

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

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS E NATATÓRIAS EM ZEBRA-FISH (*Danio rerio*),
CAUSADAS POR EXPOSIÇÃO CRÔNICA A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
COBRE II (NPsCuO)**

Maria Izabel de Oliveira Eiras

Orientador: Prof. Dr. Edison Barbieri

Coorientador: Prof. Dr. Luelc Souza da Costa

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.

Cananéia
Setembro, 2020

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

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS E NATATÓRIAS EM ZEBRA-FISH (*Danio rerio*),
CAUSADAS POR EXPOSIÇÃO CRÔNICA A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
COBRE II (NPsCuO)**

Maria Izabel de Oliveira Eiras

Orientador: Prof. Dr. Edison Barbieri

Coorientador: Prof. Dr. Luelc Souza da Costa

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.

Cananéia
Setembro, 2020

Ficha catalográfica no verso da contracapa

Certificado de aprovação

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família, por acreditarem em minha capacidade. O incentivo de vocês significou segurança e certeza de não estar sozinha nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, aos meus pais Ilda e Miguel (*in memoria*), aos meus sogros Antônio (*in memoria*) e Ivete por terem me acolhido como filha e me oportunizado continuar meus estudos. Bem como ao meu esposo Willians e minha querida filha Layara por me apoiarem e compreenderem meus momentos de ausência.

Agradeço em especial ao Professor Dr. Edison Barbieri, meu orientador, por todo o tempo e apoio a mim dedicado, pela oportunidade de realizar este trabalho em um centro de pesquisa de alto nível, por transmitir seus conhecimentos e me inspirar a buscar trabalhos de qualidade e pela recepção no Instituto de Pesca e em Cananéia. Sinto-me honrada por ter trabalhado ao seu lado. Ao Professor Dr. Luelc Souza da Costa meu coorientador, por ter sintetizado e gentilmente cedido as nanopartículas que foram utilizadas nessa pesquisa.

À doutoranda Larissa, que carinhosamente se propôs a me auxiliar nos experimentos laboratoriais. Ao Dito, da base de Cananéia, por todo seu apoio. Aos professores e alunos do Instituto de Pesca pela convivência nas disciplinas. Ao secretário Ocimar, sempre solícito.

Aos meus parceiros de trabalho do núcleo pedagógico da Diretoria de Ensino de Jundiaí, especialmente a Elisabete por todo auxílio, e a Alessandra que foi fundamental para o início desse trabalho de pesquisa.

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram durante esse processo.

Minha eterna gratidão!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	v
ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS	vi
RESUMO GERAL	vii
GENERAL ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Expansão de utilização das nanopartículas (NPs)	1
1.2. Nanopartículas de óxido de cobre II (NPsCuO)	3
1.3. Animal modelo <i>Danio rerio</i>	6
1.4. Justificativa	6
1.5. Objetivo geral	6
1.6. Objetivos específicos	6
REFERÊNCIAS	7

CAPÍTULO ÚNICO

ALTERAÇÕES METABÓLICAS E NATATÓRIAS EM ZEBRA-FISH (*Danio rerio*) CAUSADAS POR EXPOSIÇÃO CRÔNICA A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE II (NPsCuO)

RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Reagentes químicos	19
2.2. Síntese das Nanopartículas	19
2.2.1. Nanopartículas de óxido de cobre bastões	19
2.2.2. Nanopartículas de óxido de cobre esféricas	19
2.3. Caracterização das nanopartículas	20
2.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	20

2.4. Organismo teste <i>Danio rerio</i>	20
2.5. Testes experimentais	21
2.6. Consumo específico de oxigênio	21
2.7. Excreção de amônia	22
2.8. Capacidade de natação	22
2.9. Análise estatística	23
3. RESULTADOS	23
3.1. Caracterização nanopartículas de óxido de cobre II (NPsCuO)	23
3.1.1. Nanobastões	24
3.1.2. Nanoesferas	26
3.2. Consumo específico de oxigênio (NPsCuO bastões)	28
3.3. Consumo específico de oxigênio (NPsCuO esferas)	29
3.4. Excreção específica de amônia (NPsCuO bastões)	30
3.5. Excreção específica de amônia (NPsCuO esferas)	31
3.6. Capacidade de natação (NPsCuO bastões)	32
3.7. Capacidade de natação (NPsCuO esferas)	33
4. DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO	40
6. REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ag ⁺	Íon prata
Cu	Cobre
Cu ²⁺	Íon cobre
CuO	Óxido de cobre II
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Hg	Mercúrio
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MP	Materiais poliméricos
N ₂	Gás nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
NM	Nanomateriais
NPs	Nanopartículas
NPsAg	Nanopartículas de prata
NPsAl	Nanopartículas de alumínio
NPsAu	Nanopartículas de ouro
NPsCuO	Nanopartículas de óxido de cobre II
OH ⁻	Hidroxila
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotação máxima
SiO ₂	Dióxido de silício
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TiO ₂	Dióxido de titânio
ZnO	Óxido de zinco

ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS

1. Figura caracterização, aplicação e impacto das nanopartículas	3
2. Figura câmara de natação	22
3. Figura nanobastões escala de 20nm	24
4. Figura nanobastões escala de 100nm	24
5. Figura nanobastões escala de 100nm	25
6. Figura nanobastões escala de 500nm	25
7. Figura nanoesferas escala de 30nm	26
8. Figura nanoesferas escala de 30nm	26
9. Figura nanoesferas escala de 30nm	27
10. Figura nanoesferas escala de 30nm	27
11. Figura consumo específico de oxigênio nanobastões	28
12. Figura consumo específico de oxigênio nanoesferas	29
13. Figura excreção específica de amônia nanobastões	30
14. Figura excreção específica de amônia nanoesferas	31
15. Figura capacidade de natação nanobastões	32
16. Figura capacidade de natação nanoesferas	33

ALTERAÇÕES METABÓLICAS E NATATÓRIAS EM ZEBRA-FISH (*Danio rerio*) CAUSADAS POR EXPOSIÇÃO CRÔNICA A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE II (NPsCuO)

RESUMO GERAL

Cresce a cada dia, a preocupação com a poluição ambiental causada por nanopartículas devido a sua ampla utilização nos mais diversos produtos. Atualmente as nanopartículas de óxido de cobre II são as mais comercializadas, por apresentar excelentes propriedades físico-químicas e porque sua síntese é simples, rápida e de baixo custo. Mesmo considerando sua alta reatividade e biodisponibilidade no meio ambiente, ainda há uma carência de estudos sobre os mecanismos de interação com os sistemas biológicos, e as dosagens críticas em relação ao tempo de exposição. O presente estudo visou comparar os efeitos metabólicos causados pelas nanopartículas de óxido de cobre II caracterizadas em bastões e esferas; investigar os efeitos fisiológicos através de ensaios para metabolismo de rotina (consumo específico de oxigênio e excreção específica de amônia) e os efeitos comportamentais através da capacidade de natação; analisar as respostas do modelo biológico *Danio rerio* adulto, para avaliar o risco potencial ao ambiente, e fornecer informações que possibilitem a expansão do uso das NPsCuO com segurança. Para realização dos ensaios, foram utilizados 88 peixes da espécie *Danio rerio*, divididos em grupos de 6 para metabolismo de rotina e 5 para capacidade de natação, expostos por 24h em concentrações de 0, 50, 100 e 200µg/L de nanopartículas de óxido de cobre II (nanoesferas e nanobastões). Os testes realizados com as nanobastões apresentaram alterações metabólicas nos peixes, causando aumento do consumo específico de oxigênio de 294% na concentração de 100µg/L e 321% na concentração de 200µg/L, diminuição da excreção específica de amônia de 83% na concentração de 200µg/L, e a diminuição da capacidade de natação de 34% na concentração de 100µg/L e 55% na concentração de 200µg/L, quando comparados ao grupo de controle. Já os ensaios realizados com as nanoesferas não apresentaram alterações significativas. Os testes realizados demonstraram que diferentes estruturas morfológicas da mesma nanopartícula de óxido de cobre II (NPsCuO), causaram diferentes efeitos no metabolismo dos peixes. Concluindo, em estudos ecotoxicológicos utilizando nanopartículas é fundamental a sua caracterização.

Palavras-chave: Peixe-zebra; Nanopartículas; CuO; Metabolismo; Capacidade natatória.

METABOLIC AND NATATORIES CHANGES IN ZEBRA-FISH (*Danio rerio*) CAUSED BY CHRONIC EXPOSURE TO COPPER OXIDE II NANOPARTICLES (CuONPs)

GENERAL ABSTRACT

Grow the all-day the concern about environmental pollution caused by nanoparticles due to its wide use in most varied products. Currently the copper oxide II nanoparticles are the most commercialized, for presenting excellent physical-chemical properties, and because their synthesis is simple, fast, and low cost. Although this high reactivity and bioavailability in the environment, there is still a lack of studies on the interaction mechanisms with the biological systems, and the critical dosages in relation to the time of exposure. This study aimed to compare the metabolic effects caused by the copper oxide II nanoparticles characterized in rods and spheres; investigate the physiological effects through assays to routine metabolism (specific oxygen consumption and specific ammonia excretion) and the behavioral effects through the swimming capacity; analyses the responses of the adult *Danio rerio* biological model, to assess the potential risk to the environment, and provide information that enables the expansion of the safe use of the NPsCuO. For carrying out the analysis was used eighty-eight fish of the species *Danio rerio* were used divided into groups of 6 for routine metabolism and 5 for swimming ability, exposed for 24 hours in concentrations of 0, 50, 100 and 200µg/L of copper oxide II nanoparticles (nanorods and nanospheres). The analysis has carried out with copper nano-rods showed significant alterations in the fish, causing an increase in the specific oxygen consumption of 294% in the concentration of 100µg/L and 321% in the concentration of 200µg/L, a decrease in the specific excretion of ammonia of 83% in the concentration of 200µg/L, and a 34% decrease in swimming capacity at a concentration of 100µg/L and 55% at a concentration of 200µg/L, when compared to the control group. The analysis has carried out with nanospheres did not show any significant changes. They have demonstrated that different morphological structures of the same copper oxide II nanoparticle (NPsCuO) caused different effects on the metabolism of fish. As result, characterization is essential in ecotoxicological studies using nanoparticles.

Keywords: Zebrafish; Nanoparticles; Metabolism; Swimming capacity.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Expansão de utilização das nanopartículas (NPs)

A evolução em pesquisas envolvendo materiais em escala nanométrica tem levado muitos cientistas a revolucionar as mais diversas áreas. Seu conceito relaciona-se aos estudos da manipulação da matéria em uma escala atômica e molecular (“nano” prefixo que designa 10^{-9}m). O interesse nessa escala teve seu marco inicial em 1959, quando o físico Richard Feynman sugeriu que o homem conseguiria manipular objetos de dimensões atômicas e assim construir estruturas de tamanho bastante reduzido (Feynman, 1960). No entanto foi no ano de 1980, que o cientista Eric Drexler do Instituto Foresight, popularizou essa ciência, mencionando a construção de máquinas em escala molecular, contendo apenas alguns nanômetros de tamanho tais como braços de robôs, motores e computadores (Lalau, 2014). Desde então a ciência da nanotecnologia vem ganhando espaço no campo de inovações e aprimoramento de novas tecnologias. De acordo com The Project on Emerging Nanotechnologies (2014), no ano de 2013, existiam 1.628 produtos contendo algum tipo de nanopartícula, em 2015 listam-se 1.814 produtos de consumo de 622 empresas em 32 países (Vance et al., 2015). Nos últimos quinze anos as nanopartículas vem sendo incorporadas na produção em larga escala para fins de comercialização, em diversos produtos, tais como: aditivos em tintas, plásticos, lubrificantes industriais (Midander et al., 2009), revestimentos anti-incrustante (Isaza et al., 2011), revestimentos metálicos, cosméticos que tenham função de proteção UV (Kleine et al., 2008), em pesticidas e solventes organoclorados (Petosa et al., 2010), em revestimentos antimicrobianos (Griffitt et al., 2008), fungicida (Mueller e Nowack, 2008), podendo ainda ser utilizados em diagnósticos e aplicações médicas como agente de contraste de imagem biomédica e terapias contra o câncer (Studer et al., 2010).

Entre os diversos materiais que podem ser desenvolvidos com dimensões nanométricas, os óxidos metálicos têm recebido muita atenção do ponto de vista científico e tecnológico, sendo considerada a classe de nanomateriais com propriedades mais diversas (Rangel, 2014). As estimativas de produção mundial de nanopartículas de óxidos metálicos atingiram no ano de 2012 mais de 270 toneladas, podendo aumentar para mais de 1663 toneladas em 2020 (Research e Markets, 2013). Esta ascendente utilização de nanopartículas tem despertado discussão sobre os potenciais riscos toxicológicos destes materiais ao ambiente e à saúde humana. Apesar das nanopartículas se mostrarem benéficas nos mais diversos campos em que são utilizadas, há crescente preocupação nos riscos que podem ser gerados

com a sua disposição no ambiente (Lalau, 2014). Devido ao seu tamanho diminuto, possuem área superficial extremamente elevada em relação ao volume, fato que as torna altamente reativas (Arora et al., 2011), consequentemente potenciais poluidores dos compartimentos ambientais (atmosfera, hidrosfera e litosfera), por tornar-se biodisponíveis (Lu et al., 2017), exigindo a avaliação dos impactos sobre o meio ambiente (Ahmed et al., 2018).

Segundo Zucolotto (2014), este é um tema de grande interesse mundial principalmente pela carência de estudos conclusivos que forneçam informações sobre os mecanismos de interação das nanopartículas com os sistemas biológicos, as dosagens críticas e o tempo de exposição. Fatos que levaram ao surgimento da nanotoxicologia, uma área de estudo que tem como função avaliar a segurança de produtos provenientes da nanotecnologia (Oberdorster et al., 2010), contribuindo com o desenvolvimento econômico, a qualidade de vida e com a proteção ambiental (Ostiguy et al., 2009). As previsões de destino das nanopartículas são especialmente em sistemas aquáticos, e a modelagem é restrita aos processos de agregação e dissolução (Williams et al., 2019), contudo fatores físico-químicos da água, como a dureza, alcalinidade, substâncias inorgânicas e orgânicas ligantes, pH, temperatura e concentração, interferem no nível de efeitos tóxicos causado pelas nanopartículas (Malhotra et al., 2020).

Atualmente inúmeras pesquisas têm sido realizadas para avaliar a toxicidade das interações de diferentes tipos de nanopartículas com diversos organismos; aquáticos (Aruoja et al., 2009; Blinova et al., 2010; Lee et al., 2012; Pang et al., 2012; Isani et al., 2013; Melegari et al., 2013; Barbieri et al., 2019), plantas (Ma et al., 2010; Nair et al., 2010; Perreault et al., 2010), animais (Abdelazeim et al., 2020) e seres humanos (Ahamed et al., 2018; Zhao et al., 2013). A maioria desses estudos são realizados através de testes ecotoxicológicos, que *in vivo* consiste na exposição de organismos-testes às nanopartículas (Maziero, 2019), permitindo a observação das alterações metabólicas e morfológicas causadas nesses organismos e consequentemente, gerando possibilidades de proteção da vida aquática (Gomes et al., 2011). Nos organismos expostos, as nanopartículas podem ser absorvidas através da pele, mucosas e membranas celulares, por inalação e ingestão (Peng et al., 2017), causando efeitos que geram alterações; no desenvolvimento genético (Zhang et al., 2018), geração ROS (Thit et al., 2017), morfologia e fisiologia (Xu et al., 2017), desnaturação de proteínas (Hou et al., 2017), metabolismo de rotina (Barbieri et al., 2019; Medeiros et al., 2020) e no comportamento (Campos-Garcia et al., 2016). Embora essas respostas estejam condicionadas ao tipo de organismo teste, as características e concentrações das nanopartículas, interferem diretamente nos resultados (Reidy et al., 2013), tornando esses estudos importantes, por fornecerem às indústrias produtoras de NPs,

informações que possibilitam o estabelecimento de mecanismos de controle necessários (León et al., 2019), para que os produtos elaborados apresentem diminuição da toxicidade.

O organograma modificado de López-Serrano et al. (2014) representa exemplos de caracterização morfológica, classificação, aplicação e impacto das nanopartículas. (Figura 1).

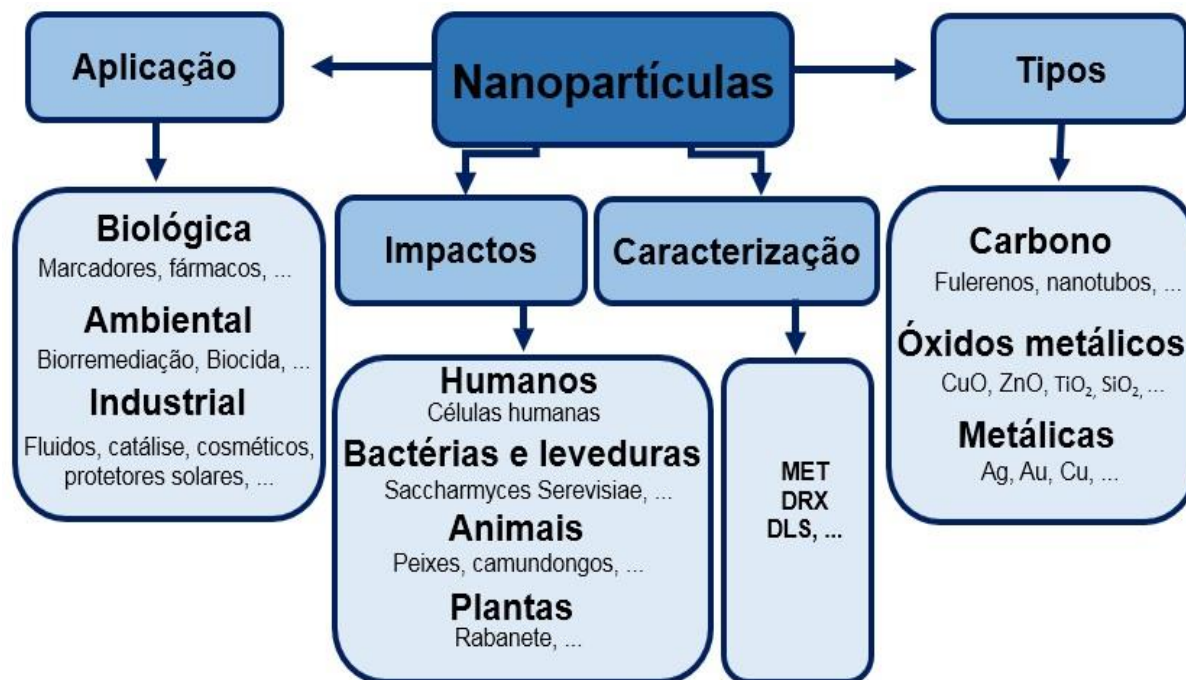


Figura 1. Caracterização, classificação, aplicação e impacto das nanopartículas. Modificado de López-Serrano et al. (2014).

1.2. Nanopartículas de óxido de cobre (NPsCuO)

Dentre as nanopartículas comercializadas, as nanopartículas de óxido de cobre II (NPsCuO), são amplamente utilizadas por apresentar excelentes propriedades físico-químicas (Ananth et al., 2015) e porque sua reação de síntese é considerada relativamente simples, rápida e de baixo custo (Rangel, 2014). O foco central da síntese é mostrar que é possível obter morfologias diferentes de óxido de cobre II (CuO), sugerindo partes do seu mecanismo de crescimento em solução por combinação de técnicas de microscopia eletrônica (Volanti, 2011).

A formação das nanoestruturas segue o mecanismo de nucleação e crescimento de La Mer, onde nucleéis (núcleos muito pequenos) se formam a partir da elevada concentração dos precursores. A partir desta etapa (concentração crítica), as nanoestruturas começam a se formar, a concentração decai e os cristais começam a crescer (Costa, 2016). Outros fatores podem interferir drasticamente na estrutura cristalina, morfologia e tamanho, tais como temperatura, agentes passivadores e redutores, uma caracterização detalhada mostra grandes

alterações morfológicas e estruturais das nanopartículas, após redução do catalisador (Costa e Zanchet, 2017; Trancredi et al., 2019).

A literatura apresenta diversos exemplos de sínteses de morfologias de CuO, tais como nanoflores (Zhu et al., 2007), nanofios (Jiang et al., 2002), microesferas (He, 2007), ouriços-do-mar (Chen et al., 2012; Hong et al., 2009) e nanobastões (Phiwdang et al., 2013). De acordo com o trabalho apresentado por Souza et al., (2012) acredita-se que o crescimento das partículas ocorre induzindo a estrutura intrínseca dos cristais, mas outros fatores como: o método escolhido, as condições de preparação, os precursores utilizados e a concentração de íons na solução também influenciem a morfologia e o tamanho observado do material. O pH e a concentração do íon OH⁻ são considerados muito relevantes na formação morfológica das nanopartículas (Kulak et al., 2007; Sun et al., 2010).

Aplicadas em diversas áreas devido à sua excelente termofísica, catalítica e propriedades antibacterianas (Ebrahimnia-Bajestan et al., 2011; Majumder e Neogi, 2016; Prasad et al., 2016), as NPsCuO são amplamente usadas em: eletrônica, catálise, sensores, células solares, produção de hidrogênio, diodos de emissão de luz, administração de medicamentos (Keller et al., 2017; Rajput et al., 2017), agricultura, preservação de alimentos (Montes et al., 2016), indústrias têxteis (Sedighi e Montazer, 2016), tintas anti-incrustante, revestimentos e tratamento de água (Ben-Sasson et al., 2016). O crescimento exponencial de produção e utilização de NPsCuO, inevitavelmente, levam à sua liberação para o ambiente aquático, representando um risco potencial para organismos (Lu et al., 2017; Wu et al., 2017), ainda que as NPsCuO apresentem baixa solubilidade em água, podem causar efeitos tóxicos nos organismos aquáticos (Keller et al., 2017), a principal fonte de toxicidade das NPsCuO é um assunto controverso, alguns estudos fundamentam que a sua toxicidade pode ser exercida por efeitos específicos das nanopartículas (Manusadzianas et al., 2012; Cronholm et al., 2013), pelos íons de cobre liberados (Jo et al., 2012), por nanopartículas e íons (Xiao et al., 2015).

As NPsCuO em contato com diferentes ambientes, com diferentes pH (potencial hidrogeniônico), podem liberar íons cobre, que dissolvidos tendem a entrar nas células através de canais iônicos e transporte ativo, interagindo e atravessando as membranas celulares através desses canais iônicos e das proteínas transportadoras, endocitose e/ou fagocitose (Chang et al., 2012).

Estudos com variados bioindicadores, apontaram os efeitos de toxicidade apresentados após exposição as NPsCuO com baixas e altas concentrações; crustáceos (*Daphnia*) expostos a 20 µg/L, aumentaram a produção de ROS (Andrade et al., 2019), algas (Clorofíceas) expostas

a 100 mg/L sofreram alteração na composição bioquímica (Alho, 2016), moluscos (*P. antipodarum*) expostos a 60 µg/L apresentaram alterações no crescimento e na reprodução (Pang et al., 2012), peixes (*H. eques*) testados em 30 µg/L sofreram apoptose e necrose em células branquiais (Mansano et al., 2018), plantas (Lemnáceas) submetidas a 1000 mg/L apresentaram inibição de crescimento (Lalau, 2014). A exposição a NPsCuO pode ser letal às espécies aquáticas devido à bioacumulação, mesmo em baixas concentrações (Subbiah et al., 2020).

1.3. Animal modelo *Danio rerio*

Os peixes são considerados bons bioindicadores de qualidade ambiental, por pertencerem ao último nível trófico das cadeias alimentares aquáticas e por apresentarem sensibilidades às mudanças ambientais (Torres De Lemos et al., 2007). O *Danio rerio* é um peixe tropical de água doce originário da Ásia que vive em média três anos e atinge, no máximo, 5 cm de comprimento, são onívoros, de comportamento pacífico e muito ativo (Jeevanandam et al., 2019). Esse peixe tem despertado interesse de vários pesquisadores, por suas características peculiares, como por exemplo, por serem bem pequenos ocupam espaço reduzido e utilizam pouco volume da solução de teste (Lammer et al., 2009); por sua capacidade de reprodução, pois cada fêmea produz centenas de ovos em curto espaço de tempo, possibilitando o acompanhamento do processo de crescimento do animal, além disso, os embriões possuem aparência transparente, facilitando a realização de experimentos que visam a investigação da evolução de doenças e a identificação das suas causas (Oliveira et al., 2009; Mione e Trede, 2010; Ablain e Zon, 2013).

A espécie vem sendo apontada pela literatura científica como um organismo-teste para a avaliação do potencial toxicológico decorrente da exposição a diferentes substâncias tóxicas, incluindo exposição aos nanomateriais, permitindo o desenvolvimento de abordagens de alto rendimento *in vivo* (Henry et al., 2007; Lin et al., 2011; Peterson e Macrae, 2012), por se apresentar como um organismo com características favoráveis para testes de toxicologia ambiental, pois apresentam respostas de nível celular a estressores, tais como metais, indicando perturbação da homeostase, e do estado fisiológico do organismo, fornecendo informações sobre mecanismos de ação tóxica do estressor (Thit et al., 2017), além disso, eles possuem câmaras e bombeiam ritmicamente o sangue que transporta oxigênio através do corpo, têm olhos com estrutura retiniana, fígado, pâncreas, rins, intestinos, coluna vertebral e mais de 80% de seus genes são homólogo aos humanos (Ali et al., 2011; Howe et al., 2013; Léon

et al., 2019). Deste modo, o peixe zebra se apresenta como um modelo *in vivo* alternativo, rápido, de alto rendimento, rentável, facilmente acessível e fiável, que possui uma boa correlação com modelos *in vitro* (Zhao et al., 2013). Por esse motivo, a espécie escolhida para o desenvolvimento deste trabalho foi o *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae), conhecido popularmente como peixe-zebra.

1.4. Justificativa

Pesquisas envolvendo estudos sobre os efeitos das NPsCuO são menores comparadas com outros óxidos metálicos (Rangel, 2014), e em se tratando de diferentes morfologias, são escassas, as existentes não abordam resultados de testes comparativos entre as estruturas morfológicas e seus efeitos causados nos organismos. As NPsCuO em diferentes formas, bastões e esferas foram selecionadas devido à sua ampla aplicação e maneira diferente de interagir com o agente biológico, uma vez que o formato das partículas parece ter respostas distintas nos efeitos provocados nos organismos (Misra et al., 2014). À vista disso, o presente trabalho visou contribuir para que novas pesquisas sejam realizadas abordando estudos comparativos da mesma nanopartícula com diferentes estruturas, considerando que o tamanho, forma e composição das NPsCuO, mostraram-se fatores de interferência nas respostas obtidas dos animais a elas expostos, os resultados aqui apresentados intenciona fornecer aos produtores destas nanopartículas, informações preliminares para elaboração de produtos que causem menores efeitos de toxicidade.

1.5. Objetivo geral

Essa pesquisa teve como objetivo geral, comparar os efeitos metabólicos causados pela exposição de nanopartículas de óxido de cobre II caracterizadas em diferentes morfologias, bastões e esferas, através da análise das respostas do modelo biológico *Danio rerio* adulto.

1.6. Objetivos específicos

Investigar os efeitos fisiológicos através de ensaios para metabolismo de rotina (consumo específico de oxigênio e excreção específica de amônia);

Investigar os efeitos comportamentais através da capacidade de natação;

Analisar as respostas do modelo biológico *Danio rerio* adulto;

Avaliar o risco potencial no ambiente aquático;

Fornecer informações que possibilitem a expansão do uso das NPsCuO com segurança.

REFERÊNCIAS

- Abdelazeim, S.A.; Shehata, N.I.; Aly, H.F.; Shams, S.G.E. 2020. Amelioration of oxidative stress-mediated apoptosis in copper oxide nanoparticles-induced liver injury in rats by potent antioxidants. *Scientific Reports*, 10: 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67784-y>
- Ablain, J.; Zon, L. I. 2013. Of fish and men: using zebrafish to fight human diseases. *Trends Cell Biology*, 23 (12): 584-586. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.09.009>
- Ahmed, B.; Khan, M.S.; Musarrat, J. 2018. Toxicity assessment of metal oxide nano-pollutants on tomato (*Solanum lycopersicon*): A study on growth dynamics and plant cell death. *Environmental Pollution*, 240: 802-816. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.015>
- Alho, L.O.G. 2016. Effects of nanoparticles of copper oxide (nano-CuO) and copper chloride (CuCl₂) on the biochemical composition and photosynthetic activity of chlorophyce chillophyce *Raphidocelis subcapitata*. 77f. Dissertação (mestrado). Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos -SP, São Paulo 2016. Disponível em: http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/SCAR_018905cb8fe25d5ff19664c16b9a1f6c acesso em: 10 jun. 2020.
- Ali, S.; Champagne, D.; Spaink, H.; Richardson, M. 2011. Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research*, 93 (2): 115-133. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20206>
- Ananth, A.; Subramanian, D.; Heo, M-S.; Mok, Y.S. 2015. Copper oxide nanomaterials: Synthesis, characterization, and structure-specific antibacterial performance. *Chemical Engineering Journal*, 262: 179-188. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.09.083>
- Andrade, L.S.; Dornfeld, A.S.M.; Chiquito, J.G.G.; Zucolotto, V. 2019. Toxicity and biochemical responses in *Daphnia magna* exposed to copper and platinum oxide nanoparticles, Book of Abstracts, São Carlos, Universidade de São Paulo - USP. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/002972655> acesso em: 01 jun. 2020.
- Arora, S.; Rajwade, J.M.; Paknikar, K.M. 2011. Review Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258 (2): 151-165. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.010>
- Aruoja, V.; Dubourquier, H.C.; Kasemets, K.; Kahru, A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *The Science of the Total Environment*, 407 (4): 1461-1468. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053>
- Barbieri, E.; Ferrarini, A.M.T.; Rezende, K.F.O.; Martinez, D.S.T.; Alves, O.L. 2019. Effects of multiwalled carbon nanotubes and carbofuran on metabolism in *Astyanax ribeirae*, a native species. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45 (1): 417- 426. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0573-2>
- Ben-Sasson, M.; Lu, X.; Nejati, S.; Jaramillo, H.; Elimelech, M. 2016. In situ surface functionalization of reverse osmosis membranes with biocidal copper nanoparticles. *Desalination* 388: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2016.03.005>

Blinova, I.; Ivask, A.; Heinlaan, M.; Mortimer, M.; Kahru, A. 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution*, 158 (1): 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.017>

Campos-Garcia, J.; Martinez, D.; Rezende, K.; Silva, J.; Alves, O.; Barbieri, E. 2016. Histopathological alterations in the gills of Nile tilapia exposed to carbofuran and multiwalled carbon nanotubes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133: 481-488. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.041>

Chang, Y.N.; Zang, M.; Xia, L.; Zang, J.E.; Xing, G. 2012. The toxic effects mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*, 5(12): 2850-3871. <https://doi.org/10.3390/ma5122850>

Chen, H.; Feng, F.; Hu, Z.; Liu, F.; Gong, W.; Xiang, K. 2012. Preparation of uniform flower-like CuO and flower-like CuO/graphene composite and their application in lithium-ion batteries. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 22(10): 2523-2528. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(11\)61495-7](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(11)61495-7)

Costa, L.S.D. 2016. Nanoestruturas híbridas de Au-FexOy aplicadas na oxidação de CO: estudo do efeito do tamanho e morfologia no desempenho catalítico. 152f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, São Paulo. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/330409>> acesso em: 20 ago. 2020.

Costa, L.S.D.; Zanchet, D. 2017. Pretreatment impact on the morphology and the catalytic performance of hybrid heterodimers nanoparticles applied to CO oxidation. *Catalysis Today*, 282: 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.06.056>

Cronholm, P.; Karisson, H.L.; Hedberg, J.; Lowe, T.A.; Winnberg, L.; Elihn, K.; Wallinder, I.O.; Moller, L. 2013. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: a comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small Weinheim an der Bergstrasse Germany*, 9(7): 970-982. <https://doi.org/10.1002/smll.201201069>

Ebrahimnia-Bajestan, E.; Niazmand, H.; Duangthongsuk, W.; Wongwises, S. 2011. Numerical investigation of effective parameter in convective heat transfer of nanofluids flowing under a laminar flow regime. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 54(19): 4376-4388. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2011.05.006>

Feynman, R. 1960. There is plenty of room at the bottom: an invitation to enter a new field of physics. *Engineering and Science*, 23(5): 22-36. Disponível em: <http://calteches.library.caltech.edu/1976/1/1960Bottom.pdf> acesso em: 18 jan. 2020.

Gomes, T.; Pinheiro, J.P.; Cancio, I.; Pereira, C.G.; Cardoso, C.; Bebianno, M.J. 2011. Effects of exposure to copper nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science Technology*, 45(21): 9356-9362. <https://doi.org/10.1021/es200955s>

Griffitt, R.J.; Luo, J.; Gao, J.; Bonzongo, J.C.; Barber, D.S. 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9): 1972-1978. <https://doi.org/10.1897/08-002.1>

He, Y.J. 2007. A novel solid-stabilized emulsion approach to CuO nanostructured microspheres. *Materials Research Bulletin*, 42(1): 190-195.

Henry, T.B.; Menn, F.M.; Fleming, J.T.; Wilgus, J.; Compton, R.N.; Sayler, G.S. 2007. Attributing effects of aqueous C60 nanoaggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression. *Environmental Health Perspectives*, 115(7): 1059-1065. <https://doi.org/10.1289/ehp.9757>

Hong, J.; Li, J.; Ni, Y. 2009. Urchin-like CuO microspheres: synthesis, characterization, and properties. *Journal of Alloys and Compounds*, 481(1-2): 610-615. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2009.03.043>

Hou, J.; Wang, X.; Hayat, T.; Wang, X. 2017. Ecotoxicological effects and mechanism of CuO nanoparticles to individual organisms. *Environmental Pollution*, 221: 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.066>

Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J. E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; McLaren, S.; Sealy, I.; Caccamo, M.; Churcher, C.; Scott, C.; Barrett, J.C.; Koch, R.; Rauch, G.J.; White, S.; Chow, W.; Stemple, D.L. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446): 498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>

Isani, G.; Falcioni, M.L.; Barucca, G.; Sekar, G.; Andreani, G.; Carpenè, E.; Falconi, G. 2013. Comparative toxicity CuO nanoparticles and CuSO₄ in rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 97: 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.001>

Isaza, F.J.; Castano, J.G.; Echeverria, F.E. 2011. Field study of experimental antifouling paint formulations. *Dyna*, 78(170): 135-143. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532011000600015&lng=en&nrm=iso acesso em: 05 jul. 2020.

Jeevanandam, J.; Chan, Y.S.; Danquah, M.K. 2019. Zebrafish as a Model Organism to Study Nanomaterial Toxicity. *Emerging Science Journal*, 3(3): 195-208. <http://dx.doi.org/10.28991/esj-2019-01182>

Jiang, X.C.; Herricks, T.; Xia, Y.N. 2002. CuO nanowires can be synthesized by heating copper substrates in air. *Nano Letters*, 2(12): 1333-1338. <https://doi.org/10.1021/nl0257519>

Keller, A.A.; Adeleye, A.S.; Conway, J.R.; Garner K.L.; Zhao, L.; Cherr, G.N.; Hong, J.; Gardea-Torresdey, J.L.; Godwin, H.A.; Hanna, S.; Ji, Z.; Kaweeteerawat, C.; Lin, S.; Lenihan, H.S.; Miller, R.J.; Nel, A.E.; Peralta-Videa, J.R.; Walker, S.L.; Zuverza-Mena, N. 2017. Comparative environmental fate and toxicity of copper nanomaterials. *Nano Impact*, 7: 28-40. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.05.003>

Klaine, S.J.; Alvarez, P.J.J.; Batley, G.E.; Fernandes, T.F.; Handy, R.D.; Lyon, D.Y.; Mahendra, S.; McLaughlin, M.J.; Lead, J.R. 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental toxicology and chemistry*, 27(9): 1825-1851. <https://doi.org/10.1897/08-090.1>

Kulak, A.N.; Iddon, P.; Li, Y.; Armes, S.P.; Cölfen, H.; Paris, O.; Wilson, R.M.; Meldrum, F.C. 2007. Continuous structural evolution of calcium carbonate particles: a unifying model of copolymer-mediated crystallization. *Journal of the American Chemical Society*, 129(12): 3729-3736. <https://doi.org/10.1021/ja067422e>

Lalau, C.M. 2014. Evaluation of the toxicity of copper oxide nanoparticles through macrophytes of the species *Landoltia punctata*. 114F. Dissertação (mestrado), Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina – SC, Santa Catarina 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/123238> acesso em: 21 mar. 2020.

Lammer, E.; Kamp, H.G.; Hisgen, V.; Koch, H.; Reinhard, D.; Salinas, E.R.; Wendler, K.; Zok, S.; Braunbeck, T.H. 2009. Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology in Vitro*, 23(7): 1436-1442. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.014>

Lee, K.J.; Nallathamby, P.D.; Browning, L.M.; Desai, T.; Cherukuri, P.K.; Xu, X.H. 2012. Single nanoparticle spectroscopy for real-time in vivo quantitative analysis of transport and toxicity of single nanoparticles in single embryos. *The Analyst*, 137(13): 2973-2986. <https://doi.org/10.1039/c2an35293a>

León, J.D.; Cotto, M.D.C.; Márquez, F. 2019. Toxicology of nanomaterials on zebrafish. *American Journal of Engineering and Applied Sciences*. 12(2): 193-203. <https://doi.org/10.3844/ajeassp.2019.193.203>

Lin, S.; Zhao, Y.; Xia, T.; Meng, H.; Ji, Z.; Liu, R.; George, S.; Xiong, S.; Wang, X.; Zhang, H.; Pokhrel, S.; Mädler, L.; Damoiseaux, R.; Lin, S.; Nel, A. E. 2011. High Content screening in zebra fish speeds up hazard ranking of transition metal oxide nanoparticles. *ACS nano*, 5(9): 7284-7295. <https://doi.org/10.1021/nn202116p>

López-Serrano, A.; Olivas, R.M.; Landaluze, J.S.; Cámara, C. 2014. Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. *Analytical Methods*, 6(1): 38-56. <https://doi.org/10.1039/C3AY40517F>

Lu, G.; Yang, H.; Xia, J.; Zong, Y.; Liu, J. 2017. Toxicity of Cu and Cr nanoparticles to *Daphnia magna*. *Water Air Soil Pollute*, 228(18): 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3206-3>

Malhotra, N.; Ger, T.-R.; Uapipatanakul, B.; Huang, J.-C.; Chen, K.H.-C.; Hsiao, C.-D. 2020. Review of Copper and Copper Nanoparticle Toxicity in Fish. *Nanomaterials*, 10(6): 1126. <https://doi.org/10.3390/nano10061126>

Manjumder, S.; Neogi, S. 2016. Antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles coated on cotton fabric and synthesized by one-pot method. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 8(2): 102-111. <https://doi.org/10.1166/ asem.2016.1832>

Mansano, A.S.; Souza, J.P.; Cancino-Bernardi, F.P.V.; Marangoni, V.S.; Zucolotto, V. 2018. Toxicity of copper oxide nanoparticles to Neotropical species *Ceriodaphnia silvestrii* and *Hyphessobrycon eques*. *Environmental Pollution*, 243: 723-733. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.020>

Manusadzianas, L.; Caillet, C.; Fachetti, L.; Gylyte, B.; Grigutyte, R.; Jurkoniene, S.; Férard, J.F. 2012. Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions to aquatic biota. *Environmental Toxicology Chemistry*, 31(1): 108-114. <https://doi.org/10.1002/etc.715>

Maziero, J.S. 2019. Avaliação da toxicidade de nanopartículas de prata em Microscrustáceo aquáticos e em embriões de *Danio rerio*. 92 f. Dissertação (mestrado), Ciências da Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisa Energética Nuclear, IPEN, USP - São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-30092019-152923/publico/2019MazieroAvaliacao.pdf> acesso em: 07 jul. 2020.

Medeiros, A.M.Z.D.; Côa, F.; Alves, O.L.; Martinez, D.S.T.; Barbieri, E. 2020. Metabolic effects in the freshwater fish *Geophagus iporangensis* in response to single and combined exposure to graphene oxide and trace elements. *Chemosphere*, 243: 125-316. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125316>

Melegari, S.P.; François, P. Costa, R.H.R.; Popovic, R.; Matias, W.G. 2013. Evaluation of toxicity and oxidative stress induce by copper oxide nanoparticles in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*. 142-143: 431-440. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.015>

Midander, K.; Cronholm, P.; Karlsson, H.L.; Elihn, K.; Möller, L.; Leygraf, C.; Wallinder, I.O. 2009. Surface Characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-Sized copper and copper (II) oxide particles: A Cross-Disciplinary Study. *Small* Weinheim an der Bergstrasse Germany, 5(3): 389-399. <https://doi.org/10.1002/smll.200801220>

Mione, M.C.; Trede, N.S. 2010. The zebrafish as a model for cancer. *Disease models & mechanisms*, 3(9-10): 517-523. <https://doi.org/10.1242/dmm.004747>

Misra, S.K.; Nuseibeh, S.; Dybowska, A.; Berhanu, D.; Tetley, T.D.; Valsami-Jones, E. 2014. Comparative study using spheres, rods and nanoplates in the form of an axis on dispersion stability, dissolution, and toxicity of CuO nanomaterials. *Journal Nanotoxicology*, 8(4): 422-432. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.796017>

Montes, M.; Pierce, C.G.; Lopez-Ribot, J.L.; Bhalla, A.S.; Guo, R.Y. 2016. Properties of silver and copper nanoparticle containing aqueous suspensions and evaluation of their In vitro activity against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Nano Research*, 37: 109-121. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/jnanor.37.109>

Mueller, N.C.; Nowack, B. 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science and Technology*, 42(12): 4447-4453. <https://doi.org/10.1021/es7029637>

Oberdorster, G. 2010. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine*, 267(1): 89-105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02187.x>

Oliveira, R.; Domingues, I.; Grisolia, C.; Soares, A. 2009. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environmental Science and Pollution Research International*, 16(6): 679-688. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0119-3>

Ostiguy, C.; Roberge, B.; Ménard, L.; Endo, C.A. 2009. A good practice guide for safe work with nanoparticles: the Quebec Approach. *Journal of Physics*, 151. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/151/1/012037>

Pang, C.; Selk, H.; Misra, K.; Berhanu, D.; Dybowska, A.; Valsami-Jones, E.; Forbes, V. E. 2012. Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or nano and micro-CuO particles. *Valery Forbes Publications*, 35. Disponível em: <https://digitalcommons.unl.edu/biosciforbes/35> acesso em: 12 jun. 2020.

Peng, C.; Shen, C.; Zheng, S.; Yang, W.; Hu, H.; Liu, J.; Shi, J. 2017. Transformation of CuO nanoparticles in the aquatic environment: influence of pH, electrolytes, and natural organic matter. *Nanomaterials Basel, Switzerland*, 7(10): 326. <https://doi.org/10.3390/nano7100326>

Perreault, F.; Oukarroum, A.; Pirastru, L.; Sirois, L.; Gerson Matias, W.; Popovic, R. 2010. Evaluation of copper oxide nanoparticles toxicity using chlorophyll a fluorescence imaging in *Lemna gibba*. *Journal of Botany*, 10. <https://doi.org/10.1155/2010/763142>

Peterson, R.T.; Macrae, C.A. 2012. Systematic approaches to toxicology in the zebrafish. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52: 433-453. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134751>

Petosa, A.R.; Jaisi, D.P.; Quevedo, I.R.; Elimelech, M.; Tufenkji, N. 2010. Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: Role of physicochemical Interactions. *Environmental Science and Technology*, 44(17): 6532-6549. <https://doi.org/10.1021/es100598h>

Phiwdang, K.; Suphankij, S.; Mekprasart, W.; Pecharapa, W. 2013. Synthesis of CuO nanoparticles by precipitation method using different precursors. *Energy Procedia*, 34: 740-745. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.06.808>

Prasad, P.R.; Kanchi, S.; Naidoo, E.B. 2016. In-vitro evaluation of copper nanoparticles cytotoxicity on prostate cancer cell lines and their antioxidant, sensing and catalytic activity: one-pot green approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 161: 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.008>

Rajput, V.D.; Minkina, T.; Suskova, S.; Mandzhieva, S.; Tsitsuashvili, V.; Chaplignin, V.; Fedorenko, A. 2017. Effects of copper nanoparticles (CuONPs) on crop plants: a mini review. *Bio Nanoscience* 8(1): 36-42. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0466-3>

Rangel, W.M. 2014. Synthesis of copper (II) oxide nanoparticles by the method of coprecipitation. 83f. Dissertação (mestrado), Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina - SC, Santa Catarina 2014. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/30408491.pdf> acesso em: 01 jun. 2020.

Reidy, B.; Haase, A.; Luch, A.; Dawson, K.A.; Lynch, I. 2013. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation, and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials*, 6(6): 2295-2350. <https://doi.org/10.3390/ma6062295>

Research and markets 2013. The global market for metal oxide nanoparticles to 2020. Disponível em: http://www.researchandmarkets.com/reports/2488811/the_global_market_for_metal_oxide_nanoparticles acesso em: 12 mar. 2020.

Sedighi, A.; Montazer, M. 2016. Tunable shaped N-doped CuO nanoparticles on cotton fabric through processing conditions: synthesis, antibacterial behavior, and mechanical properties. *Cellulose*, 23: 2229-2243. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0892-3>

Souza, A.E.; Santos, G.T.A.; Barra, B.C.; Macedo JR, W.D.; Teixeira, S.R.; Santos, C.M.; Senos, A.M.O.R.; Amaral, L.; Longo, E. 2012. Photoluminescence of SrTiO₃: Influence of Particle Size and Morphology. *Crystal Growth & Design*, 12(11): 5671-5679. <https://doi.org/10.1021/cg301168k>

Studer, A.M.; Limbach, L.K.; Van Duc, L.; Krumeich, F.; Athanassiou, E. K.; Gerber, L.C.; Moch, H.; Stark, W.J. 2010. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, 197(3): 169-174. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.05.012>

Subbiah, S.; Baskaran, R.; Kumar, S.S.; Balamurugan, S. 2020. Lethal effects of Copper oxide nanoparticles exposure on biochemical, oxidative stress, hematological and histopathological effects in fish: A review *Research Journal of Biotechnology* 15(11): 123-128. <https://doi.org/10.3390/nano10020312>

Sun, D.; Zhang, J.; Ren, H.; Cui, Z.; Sun, D. 2010. Influence of OH⁻ and SO₄²⁻ anions on morphologies of the nanosized nickel hydroxide. *The Journal of Physical Chemistry*, 114(28): 12110-12116. <https://doi.org/10.1021/jp1033849>

Tancredi, P.; Da Costa, L.S.; Calderon, S.; Londoño, M.O.; Socolovsky, L.M.; Ferreira, P.J.; Zanchet, D.; Kenobel, M.; Muraca, D. 2019. Exploring the synthesis conditions to control the morphology of gold-iron oxide heterostructures. *Nano Research*, 12: 1781-1788. <https://doi.org/10.1007/s12274-019-2431-7>

Thit, A.; Skjolding, L.M.; Selck, H.; Sturve, J. 2017. Effects of copper oxide nanoparticles and copper ions to zebrafish (*Danio rerio*) cells, embryos, and fry. *Toxicology in Vitro*, 45: 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.08.010>

Torres De Lemos, C.; Rodel, P.M.; Terra, N.R.; Oliveira, N.C.D.A.; Erdtmann, B. 2007. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(3): 391-401. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.01.004>

Vance, M.E.; Kuiken, T.; Vejerano, E.P.; McGinnis, S.P.; Hochella, M.F.; Rejeski, D.; Hull, M.S. 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6: 1769-1780. <http://dx.doi.org/10.3762/bjnano.6.181>

Volanti, D.P. 2011. Copper (II) morphologies in the mesoscale: microwave-assisted hydrothermal synthesis, growth mechanism and catalytic activity in the ethanol dehydrogenation reaction. 133f. Tese (doutorado). Química, Universidade Estadual Paulista -

SP, São Paulo 2011. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/102564/volanti_dp_dr_araiq.pdf?sequence=1 acesso em: 18 jun. 2020.

Williams, R.J.; Harrison, S.; Keller, V.; Kuenen, J.; Loft, S.; Praetorius, A.; Svendsen, C.; Vermeulen, L.C.; Wijn, J. 2019. Models for assessing engineered nanomaterial fate and behavior in the aquatic environment. *Current Opinion on Environmental Sustainability* 36: 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2018.11.002>

Wu, F.; Bortvedt, A.; Haper, B.J.; Crandon, L.E.; Haper, S.L. 2017. Uptake and toxicity of CuO nanoparticles to *Daphnia magna* varies between indirect dietary and direct waterborne exposures. *Aquatic Toxicology Amsterdam Netherlands*, 190: 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.021>

Xiao, Y.; Vijver, M.G.; Chen, G.; Peijnenburg, W.J. 2015. Toxicity and accumulation of Cu and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology*, 49(7): 4657-4664. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00538>

Xu, J.; Zhang, Q.; Li, X.; Zhan, S.; Wang, L.; Chen, D. 2017. The effects of copper oxide nanoparticles on dorsoventral patterning, convergent extension, and neural and cardiac development of zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 188:130-137. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.002>

Zhang, Y.; Ding, Z.; Zhao, G.; Zhang, T.; Xu, Q.; Cui, B.; Liu, J.X. 2018. Transcriptional responses and mechanisms of copper nanoparticle toxicology on zebrafish embryos. *Journal of Hazardous Materials*. 344: 1057-1068. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.11.039>

Zhao, X.; Ong, K.J.; Ede, J.D.; Stafford, J.L.; Ng, K.W.; Goss, G.G.; Loo, S.C.J. 2013. Evaluating the toxicity of hydroxyapatite nanoparticles in catfish cells and zebrafish embryos. *Small*, 9(9-10): 1734-1741. <https://doi.org/10.1002/sml.201200639>

Zhu, J.; Bi, H.; Wang, Y.; Wang, X.; Yang, X.; Lu, L. 2007. Synthesis of flower-like CuO nanostructures via a simple hydrolysis route. *Materials Letters*, 61(30): 5236-5238. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.04.037>

Zucolotto, V. 2014. Nanotoxicity nanomedicine and nanotoxicology laboratory. Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www5.usp.br/76732/grupo-gnano-diversifica-pesquisa-em-nanomedicina-e-em-nanotoxicologia/> acesso: 10 jun. 2020.

CAPÍTULO ÚNICO

ALTERAÇÕES METABÓLICAS E NATATÓRIAS EM ZEBRA-FISH (*Danio rerio*) CAUSADAS POR EXPOSIÇÃO CRÔNICA A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE II (NPsCuO)

Autores: Maria Izabel de Oliveira Eiras ^(a), Luelc Souza da Costa ^(b), Edison Barbieri ^{(c)*}

^(a) Programa de Pós-graduação do Instituto de Pesca - APTA- SAA/SP, Caixa Postal 157, 11990-000, Cananéia, São Paulo, Brasil.

^(b) Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brasil.

^(c) Instituto de Pesca – APTA SAA/SP, Caixa Postal 157, 11990-000 Cananeia, SP, Brasil.

* Autor Correspondente: Instituto de Pesca-APTA-SAA/SP, Caixa Postal 157, 11990- 000, Cananeia/SP, Brasil. E-mail:edisonbarbieri@yahoo.com.br

(Artigo está redigido nas normas da Revista “ Chemosphere”)

RESUMO

O presente estudo visou comparar os efeitos metabólicos causados pelas nanopartículas de óxido de cobre II caracterizadas em bastões e esferas; investigar os efeitos fisiológicos através de ensaios para metabolismo de rotina (consumo específico de oxigênio e excreção específica de amônia) e os efeitos comportamentais através da capacidade de natação; analisar as respostas do modelo biológico *Danio rerio* adulto, para avaliar o risco potencial ao ambiente, e fornecer informações que possibilitem a expansão do uso das NPsCuO com segurança. Para realização dos ensaios, foram utilizados 88 peixes da espécie *Danio rerio*, divididos em grupos de 6 para metabolismo de rotina e 5 para capacidade de natação, expostos por 24h em concentrações de 0, 50, 100 e 200µg/L de nanopartículas de óxido de cobre II (nanoesferas e nanobastões). Os testes realizados com as nanobastões apresentaram alterações metabólicas nos peixes, causando aumento do consumo específico de oxigênio de 294% na concentração de 100µg/L e 321% na concentração de 200µg/L, diminuição da excreção específica de amônia de 83% na concentração de 200µg/L, e a diminuição da capacidade de natação de 34% na concentração de 100µg/L e 55% na concentração de 200µg/L, quando comparados ao grupo de controle. Já os ensaios realizados com as nanoesferas não apresentaram alterações significativas. Os testes realizados demonstraram que diferentes estruturas morfológicas da mesma nanopartícula de óxido de cobre II (NPsCuO), causaram diferentes efeitos no metabolismo dos peixes. Concluindo, em estudos ecotoxicológicos utilizando nanopartículas é fundamental a sua caracterização.

Palavras-chave: Peixe-zebra; Nanopartículas de óxido de cobre II; Taxa metabólica; Capacidade de natação.

ABSTRACT

This study aimed to compare the metabolic effects caused by the copper oxide II nanoparticles characterized in rods and spheres; investigate the physiological effects through assays to routine metabolism (specific oxygen consumption and specific ammonia excretion) and the behavioral effects through the swimming capacity; analyses the responses of the adult *Danio rerio* biological model, to assess the potential risk to the environment, and provide information that enables the expansion of the safe use of the NPsCuO. For carrying out the analysis was used eighty-eight fish of the species *Danio rerio* were used divided into groups of 6 for routine metabolism and 5 for swimming ability, exposed for 24 hours in concentrations of 0, 50, 100 and 200µg/L of copper oxide II nanoparticles (nanorods and nanospheres). The analysis has carried out with copper nano-rods showed significant alterations in the fish, causing an increase in the specific oxygen consumption of 294% in the concentration of 100µg/L and 321% in the concentration of 200µg/L, a decrease in the specific excretion of ammonia of 83% in the concentration of 200µg/L, and a 34% decrease in swimming capacity at a concentration of 100µg/L and 55% at a concentration of 200µg/L, when compared to the control group. The analysis has carried out with nanospheres did not show any significant changes. They have demonstrated that different morphological structures of the same copper oxide II nanoparticle (NPsCuO) caused different effects on the metabolism of fish. As result, characterization is essential in ecotoxicological studies using nanoparticles.

Keywords: Zebrafish; Copper oxide nanoparticles II; Metabolic rate; Swimming capacity.

INTRODUÇÃO

As excelentes características das nanopartículas de óxido de cobre II (NPsCuO), fazem com que a sua produção e consequentemente sua utilização atinjam uma amplitude de ordem exponencial. Sua sintetização e caracterização é realizada de forma rápida e simples, e evidencia suas distintas estruturas morfológicas, mostrando partes do seu mecanismo de crescimento em solução por combinação de técnicas de microscopia eletrônica (Volanti, 2011).

A formação das nanoestruturas com núcleos muito pequenos segue o mecanismo de nucleação e crescimento de La Mer, que são formados de acordo com a variação da concentração dos precursores. Outros fatores podem interferir na formação da estrutura cristalina, morfologia e tamanho das nanopartículas, dentre eles estão a temperatura, e os agentes passivadores e redutores, uma caracterização detalhada mostra grandes alterações morfológicas e estruturais das nanopartículas, após redução do catalisador (Costa e Zanchet 2017; Trancredi et al., 2019). O pH e a concentração do íon OH^- também são considerados muito relevantes na formação morfológica das nanopartículas (Sun et al., 2010).

Com as mais diversas aplicações em eletrônica, catálise, sensores, células solares, produção de hidrogênio, diodos de emissão de luz, administração de medicamentos (Keller et al., 2017; Rajput et al., 2017), agricultura, preservação de alimentos (Montes et al., 2016), indústrias têxteis (Sedighi e Montazer, 2016), tintas anti-incrustante, revestimentos e tratamento de água (Ben-Sasson et al., 2016), torna-se inevitável, à sua liberação para o ambiente aquático, trazendo eminente risco para organismos (Lu et al., 2017; Wu et al., 2017), embora as nanopartículas de óxido de cobre II apresentem baixa solubilidade em água, podem causar efeitos tóxicos nos organismos aquáticos (Keller et al., 2017), que podem ser exercidos por efeitos específicos das nanopartículas (Manusadzianas et al., 2012; Cronholm et al., 2013), pelos íons de cobre liberados (Jo et al., 2012), por nanopartículas e íons (Xiao et al., 2015).

As nanopartículas de óxido de cobre II, podem liberar íons cobre, que dissolvidos tendem a induzir danos à membrana celular, lesão mitocondrial, desnaturação de proteínas, modificação de ácidos nucleicos, danos por geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), estresse oxidativo, dano ao DNA e apoptose (Hou et al., 2017; Peng et al., 2017; Thit et al., 2017), em variados bioindicadores à elas expostos, podendo ser letal às espécies aquáticas devido à bioacumulação, mesmo em baixas concentrações (Subbiah et al., 2020).

O peixe *Danio rerio* se apresenta como um excelente organismo-teste, para avaliação toxicológica, por fornecer informações dos mecanismos de ação do estressor (Thit et al., 2017).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes químicos

As substâncias utilizadas como reagentes foram:

I-Nanopartículas de óxido de cobre II (NPsCuO) caracterizadas morfológicamente em bastões (nanobastões) de concentração 10 mg/ml em solução 1% de citrato de sódio.

II-Nanopartículas de óxido de cobre II (NPsCuO) caracterizadas morfológicamente em esferas (nanoesferas) de concentração 10 mg/ml em solução aquosa de etanol 10%.

As NPsCuO testadas, foram fornecidas pelo LNNano do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Ambas utilizadas em três diluições diferentes 50 µg/l, 100 µg/l e 200 µg/l, submetidas a sonicação por 10 minutos em banho ultrassônico (kondortech digital ultrasonic cleaner CD 4820), para suspensão das nanopartículas, antes de serem inseridas nos aquários.

2.2. Síntese das nanopartículas

2.2.1. Nanobastões de óxido de cobre II

As NPsCuO utilizadas no presente estudo foram sintetizadas a partir da modificação do método de Misra et al., (2014). Trata-se do método de coprecipitação em meio alcalino que é amplamente utilizado na preparação de óxidos metálicos. Para preparação, 335 µL de ácido acético glacial foram adicionados a 100 ml de uma solução aquosa de 0,02 M de (precursor) sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). O sistema foi aquecido a 100 °C e em seguida, 0,45 g de hidróxido de sódio (NaOH) foi adicionado rapidamente à solução sob agitação e borbulhamento de gás nitrogênio (N_2). Após 15 minutos, o sistema foi resfriado à temperatura ambiente e o precipitado foi lavado em água ultrapura por centrifugação a 5000 RPM por 5 minutos. Em seguida, as partículas foram ressuspensas em uma solução de citrato de sódio 1% m/v e sonicadas por 20 minutos. Por fim, as partículas foram lavadas duas vezes por centrifugação a 5000 RPM por 10 minutos e ressuspensas em água ultrapura.

2.2.2. Nanoesferas de óxido de cobre II

As nanoesferas foram sintetizadas a partir da modificação do método de Misra et al., (2014). Trata-se do método de coprecipitação em meio alcalino que é amplamente utilizado na preparação de óxidos metálicos. O procedimento utilizado foi exatamente o mesmo do descrito para as nanobastões. Exceto pela quantidade de hidróxido de sódio (NaOH)

adicionado, que para síntese das nanoesferas foi 0,90 g, ou seja, o dobro da massa do reagente alcalino.

2.3. Caracterização das nanopartículas

2.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi um dos métodos utilizados para caracterização das nanopartículas sintetizadas. Para isso foi utilizado um microscópio JEOL modelo JEM 2100F, operado a 200 kV no modo Bright Field. A suspensão coloidal foi sonicada por 20 minutos e então uma pequena alíquota foi adicionada sobre uma grade de cobre (Cu) recoberta por uma camada ultrafina de carbono. A grade foi deixada para secar em dessecador durante a noite no dia anterior à análise. As NPsCuO em forma de nanobastões foram caracterizadas na ordem de 500 nanômetros, nas escalas de 20, 100 e 500 nm. As NPsCuO em forma de nanoesferas foram caracterizadas na ordem de 5 nanômetros, na escala de 30 nm.

Segundo Padilha (2013), microscopia de transmissão eletrônica (MET), consiste em um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que alinham o feixe de elétrons paralelos, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão cerca de 10⁻⁵ mmHg e com faixa de magnificação entre 50 à 600.000 vezes.

A microscopia é um dos métodos de caracterização mais importantes que permite a visualização das nanopartículas, fornecendo informação exclusiva sobre o tamanho, formato e morfologia (Powers et al., 2011). O MET é uma técnica análoga à microscopia óptica de transmissão, pois sua iluminação é obtida por um canhão de elétrons, que está no topo da coluna do microscópio, enquanto o sistema de gravação (uma tela fluorescente ou um filme fotográfico) fica no fundo, (Cáceres-Vélez et al., 2016; Cao et al., 2016).

2.4. Organismo teste *Danio rerio*

Foram utilizados nos experimentos de avaliação do metabolismo de rotina (consumo específico de oxigênio, excreção específica de amônia) e capacidade de natação um total de 88 peixes da espécie *Danio rerio* com peso médio de 0,43 ± 0,13 g, comprados em estabelecimento comercial no município de Cananéia São Paulo.

Antes de serem submetidos aos testes, os peixes foram aclimatados por 3 dias em aquários de 50 litros no laboratório do Instituto de Pesca, Cananéia APTA/SAA/SP.

Os animais foram alimentados com ração comercial (Nanolis 45% proteína bruta) uma vez ao dia, sendo que 24 horas antes dos ensaios a alimentação foi suspensa.

2.5. Testes experimentais

Para preparação do aquário foi utilizado 5 litros de água de abastecimento, previamente filtrada com filtro de celulose com poro de 0,45 µm. O recipiente foi mantido com aerador e temperatura controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$); antes da transferência dos peixes foi inserida a solução de nanopartículas de óxido de cobre II, que foi previamente sonicada por 10 minutos para garantir a sua dispersão ao meio. Após 5 minutos, com as nanopartículas já dissolvidas ao meio, os peixes foram colocados no aquário.

Os experimentos foram realizados com grupos de 6 peixes para metabolismo de rotina e grupos de 5 peixes para capacidade de natação, que permaneceram expostos por 24 horas em cada concentração relacionada:

Nanopartículas de óxido de cobre II (bastões): 0,0 µg/L, 50 µg/L, 100 µg/L e 200 µg/L.

Nanopartículas de óxido de cobre II (esferas): 0,0 µg/L, 50 µg/L, 100 µg/L e 200 µg/L.

Em síntese, para os testes do metabolismo de rotina, foram utilizados 12 peixes para o grupo controle (0,0 µg/L), e 36 peixes foram expostos a três diferentes concentrações de nanobastões e três diferentes concentrações de nanoesferas. Para os testes de capacidade de natação, foram utilizados 10 peixes para o grupo controle (0,0 µg/L), e 30 peixes foram expostos a três diferentes concentrações de nanobastões e três diferentes concentrações de nanoesferas.

2.6. Metabolismo de rotina: Consumo específico de oxigênio

A análise foi realizada através da técnica de respirômetria fechada. Foi utilizado um sistema composto por dois compartimentos com circulação contínua de água (livre de cloro) entre eles. No compartimento inferior, foram colocados 6 respirômetros. Após as 24 horas de exposição às NPsCuO os animais foram transferidos individualmente aos respectivos respirômetros (numerados de 1 a 6) e mantidos com circulação contínua de água por 1 hora para aclimação, esse processo é necessário para diminuir o estresse causado pelo manejo do peixe de um local para outro (Barbieri, 2009). Decorrido o tempo, o fluxo de água foi cessado e os respirômetros fechados com cuidado para não haver presença de bolhas de ar, e mantidos por 1 hora. Após este período, as amostras de água foram coletadas para análise do consumo específico de oxigênio, transferidas dos respirômetros para os respectivos frascos de coleta (frasco de vidro boro silicato de cor âmbar, com capacidade nominal de 70 ml com tampa de vidro esmerilhada), sempre evitando formação de bolhas de ar ao fechar o frasco. O oxigênio dissolvido foi determinado segundo o método de Winkler (1888).

A diferença entre as concentrações de oxigênio determinadas no início e ao final do confinamento foi utilizada para o cálculo do consumo específico de oxigênio ($\text{mlO}_2/\text{g/h}$). Para tal, foi considerado no cálculo o volume do respirômetro, a massa úmida do animal e o tempo de confinamento. Nenhum animal foi utilizado mais que uma vez. Não houve mortalidade dos peixes utilizados.

2.7. Metabolismo de rotina: Excreção específica de amônia

As amostras para análise da excreção específica de amônia foram coletadas sequencialmente às coletas para análise de consumo específico de oxigênio. O nitrogênio amoniacal foi determinado pelo método de Nessler, Greenberg (1995). (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1995). Os cálculos dos resultados da excreção específica de amônia foram realizados a partir da curva-padrão. A diferença entre as concentrações de amônia determinadas no início e ao final do confinamento foi utilizada para o cálculo da excreção específica de amônia (mg/g/h). Para tal, foi considerado no cálculo o volume do respirômetro, a massa úmida do animal e o tempo de confinamento.

2.8. Capacidade de natação

A fim de quantificar o efeito da exposição as nanopartículas de óxido cobre II na atividade natatória dos peixes, um túnel hidrodinâmico foi construído e utilizado no laboratório, baseado nas descrições de Brett, (1964) e modificado para indivíduos de pequeno porte (Figura 2).

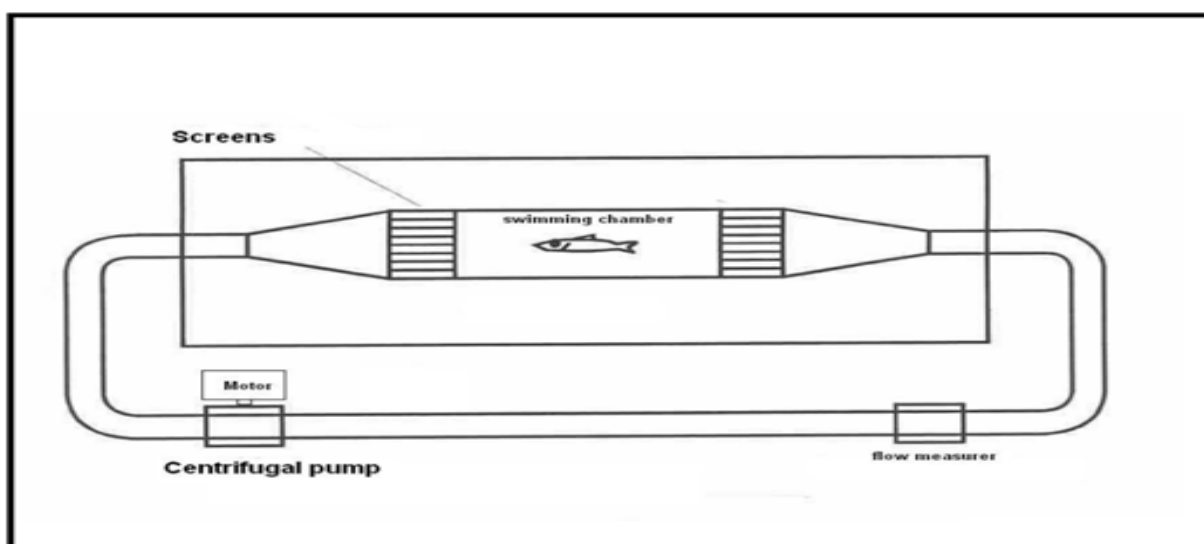


Figura 2 - Câmara de natação do laboratório do instituto de pesca Cananéia- SP.
Fonte: Barbieri 2000.

O túnel natatório, de volume total 1,2 L consistiu em uma câmara encaixada em uma caixa com água para auxiliar a estabilidade da temperatura. Individualmente, os peixes após exposição, foram forçados a nadar contra uma corrente produzida por um propulsor ligado em um motor. Cada peixe pôde se ajustar e se orientar dentro da câmara a uma baixa velocidade do fluxo da água. A velocidade da corrente foi mensurada através de medidor de fluxo “Venturi”. A velocidade do fluxo foi aumentada gradativamente até que o peixe pudesse manter sua posição.

Antes do início dos experimentos, os animais foram mantidos no respirômetro ativo (túnel de natação) com circulação contínua de água pelo período mínimo de 1 hora para atenuar o estresse causado pelo manuseio. Em seguida, o suprimento de água foi suspenso e o respirômetro ativo fechado. O respirômetro foi protegido por anteparo para isolar os animais de possíveis movimentações no laboratório. A velocidade do fluxo de água foi aumentada gradativamente de 1 cm/s até atingir 5 cm/s ($\pm 0,31$), então os peixes foram forçados a nadar a essa velocidade até a exaustão. Os animais foram considerados exaustos quando diminuíram a distância e o tempo de movimento, não conseguindo mais manter sua velocidade de natação em relação ao fluxo de água, finalmente sendo arrastados pela corrente à extremidade de saída do túnel de natação, e permanecendo nessa posição por mais de 60 segundos. Após cada experimento, a massa úmida dos peixes foi mensurada. Nenhum animal foi utilizado mais que uma vez. Não houve mortalidade dos peixes utilizados.

2.9. Análise estatística

Os dados de consumo específico de oxigênio e excreção específica de amônia foram analisados quanto a normalidade da distribuição utilizando-se o teste de Shapiro- Wilk e homocedasticidade das variâncias usando o teste de Levene. Como os resultados formam normais e homocedásticos, as diferenças entre as médias dos tratamentos foram avaliadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$. Os dados de capacidade de natação foram avaliados em função das médias e desvios padrões obtidos por análises estatísticas do ANOVA, após a verificação das distribuições normais. Diferenças foram consideradas significantes quando o $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização nanopartículas de óxido de cobre II (NPsCuO)

3.1.1. Nanobastões

Na ordem de 500 nm (Figuras 3, 4, 5 e 6). Apresentaram: partículas maiores, difícil dispersão, instabilidade coloidal, cinética rápida, fácil precipitação e grandes aglomerados.

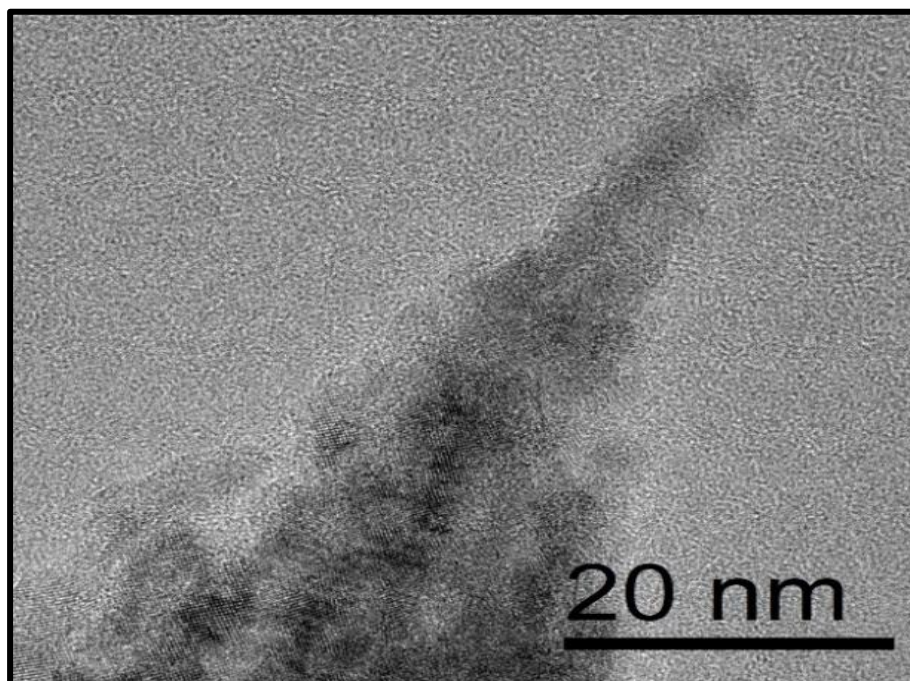


Figura 3 - Nanobastões escala de 20 nanômetros, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

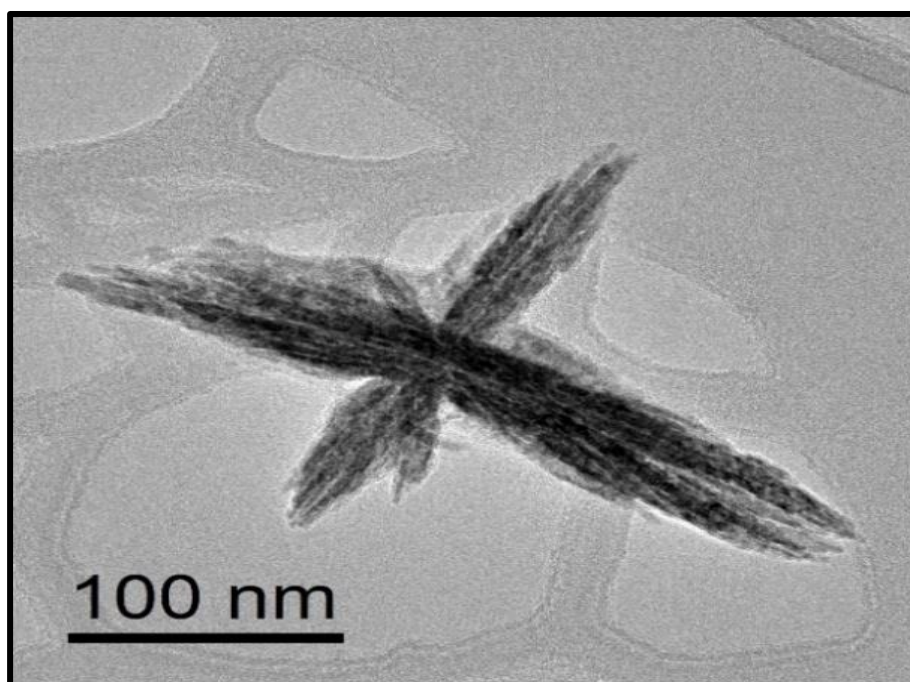


Figura 4 - Nanobastões escala de 100 nanômetros, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

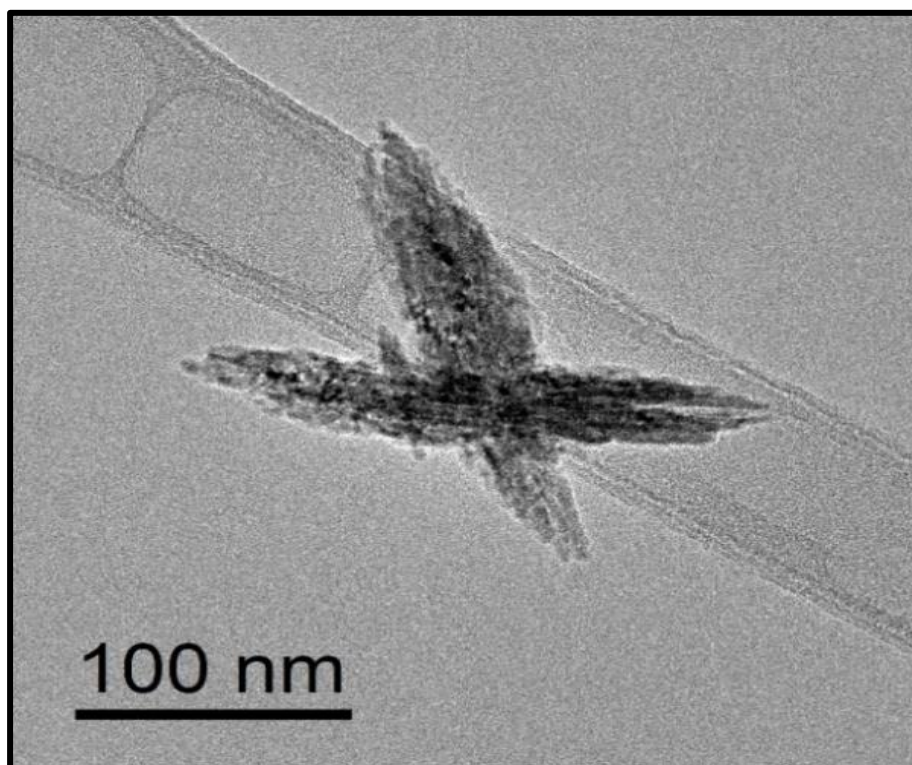


Figura 5 - Nanobastões escala de 100 nanômetros, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

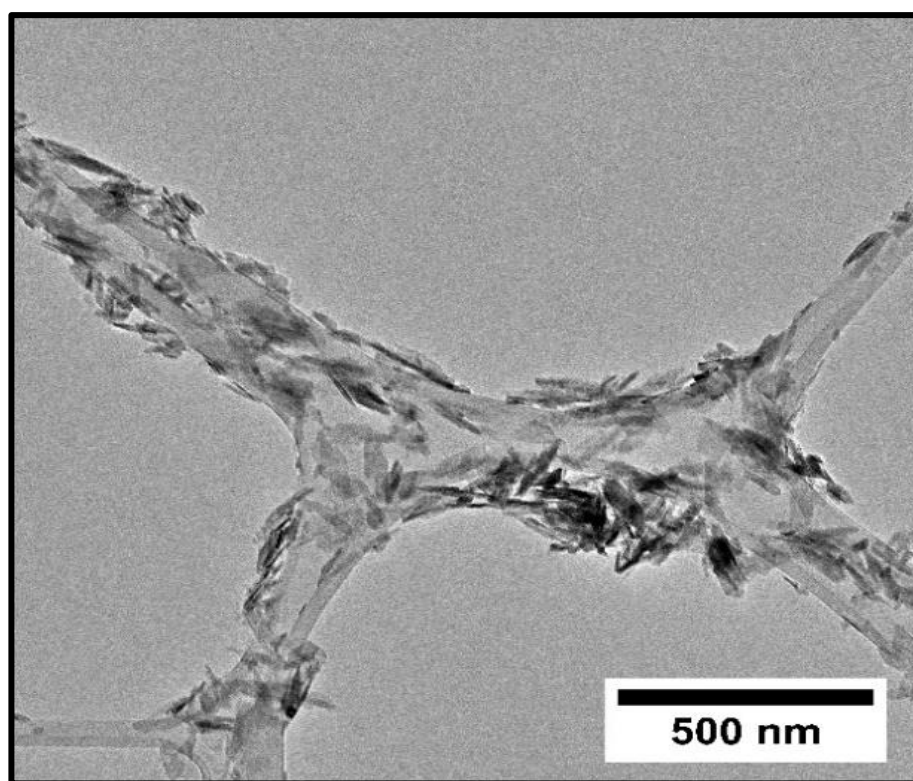


Figura 6 - Nanobastões escala de 500 nanômetros, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.1.2. Nanoesferas

Na ordem de 5 nm, (Figuras 7, 8, 9 e 10). Apresentaram: partículas menores, fácil dispersão, estabilidade coloidal, cinética e nucleação lenta, precipitação inexistente e ausência de aglomerados.

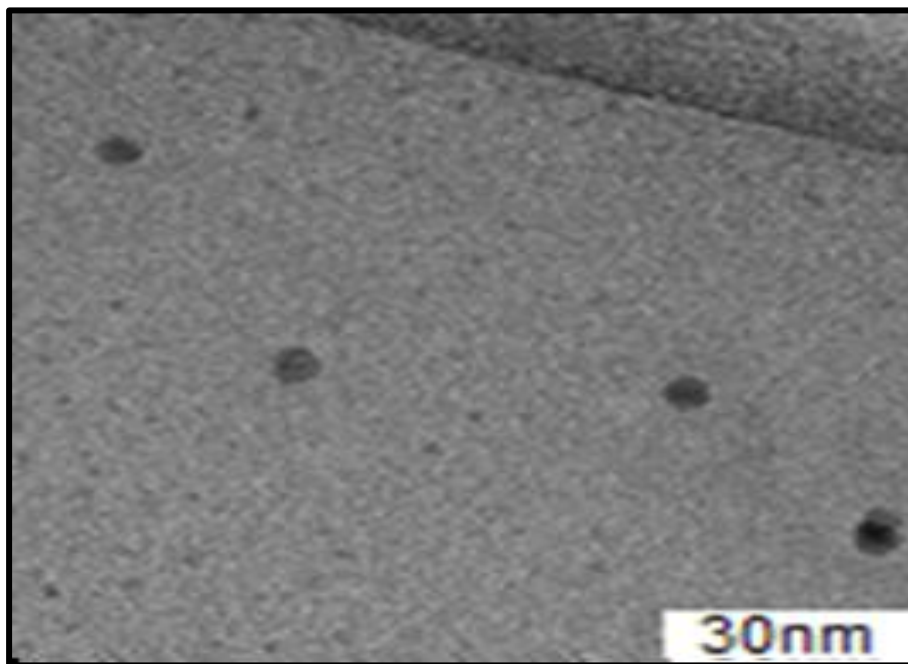


Figura 7 - Nanoesferas escala de 30 nanômetros, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

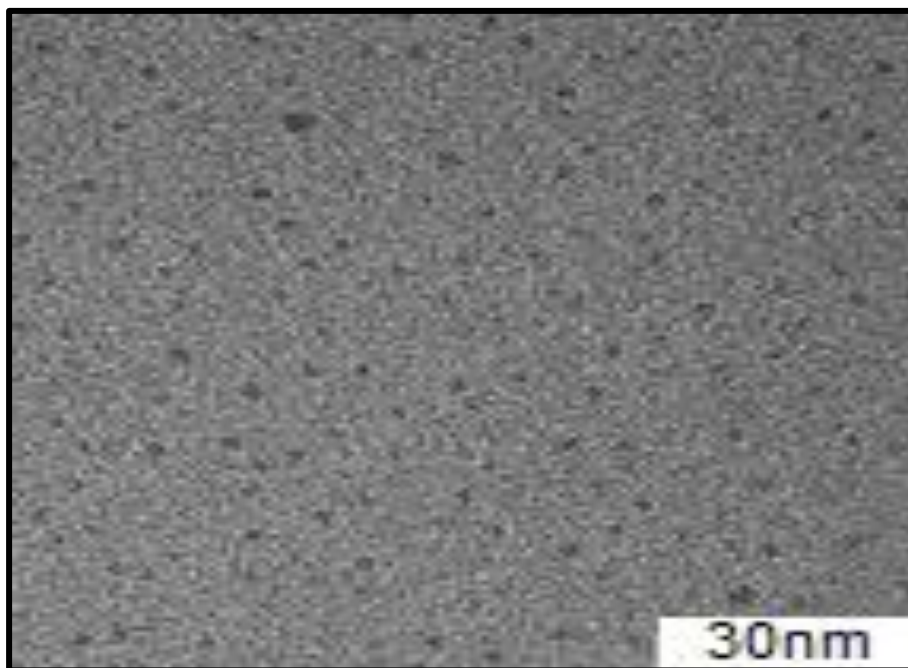


Figura 8 - Nanoesferas escala de 30 nanômetros, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

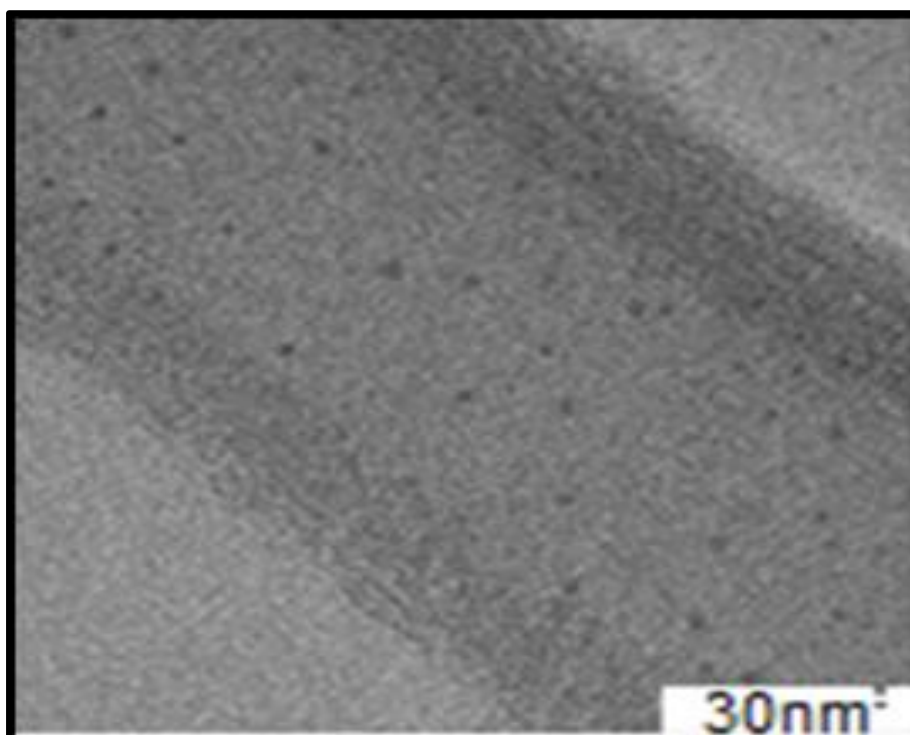


Figura 9 - Nanoesferas escala de 30 nanômetros, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

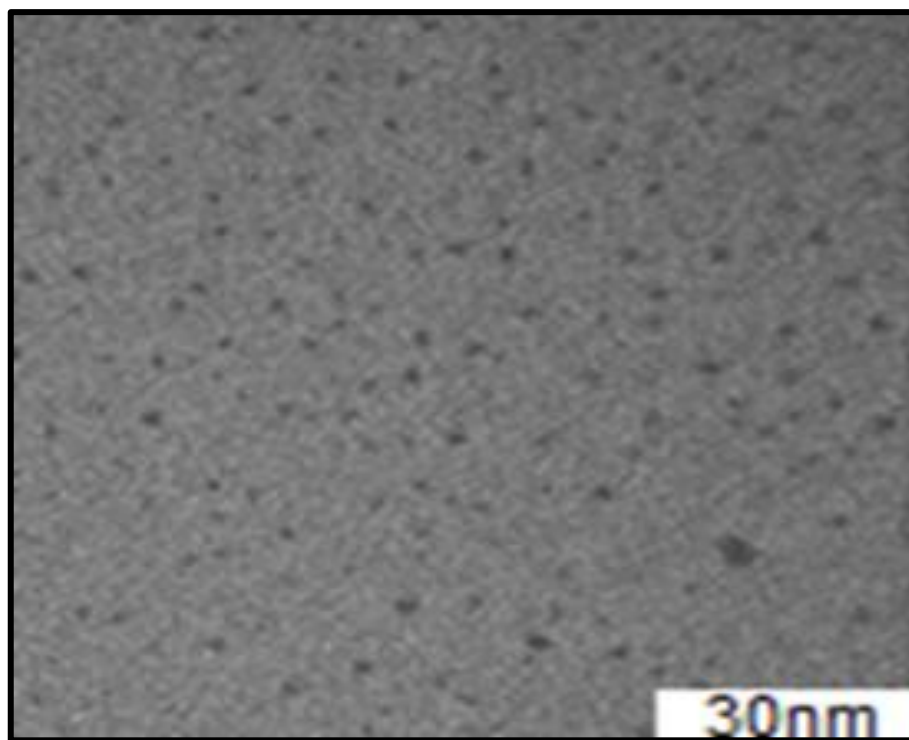


Figura 10 - Nanoesferas escala de 30 nanômetros, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.2. Consumo específico de oxigênio (NPCuO bastões)

Os ensaios para consumo específico de oxigênio ($\text{mLO}_2/\text{g}/\text{h}$) realizados com os peixes expostos por 24 horas as nanopartículas de óxido de cobre II caracterizadas em bastões (nanobastões), apresentaram na concentração de $50 \mu\text{g}/\text{L}$ um aumento não significativo estatisticamente, já nas concentrações de $100 \mu\text{g}/\text{L}$ e $200 \mu\text{g}/\text{L}$, apresentaram um aumento considerável de (294%) e (321%) respectivamente, em relação ao controle (Figura 11).

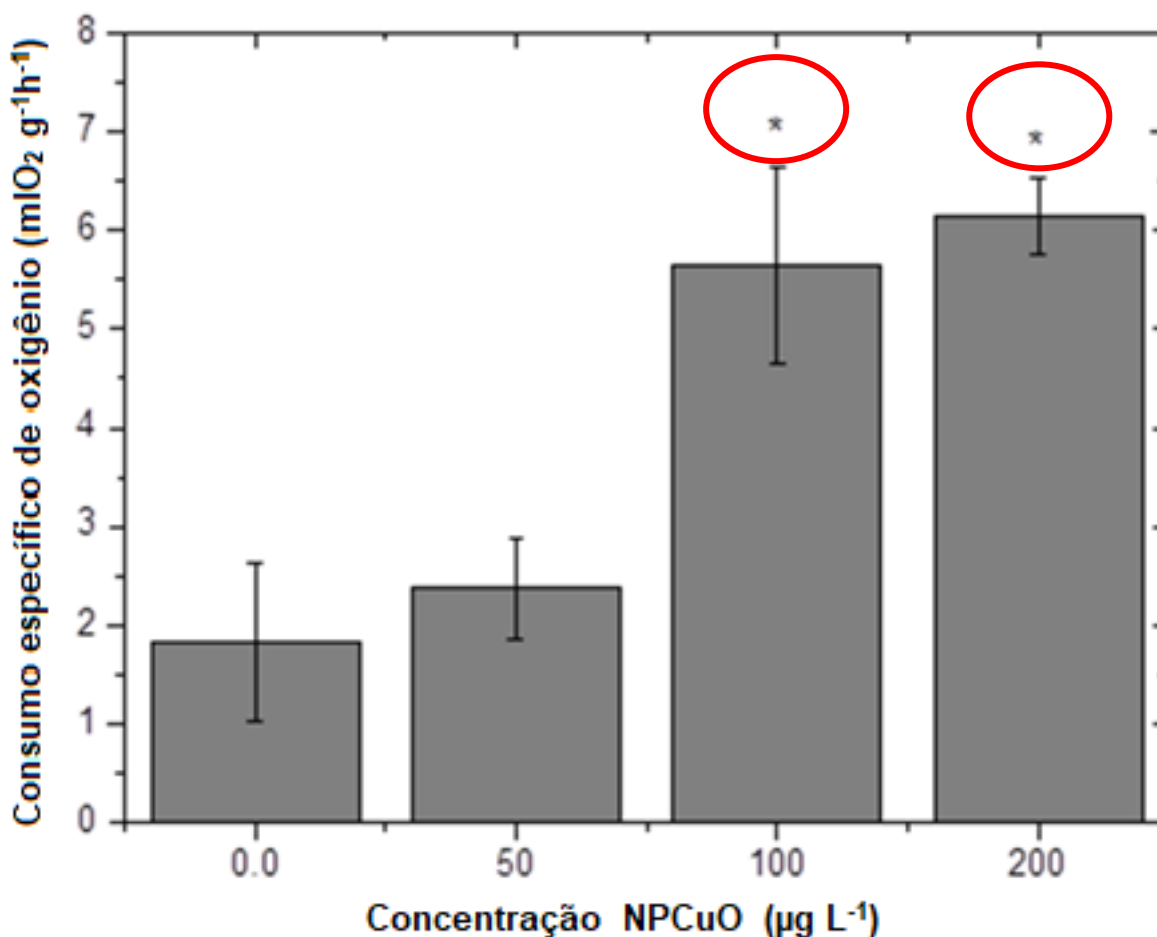


Figura 11 – Consumo específico de oxigênio ($\text{mLO}_2/\text{g}/\text{h}$) conforme variação na concentração de nanopartículas de óxido de cobre II (nanobastões). As colunas representam as médias ($n=6$) e as barras são os respectivos desvios padrões. O asterisco indica os grupos que apresentaram diferença estatística ($p<0,05$).

3.3. Consumo específico de oxigênio (NPCuO esferas)

Os ensaios para consumo específico de oxigênio ($\text{mLO}_2/\text{g}/\text{h}$) realizados com os peixes expostos por 24 horas as nanopartículas de óxido de cobre II caracterizadas em esferas (nanoesferas), embora demonstrem um leve aumento nas concentrações de $100 \mu\text{g}/\text{L}$ e $200 \mu\text{g}/\text{L}$, não apresentaram diferença significativa nas concentrações empregadas, em relação ao controle (Figura 12).

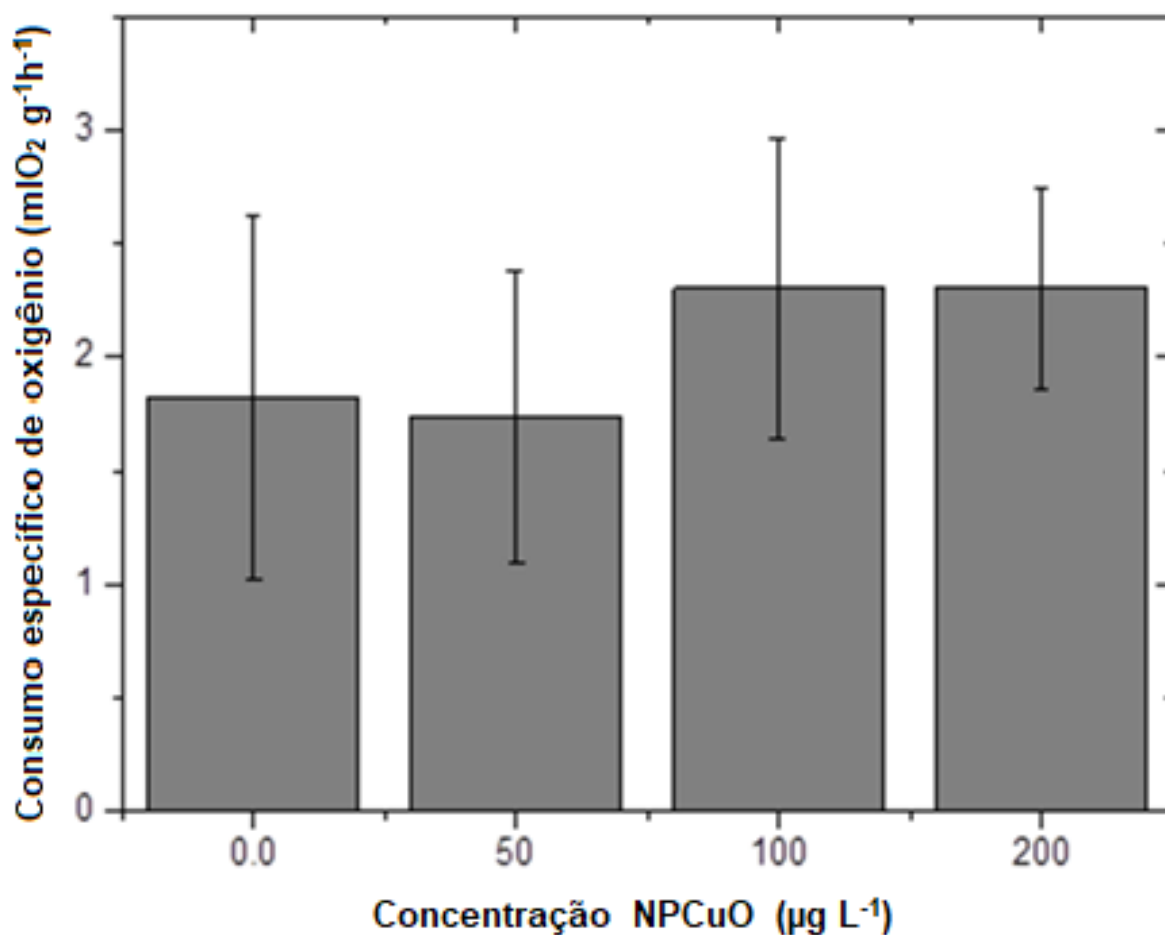


Figura 12 – Consumo específico de oxigênio ($\text{mLO}_2/\text{g}/\text{h}$) conforme variação na concentração de nanopartículas de óxido de cobre II (nanoesferas). As colunas representam as médias ($n=6$) e as barras são os respectivos desvios padrões.

3.4. Excreção específica de amônia (NPsCuO bastões)

Os testes para excreção específica de amônia (mg/g/h), realizados com os peixes expostos por 24 horas as nanopartículas de óxido de cobre II caracterizadas em bastões (nanobastões), mostraram uma tendência de aumento na concentração $100 \mu\text{g/L}$ não significativa estatisticamente e uma pronunciada diminuição (83%) na concentração $200 \mu\text{g/L}$, a qual foi significativamente diferente, em relação ao controle (Figura 13).

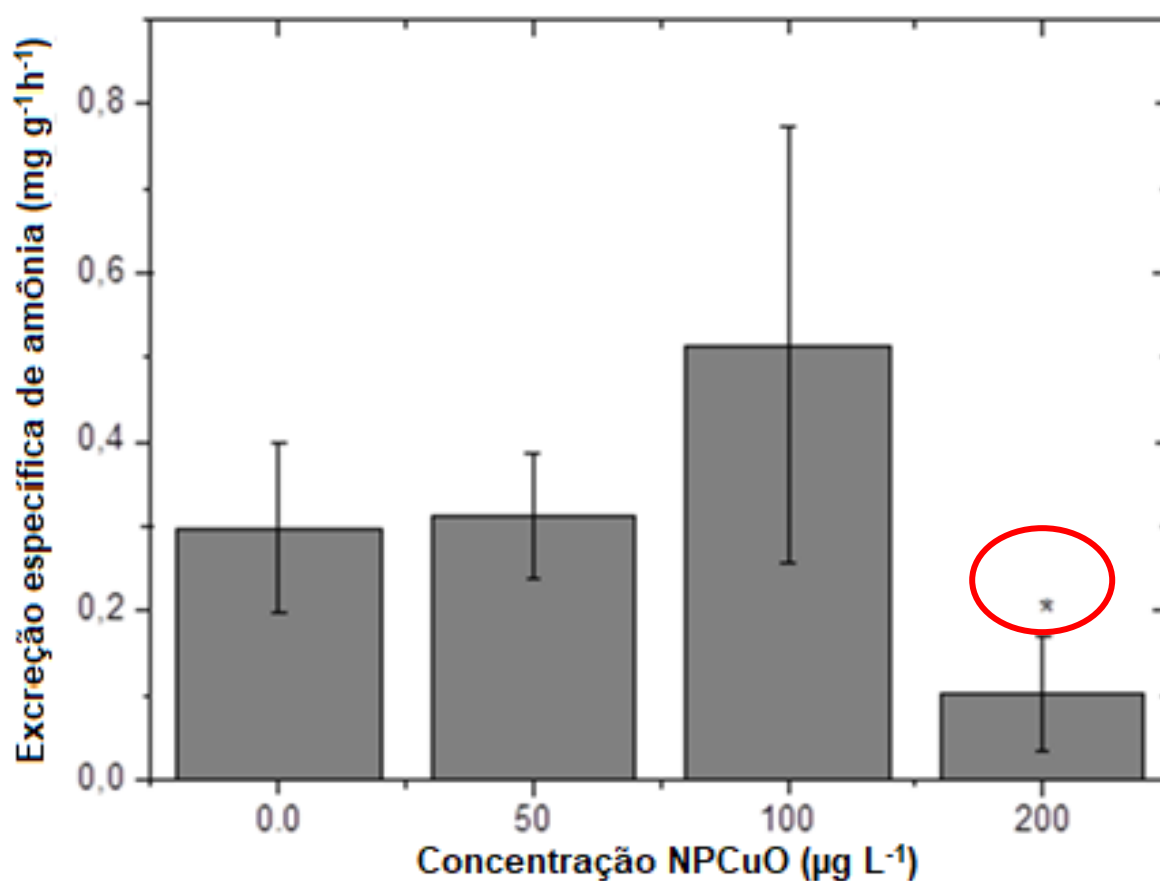


Figura 13 - Excreção específica de amônia (mg/g/h) em relação à concentração de nanopartículas de óxido de cobre II (nanobastões). As colunas representam as médias ($n=6$) e as barras são os respectivos desvios padrões. O asterisco indica os grupos que apresentaram diferença estatística ($p<0,05$).

3.5. Excreção específica de amônia (NPCuO esferas)

Os testes para excreção de amônia (mg/g/h), realizados com os peixes expostos por 24 horas as nanopartículas de óxido de cobre II caracterizadas em esferas (nanoesferas), embora demonstre uma leve diminuição na concentração de $100 \mu\text{g/L}$, não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das concentrações aplicadas, em relação ao controle (Figura 14).

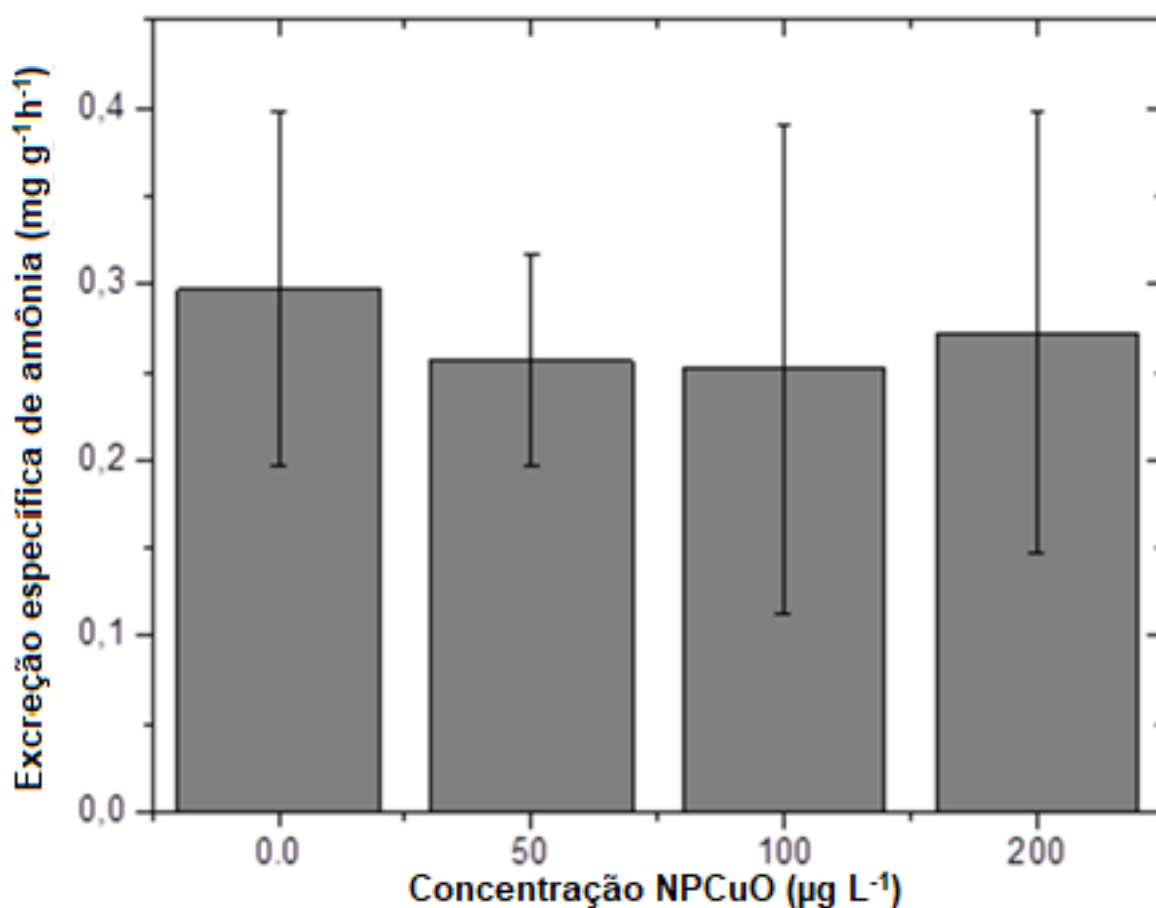


Figura 14 - Excreção específica de amônia (mg/g/h) em relação à concentração de nanopartículas de óxido de cobre II (nanoesferas). As colunas representam as médias ($n=6$) e as barras são os respectivos desvios padrões.

3.6. Capacidade de natação (NPsCuO bastões)

Os peixes expostos por 24 horas as nanopartículas de óxido de cobre II caracterizadas em bastões (nanobastões) e posteriormente submetidos a atividade natatória, apresentaram diminuição significativa na capacidade de natação nas concentrações de 100 $\mu\text{g/L}$ e 200 $\mu\text{g/L}$, (34%) e (55%) respectivamente, em relação ao controle (Figura 15).

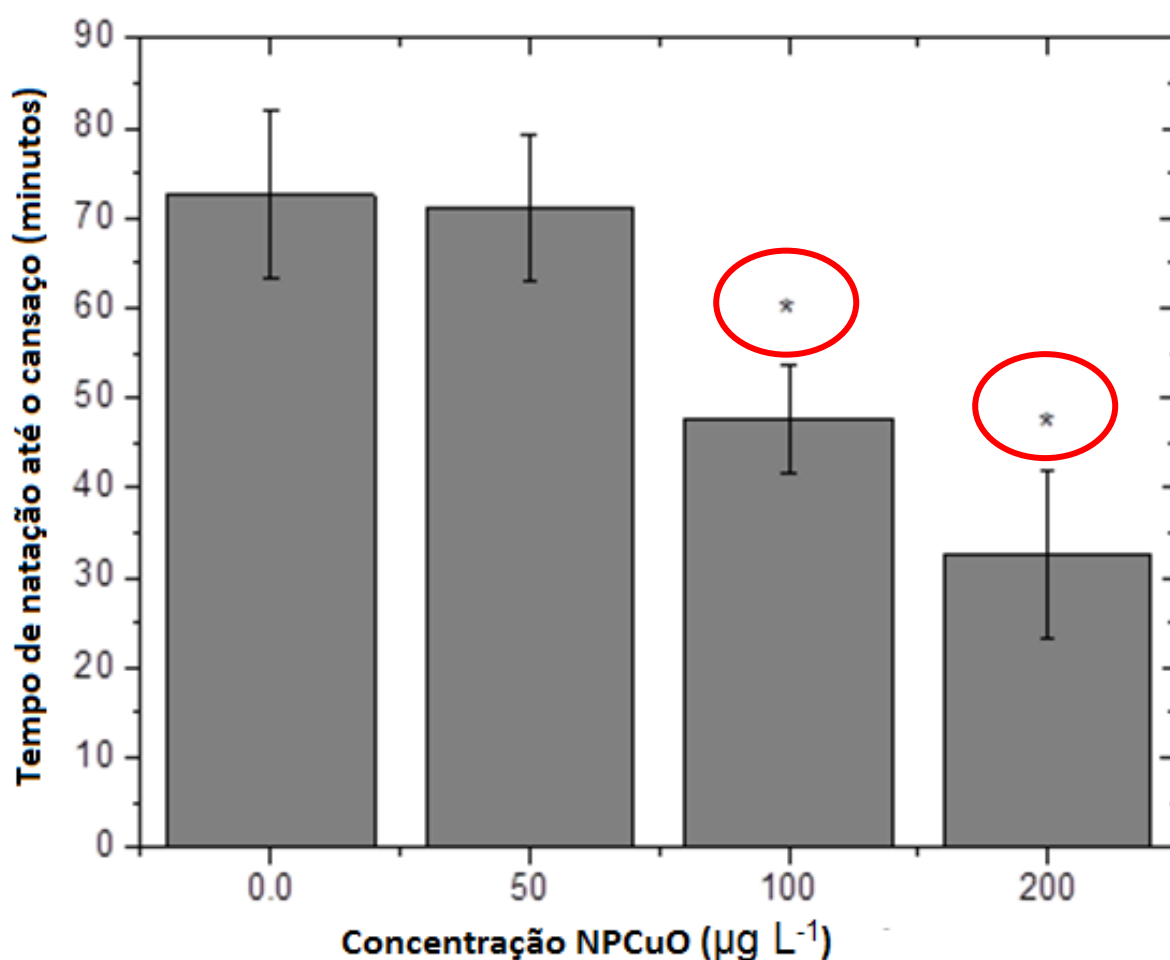


Figura 15 – Tempo de natação até o cansaço em relação ao aumento da concentração de nanopartículas de óxido de cobre II (nanobastões). As colunas representam as médias ($n=5$) e as barras são os respectivos desvios padrões. O asterisco indica os grupos que apresentaram diferença estatística ($p<0,05$).

3.7. Capacidade de natação (NPsCuO esferas)

Os peixes expostos por 24 horas às nanopartículas de óxido de cobre II caracterizadas em esferas (nanoesferas) e posteriormente submetidos a atividade natatória, embora demonstre uma leve diminuição na concentração de 200 $\mu\text{g/L}$, não apresentaram diferenças significativas na capacidade de natação em nenhuma das concentrações aplicadas, em relação ao controle (Figura 16).

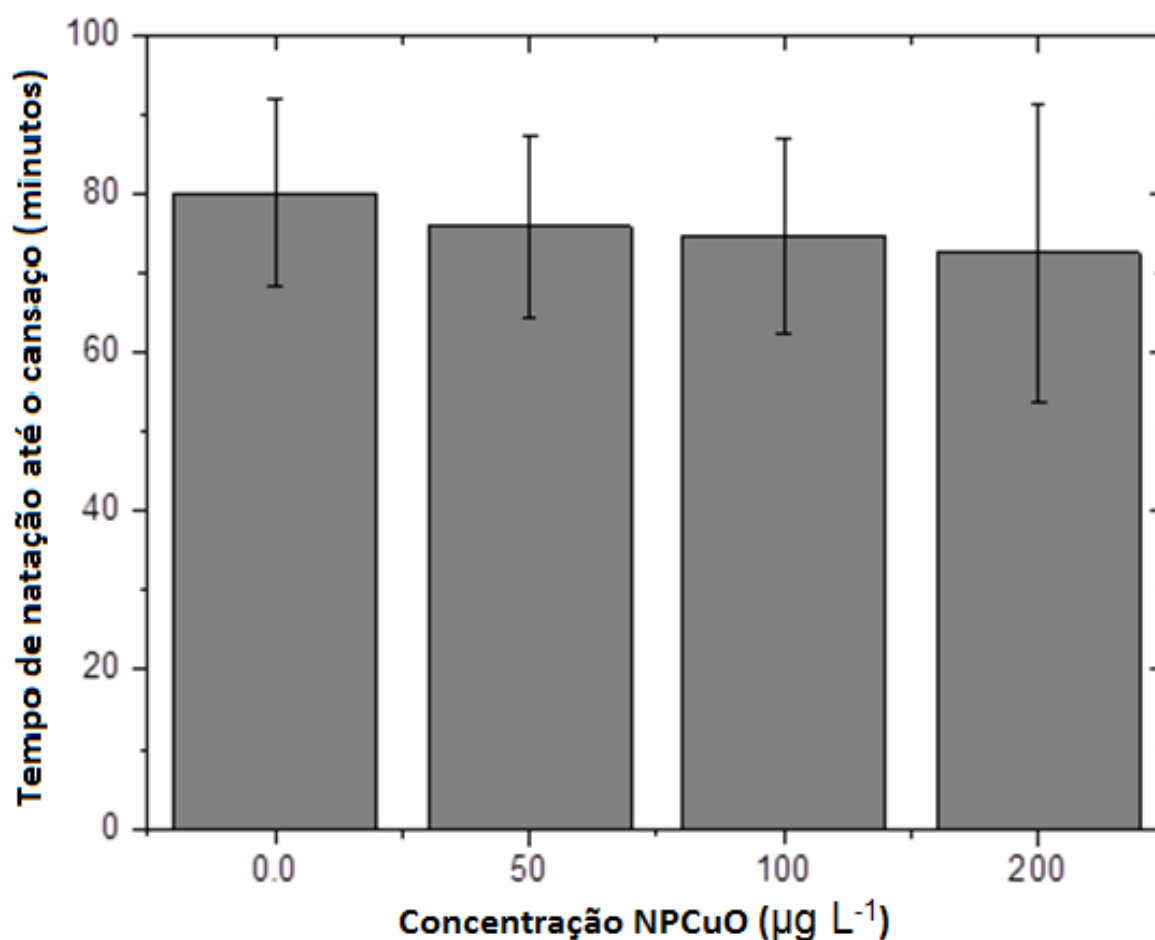


Figura 16 - Tempo de natação até o cansaço em relação ao aumento da concentração de nanopartículas de óxido de cobre II (nanoesferas). As colunas representam as médias ($n=5$) e as barras são os respectivos desvios padrões.

4. DISCUSSÃO

Ponderando que a maior parte dos trabalhos de pesquisa, trazem os efeitos toxicológicos das nanopartículas, sem enfatizar a importância de suas diferentes estruturas morfológicas. Fez-se necessário a presente pesquisa com o propósito de estudos comparativos de duas formas estruturais da mesma nanopartícula de óxido de cobre II (NPsCuO) em peixes da mesma espécie, considerando que as respostas dos peixes testados podem ser diferentes em função da estrutura e concentração da nanopartícula, da espécie testada, bem como de outros fatores de interferência, os experimentos foram realizados utilizando as mesmas concentrações para as distintas morfologias, nas mesmas condições ambientais.

A partir dos resultados experimentais obtidos no respectivo estudo, foi possível comparar os efeitos no metabolismo da espécie *Danio rerio* quando expostos a nanopartículas de óxido de cobre II (NPsCuO), com caracterizações morfológicas distintas: bastões e esferas. Os testes confirmaram que a mesma espécie de animais, nas mesmas condições, apresentaram diferentes respostas em relação as alterações metabólicas, no que diz respeito ao consumo específico de oxigênio, a excreção específica de amônia, e ao tempo de natação até o cansaço, quando expostos as NPsCuO morfolologicamente diferentes.

Embora haja vários biomarcadores relevantes, a princípio essa pesquisa se restringiu aos testes do metabolismo de rotina e capacidade de natação, porque diante dos objetivos, os resultados encontrados se mostraram favoráveis, porém posteriormente serão realizados testes histológicos e enzimáticos com a finalidade de complementar os estudos de investigação.

Os peixes testados com solução contendo nanobastões demonstraram aumento na taxa de consumo específico de oxigênio à medida que as concentrações foram elevadas, essas respostas podem estar relacionadas ao fato das nanobastões dissolvidas, apresentarem características que favorecem, maior liberação de íons cobre (Cu^{+2}) no meio teste (Rossetto, 2016), em formas complexas, o cobre é menos biodisponível e menos tóxico do que na forma iônica livre (Zitoun, 2019), embora os estudos das nanopartículas de metal apresentem controvérsias, no que diz respeito aos efeitos de toxicidade, que podem ser resultado dos íons dissolvidos, das partículas ou da combinação de ambos (Bai et al., 2010), as NPsCuO tendem a liberar íons Cu^+ e Cu^{2+} , de forma que os organismos podem ser afetados pela absorção do metal em suas diferentes formas iônicas (Malhotra et al., 2020).

Alguns estudos, como os de (Song et al., 2015; Mansano et al., 2018), revelaram que nanopartículas de formas distintas tendem a liberar diferentes quantidades de íons no meio

de teste, as nanobastões formaram agregados, e conforme sua agregação, as nanopartículas pode modificar a sua estabilidade, mobilidade, destino, persistência e toxicidade (Saleh et al., 2010), contribuindo para definir os efeitos de toxicidade das NPsCuO, pois quanto maior o nível de agregação, maior quantidade de íons liberados nas amostras (Bondarenko et al., 2012; Agnihotri et al., 2013; Hu et al., 2017). Assim os animais submetidos às nanobastões, provavelmente sofreram maior exposição a esses íons liberados na solução (Souza et al., 2019), que possivelmente acumularam no interior das células, causando alterações metabólicas nos animais testados.

No entanto, os resultados dos peixes testados com solução contendo nanoesferas, não apresentaram alterações metabólicas em nenhum biomarcador testado, considerando que o fator, temperatura foi controlado, essa diferença no efeito do metabolismo dos peixes pode estar relacionado as características das NPsCuO, visto que a caracterização das nanopartículas são de extrema importância para estudos de ecotoxicologia (Handy et al., 2008), pelo fato de interferirem na quantidade de íons cobre liberados no meio teste, pouco cobre dissolvido resulta em menor toxicidade (Xu et al., 2017). Ademais, as características físico-químicas das nanopartículas e/ou da solução, tendem a estabilizar ou desestabilizar as partículas em suspensão e esse desarranjo, pode modificar as interações com os organismos (Conway et al., 2015).

O tamanho da partícula influencia no tempo de circulação dos nanomateriais na corrente sanguínea do animal, a penetração através de diferentes barreiras biológicas, distribuição nos tecidos e indução de respostas celulares (Jiang et al., 2008), cada partícula tem um efeito biológico distinto que pode ou não ser acionada pela liberação de íons metálicos solúveis na coluna de água (Souza et al., 2019). Embora ambas (nanobastões e nanoesferas) apresentem grandes vantagens na performance quando comparadas com o material na forma macroscópica (Phiwdang et al., 2013), especificamente as nanobastões demonstram propriedades aprimoradas devido à sua maior superfície específica em comparação com as nanoesferas (Jia et al., 2015). Diante disso, faz-se necessário analisar a liberação de formas de íons cobre no ambiente, bem como, os efeitos específicos das nanopartículas, a fim de avaliar a toxicidade e biodisponibilidade acumulada na biota aquática (Malhotra et al., 2020).

Os níveis de cobre em corpos d'água devem ser sempre mantidos em níveis baixos. Água não poluída tem um nível de cobre tão baixo quanto 0,5 a 1 µg/L (Moore et al., 2012), normalmente o cobre é encontrado em ambientes aquáticos naturais em baixa concentração (Malhotra et al., 2020). As agências reguladoras de qualidade da água (EPA, 2007, 2012; União

Europeia, 2015) estabeleceram que a concentração máxima permitida de Cobre em corpos d'água deve ser 100 µg/L, já o limite superior estabelecido para cobre pela agência reguladora brasileira é 9 µg/L, que é aplicado a ecossistemas aquáticos usados para aquicultura (CONAMA, 2005), em se tratando de nanopartículas de cobre, presentes no ambiente aquático a concentração prevista é em torno 60 µg/L (Chio et al., 2012).

Há uma lacuna significativa no conhecimento sobre a bioatividade das NPsCuO nos peixes, em alguns testes a concentração 20 µg/L são consideradas altas e preocupantes (Braz-Mota et al., 2018), pois mesmo em baixas concentrações a exposição as NPsCuO, causam estresse oxidativo nos peixes, e pode ser letal às espécies aquáticas devido à bioacumulação (Subbiah et al., 2020), quando a ingestão de cobre excede o limite tolerável, mostra efeitos tóxicos que levam à morte celular. (Hejazy et al., 2018).

No presente trabalho com *Danio rerio* expostos as NPsCuO bastões por 24 horas nas concentrações de 100 e 200 µg/L, apontaram alterações metabólicas, apresentando aumento no consumo específico de oxigênio, provavelmente sofreram maior exposição aos íons, que devido sua reatividade e acumulação excessiva no interior das células, levam a sobrecarga de concentrações intracelulares de cobre iônico (Hejazy et al., 2018). Corroborando com os resultados dessa pesquisa, os estudos realizados por Liu et al., (2020) relataram que *Danio rerio* expostos as nanopartículas de cobre em concentração de 100 µg/L demonstraram diferentes efeitos morfológicos e metabólicos.

As NPsCuO são capturadas pelo muco das guelras dos peixes afetando os processos respiratórios e o transporte de íons (Chang et al., 2012), causando efeitos subletais, como o estresse oxidativo, que tem sido observado com frequência em muitos organismos, na maioria das vezes essa alteração tem sido causado por dissolução de Cu²⁺, resultando em impactos crônicos à saúde dos animais (Baker et al., 2014).

Na pesquisa realizada por Mansano et al., (2018) com nanopartículas de óxido de cobre II na forma de bastões demonstraram que nas concentrações de 60 e 120 µg/L, as células branquiais de *Hyphessobrycon eques* internalizaram NPsCuO bastões após 24 horas de exposição e causaram alterações no metabolismo dos animais.

As nanopartículas de metais causam efeitos adversos nos peixes, como exemplo; dificuldade respiratória (Shaw et al., 2016), alguns resultados indicam que a exposição até mesmo de minúscula quantidade de NPsCuO em curto e longo prazo, afetam a maioria das enzimas metabólicas dos peixes (Kaviani et al., 2019)

No estudo realizado por Rezende et al., (2018) os *Oreochromis niloticus* quando expostos por 24 horas nas maiores concentrações de nanopartículas de dióxido de titânio, demonstraram um aumento do consumo específico de oxigênio, assim como as respostas dos peixes testados com NPs CuO bastões dessa pesquisa. Nanomateriais afetam os processos de respiração dos organismos, a resposta ao estresse do animal inclui aumento na taxa de absorção de oxigênio pelas brânquias, em função do aumento da taxa de ventilação (Barbieri et al., 2019).

Outras pesquisas como as de Griffitt et al., (2007, 2008 e 2011), mostraram que os materiais em escala nanométrica podem produzir muitos efeitos tóxicos sobre as brânquias do *Danio rerio* e esse efeito tóxico está diretamente relacionado ao tamanho nanométrico desses materiais que podem causar diferentes alterações morfológicas devido sua fácil absorção, os nanomateriais são suficientemente pequenos para atingir a lamela secundária tendo acesso a superfície das brânquias (Medeiros et al., 2020).

Para o biomarcador excreção específica de amônia, houve diminuição na atividade excretora dos peixes expostos a maior concentração de nanobastões, esse resultado também pode estar relacionado aos íons cobre liberados pelas nanobastões e absorvidos pelos peixes via branquial, de acordo com Castilho-Westphal et al., (2008) as brânquias apresentam células específicas que realizam respiração e outras que realizam excreção de amônia, de forma que os íons cobre dissolvidos podem funcionar como “cavalo de troia” nas células dos organismos (Boncel et al. 2015), o que pode ter causado alteração da atividade metabólica, no que diz respeito a variação do nitrogênio como produto de excreção dos peixes testados.

A amônia é o produto do catabolismo das proteínas em peixes, e sua excreção é realizada pelo complexo trocador Na^+/NH_4 , que podem apresentar distúrbios osmorregulatórios causados pela exposição à nanomateriais (Smith et al. 2007).

Tunçsoy e Erden, (2018) relataram em sua pesquisa que o efeito das concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g/L}$ de cobre aplicado como NPs CuO causou acúmulo de íons do metal na guelra dos *Oreochromis niloticus*, prejudicando o desempenho de uma série de funções, como a troca de gás para respiração, osmorregulação, equilíbrio ácido-base e principalmente a excreção de compostos de nitrogênio.

Estudos realizados por Barbieri et al., (2019) para excreção de amônia em peixes da espécie *Astyanax ribeirae*, expostos a concentração 500 $\mu\text{g/L}$ de nanotubos de carbono também evidenciaram a diminuição de 80% na taxa de excreção de amônia, assim como no presente

trabalho, os peixes expostos a concentração de 200 µg/L, apresentaram resultados bem próximos, com diminuição na taxa de excreção de amônia de 83%.

Nos resultados dos experimentos para capacidade de natação foi constatado a diminuição do tempo de natação até o cansaço dos peixes expostos às maiores concentrações de nanobastões, essas respostas indicaram que os peixes podem ter sofrido estresse pela exposição aos íons cobre dissolvidos no meio teste, o principal fator para a toxicidade das NPsCuO nos organismos aquáticos (Keller et al., 2017) são os íons Cu²⁺, liberados durante sua solubilização e espalhados no meio (Perreault et al., 2012). Corroborando com essa pesquisa, os estudos realizados por Thit et al., (2017), com *Danio rerio* apontaram que a atividade de natação (distância percorrida), foi significativamente afetada tanto em exposição a NPsCuO, quanto em cobre, assim como a locomoção tridimensional (Audira et al., 2018).

Acosta et al., (2016), em sua pesquisa concluiu que houve grave alteração no desempenho natatório das larvas de *Danio rerio* expostas a concentração de 9 µg/L de íons cobre, provenientes das NPsCuO.

No estudo realizado por McNeil et al., (2014) foi relatado, que larvas de peixe-zebra de natação livre quando expostas a NPsCu exibiram desempenho reduzido de reotaxia, que é um comportamento importante para a sobrevivência e desenvolvimento do animal.

Griffitt et al., (2011) apontaram que a toxicidade de nanopartículas de alumínio, em uma concentração de 12,5 µg/L, na exposição em *Danio rerio*, resultou em mudanças na resposta do organismo quanto a (rotas metabólicas, capacidade de natação).

A redução do metabolismo pode refletir diretamente sobre a mobilidade e consequentemente na diminuição da velocidade de natação (Sampaio et al., 2012), prejudicando a sobrevivência do peixe no ambiente aquático, uma vez que o desempenho de locomoção é um parâmetro ecológico relevante (Carneiro et al., 2020).

Troung et al., (2012) e Kim et al., (2013) estudaram com embriões de *Danio rerio* expostos a nanopartículas de ouro, os testes relataram diferenças significativas no comportamento de natação dos peixes expostos.

Kim et al., (2013) apontaram que as nanopartículas de ouro de 1,3 nm revestidas com o ligante catiônico produziram alterações no comportamento locomotor, alterações do tempo total de nado e distância total percorrida de *Danio rerio* (Moura, 2016).

Ferrarini et al., (2016) em seus testes com *Poecilia vivipara*, apontaram que com o aumento da concentração de mercúrio (Hg) para 30 µg/L verificou-se uma redução acentuada da capacidade de natação, os peixes cansavam após nadarem por apenas 16 minutos, enquanto

os peixes do controle nadaram por 103 minutos. A fisiologia da natação de um peixe é afetada pela maturidade e condições orgânicas, o grau de exposição a outros fatores associados ao estresse (Campos-Garcia et al, 2015). A atividade natatória é dentre as alterações comportamentais a mais importante, por ser um indicador que integra a condição interna do animal (Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

Nos experimentos realizados por Vélez, (2017) com peixes da espécie *Danio rerio* adultos, após 24 horas de exposição a nanopartículas de prata (NPsAg) a partir da concentração de 20 mg/L, os peixes começaram a apresentar alterações, como: perda do equilíbrio, natação errática e circular.

Bilberg et al., (2012) e Ottoni et al., (2019) ao avaliarem a toxicidade de nanopartículas de prata sobre os parâmetros comportamentais do *Danio rerio*, também observaram que, as altas concentrações (>70 µg/L) causaram significativas alterações comportamentais nesses organismos, e um dos principais fatores, foram os íons prata dissolvidos, bem como no presente trabalho as respostas podem estar relacionadas aos íons Cu^{2+} liberados pelas nanobastões e absorvidos pelos peixes.

Mills et al., (2006) desenvolveram um sistema para testes de ecotoxicidade comportamental *G. pulex* para cobre (Cu) nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 µg/L e eles encontraram uma redução na atividade de movimento à medida que a concentração de cobre foi aumentada, os organismos expostos a concentração de 100 µg/L de cobre apresentaram redução na velocidade de 52,2% em relação ao controle.

O estresse oxidativo provocados pelas NPsCuO é um parâmetro importante para analisar a toxicidade e ecotoxicidade, pois as células montam uma gama de respostas defensivas que podem facilmente medir as alterações metabólicas, enzimáticas ou genéticas (Abdel et al., 2015; Hou et al., 2017; Xu et al., 2017; Tunçsoy e Erden, 2018).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram, que é possível garantir o uso responsável das NPsCuO, se os esforços forem dedicados a reduzir sua toxicidade, controlando o diâmetro das partículas e regulando a liberação de íons cobre (Hou et al., 2017), tendo em vista que a toxicidade NPsCuO pode variar significativamente entre as espécies de peixes, devido aos fatores; tamanho do peixe, dose e tempo de exposição, metabolismo para o mecanismo do íon cobre, condições fisiológicas dos indivíduos, e parâmetros físico-químico da água (Kaviani et al., 2019).

É importante compreender os mecanismos de toxicidade para estabelecer diretrizes e garantir o uso seguro dessas nanopartículas, de modo que os organismos aquáticos não sejam gravemente afetados e permaneçam seguros para consumo humano (Malhotra et al., 2020).

Embora haja vários biomarcadores relevantes, a princípio essa pesquisa se restringiu aos testes do metabolismo de rotina e capacidade de natação, porque diante dos objetivos os resultados encontrados se mostraram favoráveis, porém posteriormente serão realizados testes histológicos e enzimáticos com a finalidade de complementar os estudos de investigação.

5. CONCLUSÃO

Os testes realizados nesse estudo experimental demonstraram, de forma clara, que as distintas caracterizações morfológicas das mesmas nanopartículas de óxido de cobre II (NPsCuO) sintetizadas, causaram efeitos divergentes no metabolismo dos peixes da espécie *Danio rerio* a elas expostos.

As NPsCuO, com morfologias na forma de bastões, em concentrações maiores, afetaram significativamente o metabolismo dos peixes testados após 24 horas de exposição, causando aumento do consumo específico de oxigênio nas concentrações de 100 e 200 µg/L, diminuição da excreção de amônia na concentração de 200 µg/L e a diminuição na capacidade de natação nas concentrações de 100 e 200 µg/L, quando comparados ao controle.

Estes testes também apontaram que os peixes submetidos as NPsCuO caracterizadas em esferas, durante o mesmo período e mesmas condições ambientais, não apresentaram nenhuma alteração metabólica em todas as concentrações aplicadas durante os tratamentos, quando comparados ao controle.

Pode-se concluir que, apenas os peixes expostos às maiores concentrações de NPsCuO bastões sofreram algum tipo de estresse metabólico, provavelmente causado pelo excesso de íons cobre (Cu^{2+}) no meio teste, apresentando como resposta aumento na taxa de oxigênio consumido, diminuição na excreção de amônia e diminuição no tempo de natação até o cansaço.

6. REFERÊNCIAS

- Abdel-Khalek, A.A.; Kadry, M.A.M.; Badran, S.R.; Marie, M.A.S. 2015. Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus*: biochemical and oxidative stress. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 72: 43-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.04.001>
- Acosta, D.D.S.; Danielle, N.M.; Altenhofen, S.; Luzardo, M.D.; Costa, P.G.; Bianchini, A.; Bonan, C.D.; Silva, R.S.; Dafre, A.L. 2016. Copper at low levels impairs memory of adult zebrafish (*Danio rerio*) and affects swimming performance of larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology*, 185-186: 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.03.008>
- Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. 2013. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. *Nanoscale*, 5 (16): 7328-7340. <https://doi.org/10.1039/c3nr00024a>
- Audira, G.; Sampurna, B.; Juniardi, S.; Liang, S.-T.; Lai, Y.-H.; Hsiao, C.-D. 2018. A simple setup to perform 3D locomotion tracking in zebrafish by using a single camera. *Inventions*. 3 (1): 11. <https://doi.org/10.3390/inventions3010011>
- Bai, W.; Tian, W.; Zhang, Z.; He, X.; Ma, Y.; Liu, N.; Chai, Z. 2010. Effects of copper nanoparticles on the development of zebrafish embryos. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10 (12): 8670-8676. <https://doi.org/10.1166/jnn.2010.2686>
- Baker, T.J.; Tyler, C.R.; Galloway, T.S. 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution*, 186: 257-271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.014>
- Barbieri, E.; Phan V.N.; Gomes, V. 2000. Effects of LAS-C12, Linear Alkylbenzene Sulphonate, on Metabolic Rate and Swimming Capacity of *Ciprinus carpio*. *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, 3 (2): 69-75. <https://zenodo.org/record/3531551#.X-ge8thKjIV>
- Barbieri, E. 2009. Effects of zinc and cadmium on oxygen consumption and ammonium excretion in pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967, Crustacea). *Ecotoxicology* 18: 312-318. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0285-y>
- Barbieri, E.; Ferrarini, A.M.T.; Rezende, K.F.O.; Martinez, D.S.T.; Alves, O.L. 2019. Effects of multiwalled carbon nanotubes and carbofuran on metabolism in *Astyanax ribeirae*, a native species. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45 (1): 417- 426. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0573-2>
- Ben-Sasson, M.; Lu, X.; Nejati, S.; Jaramillo, H.; Elimelech, M. 2016. In situ surface functionalization of reverse osmosis membranes with biocidal copper nanoparticles. *Desalination* 388: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2016.03.005>
- Bilberg, K.; Hovgaard, M. B.; Besenbacher, F.; Baatrup, E. 2012. In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Toxicology*, 2012: 1-9. <https://doi.org/10.1155/2012/293784>

Boncel, S.; Kyziol-Komosinska, J.; Krzyzewska, I.; Czupiol, J. 2015. Interactions of carbon nanotubes with aqueous/aquatic media containing organic/inorganic contaminants and selected organisms of aquatic ecosystems – A review. *Chemosphere*,136: 211-221. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.095>

Bondarenko, O.; Ivask, A.; K  inen, A. 2012. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. *Environmental Pollution*, 169: 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.05.009>

Braz-Mota, S.; Campos, D.F.; MacCormack, T.J.; Duarte, R.M.; Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 2018. Mechanisms of toxic action of copper and copper nanoparticles in two Amazon fish species: Dwarf cichlid (*Apistogramma agassizii*) and cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*). *The Science of the Total Environment*, 630: 1168-1180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.216>

Brett, J.R. 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 21: 1183-1226. <http://dx.doi.org/10.1139/f64-103>

Cáceres-Vélez, P.R.; Fascineli, M. L.; Grisolia, C.K.; De Oliveira Lima, E.C.; Sousa, M.H.; De Moraes, P.C.; Bentes De Azevedo, R. 2016. Genotoxic and histopathological biomarkers for assessing the effects of magnetic exfoliated vermiculite and exfoliated vermiculite in *Danio rerio*. *Science of The Total Environment*, 551-552: 228-237. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.048>

Campos-Garcia, J.; Matinez, D.S.; Alves, O. L.; Leonardo, A.F.; Barbieri, E. 2015. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidized multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia: nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111: 131-137. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.005>

Cao, S.; Ravikumar, B.; Hussain, S.; Ayeshamariam, A.; Aslam, N.; Naseer, K. 2016. Synthesis and characterization of CeO₂ and ZnCeO₂ nanomaterials and exposure to photocatalytic activity. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 27(2): 1873-1880. <https://doi.org/10.1007/s10854-015-3967-2>

Carneiro, J.S.; Barbieri, B.; Rezende, K.F.O.; Barros, L.C.; Henriques, M. B. 2020. Salinity effects in metabolic rate and behavior in lambari *Astyanax bimaculatus*. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 3(3): 2165-2179. <https://doi.org/10.34188/bjaerv3n3-127>

Castilho-Westphal, G.; Ostrensky, A.; Pie, M.; Boeger, W. 2008. The state of the art of the research on the mangrove land crab, *Ucides cordatus*. *Archives of Veterinary Science*,13(2): 151-166. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/258099898> acesso em: 10 jan. 2020.

Chang, Y.N.; Zang, M.; Xia, L.; Zang, J.E.; Xing, G. 2012. The toxic effects mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*, 5(12): 2850-3871. <https://doi.org/10.3390/ma5122850>

Chio, C.P.; Chen, W.Y.; Chou, W.C.; Hsieh, N.H.; Ling, M.P.; Liao, C.M. 2012. Assessing the potential risks to zebrafish posed by environmentally relevant copper and silver nanoparticles. *The Science of the Total Environment*, 420: 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.023>

CONAMA 2005. (Conselho Nacional do Meio Ambiente do Brasil) Resolução número 357, de 17 de março de 2005. CONAMA, Brasília, DF, Brasil.

Conway, J.R.; Adeleye, A.S.; Gardea-Torresdey, J.; Keller, A.A. 2015. Aggregation, dissolution, and transformation of copper nanoparticles in natural waters. *Environmental Science and Technology*, 49(5): 2749-2756. <https://doi.org/10.1021/es504918q>

Costa, L.S.D.; Zanchet, D. 2017. Pretreatment impact on the morphology and the catalytic performance of hybrid heterodimers nanoparticles applied to CO oxidation. *Catalysis Today*, 282: 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.06.056>

Cronholm, P.; Karisson, H.L.; Hedberg, J.; Lowe, T.A.; Winnberg, L.; Elihn, K.; Wallinder, I.O.; Moller, L. 2013. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: a comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small Weinheim an der Bergstrasse Germany*, 9(7): 970-982. <https://doi.org/10.1002/sml.201201069>

EPA 2007. (U.S. Environmental Protection Agency) Aquatic life ambient freshwater quality criteria - Cooper. 2007 Revision. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

EPA 2012. (U.S. Environmental Protection Agency) 2012 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Ferrarini, A.M.T.; Rezende, K.F.O.; Barbieri, E. 2016. Use of swimming capacity to evaluate the effect of mercury on *Poecilia vivipara* (Poecílideos) according to salinity and temperature. *Journal of Marine Biology & Oceanography*, 5: 1-5. <https://doi.org/10.4172/2324-8661.1000163>

Greenberg, A. E.; Clesceri, L. S.; Eaton, A. D. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation.

Griffitt, R.J.; Weil, R.; Hyndman, K. A. 2007. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology*, 41(23): 8178-8186. <https://doi.org/10.1021/es071235e>

Griffitt, R.J.; Luo, J.; Gao, J.; Bonzongo, J.C.; Barber, D.S. 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9): 1972-1978. <https://doi.org/10.1897/08-002.1>

Griffitt, R.J.; Feswick, A.; Weil, R.; Hyndman, K.; Carpinone, P.; Powers, K.; Denslow, N.D.; Barber, D.S. 2011. Investigation of acute nanoparticulate aluminum toxicity in zebrafish. *Environmental Toxicology*, 26 (5): 541-551. <https://doi.org/10.1002/tox.20669>

Handy, R.D.; Owen, R.; Jones, E.V. 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges and future needs. *Ecotoxicology*, 17(5): 315-325. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0206-0>

Hejazy, M.; Koochi, M.K.; Bassiri Mohamad Pour, A.; Najafi, D. 2018. Toxicity of manufactured copper nanoparticles - A review. *Nanomedicine Research Journal*, 3(1): 1-9. <https://doi.org/10.22034/nmrj.2018.01.001>

Hou, J.; Wang, X.; Hayat, T.; Wang, X. 2017. Ecotoxicological effects and mechanism of CuO nanoparticles to individual organisms. *Environmental Pollution*, 221: 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.066>

Hu, Q.; Guo, F.; Zhao, F.; Fu, Z. 2017. Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on Parkinsonism in zebrafish larvae and PC12. *Chemosphere*, 173: 373-379. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.063>

Jia, W.; Liu, Y.; Hu, P.; Yu, R.; Wang, Y.; Ma, L.; Wang, D.; Li, Y. 2015. Ultrathin CuO nanorods: controllable synthesis and properties superior catalysts in styrene epoxidation. *Chemical Communications*, 51(42): 8817-8820. <https://doi.org/10.1039/C5CC02480C>

Jiang, W.; Kim, B.Y.S.; Rutka, J.T.; Chan, W.C.W. 2008. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature nanotechnology*, 3(3): 145-150. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>

Jo, H.J.; Choi, J.W.; Lee, S.H.; Hong, S.W. 2012. Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticles suspensions against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. *Journal of Hazardous Materials*, 15(227): 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.066>

Kaviani, E.F.; Naeemi, A.S.; Salehzadeh, A. 2019. Influence of copper oxide nanoparticle on hematology and plasma biochemistry of Caspian trout (*Salmo trutta caspius*), following acute and chronic exposure. *Pollution*, 5(1): 225-234. <https://doi.org/10.22059/poll.2018.251034.383>

Keller, A.A.; Adeleye, A.S.; Conway, J.R.; Garner K.L.; Zhao, L.; Cherr, G.N.; Hong, J.; Gardea-Torresdey, J.L.; Godwin, H.A.; Hanna, S.; Ji, Z.; Kaweeteerawat, C.; Lin, S.; Lenihan, H.S.; Miller, R.J.; Nel, A.E.; Peralta-Videa, J.R.; Walker, S.L.; Zuverza-Mena, N. 2017. Comparative environmental fate and toxicity of copper nanomaterials. *Nano Impact*, 7: 28-40. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.05.003>

Kim, K.T.; Zaikova, T.; Hutchison, J.E.; Tanguay, R.L. 2013. Gold nanoparticles disrupt zebrafish eye development and pigmentation. *Toxicological Sciences*, 133(2): 275-288. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft081>

Liu, J.-X.; Zhang, T.; Sun, H.-J.; Liu, J.-X. 2020. Copper nanoparticles induce intestinal defects in the zebrafish endoplasmic vein and oxidative stress. *Metalômica*, 12: 12-22. <https://doi.org/10.1039/C9MT00210C>

Lu, G.; Yang, H.; Xia, J.; Zong, Y.; Liu, J. 2017. Toxicity of Cu and Cr nanoparticles to *Daphnia magna*. *Water Air Soil Pollute*, 228(18): 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3206-3>

Magalhães, D.P.; Ferrão Filho, A.S. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Ecologia Bras*, 12(3): 355-381. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/27395> acesso em: 6 mar. 2020

Malhotra, N.; Ger, T.-R.; Uapipatanakul, B.; Huang, J.-C.; Chen, K.H.-C.; Hsiao, C.-D. 2020. Review of Copper and Copper Nanoparticle Toxicity in Fish. *Nanomaterials*, 10(6): 1126. <https://doi.org/10.3390/nano10061126>

Mansano, A.S.; Souza, J.P.; Cancino-Bernardi, F.P.V.; Marangoni, V.S.; Zucolotto, V. 2018. Toxicity of copper oxide nanoparticles to Neotropical species *Ceriodaphnia silvestrii* and *Hyphessobrycon eques*. *Environmental Pollution*, 243: 723-733. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.020>

Manusadzianas, L.; Caillet, C.; Fachetti, L.; Gylyte, B.; Grigutyte, R.; Jurkoniene, S.; Férard, J.F. 2012. Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions to aquatic biota. *Environmental Toxicology Chemistry*, 31(1): 108-114. <https://doi.org/10.1002/etc.715>

McNeil, P.L.; Boyle, D.; Henry, T.B.; Handy, R.D.; Sloman, K.A. 2014. Effects of metal nanoparticles on the lateral line system and behaviour in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 152, 318-323. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.022>

Medeiros, A.M.Z.D.; Côa, F.; Alves, O.L.; Martinez, D.S.T.; Barbieri, E. 2020. Metabolic effects in the freshwater fish *Geophagus iporangensis* in response to single and combined exposure to graphene oxide and trace elements. *Chemosphere*, 243: 125-316. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125316>

Mills, C.L.; Shukla, D.H.; Compton, G.J. 2006. Development of a new low-cost high sensitivity system for behavioral ecotoxicity testing. *Aquatic Toxicology Amsterdam Netherlands*, 77(2): 197-201. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.12.003>

Misra, S.K.; Nuseibeh, S.; Dybowska, A.; Berhanu, D.; Tetley, T.D.; Valsami-Jones, E. 2014. Comparative study using spheres, rods and nanoplates in the form of an axis on dispersion stability, dissolution, and toxicity of CuO nanomaterials. *Journal Nanotoxicology*, 8(4): 422-432. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.796017>

Montes, M.; Pierce, C.G.; Lopez-Ribot, J.L.; Bhalla, A.S.; Guo, R.Y. 2016. Properties of silver and copper nanoparticle containing aqueous suspensions and evaluation of their In vitro activity against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Nano Research*, 37: 109-121. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/jnanor.37.109>

Moura, D.S. 2016. Ecotoxicological evaluation of psychotropic drugs and their possible interactions with nanomaterials using zebrafish embryos. 545f. Dissertação (mestrado), Ciências Biológicas, Universidade De Brasília - DF, Brasília 2016. Disponível em: [file:///C:/Users/belei/Downloads/2016_DiegoSousaMoura%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/belei/Downloads/2016_DiegoSousaMoura%20(2).pdf) acesso em: maio 2020.

Otoni, C.A.; Lima Neto, M.C.; Léo, P.; Ortolan, B.D.; Barbieri, E.; De Souza, A.O. 2020. Environmental impact of biogenic silver nanoparticles in soil and aquatic organisms. *Chemosphere*, 239: 124-698. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124698>

Padilha, A.F. 2013. Microscopia Eletrônica de Transmissão. Engenharia Metalúrgica e de Materiais da EPUSP. São Paulo, 1-12. Disponível em: https://www2.sorocaba.unesp.br/professor/jrborto/2008S2/POSMAT/MET_notes.pdf acesso em: 20 mar. 2020.

Peng, C.; Shen, C.; Zheng, S.; Yang, W.; Hu, H.; Liu, J.; Shi, J. 2017. Transformation of CuO nanoparticles in the aquatic environment: influence of pH, electrolytes, and natural organic matter. *Nanomaterials Basel, Switzerland*, 7(10): 326. <https://doi.org/10.3390/nano7100326>

Perreault, F.; Melegari, S.P.; Costa, C.H.; Rossetto, A.L.O.F.; Popovic, R.; Matias, W.G. 2012. Genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in Neuro 2A cell cultures. *Science of the Total Environment*, 441: 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.065>

Phiwdang, K.; Suphankij, S.; Mekprasart, W.; Pecharapa, W. 2013. Synthesis of CuO nanoparticles by precipitation method using different precursors. *Energy Procedia*, 34: 740-745. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.06.808>

Powers, C.M.; Slotkin, T.A.; Seidler, F.J.; Badireddy, A.R.; Padilla, S. 2011. Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating, and composition. *Neurotoxicology and Teratology*, 33(6): 708-714. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.02.002>

Rajput, V.D.; Minkina, T.; Suskova, S.; Mandzhieva, S.; Tsitsuashvili, V.; Chaplgin, V.; Fedorenko, A. 2017. Effects of copper nanoparticles (CuONPs) on crop plants: a mini review. *Bio Nanoscience* 8(1): 36-42. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0466-3>

Rezende, K.F.O.; Bergami, E.; Alves, K.V.B.; Corsi, I.; Barbieri, E. 2018. Titanium dioxide nanoparticles alters routine metabolism and causes histopathological alterations in *Oreochromis niloticus*. *Boletim do instituto de pesca*, 44(2): 365-371. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.343>

Rossetto, A.L.D.O.F. 2016. Comparative study between the acute and chronic toxic effects of copper oxide in the form of nanoparticles and microparticles. 167f. Dissertação (mestrado), Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina - SC, Santa Catarina 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/168228/340505.pdf?sequence=1> acesso em: 01 jul. 2020.

Saleh, N.B.; Pfefferle, L.D.; Elimelech, M. 2010. Influence of biomacromolecules and humic acid on the aggregation kinetics of single-walled carbon nanotubes. *Environmental Science and Technology*, 44(7): 2412-2418. <https://doi.org/10.1021/es903059t>

Sampaio, F.A.C.; Santos, H.A.; Pompeu, P.S.; Ferreira, R.L. 2012. Swimming performance of epigeal and hypogeal species of *Characidae*, with an emphasis on the troglolotic *Stygichthys typhlops* Brittan & Bohlke, 1965. *International Journal of Speleology*, 41: 9-16. <http://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.41.1.2>

Sedighi, A.; Montazer, M. 2016. Tunable shaped N-doped CuO nanoparticles on cotton fabric through processing conditions: synthesis, antibacterial behavior and mechanical properties. *Cellulose*, 23: 2229-2243. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0892-3>

Shaw, B.J.; Liddle, C.C.; Windeatt, K.M.; Handy, R.D. 2016. A critical evaluation of the fish early-life stage toxicity test for engineered nanomaterials: Experimental modifications and recommendations. *Archives of Toxicology*, 90(9): 2077-2107. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1734-7>

Smith, C.J.; Shaw, B.J.; Handy, R.D. 2007. Toxicity of single walled carbon 762 nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ 763 pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 82(2): 94-109. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.02.003>

Song, L.; Vijver, M.G.; Snoo, G.R.; Peijnenburg, W.J. 2015. Assessing the toxicity of copper nanoparticles in five species of cladocerans. *Environmental Toxicology Chemistry*, 34(8): 1863-1869. <https://doi.org/10.1002/etc.3000>

Souza, G.C.; Dias, R.S.I.; Duarte, V.M.; Costa, M.N.; Sánchez-Ortiz, B.L.; Maia, R.O.M.; Ramos, B.W.; Maciel, F.I.; Tavares, C.J.C. 2019. Acute toxicity of the hydroethanolic extract of the flowers of *acmella oleracea* L. in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and histopathological studies. *Pharmaceuticals*, 12(4): 173-190. <https://doi.org/10.3390/ph12040173>

Subbiah, S.; Baskaran, R.; Kumar, S.S.; Balamurugan, S. 2020. Lethal effects of Copper oxide nanoparticles exposure on biochemical, oxidative stress, hematological and histopathological effects in fish: A review *Research Journal of Biotechnology* 15(11): 123-128. <https://doi.org/10.3390/nano10020312>

Sun, D.; Zhang, J.; Ren, H.; Cui, Z.; Sun, D. 2010. Influence of OH⁻ and SO₄²⁻ anions on morphologies of the nanosized nickel hydroxide. *The Journal of Physical Chemistry*, 114(28): 12110-12116. <https://doi.org/10.1021/jp1033849>

Tancredi, P.; Da Costa, L.S.; Calderon, S.; Londoño, M.O.; Socolovsky, L.M.; Ferreira, P.J.; Zanchet, D.; Kenobel, M.; Muraca, D. 2019. Exploring the synthesis conditions to control the morphology of gold-iron oxide heterostructures. *Nano Research*, 12: 1781-1788. <https://doi.org/10.1007/s12274-019-2431-7>

Thit, A.; Skjolding, L.M.; Selck, H.; Sturve, J. 2017. Effects of copper oxide nanoparticles and copper ions to zebrafish (*Danio rerio*) cells, embryos, and fry. *Toxicology in Vitro*, 45: 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.08.010>

Truong, L.; Zaikova, T.; Richman, E.K.; Hutchinson, J.E.; Tanguay, R.L. 2012. Media ionic strength impacts embryonic responses to engineered nanoparticle exposure. *Nanotoxicology*, 6(7): 691-699. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.604440>

Tunçsoy, M.; Erdem, C. 2018. Copper accumulation in tissues of *Oreochromis niloticus* exposed to copper oxide nanoparticles and copper sulphate with their effect on antioxidant enzyme

activities in liver. *Water Air Soil Pollution*, 229(8): 269. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3913-z>

Union, European 2015. Drinking Water-Regulations. p.2014.

Vélez, P.R.C. 2017. Silver nanoparticles in the presence of humic acid in aqueous media: physical-chemical characterization and toxicological evaluation in a zebrafish model (*Danio rerio*). 175f. Tese (doutorado). Ciências Biológicas, Universidade de Brasília – DF, Brasília 2017. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/94140547.pdf> acesso em: 22 maio 2020.

Volanti, D.P. 2011. Copper (II) morphologies in the mesoscale: microwave-assisted hydrothermal synthesis, growth mechanism and catalytic activity in the ethanol dehydrogenation reaction. 133f. Tese (doutorado). Química, Universidade Estadual Paulista - SP, São Paulo 2011. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/102564/volanti_dp_dr_araiq.pdf?sequence=1 acesso em: 18 jun. 2020.

Winkler, L.A.W.1888. Methods for measurement of dissolved oxygen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 21(2): 2843-2854.

Wu, F.; Bortvedt, A.; Haper, B.J.; Crandon, L.E.; Haper, S.L. 2017. Uptake and toxicity of CuO nanoparticles to *Daphnia magna* varies between indirect dietary and direct waterborne exposures. *Aquatic Toxicology Amsterdam Netherlands*, 190: 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.021>

Xiao, Y.; Vijver, M.G.; Chen, G.; Peijnenburg, W.J. 2015. Toxicity and accumulation of Cu and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology*, 49(7): 4657-4664. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00538>

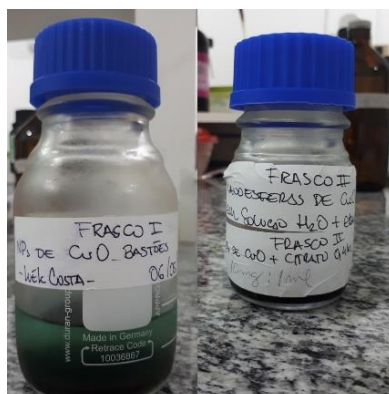
Xu, J.; Zhang, Q.; Li, X.; Zhan, S.; Wang, L.; Chen, D. 2017. The effects of copper oxide nanoparticles on dorsoventral patterning, convergent extension, and neural and cardiac development of zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 188:130-137. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.002>

Zitoun, R. 2019. Copper speciation in different marine ecosystems around New Zealand. 321f. Tese (doutorado), University of Otago; Dunedin, New Zealand. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10523/9214> acesso em: 20 nov. 2020.

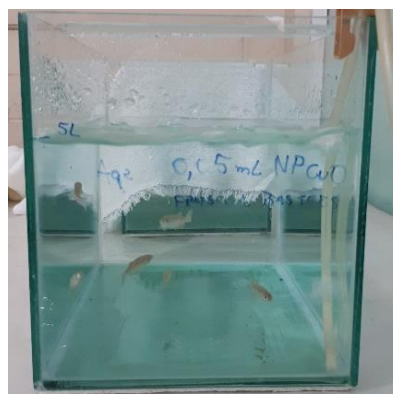
ANEXOS



TANQUE DE ADAPTAÇÃO PRÉVIA



NANOPARTÍCULAS UTILIZADAS



EXPOSIÇÃO A NANOBASTÕES



EXPOSIÇÃO A NANOESFERAS



SISTEMA PARA TESTE DE RESPIROMETRIA



PREPARAÇÃO PARA ACLIMATAÇÃO



PROCESSO DE ACLIMATAÇÃO



COLETAS PARA ANÁLISE



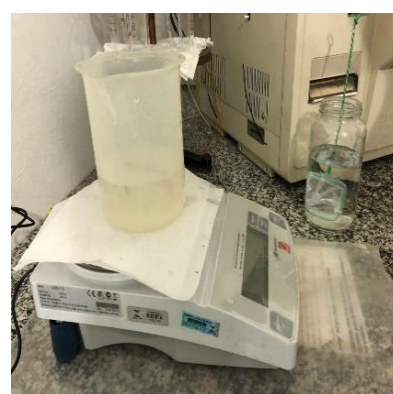
AMOSTRAS PARA OXIGÊNIO



AMOSTRAS PARA AMÔNIA



TÚNEL HIDRODINÂMICO



MENSURAÇÃO DA MASSA

