entre nanopartículas engenheiradas (ENPs) e plantas: Fitotoxicidade, absorção e acúmulo. Ciência Total. Ambiente, v. 408, p. 3053– 3061. 2010.

MABROUK, M. M.; MANSOUR, A. T.; ABDELHAMID, A. F.; ABUALNAJA, K. M.; MAMOON, A.; GADO, W. S.; MATTER, A. F.; AYOUB, H. F. Impact of aqueous exposure to silver nanoparticles on growth performance, redox status, non-specific immunity, and histopathological changes of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, challenged with Aeromonas hydrophila. Aquaculture Reports, v. 21, 2021.

MAKARAS, Tomas et al. Interacting effects of graphene oxide derivatives and trace metals on freshwater brown trout (*Salmo trutta*) behaviour at different stages of development. Environmental Science: Nano, v. 10, n. 8, p. 2172-2184. 2023.

MALIK S, MUHAMMAD K, WAHEED Y. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. Molecules. v. 28 n. 2, p. 661. 2023.

MARTÍNEZ, G.; MERINERO, M.; PÉREZ-ARANDA, M.; PÉREZ-SORIANO, E.M.; ORTIZ, T.; VILLAMOR, E.; BEGINES, B.; ALCUDIA, A. Environmental Impact of Nanoparticles' Application as an Emerging Technology: A Review. Materials, v. 14, p. 166. 2021.

MARTINEZ, D S T.; ALVES, O L.; BARBIERI, E. Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish. Journal of Physics. Conference Series (Print), v. 429, p. 012043, 2013

MATTSSON, K.; EKVALL, M. T.; HANSSON,L. A.; LINSE, S.; MALMENDAL, A.; CEDERVALL, T. Altered Behavior, Physiology, and Metabolism in Fish Exposed to Polystyrene Nanoparticles. Environmental Science & Technology, v. 49, p. 553-561. 2015.

MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Fish ecophysiology. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 297-321.1993.

MEDEIROS, A. M. Z.; FRANCINE, C; ALVES, O. L.; MARTINEZ, D. T. S.; BARBIERI, E. Metabolic effects in the freshwater fish *Geophagus iporangensis* in response to single and combined exposure to graphene oxide and trace elements. CHEMOSPHERE, v. 243, p. 125316. 2020.

MESARIČ TINA, CHIARA GAMBARDELLA, TAMARA MILIVOJEVIĆ, MARCO FAIMALI, DAMJANA DROBNE, CARLA FALUGI, DARKO MAKOVEC, ANITA JEMEC, KRISTINA SEPČIĆ. High surface adsorption properties of carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition, and biochemical responses in *Artemia salina* larvae. Aquatic Toxicology, v. 163, p. 121-129. 2015.

MINJIE, C.; YIN, J.; LIANG, Y.; YUAN, S.; WANG, F., SONG, M.; WANG, H. Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish. Aquatic Toxicology, v. 174, p. 54-60. 2016.

MIRANZADEH, M.; KASSAEE, M.; AFSHARI, F. Efficiency of Cu, Ag, and Fe Nanoparticles As Detergents Preservatives Against E. coli and *S. aureus*. Nanochem. Res. V. 4, 1p. 70–178. 2019.

MIRKATULI HA, BAGHBANI M, YAHYAEI B. Comparison of the possible histopathological changes of the rat neonatal cerebellum induced by toxic and nontoxic doses of biological silver nanoparticles with chemical silver nanoparticles. Brain Behav v. 11, n. 8, p. 2319. 2021.

MORAIS, C. R.; CARVALHO, S. M.; ARAUJO, G. R.; SOUTO, H. N.; BONETTI, A. M.; SANDRA MORELLI, JÚNIOR, E. O. C. Assessment of water quality and genotoxic impact by toxic metals in *Geophagus brasiliensis*. Chemosphere, v. 152, p. 328-334. 2016.

NICA, AURELIA, ALINA ANTACHE, IRA-ADELINE SIMIONOV, STEFAN-MIHAI PETREA, CATALINA ITICESCU, and VICTOR CRISTEA. "The impact of environmental factors on the metabolic rate in fish: integration of existing data." Scientific Papers. Series D. Animal Science, v. 66, no. 2, p. 652-657. 2023.

NIELSEN, M. B.; VAVRA, J.; PALMQVIST, A.; FORBES, V. E. Long-term effects of sediment-associated silver nanoparticles and silver nitrate on the deposit-feeding polychaete *Capitella teleta*. Aquatic Toxicology, v. 242. 2022.

NIKOKHERAD, H.; SARI, A. E.; MORADI, A. M.; BAHRAMIFAR, N.; Mostafavi, P. G. Bioaccumulation capacity of Chlorella vulgaris and Spirulina platensis exposed to silver nanoparticles and silver nitrate: Bio- and health risk assessment approach, Algal Research, v. 64. 2022.

NILSSON GÖRAN E., AGNIESZKA DYMOWSKA, JONATHAN A.W. STECYK. New insights into the plasticity of gill structures. Respiratory Physiology & Neurobiology, v. 184, n. 3, p. 214-222. 2012.

OLSON, K. R. Vasculature of the fish gill: Anatomical correlates of physiological functions. Journal of Electron Microscopy Technique, v. 19, p. 389–405. 1991.

ORTEGA, P., SANTOS, R.A., LACOUTH, P., ROZAS, E.E., CUST_ODIO, M.R., ZANOTTO, F.P. Cytochemical characterization of gill and hepatopancreatic cells of the crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura) validated by cell metal transport. Iheringia, Serie Zool., v. 104, p. 347-354. 2014.

OTTONI, C. A.; NETO, M. C. L.; LÉO, P.; ORTOLAN, B. D.; E. BARBIERI, DE SOUZA, A. O. Environmental impact of biogenic silver nanoparticles in soil and aquatic organisms, Chemosphere, v. 239. 2020.

PAITAL, B.; BP.; DEEPTIMAYEE GURU, D.; PRIYADARSINI MOHAPATRA, BISWAJIT PANDA, NIBEDITA PARIDA, SASMITA RATH, VINOD KUMAR, PREETI S. SAXENA, ANCHAL SRIVASTAVA. Ecotoxic impact assessment of graphene oxide on lipid peroxidation at mitochondrial level and redox modulation in fresh water fish *Anabas testudineus*, Chemosphere, v. 224, Pages 796-804. 2019.

PANIGRAHI, A.K.; PAL, P.K.; SARKAR (PARIA), D. Melatonin as an Ameliorative Agent Against Cadmium- and Lead-Induced Toxicity in Fish: an Overview. Appl Biochem Biotechnol. 2024.

PANNETIER, P.; MORIN, B.; CLÉRANDEAU, C.; LAURENT, J.; CHAPELLE, C.; CACHOT, J. Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental microplastics collected on beaches: Part II-adverse effects on Japanese medaka early life stages. Environmental Pollution, v. 248, p. 1098-1107. 2019.

PARK, J.; PARK, C.; LEE, Y.; RYU, C.; PARK, J; KIM, Y. Acute Adverse Effects of Metallic Nanomaterials on Cardiac and Behavioral Changes in *Daphnia magna*. Environments*, v. 9, p. 26. 2022*.

PAUL, J. S.; SMALL, B. C. Chronic exposure to environmental cadmium affects growth and survival, cellular stress, and glucose metabolism in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquatic Toxicology, v. 230, p. 0166-445X. 2021.

PEQUIN, L. and SERFATY, A. L'excretion ammoniacale chez un Teleosteen dulcicole *Cvprinius carpio* L. Comp. Biochem. Phyvsiol., v. 10, p. 315-324. 1963.

PÉREZ, SANDRA; LA FARRÉ, MARINEL; BARCELÓ, DAMIÀ. Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. (TrAC) Trends in Analytical Chemistry, v. 28, n. 6, p. 820-832. 2009.

PHILIP, D. Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract. Spectrochim. Acta A, v. 73, p. 374–381. 2009.

PISTOLE, D. H.; PELES, J. D.; TAYLOR, K. Influence of metal concentrations, percent salinity, and length of exposure on the metabolic rate of fathead minnows

(*Pimephales promelas*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 148, p. 48-52. 2008.

PLAUT, I. Critical swimming speed: its ecological relevance. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 131, p. 41-50. 2001.

PRATO E, BIANDOLINO F, SCARDICCHIO C. Test of acute toxicity of copper, cadmium and mercury in five marine species. Turk J Zool, v. 30, p. 285–290. 2006.

PRETTO, A.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; MORAES, B. S; CHARLENE, SANTI, A.; CÂNDIDA TONI. Alterations in carbohydrate and protein metabolism in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cádmium. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 100, p.188-192. 2014.

QU, R.; WANG, X.; WANG, Z.; WEI, Z.; WANG, L. Metal accumulation and antioxidant defenses in the freshwater fish *Carassius auratus* in response to single and combined exposure to cadmium and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes. Journal of Hazardous Materials, v. 275, p. 89-98. 2014.

RANDALL D.J, D.W. CONNELL, R. YANG, S.S. WU. Toxicant body burden in fish is determined by transfer across the gills, not by feeding. Chemosphere, v. 37 p. 1263-1270. 1998.

RANDALL, David J.; WRIGHT, PATRICIA A. Ammonia distribution and excretion in fish. Fish physiology and biochemistry, v. 3, p. 107-120. 1987.

RANDI, A.S., MONSERRAT, J.M., RODRIGUEZ, E.M., ROMANO, L.A. Histopathological efects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). J. Fish Dis., v. 19, p. 311-322. 1996.

REZENDE, K. F. O.; BERGAMI, E; ALVES, K. V. B.; CORSI, I.; BARBIERI, E. Titanium dioxide nanoparticles alters routine metabolism and causes histopathological alterations in *Oreochromis niloticus*. Boletim do Instituto de Pesca, v. 44, p. 343-343. 2018.

RIBEIRO, L. G.; REZENDE, K. F. O.; BARBIERI, E.; DE SOUZA, A. O. Study of routine metabolism and acute toxicity of mycogenic silver nanoparticles on *Palaemon pandaliformis* (shrimp). Environmental Science: Nano Environ. Sci.: The Royal Society of Chemistry Nano v. 106, p. 2051-8153. 2023.

RICE, M. K., & RUDER, W. C. Creating biological nanomaterials using synthetic biology. Science and Technology of Advanced Materials, v. 15 (1). 2013.

ROCHA, O.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, JR.; RIETZLER, A. C. Espécies invasoras em águas doces: estudos de caso e propostas de manejo, p. 416. 2005.

RODRIGUES, A. G.; PING, L. Y.; MARCATO, P. D.; ALVES, O. L.; SILVA, M. C. P.; RUIZ, R. C.; IS MELO, I. S.; TAS; I. C, L. DE SOUZA. A. O. Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 97, p. 775 – 782. 2013.

RUÍZ-HIDALGO, K.; MASÍS-MORA, M.; BARBIERI, E.; CARAZO-ROJAS, E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C.E. Ecotoxicological analysis during the removal of carbofuran in fungal bioaugmented matrices. Chemosphere., v. 144, p. 864-871, 2016.

SAFSHATH, M. I. M. WAIDYASEKARA, K. G. A. S. and TENNAKOON, G. A. "Application of Nanotechnology and Nanomaterials in the Construction Industry: The Case of Sri Lanka, Moratuwa Engineering Research Conference (MERCon), Moratuwa, p. 7-12. 2021.

SALAH M. A.; EISSA, A. E.; RAZEK, N. A.; RAMLAWY, A. O. E. The antibacterial activity and immunomodulatory effect of naturally synthesized chitosan and silver nanoparticles against Pseudomonas fluorescence infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): An in vivo study, Fish & Shellfish Immunology, v. 135. 2023.

SANCHÍS, J.; OLMOS, M.; VINCENT, P.; FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. New Insights on the Influence of Organic Co-Contaminants on the Aquatic Toxicology of Carbon Nanomaterials. Environmental Science & Technology, v. 50, p. 961-969. 2016.

SHAH M, FAWCETT D, SHARMA S, TRIPATHY SK, POINERN GEJ. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. Materials. 2015; v. 8, n. 11, p. 7278-7308. 2015.

SHANKAR, S.S.; AHMAD, A.; PASRICHA, R.; SASTRY, M. Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. J. Mater. Chem., v. 13, p. 1822–1826. 2003.

SHEREENA K.M, LOGASWAMY S. Impact of some heavy metals on oxygen consumption by the fish Tilapia mossambicus (*Oreochromis mossambicus)*. Curr Biot, v. 2, n. 3, p. 300–307. 2008.

SHUHAIMI-OTHMAN M.; YAKUB, N, RAMLE, N. A.; ABAS A. Comparative toxicity of eight metals on freshwater fish. Toxicology and Industrial Health, v. 31, p. 773-782. 2015.

SIBIYA, A.; GOPI, N.; JEYAVANI, J.; MAHBOOB, S.; KHALID GHANIM, K. A. A. SULTANA, A.; MUSTAFA, A.; MARIMUTHU GOVINDARAJAN, M.; BASKARALINGAM VASEEHARAN, B. Comparative toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate in freshwater fish *Oreochromis mossambicus*: A multi-biomarker approach. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology, v. 259, 2022.

SILVA, C. A.; RIBEIRO, B. M.; TROTTA, C. V.; PERINA, F. C.; MARTINS, R.; ABESSA, D. M. S.; BARBIERI, E.; SIMÕES, M. F.; OTTONI, C. A. Effects of mycogenic silver nanoparticles on organisms of different trophic levels. Chemosphere, v. 308. 2022.

SITKO, R., TUREK, E., ZAWISZA, B., MALICKA, E., TALIK, E., HEIMANN, J., GAGOR, A., FEIST, B., WRZALIK, R. Adsorption of divalent metal ions from aqueous solutions using graphene oxide. Dalton Trans, v. 42, p. 5682. 2013.

SOUZA, J.P.; MANSANO, A.S.; VENTURINI, F. P.; FABRÍCIO, S.; ZUCOLOTO, V. Antioxidant metabolism of zebrafish after sub-lethal exposure to graphene oxide and recovery. Fish Physiol Biochem, v. 45, p. 1289–1297. 2019.

SPICER, J. I.; WEBER, R. E. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals, Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Comparative Pharmacology, v. 100, p. 339-342. 1991.

SRIVASTAVA R, SRIVASTAVA N. Changes in nutritive value of fish *Channa punctatus* after chronic exposure to Zinc. J Environ Biol, v. 29, p. 299–302. 2008.

STRAMBEANU, N.; DEMETROVICI, L.; DRAGOS, D.; LUNGU, M. NECULAE, A., BUNOIU, M., BIRIS, C Nanoparticles: Definition, Classification and General Physical Properties. In Nanoparticles' Promises and Risks: Characterization, Manipulation, and Potential Hazards to Humanity and the Environment; Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, pp. 3–8. 2015.

TIEDE, A.B.A. BOXALL, S.P. TEAR, J. LEWIS, H. DAVID, M. HASSELLO. Food Addit. Contam., v. 25 p. 795. 2008.

VEZZONE, M.; CESAR, R.; SERRANO, a. et al. Mercury Contamination in Sediments and fFsh from an Urban Tropical Estuary: Ecological and Human Health risks. water air soil pollut v. 234, p. 72. 2023.

VIGNESHWARAN, N.; ASHTAPUTRE, N.M.; VARADARAJAN, P.V.; NACHANE, R.P.; PARALIKAR, K.M.; BALASUBRAMANYA, R.H. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. Mater. Lett., v. *61*, p. 1413–1418. 2007.

VIJAYARAGHAVAN K.; ASHOKKUMAR, T. PLANT-MEDIATED biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 5, p. 4866-4883. 2017.

VINODHINI, R, NARAYANAN M. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). Int J Environ Sci Technol, v. 5, p. 179–182. 2008.

VOIGT, C. L.; DA SILVA, C. P.; DORIA, H. B.; RANDI, M. A. F.; RIBEIRO, C. A. O.; DE CAMPOS, S. X. Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. Environ Sci Pollut, v. 22, p. 8242–8252. 2015.

WAFAA, A. A. M.; ABDELSALAM, N. R.; TANEKHY, M.; KHALED, A. A.; MANSOUR, A. T. TOXICITY, inflammatory and antioxidant genes expression, and physiological changes of green synthesis silver nanoparticles on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 247. 2021.

WALAA, E. H.; MANSOUR, M. F.; WAFAA A. M.; MOHAMED, N. A. A. G.; SAYED, A. A. E.; ALTOHAMY, D. E. A.; IBRAHIM, R. E. Silver nanoparticles mitigate Aeromonas hydrophila-induced immune suppression, oxidative stress, and apoptotic and genotoxic effects in *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, v. 535. 2021.

WANG, M.; CHEN, Z.; SONG, W.; HONG, D.; HUANG, L.; LI, Y. A review on Cadmium Exposure in the Population and Intervention Strategies Against Cadmium Toxicity. Bull Environ Contam Toxicol, v. 106, p. 65–74. 2021.

WANG, Z.; ZHANG, F.; WANG, S.; PEIJNENBURG, W. J. G. M. Assessment and prediction of joint algal toxicity of binary mixtures of graphene and ionic liquids. Chemosphere, v. 185, p. 681-689. 2017.

WINKLER, L. W. Die Bestimmung des im wasser gelösten sauerstoffes. Ber. Dtsch. Chem. Ges. v. 21, p. 2843–2854. 1888.

WU, J. P.; CHEN, H. C. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Chemosphere, v. 57, p. 1591-1598. 2004.

WU, K.; LI, Y.; ZHOU, Q.; HU, X.; OUYANG, S.; Integrating FTIR 2D correlation analyses, regular and omics analyses studies on the interaction and algal toxicity mechanisms between graphene oxide and cádmium. Journal of Hazardous Materials, v. 443, Part B. 2023.

YANG WONG, COLIN BRAUNER, VANCE THURSTON, JOHN NEUMAN, DAVID J. RANDALL. Relationship between toxicant transfer kinetic processes and fish oxygen consumption. Aquatic Toxicology, v. 48, n. 2–3, p. 95-108. 2000.

ZAHEER U. D. S.; SHAH, K.; BIBI, N. *et al.* Recent Insights into the Silver Nanomaterials: an Overview of Their Transformation in the Food Webs and Toxicity in the Aquatic Ecosystem. Water Air Soil Pollut v. 234, p. 114. 2023.

ZHANG, C.; LI, F.; XIANG, J. Acute effects of cadmium and copper on survival, oxygen consumption, ammonia-N excretion, and metal accumulation in juvenile *Exopalaemon carinicauda*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 104, Pages 209-214. 2014.

ZHANG, Y.; DUAN, X.; BAI, L.; QUAN, X.; Effects of nanomaterials on metal toxicity: Case study of graphene family on Cd. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 194. 2020.

ZHAO, G.; WANG, Z. Y.; XU, L.; XIA, C.X.; LIU, J.X. Silver nanoparticles induce abnormal touch responses by damaging neural circuits in zebrafish embryos. Chemosphere, v. 229, p. 169–180. 2019.

ZHAO, J., WANG, Z., WHITE, J.C., XING, B. Graphene in the aquatic environment: adsorption dispersion, toxicity and transformation. Environ. Sci. Technol., v. 48, p. 9995‑10009. 2014.

ZHAO, T.; ZHENG, H.; XU, J.J.; XU, Y. C.; LIU, L.L.; LUO, Z. MnO2 nanoparticles and MnSO4 differentially affected hepatic lipid metabolism through miR-92a/acsl3-dependent de novo lipogenesis in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Environmental Pollution, v. 336, 2023.