

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

EFEITOS DE AgNPs DE ORIGEM BIOGÊNICA NO METABOLISMO DE
ROTINA DE *Astyanax ribeirae* e *Danio rerio*

Renata Antunes Portis

Orientador: Dr. Edison Barbieri

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Aquicultura e Pesca do Instituto de
Pesca - APTA - SAA, como parte
dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Aquicultura e
Pesca.

São Paulo
Dezembro - 2024

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

EFEITOS DE AgNPs DE ORIGEM BIOGÊNICA NO METABOLISMO DE
ROTINA DE *Astyanax ribeirae* e *Danio rerio*

Renata Antunes Portis

Orientador: Dr. Edison Barbieri

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Dezembro - 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e as forças da natureza que me acompanham e me guiam. Agradeço a minha família por ser meu suporte emocional e por todos os incentivos, especialmente por nunca me deixarem desistir, obrigada Mãe e Pai, Cleide Maria e Raimundo vocês são meus pilares. Também agradeço meu esposo, meu amado companheiro e confidente, Patrick Gomes por estar sempre ao meu lado e me ajudando neste processo. Agradeço minha tão sonhada Yara por iluminar meus dias, me trazendo muitas alegrias.

Agradeço imensamente à orientação, ensinamentos e paciência do Dr. Edison Barbieri. Obrigada por ceder um pouco do seu tempo e me acompanhar nesta etapa. Também não poderia deixar de agradecer à Professora Dra. Cristiane Ottoni da UNESP, a Dra. Francine Côa do CNPEM, e ao Professor Dr. Marcelo Henriques pelas importantes contribuições neste trabalho.

Agradeço também as amigas criadas no Instituto de Pesca, que sem dúvidas tornaram este espaço e o processo do mestrado muito mais leves. Mara obrigada pelos cafezinhos com fofoca na cozinha (risos). Luiz Gustavo, obrigada meu querido não só pela amizade e excelente companhia que você oferece, mas por todas as vezes que me ajudou e aconselhou, e pelos cafezinhos da tarde na cozinha (risos).

Agradeço à CAPES pelo financiamento desta pesquisa e ao Governo Federal, representado pelo Presidente Lula por ter aprovado o aumento no valor da bolsa CAPES. Ao Instituto de Pesca pela utilização das instalações técnicas para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço também a cidade de Cananéia por ter me acolhido tão bem. E as artes, em especial a capoeira e dança por me manterem no eixo e cuidarem do meu corpo (físico e espiritual) agradeço também as amigas criadas nestes espaços.

Por fim, dedico este trabalho a minha filha e a todos que me ajudaram até aqui.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
SUMÁRIO	II
RESUMO GERAL	III
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	3
CAPÍTULO ÚNICO	
Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução	7
2. Material e Métodos	9
2.1. <i>Biossíntese de AgNPs Biológicas</i>	9
2.1.1. <i>Bagaço de Cana-de-açúcar</i>	9
2.1.2. <i>Fungo Isolado de Sedimento Marinho</i>	10
2.2. <i>Caracterização das AgNPs biológicas</i>	11
2.3. <i>Manejo dos animais</i>	11
2.4. <i>Testes de toxicidade aguda</i>	13
2.5. <i>Metabolismo de rotina</i>	13
2.6. <i>Análise estatística</i>	14
3. Resultados	14
3.1. <i>Caracterização das AgNPs</i>	14
3.2. <i>Toxicidade aguda</i>	16
3.3. <i>Metabolismo de rotina</i>	17
4. Discussão	22
4.1. <i>Caracterização das AgNPs</i>	22
4.2. <i>Toxicidade aguda</i>	23
4.3. <i>Efeitos metabólicos</i>	24
4.4. <i>Implicações ecológicas e diretrizes ambientais</i>	25
5. Conclusão	25
Referências	27
Considerações Finais	31

Resumo Geral

O efeito ecotoxicológico de nanopartículas de prata (AgNPs) fitogênicas e micogênicas expostas aos peixes dulcícolas *Astyanax ribeirae* (lambari) e *Danio rerio* (peixe-zebra) foram investigados. As AgNPs fitogênicas foram sintetizadas a partir de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e revestidas com polietilenoimina (PEI) e as micogênicas, foram obtidas utilizando o fungo (*Penicillium polonicum*). Os ensaios de toxicidade aguda e crônica foram realizados para avaliar o consumo de oxigênio e a excreção de amônia. Os resultados mostraram que *A. ribeirae* é mais sensível às AgNPs em comparação a *D. rerio*, com mortalidade total observada em concentrações de 500 µg/L das AgNPs micogênicas. A caracterização das nanopartículas revelou diferenças no potencial zeta ($P\zeta$) e na estabilidade coloidal, fatores que influenciam sua toxicidade. Este estudo oferece novos insights sobre a toxicidade de AgNPs biogênicas, evidenciando a importância de avaliar espécies nativas para a formulação de diretrizes de segurança ambiental que minimizem os riscos ecotoxicológicos de nanomateriais em ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata biogênicas, bagaço de cana-de-açúcar, polietilenoimina, nanotoxicologia, parâmetros fisiológicos.

Introdução Geral

A nanotecnologia tem se consolidado como uma das áreas mais promissoras e inovadoras da ciência, com aplicações que abrangem desde a medicina até a indústria e a agricultura (Malik *et al.*, 2023). Em particular, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm atraído grande interesse devido às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e anticorrosivas, que as tornam ideais para aplicações em produtos de consumo, dispositivos médicos, eletrônicos, têxteis e sistemas de purificação de água (Bayda *et al.*, 2019; Chapa González *et al.*, 2023). No entanto, o aumento do uso de AgNPs em setores industriais e a subsequente liberação dessas partículas no ambiente têm levantado preocupações significativas quanto aos seus potenciais impactos ecotoxicológicos, especialmente em ecossistemas aquáticos (Choi *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2022).

A presença de AgNPs no ambiente aquático pode ocorrer por meio de diferentes fontes, incluindo efluentes industriais, esgoto doméstico e produtos de consumo descartados. Em ambientes aquáticos, as AgNPs interagem com a biota, afetando organismos de diferentes níveis tróficos, como peixes, invertebrados e microrganismos (Das *et al.*, 2013; Kakakhel *et al.*, 2021; Silva *et al.* 2022). A toxicidade das AgNPs em organismos aquáticos depende de fatores como concentração, tamanho das partículas, forma de síntese e revestimento. Estudos têm demonstrado que, em peixes, as AgNPs podem causar alterações fisiológicas e comportamentais, como o aumento do estresse oxidativo, danos aos tecidos, alterações na natação e efeitos sobre o metabolismo (Mahboub *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2024). Essas alterações podem comprometer a sobrevivência, o crescimento e a reprodução dos organismos, resultando em consequências ecológicas amplas.

Um aspecto relevante na pesquisa com AgNPs é a diferenciação entre as partículas sintetizadas por métodos físicos, químicos e biológicos. As AgNPs biológicas, também denominadas biogênicas, são sintetizadas a partir de materiais biológicos como plantas, fungos e bactérias, apresentam propriedades físico-químicas distintas das nanopartículas químicas, incluindo maior biocompatibilidade e estabilidade devido à presença de biomoléculas em sua

superfície (Kuppusamy et al., 2016; Khan et al., 2022). A toxicidade reduzida das AgNPs biogênicas em comparação às AgNPs sintetizadas por métodos físicos e químicos tem sido atribuída à sua menor liberação de íons de prata, principal responsável pelos efeitos tóxicos em organismos vivos (Hamedi et al., 2017).

Contudo, mesmo entre as AgNPs biogênicas, a toxicidade pode variar amplamente dependendo da fonte biológica utilizada e do método de síntese. Neste contexto, este estudo visa investigar os efeitos ecotoxicológicos AgNPs fitogênicas [forma livre e revestida de polietilenoimina (PEI)] e micogênicas nas espécies de peixes *Astyanax ribeirae* (lambari) e *Danio rerio* (peixe-zebra). A escolha dessas espécies se justifica por sua relevância ecológica, distribuição geográfica e sensibilidade a contaminantes ambientais.

Referências

Abdel-Latif, H. M., Shukry, M., El Euony, O. I., Mohamed Soliman, M., Noreldin, A. E., Ghetas, H. A., and Dawood, M. A. O. 2021. "Hazardous Effects of SiO₂ Nanoparticles on Liver and Kidney Functions, Histopathology Characteristics, and Transcriptomic Responses in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Juveniles." *Biology* 10 (3): 183. <https://doi.org/10.3390/biology10030183>.

Aguiar, A. P., Ottoni, C. A., Aquaroli, C. D. L. R., Mendes, E. C. V., de Souza Araújo, A. L., Simões, M. F., and Barbieri, E. 2024. "Mycogenic Silver Nanoparticles from *Penicillium citrinum* IB-CLP11 – Their Antimicrobial Activity and Potential Toxicity Effects on Freshwater Organisms." *Environmental Science: Nano* 11 (5): 2229–2238. <https://doi.org/10.1039/d4en00002a>.

American Public Health Association (APHA). 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22nd ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.

Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., and Rizzolio, F. 2019. "The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine." *Molecules* 25 (1): 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>.

Chapa González, C., González García, L. I., Burciaga Jurado, L. G., and Carrillo Castillo, A. 2023. "Bactericidal Activity of Silver Nanoparticles in Drug-Resistant Bacteria." *Brazilian Journal of Microbiology* 54 (2): 691–701. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00991-7>.

Choi, J., Kim, S., Ahn, J., Youn, P., Kang, J. S., and Ryu, D. Y. 2010. "Induction of Oxidative Stress and Apoptosis by Silver Nanoparticles in the Liver of Adult Zebrafish." *Aquatic Toxicology* 100 (2): 151–159. DOI: [10.1016/j.aquatox.2009.12.012](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.012)

Hamed, S., Ghaseminezhad, M., Shokrollahzadeh, S., and Shojaosadati, S. A. 2017. "Controlled Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Nitrate Reductase Enzyme Induction of Filamentous Fungus and Their Antibacterial Evaluation." *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 45: 1588–1596. <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2016.1267011>

Handy, R. D., von der Kammer, F., Lead, J. R., Hassellöv, M., Owen, R., and Crane, M. 2012. "The Ecotoxicology and Chemistry of Manufactured Nanoparticles." *Ecotoxicology* 21 (4): 933–972. DOI: [10.1007/s10646-008-0199-8](https://doi.org/10.1007/s10646-008-0199-8)

Khan, N., Ali, S., Latif, S., and Mehmood, A. 2022. "Biological Synthesis of Nanoparticles and Their Applications in Sustainable Agriculture Production." *Natural Science* 14: 226–234. DOI: [10.4236/ns.2022.146022](https://doi.org/10.4236/ns.2022.146022)

Kuppusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., and Govindan, N. 2016. "Biosynthesis of Metallic Nanoparticles Using Plant Derivatives and Their New Avenues in Pharmacological Applications—An Updated Report." *Saudi Pharmaceutical Journal* 24: 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.013>.

Mahboub, H., Khedr, M., Elshopakey, G., Shakweer, M., Mohamed, D., Ismail, T., Ismail, S., and Abdel Rahman, A. 2021. "Impact of Silver Nanoparticles Exposure on Neuro-Behavior, Hematology, and Oxidative Stress Biomarkers of African Catfish (*Clarias gariepinus*)." *Aquaculture* 544: 737082. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737082>.

Malik, S., Muhammad, K., and Waheed, Y. 2023. "Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry." *Molecules* 28 (2): 661. <https://doi.org/10.3390/molecules28020661>.

Naguib, M., Mahmoud, U.M., Mekkawy, I.A., and Sayed, A.E.H. 2020. "Hepatotoxic effects of silver nanoparticles on *Clarias gariepinus*; Biochemical, histopathological, and histochemical studies" *Toxicology Reports* 7: 133-141. DOI: [10.1016/j.toxrep.2020.01.002](https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.01.002).

Ortega, M.P., López-Marín, L.M., Millán-Chiu, B., Manzano-Gayosso, P., Acosta-Torres, L.S., García-Contreras, R., Manisekaran, R. 2021. "Polymer mediated synthesis of cationic silver nanoparticles as an effective anti-fungal and anti-biofilm agent against *Candida* species" *Colloid and Interface Science Communications* 43: 100449. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100449>

Silva, C. A., Ribeiro, B. M., Trotta, C. V., Perina, F. C., Martins, R., Abessa, D. M. S., Barbieri, E., Simões, M. F., and Ottoni, C. A. 2022. "Effects of Mycogenic Silver Nanoparticles on Organisms of Different Trophic Levels." *Chemosphere* 308: 136540. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136540>.

Souza, T.A.J., Souza, L.R.R., Franchi, L.P. 2019. "Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity." *Ecotoxicology and environmental safety* 171: 691-700. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.095>.

Tesser, M. E., Guilger, M., Bilesky-José, N., Pasquoto-Stigliani, T., Risso, W., Bianchini, A., and Martinez, C. B. 2024. "Effects of Biogenic Metallic Nanoparticles (Ag, TiO₂, Fe) on the Freshwater Fish *Prochilodus lineatus*: Bioaccumulation and Multiple Biomarkers." *Environmental Science and Pollution Research* (in press). <https://doi.org/10.2139/ssrn.4772482>.

CAPÍTULO ÚNICO

EFEITOS DE AgNPs DE ORIGEM BIOGÊNICA NO METABOLISMO DE ROTINA DE *Astyanax ribeirae* e *Danio rerio*

Renata Antunes Portis; Edison Barbieri

Email: portisrenata@gmail.com

Instituto de Pesca, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimento, de São Paulo, (SAASP) - Governo do Estado de São Paulo, Brazil
Artigo será submetido para revista Nanotoxicology (ISSN: 1743-5390) - Qualis A1

Resumo

O estudo aborda os efeitos ecotoxicológicos de nanopartículas de prata (AgNPs) biogênicas nos peixes *Astyanax ribeirae* (lambari) e *Danio rerio* (peixe-zebra). As AgNPs biogênicas derivadas de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) foram também revestidas de polietilenoimina (PEI) enquanto que, as micogênicas foram sintetizadas utilizando um fungo isolado de sedimento marinho. As nanopartículas foram caracterizadas quanto à morfologia e estabilidade coloidal, utilizando técnicas como microscopia eletrônica de transmissão (MET), tamanho tamanho hidrodinâmico por espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial Zeta ($P\zeta$) e índice de polidispersão (PDI). Os ensaios de toxicidade aguda foram conduzidos mensurando a letalidade das AgNPs nas duas espécies de peixes. *Astyanax ribeirae* mostrou-se mais sensível, com mortalidade total observada a 500 $\mu\text{g/L}$ de AgNPs_{BCA} e 1000 $\mu\text{g/L}$ de AgNPs_{BCA-PEI}. Já as AgNPs_{IBCLP22} apresentaram alta toxicidade, causando 100% de mortalidade a 500 $\mu\text{g/L}$. Em relação ao *Danio rerio*, a toxicidade foi menos expressiva, com menor letalidade nas mesmas concentrações. Os testes metabólicos indicaram que *A. ribeirae* exposto às AgNPs_{BCA} demonstrou um padrão bifásico no consumo de oxigênio, com redução em concentrações mais baixas e aumento em doses elevadas. A excreção de amônia diminuiu com o aumento da concentração das nanopartículas. Com as AgNPs_{BCA-PEI}, houve declínio no consumo de oxigênio e leve alteração na excreção de amônia, com mortalidade total em concentrações mais altas. *Danio rerio* exibiu aumento no consumo de oxigênio até 500 $\mu\text{g/L}$ de AgNPs_{BCA}, mas uma diminuição significativa a 1000 $\mu\text{g/L}$. A excreção de amônia também variou, com um pico em 100 $\mu\text{g/L}$ e queda em doses intermediárias. Este estudo fornece novos dados sobre os impactos das AgNPs biogênicas, especialmente em relação às diferentes sensibilidades das duas espécies de peixes. Esses resultados são importantes para a elaboração de diretrizes de segurança ambiental para o uso dessas nanopartículas, considerando suas potenciais implicações ecológicas e toxicológicas.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata biogênicas, Toxicidade em peixes, Bagaço de cana-de-açúcar, Nanotoxicologia, Parâmetros fisiológicos.

Abstract

The study addresses the ecotoxicological effects of biogenic silver nanoparticles (AgNPs) on two fish species: *Astyanax ribeirae* (Lambari) and *Danio rerio* (Zebrafish). The biogenic AgNPs, derived from sugarcane bagasse and a fungus isolated from marine sediments, possess physicochemical properties that can influence their toxicity in aquatic environments. The research characterizes these nanoparticles in terms of morphology and colloidal stability, using techniques such as scanning and transmission electron microscopy, as well as analyses of hydrodynamic size and zeta potential. Acute toxicity assays were conducted in the laboratory, measuring the lethality of the AgNPs in both fish species. *Astyanax ribeirae* was found to be more sensitive, with total mortality observed at 500 µg/L of AgNP_{SBCA} and 1000 µg/L of AgNP_{SBCA-PEI}. The AgNP_{SIBCLP22} showed high toxicity, causing 100% mortality at 500 µg/L. In contrast, *Danio rerio* exhibited lower toxicity, with less lethality at the same concentrations. Metabolic tests indicated that *A. ribeirae* exposed to AgNP_{SBCA} demonstrated a biphasic pattern in oxygen consumption, with a reduction at lower concentrations and an increase at higher doses. Ammonia excretion decreased with the increasing concentration of nanoparticles. Exposure to AgNP_{SBCA-PEI} resulted in a decline in oxygen consumption and slight alteration in ammonia excretion, with total mortality observed at higher concentrations. *Danio rerio* showed an increase in oxygen consumption up to 500 µg/L of AgNP_{SBCA}, but a significant decrease at 1000 µg/L. Ammonia excretion also varied, with a peak at 100 µg/L and a drop at intermediate doses. This study provides new insights into the impacts of biogenic AgNPs, particularly regarding the different sensitivities of the two fish species. These findings are crucial for the development of environmental safety guidelines for the use of these nanoparticles, considering their potential ecological and toxicological implications.

Keywords: Biogenic silver nanoparticles, Fish toxicity, Sugarcane bagasse, Nanotoxicology, Physiological parameters

1. Introdução

Nas últimas décadas, as nanopartículas de prata (AgNPs) despontaram como ferramentas versáteis em diversos setores industriais, impulsionadas por suas propriedades antimicrobianas, eletrônicas e catalíticas singulares (Xu *et al.*, 2020). Sua aplicação em produtos como cosméticos, dispositivos médicos, eletrônicos, têxteis, revestimentos e sistemas de purificação de água é cada vez mais difundida (Souza *et al.*, 2019; Altammar *et al.*, 2023). No entanto, o crescente interesse e a expansão de suas aplicações tecnológicas suscitaram sérias preocupações quanto à toxicidade potencial dessas nanopartículas para

organismos vivos e, conseqüentemente, para os ecossistemas aquáticos (Malik *et al.*, 2023).

Estudos prévios já demonstraram os efeitos deletérios das AgNPs em organismos aquáticos, incluindo alterações no comportamento, como a diminuição da atividade natatória em bagre africano (*Clarias gariepinus*) (Naguib *et al.*, 2020), e impactos na fisiologia, como o aumento do estresse oxidativo em larvas e embriões de Peixe Zebra (*Danio rerio*) (Kokturk *et al.*, 2021). Além disso, a bioacumulação de AgNPs em tecidos de peixes, como brânquias e fígado, tem sido relatada em diversas espécies, como a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (Khallaf *et al.*, 2017) e a carpa comum (*Cyprinus carpio*) (Krishnasamy *et al.*, 2023).

A toxicidade das AgNPs em organismos aquáticos tem sido objeto de crescente atenção científica, uma vez que esses ambientes frequentemente se tornam o destino das nanopartículas liberadas no meio ambiente (Lazim *et al.*, 2023). A liberação de AgNPs no ambiente pode ocorrer através de diversas fontes, como efluentes industriais, esgoto doméstico e produtos de consumo que contêm AgNPs. Uma vez no ambiente aquático, as AgNPs podem interagir com a biota, incluindo peixes, algas, invertebrados e microrganismos, desencadeando uma série de efeitos adversos (Lazim *et al.*, 2023).

Contudo, ainda persistem lacunas no entendimento de como diferentes tipos de AgNPs, especialmente aquelas de origem biogênica, afetam distintas espécies de peixes. As AgNPs biogênicas são sintetizadas a partir de organismos vivos, como plantas, fungos e bactérias, e apresentam características físico-químicas distintas das AgNPs produzidas por métodos químicos e físicos (Xu *et al.*, 2020). Algumas dessas diferenças como a distribuição de tamanho controlado, formas mais variadas e maior estabilidade são devido à presença de biomoléculas em sua superfície, que podem contribuir para sua maior biocompatibilidade (Khan *et al.*, 2022). Essas diferenças podem influenciar sua toxicidade e seus mecanismos de ação em organismos aquáticos. A compreensão desses mecanismos de toxicidade é fundamental para o desenvolvimento de medidas de mitigação e prevenção dos impactos ambientais causados por essas nanopartículas (Kumar *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, este estudo se propõe a investigar os efeitos de diferentes AgNPs de origem biogênica em duas espécies de peixes com relevância ecológica e econômica: o Lambari (*Astyanax ribeirae*) e o Peixe-zebra (*Danio rerio*). A escolha dessas espécies se justifica por sua distribuição geográfica, importância ecológica e sensibilidade a diferentes tipos de poluentes, tornando-os organismos modelo relevantes para estudos ecotoxicológicos (APHA, 2012). De acordo com Oyakawa *et al* (2006) *Astyanax ribeirae* é um caracádeo endêmico da bacia do rio Ribeira de Iguape, popularmente conhecido como lambari, essa espécie vêm sendo utilizada em estudos de ecotoxicologia devido à sua fácil manutenção em laboratório e sensibilidade a diferentes contaminantes (Barbieri *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2022; Aguiar *et al.*, 2024). Já o *Danio rerio* é um modelo amplamente utilizado em pesquisas biomédicas e toxicológicas, devido ao seu rápido desenvolvimento embrionário, genoma sequenciado e alta similaridade genética com (Teame *et al.*, 2019). Considerando as diferenças na fisiologia e na distribuição geográfica dessas duas espécies, é plausível que elas apresentem respostas metabólicas distintas à exposição a nanopartículas de prata (AgNPs). Além disso, tais respostas metabólicas devem variar em função da origem das AgNPs. A avaliação dos efeitos dessas AgNPs em peixes é crucial para compreender os potenciais impactos ecológicos e toxicológicos associados ao seu uso crescente. Além disso, os resultados deste estudo podem auxiliar na elaboração de diretrizes e regulamentações para o uso seguro de AgNPs, minimizando os riscos para os ecossistemas aquáticos e a saúde humana.

2. Material e métodos

2.1 Biossíntese de AgNPs biológicas

2.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

As nanopartículas de prata (AgNPs) foram sintetizadas utilizando extrato aquoso do bagaço de cana de açúcar (BCA). De maneira simplificada, o BCA foi incorporado a um volume de água ultrapura na razão de 1:20. A mistura foi aquecida a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente, com o auxílio de um sistema

de filtração, o extrato foi filtrado em papel filtro Whatman (80g/m²-4µm). A síntese ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL que continham 50 mL de extrato ajustado a pH 11 e 50µL de solução de nitrato de prata (AgNO₃) na concentração final da solução de 1,0 mM (107 mg/L de Ag). A mistura foi incubada em plataforma orbital com agitação de 180 rpm, temperatura de 30 °C por 24 horas, protegida da luz em vidro âmbar.

Estabilização

As AgNPs de bagaço de cana de açúcar (AgNPs_{BCA}) foram modificadas quanto a sua carga de superfície utilizando o polieletrólito catiônico polietilenoimina (PEI) de carga positiva. A reação ocorreu em frasco Erlenmeyer de 250 mL que continha 50 mL de solução coloidal de AgNPs (107 mg/L de Ag) ajustada a pH 9 e 95 µL de solução de PEI, equivalente a 190 mg/L no volume final. A mistura permaneceu incubada a 30 °C, sob agitação de 180 rpm e protegida da luz, por 24 h. As AgNPs_{BCA} revestidas de PEI foram codificadas de AgNPs_{BCA-PEI}.

2.1.2 Fungo isolado de sedimento marinho

O fungo *P. polonicum* IBCLP22, previamente isolado do sedimento marinho da Baía do Araçá (São Sebastião, SP), foi utilizado para a síntese extracelular de AgNPs_{IBCLP22}, conforme descrito por Silva *et al.* (2022) e Ottoni *et al.* (2017). O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) a 30 °C por 7 dias. Cinco discos de 6 mm de diâmetro, retirados da periferia da cultura, foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio MGLP (extrato de malte 3 g/L, glicose 10 g/L, extrato de levedura 3 g/L, peptona bacteriológica 35 g/L). O cultivo foi mantido sob agitação (150 rpm) a 30 °C por 72 horas.

Após o crescimento, a biomassa fúngica foi lavada com 300 mL de água destilada estéril e transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de água deionizada estéril. Essa mistura foi mantida sob agitação a 150 rpm e a 30 °C por 72 horas. Ao final do período, realizou-se uma nova filtração

utilizando membranas Whatman (0,45 μm e 0,22 μm). Em seguida, foram adicionados aproximadamente 50 mL do extrato fúngico e 500 μL de uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) para a concentração final da solução de 1,0 mM em um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Para o grupo controle, o mesmo procedimento foi adotado, porém a biomassa foi autoclavada após o crescimento no meio MGLP.

2.2 Caracterização das AgNPs biológicas

Antes de cada análise de caracterização, as AgNPs foram agitadas suavemente e quando possível, sonicadas em banho ultrassom. As amostras foram analisadas na suspensão estoque, na concentração de 1 mM de AgNO_3 .

As faixas de ressonância plasmônica de superfície (SPR) das AgNPs foram analisadas utilizando um espectrofotômetro UV-visível (U-2000 Hitachi, Japão) no intervalo de 200 a 800 nm. O tamanho hidrodinâmico (DLS), o potencial zeta ($P\zeta$) e o índice de polidispersão (PDI) foram avaliados com o Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido).

A morfologia das AgNPs foi investigada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a MET, as suspensões de AgNPs foram depositadas em grades de cobre revestidas com carbono (40 \times 40 μm) por meio do método de gotejamento. Após duas horas de secagem, as medições foram realizadas em um microscópio eletrônico JEOL JEM-2100 operando a 200 kV.

Na análise por MEV, as amostras foram colocadas sobre uma fita de carbono em um porta-amostras (stub) e cobertas com uma fina camada de liga de ouro-paládio por sputtering, utilizando um mini revestidor modelo Polaron Emitech SC7620.

2.3 Manejo dos animais

Os animais utilizados nos experimentos foram obtidos por meio de colaborações com produtores locais. Os organismos foram encaminhados para o Laboratório de Ecotoxicologia do Instituto de Pesca, no Núcleo de Pesquisa e

Desenvolvimento do Litoral Sul em Cananéia, São Paulo, onde foram mantidos até a utilização nos experimentos.

Os animais foram dispostos em tanques previamente higienizados que possuíam aeração contínua e renovação diária da água. Os organismos foram alimentados diariamente, *ad libidum*, com ração peletizada, (comercial extrusada, 2,0 mm com 36% de proteína bruta, 7% de extrato etéreo e 4% de fibra bruta), colocados nos tanques com capacidade máxima de 1000 L, garantindo assim suas necessidades nutricionais até serem selecionados para o experimento.

2.4 Testes de toxicidade aguda

Os experimentos ocorreram em aquários com 5 L de água desclorada, sob aeração constante e mantidos a uma temperatura de 23 ± 2 °C. As AgNPs foram diluídas em água filtrada e desclorada 15 minutos antes do início de cada experimento, de acordo com a concentração final desejada.

As duas espécies de peixes foram divididas em quatro grupos experimentais, cada um com seis réplicas: um grupo controle, sem exposição a AgNPs, e três grupos de tratamento com diferentes concentrações de nanopartículas (100 µg/L, 500 µg/L e 1000 µg/L). No entanto, os indivíduos de *A. ribeirae* expostos às AgNPs_{SIBCLP22} apresentaram alta sensibilidade, inviabilizando o teste na concentração de 1000 µg/L. Devido a essa observação, duas novas concentrações intermediárias (50 µg/L e 100 µg/L) foram introduzidas, resultando em grupos de tratamento que incluíram um controle, as concentrações intermediárias e uma concentração máxima de 500 µg/L para as AgNPs.

2.5 Metabolismos de rotina

O metabolismo dos animais foi avaliado por meio de testes de respirometria em sistema fechado, conforme descrito por Damato e Barbieri (2012). Após 24 horas de exposição às diferentes concentrações de AgNPs, tanto os indivíduos de *A. ribeirae*, quanto de *D. rerio*, foram transferidos para respirômetros individuais, onde passaram por uma aclimatação de 1 hora com circulação contínua de água, minimizando qualquer estresse potencial devido ao manuseio e tratamento. Após esse período, os respirômetros foram selados, ajustando-se o tempo de confinamento para que a concentração de oxigênio no final do experimento não caísse abaixo de 70% da concentração inicial.

Ao término do confinamento, os respirômetros foram abertos e amostras de água foram coletadas imediatamente por sifonamento com mangueiras de silicone, utilizando frascos de vidro âmbar. Foram coletados 60 mL de água para a determinação do consumo de oxigênio e 20 mL para a análise de excreção de amônia. O oxigênio dissolvido foi determinado pelo método de Winkler (1888), no qual a amostra é fixada com cloreto ou sulfato de manganês e hidróxido de

sódio. O $\text{Mn}(\text{OH})_4$ resultante reage com o oxigênio, formando um composto de manganês trivalente, que posteriormente é analisado após acidificação e reação com iodeto de sódio, formando I_2 . A quantidade de I_3^- gerada, proporcional ao O_2 presente, foi determinada por titulação com tiosulfato de sódio, utilizando um complexo amarelo para identificar o ponto final.

O consumo específico de oxigênio foi calculado com base no volume do respirômetro, no peso úmido do animal e no tempo de confinamento. Para a excreção de amônia, utilizou-se o método de Nessler (Greenberg, 1995), em que 20 mL da amostra foram reagidos com 1 mL do reagente de Nessler. A absorvância foi medida após 10 minutos em um espectrofotômetro a 410 nm, e a concentração de amônia foi determinada por comparação com uma curva-padrão.

As concentrações de oxigênio e amônia no início e no fim do confinamento foram usadas para calcular o consumo específico de oxigênio ($\text{mL O}_2/\text{g/L/h}$) e a excreção específica de amônia (mg/L/g/h), levando em conta o volume do respirômetro, o peso do animal e o tempo de confinamento.

2.6 Análise estatística

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi realizado inicialmente para avaliar a distribuição dos dados. Como a distribuição não foi normal, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para analisar diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações investigadas.

3. Resultados

3.1 Caracterização das AgNPs

As AgNPs sintetizadas a partir do bagaço de cana-de-açúcar ($\text{AgNPs}_{\text{BCA}}$), revestidas por PEI ($\text{AgNPs}_{\text{BCA-PEI}}$) e pelo fungo IBCLP22 ($\text{AgNPs}_{\text{IBCLP22}}$), apresentaram uma tonalidade marrom característica e banda de ressonância plasmônica de superfície (SPR) na faixa de 420-460 nm, confirmando a presença de AgNPs.

A Tabela 1 apresenta os dados de tamanho hidrodinâmico (DLS), potencial zeta ($P\zeta$) e índice de dispersão (PDI) das AgNPs. As AgNPs_{IBCLP22} apresentaram tamanho e PDI indicativos de uma dispersão monodispersa, sem formação de agregados. O potencial zeta das AgNPs_{BCA-PEI} tornou-se positivo após a modificação com polietilenoimina (PEI), devido à maior exposição de grupos amina na superfície do polímero, conferindo maior estabilidade coloidal e potencial atividade antimicrobiana, conforme observado por Ortega *et al.* (2021).

Tabela 1. Caracterização físico-química de AgNPs_{BCA}, AgNPs_{BCA-PEI} e AgNPs_{IBCLP22} obtidas por espalhamento dinâmico de luz (DLS), zeta potencial (ζ), índice de polidispersidade (PDI) e pH.

AgNPs	DLS (nm)	$P\zeta$ (em água, mV)	PDI	pH
BCA	31,2	-22,00	0,234	11
BCA-PEI	49,9	+40,00	0,220	9
IBCLP22	36,9	-30,92	0,211	8,5

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelaram que todas as AgNPs possuíam forma esférica e tamanho entre 20 e 70 nm (Fig. 1). As AgNPs_{IBCLP22}, (Fig 1A) apresentaram um padrão monodisperso na MET, com tamanho médio entre 22,5 e 42,0 nm, corroborando os resultados de DLS. Valores similares entre MET e DLS foram obtidos para as AgNPs_{BCA} (Fig. 1B) e AgNPs_{BCA-PEI} (Fig.1C).

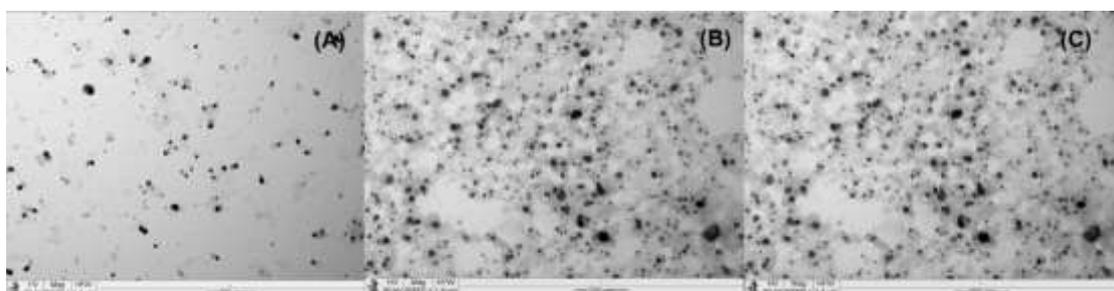


Figura 1. Imagens de MET de (A) AgNPs_{IBCLP22}; (B) AgNPs_{BCA} e (C) AgNPs_{BCA-PEI}. Escala 200nm.

Todas as AgNPs apresentaram pH alcalino, independentemente da origem ou do revestimento. O pH alcalino contribui para a estabilidade das AgNPs, influenciando sua carga superficial, agregação e dissolução oxidativa, conforme descrito por Fernando e Zhou (2019). No entanto, é importante ressaltar que o ambiente aquático, um dos principais receptores de AgNPs, pode alterar rapidamente suas propriedades físico-químicas, como carga superficial e morfologia, devido à interação com componentes ambientais (Souza *et al.*, 2019; Tortella *et al.*, 2020).

3.2 Toxicidade aguda

A espécie nativa, *A. ribeirae*, mostrou-se mais sensível às AgNPs em comparação com o *D. rerio*, apresentando taxas de mortalidade significativamente maiores (Tabela 2).

Tabela 2. Mortalidade (%) de *Astyanax ribeirae* e *Danio rerio* expostos a diferentes AgNPs.

AgNPs	Concentração (µg/L)	<i>A. ribeirae</i> (n=6)	<i>D. rerio</i> (n=6)
IBCLP22	Controle	0	0
	50	0	0
	100	0	0
	500	100	0
BCA	Controle	16.6	0
	100	16.6	0
	500	100	0
	1000	16.6	0
BCA-PEI	Controle	16.6	0
	100	0	0
	500	0	0
	1000	100	0

A AgNPs_{BCA} causou 100% de mortalidade em *A. ribeirae* na concentração de 500 µg/L, mas não a 1000 µg/L, sugerindo um possível efeito de saturação ou mecanismo de defesa ativado em concentrações mais elevadas. A AgNPs_{BCA-PEL}, por sua vez, induziu mortalidade total apenas a 1000 µg/L, indicando uma liberação mais lenta e potencialmente mais segura em doses menores. As AgNP_{IBCLP22} foram extremamente tóxicas na concentração de 500 µg/L para *A. ribeirae*, inviabilizando o teste em 1000 µg/L e motivando a inclusão de concentrações intermediárias (50 e 100 µg/L) para uma avaliação mais precisa de seus efeitos.

3.3 Metabolismo de rotina

Os indivíduos de *A. ribeirae* quando expostos a AgNPs_{BCA} apresentaram um padrão bifásico no consumo de oxigênio, com diminuição na concentração de 100 µg/L e aumento em 1000 µg/L, em relação ao grupo controle (Fig. 2A). Enquanto o *D. rerio* apresentou uma resposta de aumento no consumo específico de O₂ em concentrações de até 500 µg/L. No entanto, esse consumo diminuiu significativamente na concentração mais alta de 1000 µg/L (Fig. 2B).

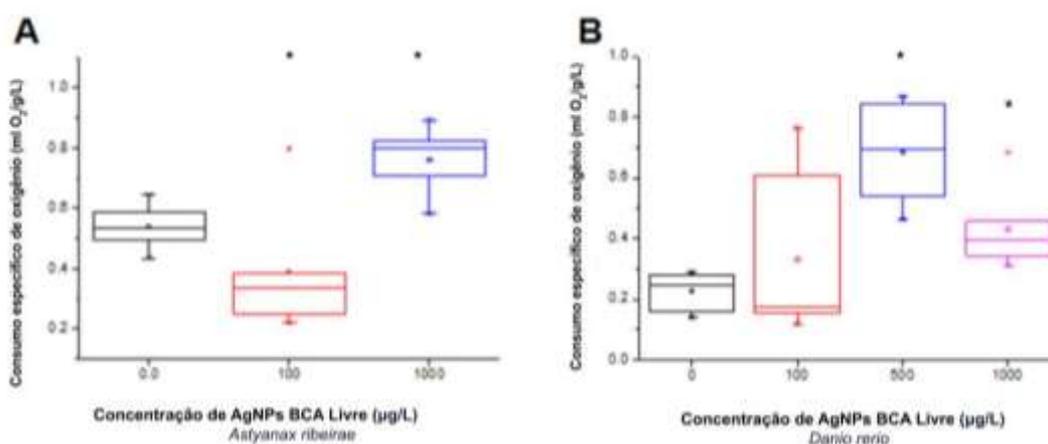


Figura 2. Efeitos da exposição à AgNPs_{BCA} no consumo específico de oxigênio (mL O₂/g/L/h) em (A) *Astyanax ribeirae*, (B) *Danio rerio*. As barras coloridas representam o intervalo dos valores de consumo em cada concentração (0, 100, 500 e 1000 µg/L) de AgNP (N=6). Linhas acima/abaixo das barras: valores

discrepantes. Asteriscos: assinalam grupos com diferenças estatisticamente significativas.

Astyanax ribeirae expostos a AgNPs_{BCA-PEI} apresentaram uma diminuição gradual no consumo específico de O₂ (Fig. 3A). Essa resposta metabólica foi diferente para *D. rerio*, que após a exposição as AgNPs_{BCA-PEI}, apresentaram um aumento gradual no consumo de específico de oxigênio em relação ao grupo controle nas concentrações de 100 e 500 µg/L. Para os peixes dessa mesma espécie expostos à 1000 µg/L esse consumo foi muito parecido com o grupo exposto na concentração anterior, de 500 µg/L (Fig. 3B).

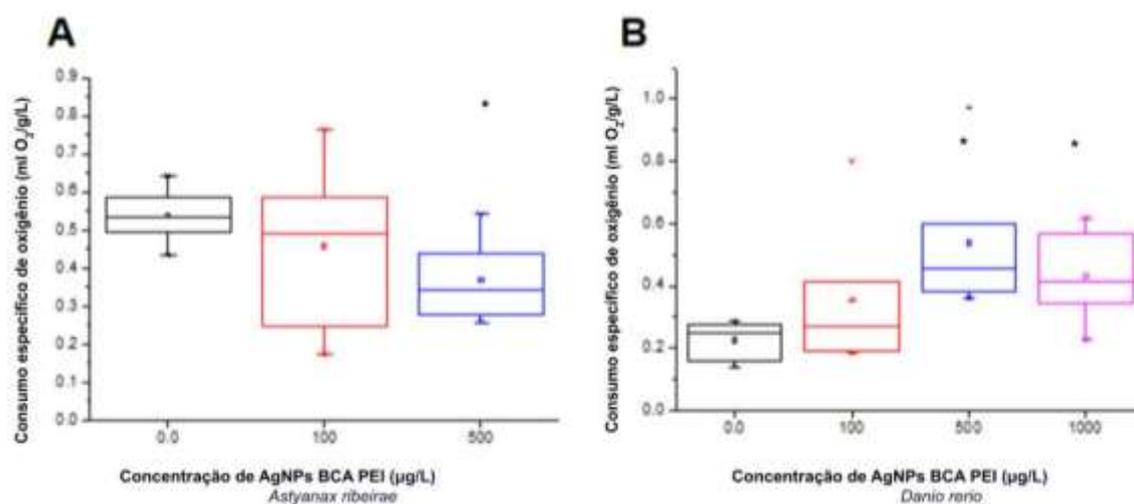


Figura 3. Efeitos da exposição à AgNP_{BCA-PEI} no consumo específico de oxigênio (mL O₂/g/L/h) em (A) *Astyanax ribeirae*, (B) *Danio rerio*. As barras coloridas representam o intervalo dos valores de consumo em cada concentração (0, 100, 500 e 1000 µg/L) de AgNP (N=6). Linhas acima/abaixo das barras: valores discrepantes. Asteriscos: assinalam grupos com diferenças estatisticamente significativas.

Em relação às AgNPs_{IBCLP22}, observou-se um aumento progressivo no consumo específico de oxigênio entre os peixes da espécie *A. ribeirae* (Fig. 4A). Para *D. rerio* esse parâmetro foi maior em todas as concentrações em comparação com o grupo controle. A concentração de 50 µg/L apresentou o maior consumo

específico de O_2 , enquanto nas concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g/L}$ a espécie apresentou consumo semelhante. (Fig. 4B)

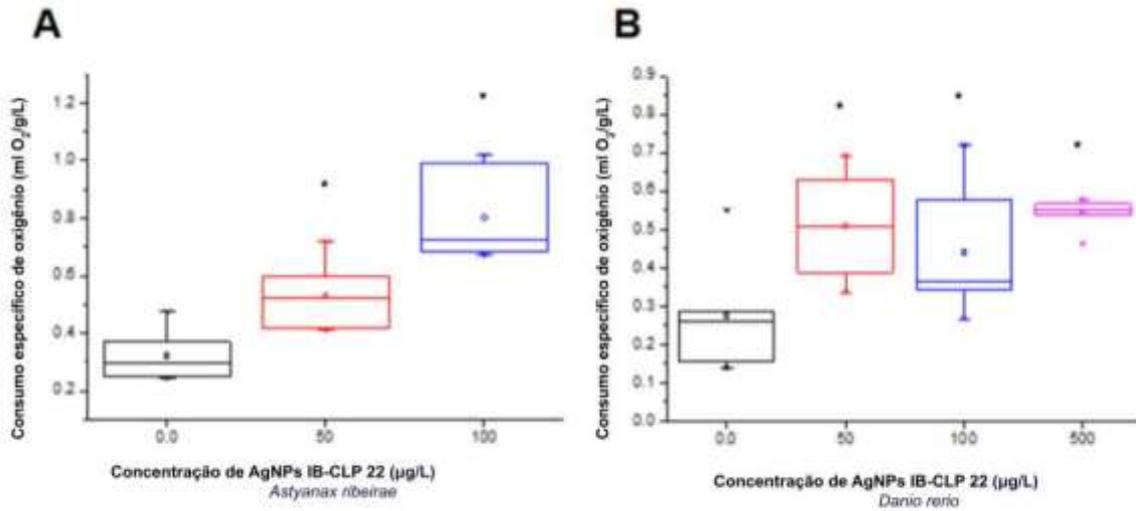


Figura 4. Efeitos da exposição à AgNP_{IB-CLP22} no consumo específico de oxigênio (mL O_2 /g/L/h) em (A) *Astyanax ribeirae*, (B) *Danio rerio*. As barras coloridas representam o intervalo dos valores de consumo em cada concentração (0, 50, 100 e 500 $\mu\text{g/L}$) de AgNP (N=6). Linhas acima/abaixo das barras: valores discrepantes. Asteriscos: assinalam grupos com diferenças estatisticamente significativas.

A excreção específica de amônia exibiu uma relação dose-dependente, em indivíduos de *A. ribeirae*, diminuindo com o aumento da concentração de AgNPs_{BCA} (Fig. 5A). A concentração de 500 $\mu\text{g/L}$ de AgNPs_{BCA} resultou em 100% de mortalidade dos lambaris, impossibilitando a avaliação deste parâmetro fisiológico nesta dose. Em *D. rerio* na concentração de 100 $\mu\text{g/L}$, foi observado um aumento significativo na excreção específica de amônia, seguido por uma redução relativamente modesta na concentração de 500 $\mu\text{g/L}$, que se manteve na concentração máxima (Fig 5B).

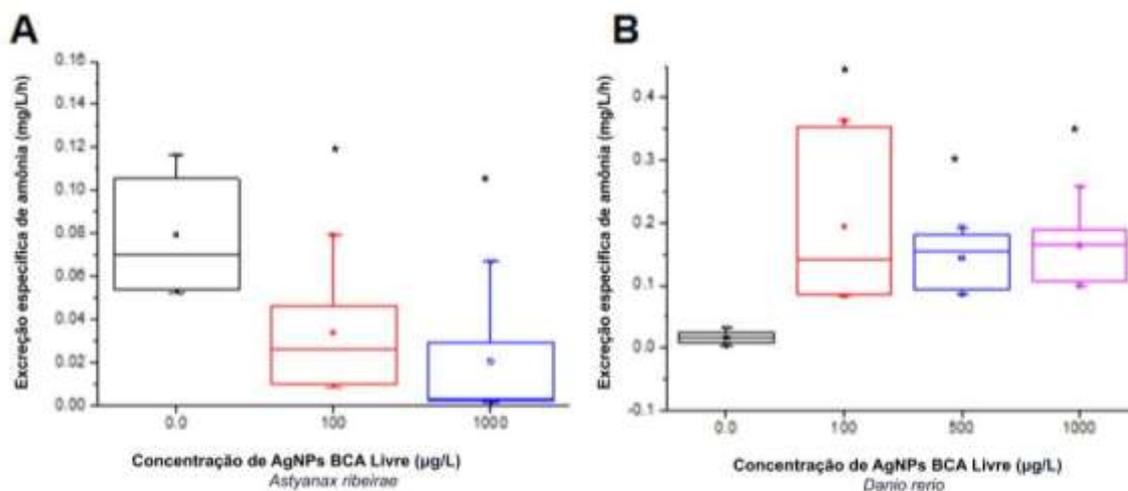


Figura 5. Efeitos da exposição à AgNP_{BCA} na excreção específica de amônia (mg/L/g/h) em (A) *Astyanax ribeirae*, (B) *Danio rerio*. As barras coloridas representam o intervalo dos valores de excreção em cada concentração (0, 100, 500 e 1000 µg/L) de AgNP (N=6). Linhas acima/abaixo das barras: valores discrepantes. Asteriscos: assinalam grupos com diferenças estatisticamente significativas.

Em relação a excreção específica de amônia com o uso das AgNPs_{BCA-PEL}, o observado foi uma redução neste parâmetro para *A. ribeirae* (Fig. 6A), em relação ao grupo controle. Enquanto para *D. rerio* todas as concentrações testadas apresentaram valores mais altos do que o grupo sem tratamento, tendo um pico na concentração máxima de 1000 µg/L (Fig. 6B).

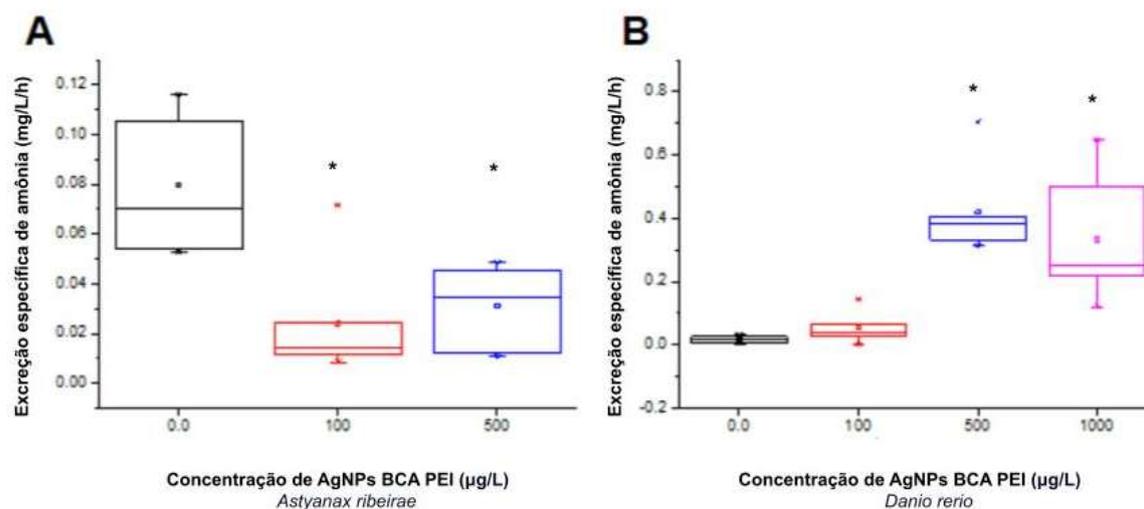


Figura 6. Efeitos da exposição à AgNP_{BCA-PEI} na excreção específica de amônia (mg/L/g/h) em (A) *Astyanax ribeirae*, (B) *Danio rerio*. As barras coloridas representam o intervalo dos valores de excreção em cada concentração (0, 100, 500 e 1000 µg/L) de AgNP (N=6). Linhas acima/abaixo das barras: valores discrepantes. Asteriscos: assinalam grupos com diferenças estatisticamente significativas.

A excreção específica de amônia em *A. ribeirae* expostos a AgNPs_{SIB-CLP22} aumentou de forma sutil e de acordo com a concentração da AgNP em que estava submetido (Fig 7A). Em *D. rerio* todas as três concentrações comparadas ao grupo controle também apresentaram um aumento na excreção específica de amônia, o tratamento com 100 µg/L apresentou a maior excreção específica e na concentração seguinte de 500 µg/L houve uma redução neste parâmetro, ainda assim esse valor foi maior do que o grupo controle (Fig. 7B).

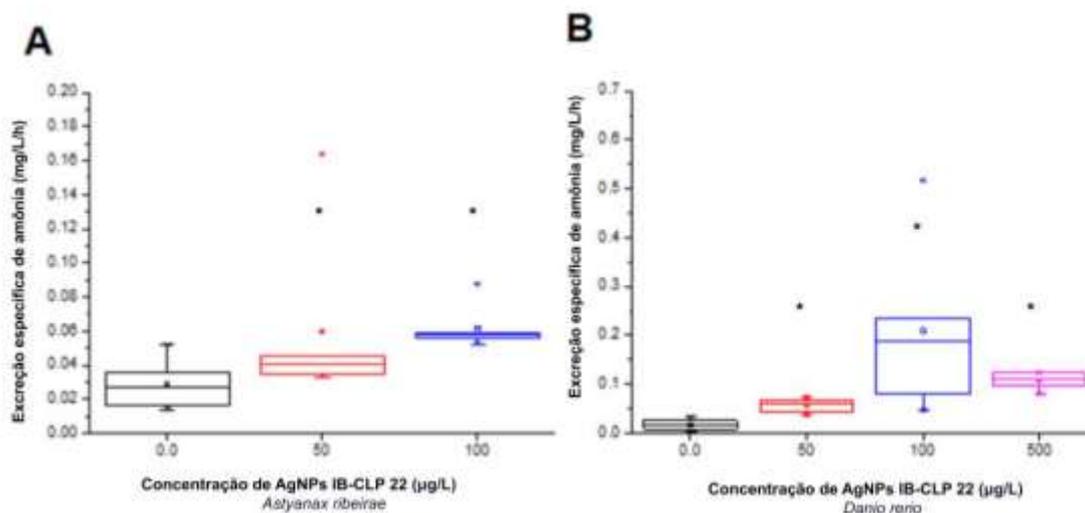


Figura 7. Efeitos da exposição à AgNPs IB-CLP22 na excreção específica de amônia (mg/L/g/h) em (A) *Astyanax ribeirae*, (B) *Danio rerio*. As barras coloridas representam o intervalo dos valores de excreção em cada concentração (0, 50, 100 e 500 µg/L) de AgNP (N=6). Linhas acima/abaixo das barras: valores discrepantes. Asteriscos: assinalam grupos com diferenças estatisticamente significativas.

4. Discussão

4.1 Caracterização das AgNPs

A caracterização físico-química das nanopartículas de prata biogênicas (AgNPs) revelou propriedades fundamentais que influenciam diretamente sua estabilidade coloidal e seus potenciais efeitos tóxicos. As AgNPs_{IBCLP22} exibiram uma dispersão monodispersa, sem formação de agregados, o que corrobora a eficiência do revestimento fúngico em manter a estabilidade das partículas. Estudos anteriores indicam que uma maior estabilidade coloidal pode reduzir a formação de agregados e aumentar a biodisponibilidade de nanopartículas em ambientes aquáticos, aumentando potencialmente sua toxicidade (Tortella *et al.*, 2020).

O potencial zeta positivo das AgNPs_{SBCA-PEI} indica que o revestimento com polietilenoimina (PEI) melhora a estabilidade eletrostática, reduzindo a liberação

de íons prata, o que foi associado a uma menor toxicidade, conforme Ortega *et al.* (2021) também observaram em nanopartículas com revestimento de PEI. O pH alcalino encontrado nas amostras, independentemente da origem ou do revestimento, também pode influenciar as interações das nanopartículas com o meio ambiente. Fernando e Zhou (2019) ressaltam que o pH pode modular a solubilidade e a estabilidade das AgNPs, afetando a forma como interagem com os organismos aquáticos. No entanto, é importante lembrar que em ambientes ricos em íons, como cloretos e sulfatos, essas propriedades podem ser alteradas, como descrito por Souza *et al.* (2019), o que ressalta a necessidade de mais estudos sob condições ambientais realistas.

4.2 Toxicidade aguda

Os dados de toxicidade aguda revelam uma clara diferença nas respostas entre *A. ribeirae* e *D. rerio*. *Astyanax ribeirae* apresentou maior sensibilidade às AgNPs, especialmente às AgNPs_{SBCA} e AgNPs_{SIBCLP22}, com 100% de mortalidade em 500 µg/L. Estudos semelhantes, como o de Schultz *et al.* (2021), observaram que a que os efeitos de AgNPs pode variar significativamente entre espécies, os autores avaliaram a resposta de três espécies de peixes em fases iniciais, a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a truta do lago (*Salvelinus namaycush*) e o lúcio do norte (*Esox lucius*) e relataram uma maior sensibilidade nos embriões e nas larvas de lúcio do norte.

O comportamento atípico observado nas AgNPs_{SBCA}, com mortalidade total em 500 µg/L, mas não em 1000 µg/L, pode ser explicado por um efeito de saturação. Isso pode ocorrer devido à agregação das nanopartículas em concentrações mais elevadas, resultando em menor biodisponibilidade e, conseqüentemente, toxicidade reduzida. Esse padrão bifásico foi observado em outros estudos sobre a exposição de peixes a metais pesados, onde a produção de metalotioneínas é ativada em níveis mais altos de contaminação, reduzindo a toxicidade (Ribeiro, 2020). A toxicidade extrema das AgNPs_{SIBCLP22}, com 100% de mortalidade a 500 µg/L para *A. ribeirae*, destaca a necessidade de uma avaliação

mais rigorosa do uso dessas nanopartículas biogênicas em ambientes aquáticos. Estudos prévios, como o de Silva *et al.* (2022), já mostraram que nanopartículas derivadas de fungos podem exibir alta toxicidade devido à presença de biomoléculas que podem influenciar suas propriedades físico-químicas.

4.3 Efeitos metabólicos

Os efeitos metabólicos observados em *A. ribeirae* e *D. rerio* indicam que as AgNPs afetam diretamente o consumo específico de oxigênio e a excreção específica de amônia. O padrão bifásico de consumo de oxigênio observado em *A. ribeirae* após a exposição às AgNPs_{BCA} sugere que, em concentrações mais baixas, as nanopartículas induzem estresse oxidativo, que é compensado em concentrações mais altas por mecanismos de defesa metabólicos. Estudos anteriores, como o de Abdel-Latif *et al.* (2021), também relataram uma relação semelhante entre o estresse oxidativo e o consumo de oxigênio em peixes expostos a nanopartículas de óxidos metálicos. A diminuição da excreção de amônia em concentrações mais elevadas pode indicar comprometimento hepático ou renal, resultando em menor capacidade de excretar produtos nitrogenados (Xu et al 2021)(Figura 2B).

Em *D. rerio*, o aumento inicial no consumo específico de oxigênio, seguido por uma queda acentuada em 1000 µg/L de AgNPs_{BCA}, sugere que a espécie tem uma tolerância limitada a doses elevadas de nanopartículas. Kokturk *et al.* (2022) também observaram esse comportamento em *D. rerio* exposto a nanopartículas metálicas, onde o estresse metabólico levou a um colapso do sistema respiratório em concentrações críticas. Esse resultado sugere que, embora o peixe-zebra possa tolerar nanopartículas em doses mais baixas, os impactos subletais ainda podem comprometer suas funções fisiológicas.

A exposição às AgNPs_{BCA-PEI} resultou em padrões distintos de consumo de oxigênio e excreção de amônia, com *D. rerio* mostrando maior resistência em concentrações mais altas. Esses achados são consistentes com os resultados de

Ortega *et al.* (2021), que destacam que o revestimento com PEI pode diminuir a biodisponibilidade das nanopartículas, reduzindo sua toxicidade aguda.

4.4 Implicações Ecológicas e Diretrizes Ambientais

Os resultados deste estudo têm importantes implicações para o desenvolvimento de diretrizes de segurança ambiental relativas ao uso de AgNPs biogênicas. A sensibilidade diferencial entre espécies nativas, como *A. ribeirae*, e espécies modelos, como *D. rerio*, reforça a necessidade de ampliar o escopo das avaliações ecotoxicológicas para incluir espécies ecologicamente relevantes. Como destacado por Handy *et al.* (2012), a toxicidade subletal pode ter efeitos graves sobre o comportamento e a fisiologia dos peixes, afetando suas funções ecossistêmicas.

Com base nos resultados obtidos, recomenda-se que futuras diretrizes considerem não apenas as concentrações letais, mas também os efeitos subletais, que podem impactar a saúde fisiológica das espécies e suas interações no ecossistema. A monitoração contínua e a avaliação de nanopartículas em condições ambientais realistas são essenciais para uma compreensão abrangente de seus impactos a longo prazo (Handy *et al.*, 2012). Além disso, esses dados podem servir como base para a formulação de novos regulamentos que limitem a liberação de nanopartículas em ambientes aquáticos, minimizando seus efeitos adversos sobre a biodiversidade.

5. Conclusão

Este estudo demonstrou que a toxicidade das AgNPs em peixes é influenciada pela origem, concentração e revestimento das nanopartículas. Os lambaris apresentaram-se significativamente mais sensíveis às AgNPs em comparação ao peixe-zebra, destacando a importância de avaliar os riscos das AgNPs em espécies nativas e ecologicamente relevantes, bem como a importância dos testes com espécies nativas para prever futuros impactos nos ecossistemas regionais. A redução da toxicidade observada nas AgNP_{BCA-PEI}

sugere que o revestimento pode ser uma estratégia eficaz para mitigar os impactos ambientais dessas nanopartículas, regulando a liberação de íons prata e sua interação com os organismos.

É fundamental que futuras pesquisas incluam espécies nativas e explorem estratégias de modificação das AgNPs que minimizem seus efeitos adversos, assegurando a proteção dos ecossistemas aquáticos.

Agradecimentos e apoio financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); ao Instituto de Pesca.

Referências

- Abdel-Latif, H. M., Shukry, M., El Euony, O. I., Mohamed Soliman, M., Noreldin, A. E., Ghetas, H. A., and Dawood, M. A. O. 2021. "Hazardous Effects of SiO₂ Nanoparticles on Liver and Kidney Functions, Histopathology Characteristics, and Transcriptomic Responses in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Juveniles." *Biology* 10 (3): 183. <https://doi.org/10.3390/biology10030183>.
- Aguiar, A. P., Ottoni, C. A., Aquaroli, C. D. L. R., Mendes, E. C. V., de Souza Araújo, A. L., Simões, M. F., and Barbieri, E. 2024. "Mycogenic Silver Nanoparticles from *Penicillium citrinum* IB-CLP11 – Their Antimicrobial Activity and Potential Toxicity Effects on Freshwater Organisms." *Environmental Science: Nano* 11 (5): 2229–2238. <https://doi.org/10.1039/d4en00002a>.
- Al Abboud, M. A. 2018. "Fungal Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Their Role in Control of Fusarium Wilt of Sweet Pepper and Soil-Borne Fungi in Vitro." *International Journal of Pharmacology* 14: 773–780. <https://doi.org/10.3923/ijp.2018.773.780>.
- Altammar, K. A. 2023. "A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges." *Frontiers in microbiology* 14: 1155622. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155622>
- Alves, M. F., Silva, E., Franchi, L. P., and Souza, R. F. B. 2022. "Biological Synthesis of Low Cytotoxicity Silver Nanoparticles (AgNPs) by the Fungus *Chaetomium thermophilum* – Sustainable Nanotechnology." *Journal of Fungi* 8 (6): 605. <https://doi.org/10.3390/jof8060605>.
- American Public Health Association (APHA). 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22nd ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- Asharani, P. V., Mun, G. L. K., Hande, M. P., and Valiyaveetil, S. 2009. "Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells." *ACS Nano* 3 (2): 279–290. <https://doi.org/10.1021/nn800596w>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., and Rizzolio, F. 2019. "The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine." *Molecules* 25 (1): 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>.
- Choi, J., Kim, S., Ahn, J., Youn, P., Kang, J. S., and Ryu, D. Y. 2010. "Induction of Oxidative Stress and Apoptosis by Silver Nanoparticles in the Liver of Adult Zebrafish." *Aquatic Toxicology* 100 (2): 151–159. DOI: [10.1016/j.aquatox.2009.12.012](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.012)

Chung, D. S., Kim, H., Ko, J., Lee, J., Hwang, B., Chang, S., et al. 2018. "Microwave Synthesis of Silver Nanoparticles Using Different Pentose Carbohydrates as Reducing Agents." *Journal of Chemistry* 12: 1-10. DOI: [10.17265/1934-7375/2018.01.001](https://doi.org/10.17265/1934-7375/2018.01.001).

Das, P., Xenopoulos, M.A. & Metcalfe, C.D. Toxicity of Silver and Titanium Dioxide Nanoparticle Suspensions to the Aquatic Invertebrate, *Daphnia magna*. *Bull Environmental Contamination and Toxicology* 91, 76-82 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1015-6>

Fayaz, A. M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P. T., and Venketesan, R. 2010. "Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Synergistic Effect with Antibiotics: A Study Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 12 (1): 103-109. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.006>.

Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Venkataraman, D., Pandian, S. R. K., Muniyandi, J., et al. 2009. "Biosynthesis, Purification and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Escherichia coli*." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 121: 438-444. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.07.048>.

Hamedi, S., Ghaseminezhad, M., Shokrollahzadeh, S., and Shojaosadati, S. A. 2017. "Controlled Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Nitrate Reductase Enzyme Induction of Filamentous Fungus and Their Antibacterial Evaluation." *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 45: 1588-1596. <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2016.1267011>

Hu, X., Li, D., Gao, Y., Mu, L., and Zhou, Q. 2016. "Knowledge Gaps Between Nanotoxicological Research and Nanomaterial Safety." *Environment International* 94: 8-23. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.05.001>.

Kakakhel, M.A., Wu, F., Sajjad, W. et al. Long-term exposure to high-concentration silver nanoparticles induced toxicity, fatality, bioaccumulation, and histological alteration in fish (*Cyprinus carpio*). *Environ Sci Eur* 33, 14 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00453-7>

Khan, N., Ali, S., Latif, S., and Mehmood, A. 2022. "Biological Synthesis of Nanoparticles and Their Applications in Sustainable Agriculture Production." *Natural Science* 14: 226-234. <https://doi.org/10.4236/ns.2022.146022>.

Khallaf, Elsayed A., Mohammad M. N. Authman, and Alaa A. Alne-na-ei. 2017. "Evaluation of Organochlorine and Organophosphorus Pesticides Residues in the Sediment and Muscles of Nile Tilapia *Oreochromis Niloticus* (Linnaeus, 1758) Fish from a River Nile Canal, Egypt." *International Journal of Environmental Studies* 75 (3): 443-65. doi: [10.1080/00207233.2017.1378019](https://doi.org/10.1080/00207233.2017.1378019).

Kokturk, M., Elsan, R., and Kucukkara, R. 2022. "Investigation of the Oxidative Stress Response of a Green Synthesis Nanoparticle (RP-Ag/ACNPs) in Zebrafish." *Biological Trace Element Research* 200 (6): 2897–2907. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02414-1>.

Kuppusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., and Govindan, N. 2016. "Biosynthesis of Metallic Nanoparticles Using Plant Derivatives and Their New Avenues in Pharmacological Applications—An Updated Report." *Saudi Pharmaceutical Journal* 24: 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.013>.

Mashwani, Z., Khan, M. A., Khan, T., and Nadhman, A. 2016. "Applications of Plant Terpenoids in the Synthesis of Colloidal Silver Nanoparticles." *Advances in Colloid and Interface Science* 234: 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.04.008>.

Mat Lazim, Z., Salmiati, S., Marpongahtun, M., Arman, N. Z., Mohd Haniffah, M. R., Azman, S., Yong, E. L., and Salim, M. R. 2023. "Distribution of Silver (Ag) and Silver Nanoparticles (AgNPs) in Aquatic Environment." *Water* 15 (7): 1349. <https://doi.org/10.3390/w15071349>.

Nel, A., Xia, T., Madler, L., and Li, N. 2006. "Toxic Potential of Materials at the Nanolevel." *Science* 311 (5761): 622–627. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>.

Nemmar, A., Hoet, P. H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M. F., et al. 2002. "Passage of Inhaled Particles into the Blood Circulation in Humans." *Circulation* 105 (4): 411–414. <https://doi.org/10.1161/hc0402.104118>.

Otoni, C. A., Simões, M. F., Fernandes, S., Santos, J. G., Silva, E. S., Souza, R. F. B., and Maiorano, A. E. 2017. "Screening of Filamentous Fungi for Antimicrobial Silver Nanoparticles Synthesis." *AMB Express* 7 (31): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0332-2>.

Ribeiro, B. M. 2020. *Efeitos de nanopartículas de prata biossintetizadas por Aspergillus niger em diferentes níveis tróficos*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista.

Ribeiro, L. G., Rezende, K. F. O., Barbieri, E., and de Souza, A. O. 2023. "Study of Routine Metabolism and Acute Toxicity of Mycogenic Silver Nanoparticles on *Palaemon pandaliformis* (Shrimp)." *Environmental Science: Nano* 10 (6): 1715–1729. <https://doi.org/10.1039/D2EN00726F>

Silva, C. A., Ribeiro, B. M., Trotta, C. V., Perina, F. C., Martins, R., Abessa, D. M. S., Barbieri, E., Simões, M. F., and Otoni, C. A. 2022. "Effects of Mycogenic Silver

Nanoparticles on Organisms of Different Trophic Levels." *Chemosphere* 308: 136540. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136540>.

Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., and Zhou, Z. 2019. "The Use of Zebrafish (*Danio rerio*) as Biomedical Models." *Animals Frontiers* 9 (3): 68-77. <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>.

Tesser, M. E., Guilger, M., Bilesky-José, N., Pasquoto-Stigliani, T., Risso, W., Bianchini, A., and Martinez, C. B. 2024. "Effects of Biogenic Metallic Nanoparticles (Ag, TiO₂, Fe) on the Freshwater Fish *Prochilodus lineatus*: Bioaccumulation and Multiple Biomarkers." *Environmental Science and Pollution Research* (in press). <https://doi.org/10.2139/ssrn.4772482>.

Xu, L., Wang, Y.Y., Huang, J., Chen, C.Y., Wang, Z.X., Xie, H. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*, 10(20), 8996-9031. <https://doi.org/10.7150/thno.45413>

Xu, Z., Cao, J., Qin, X., Qiu, W., Mei, J., and Xie, J. 2021. "Toxic Effects on Bioaccumulation, Hematological Parameters, Oxidative Stress, Immune Responses and Tissue Structure in Fish Exposed to Ammonia Nitrogen: A Review." *Animals* 11 (11): 3304. <https://doi.org/10.3390/ani11113304>.

Considerações finais

As nanopartículas, especialmente as AgNPs, são uma excelente ferramenta tecnológica para diferentes indústrias. Entretanto, seu uso precisa ser realizado de forma cautelosa e seguindo protocolos rigorosos, uma vez que podem ser nocivas a algumas espécies, principalmente organismos aquáticos, ambiente que costuma ser o destino desse material.

Apesar das diferenças entre os ambientes laboratoriais e os aquáticos naturais, este estudo já indica os possíveis impactos negativos das AgNPs em peixes, especialmente em espécies nativas como *A. ribeirae*, que demonstrou maior sensibilidade a esse nanomaterial quando comparada à espécie modelo *D. rerio*. Esse achado tem importância estratégica para gestores ambientais, pois, ao preservar espécies mais sensíveis a essa substância, garante-se também a proteção de espécies com menor sensibilidade, assegurando, assim, a conservação de uma maior parte do meio ambiente.

Outro resultado importante deste estudo é a menor toxicidade das AgNPs com revestimentos superficiais. Essa pode ser uma estratégia para mitigar o impacto das AgNPs, permitindo que elas cheguem ao seu destino de forma menos tóxica. Por fim, é fundamental ressaltar que, mesmo adaptando esse material para formas mais seguras, ainda é necessário estabelecer dosagens-limite para seu uso seguro.