



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

HELLEN INGRID FERRONI

**EFEITOS E ACÚMULO DE PRATA E NANOPRATA EM**  
***Prochilodus lineatus*:**  
**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS**

HELLEN INGRID FERRONI

**EFEITOS E ACÚMULO DE PRATA E NANOPRATA EM**  
***Prochilodus lineatus*:**  
**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados).

Orientador: Profa. Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha.

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ferroni, Hellen Ingrid Ferroni, Hellen Ingrid.  
Efeitos e acúmulo de prata e nanop prata em *Prochilodus lineatus*: biomarcadores bioquímicos e fisiológicos / Hellen Ingrid Ferroni. - Londrina, 2021.  
88 f.

Orientador: Juliana Delatim Simonato Rocha.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Ecotoxicologia - Tese. 2. Bioacumulação de prata - Tese. 3. Nanotoxicidade - Tese. 4. Biomarcadores fisiológicos e bioquímicos - Tese. I. Simonato Rocha, Juliana Delatim. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

HELLEN INGRID FERRONI

**EFEITOS E ACÚMULO DE PRATA E NANOPRATA EM**  
***Prochilodus lineatus*:**  
**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados).

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Delatim  
Simonato Rocha  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Evanilde Benedito  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Bueno dos Reis Martinez  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho  
à minha avó,  
Ivony.

## AGRADECIMENTOS

---

A minha orientadora, Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha, pela confiança, incentivo, apoio, disponibilidade e paciência não apenas na realização deste trabalho, mas em todos os momentos em que precisei durante esses cinco anos. Por ser essa pessoa acessível e empolgada, que coloca amor em tudo que faz. Você é meu exemplo de pesquisadora, professora e mãe, ter todas essas funções são cansativas, mas você tira de letra!

Aos componentes da banca:

Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez, pelo aceite do convite e sugestões para enriquecimento deste trabalho. Além de todo o aprendizado me proporcionado, em todos os meus anos fazendo parte do LEFA.

Profa. Dra. Evanilde Benedito, pelo aceite imediato e disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Ao prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio e ao Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal, pela concessão das nanopartículas de prata biogênica para realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Luciana Fernandes de Oliveira e a Profa. Dra. Thaís Graciano Santos-Silva que me ajudaram muito com sugestões na banca de qualificação, além de terem muito me ensinaram na bancada.

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Aos órgãos financiadores CNPQ e CAPES pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

Ao Wagner, pelos ensinamentos, broncas, e por toda a ajuda na quantificação dos metais e em todas as amostragens realizadas.

Ao grupo LEFA, que me ensinou a importância em ajudar, cooperar, dividir (equipamento, tempo, conhecimento), e o fato de trabalharmos como um grupo faz toda a diferença. Vocês fazem parte de tudo que eu aprendi nesses anos, o quanto evolui e amadureci. Obrigada por todo companherismo e descontrações que me proporcionaram, vou sentir muita falta.

Agradeço em especial:

A Millena, por tudo que me ensinou, pela paciência em explicar o protocolo da ATPases muitas vezes, pelo apoio e conselhos sempre que precisei, além da ajuda na busca de artigos infinita, e claro pela amizade construída nesses anos!

A Vanessa, por estar sempre presente e me ajudar em tudo que fosse possível deste quando realizei meu TCC, até agora no mestrado.

A Jéssica, por toda ajuda nas amostragens, nas ATPase, pelas conversas, descontrações, conselhos, e sinceridade sempre.

A Carol, por todo carinho, cuidado e amor por todos do lab, por toda a ajuda no laboratório mas, mais que isso, pela amizade, descontração, pelos almoços e jantas maravilhosos, pelos bolos, pela parceria em festas, pela indicação de filmes e séries, pela energia boa que carrega consigo. Aonde quer que você vá, irei te visitar!

Ao Tiago, por ter me ensinado e me ajudado em todos os ensaios do cometa, pelas horas prolongadas de análises até tarde, pelo fim de semana perdido para me ajudar a homogeneizar, pelo companherismos nas gordices, e principalmente por aguentar minhas reclamações e me ajudar sempre que possível.

A Angélica, por tudo... faltam palavras pra descrever o presente que você é pra mim, e o quanto me ajudou neste mestrado, não há uma etapa dele que você não esteve presente. Obrigada pelo companherismo, apoio, ajuda, motivação, carinho, cuidado, pelos ensinamentos, e principalme por todo tempo que disponibilizou para mim. A pós-graduação se mostrou uma corrida contra o tempo e você correu ao meu lado durante esses dois anos, obrigada por existir!

Ao IC Junior Heitor, que me auxiliou na preparação para os experimentos fazendo centenas de etiquetas e muitas soluções, ajudou a cuidar dos peixes, na contagem do RBC, e em tudo que possível.

Aos amigos: Amanda, Bia, Bruna, Caroline, Gislaine, Giovanna, Heloísa, Jéssica, Kenny, Laís, Lenora, Vitor, vocês fazem a minha vida melhor, estar com vocês é um presente sempre! Em especial, agradeço a Gislaine, pela amizade incondicional, pelo companherismo e extrema paciência em todos os momentos.

Aos meus pais, João e Rosângela e a minha avó Ivony, pelo esforço realizado para garantir minha educação, pelo apoio e incentivo constante, pelo amor incondicional. Aos meus irmãos: Jenifer, Caroline e João por fazerem minha vida mais feliz, pelo amor, companheirismo e apoio.

Agradeço a cada um que de alguma forma contribuiu para a realização desse trabalho!

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

Ferroni, Hellen Ingrid. **Efeitos e acúmulo de prata e nanop prata em *Prochilodus lineatus***: biomarcadores bioquímicos e fisiológicos. 2021. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

As nanopartículas de prata (AgNP) apresentam alto potencial microbicida, por isso, compõem mais de 400 produtos, onde muitos deles são de uso diário como cosméticos, embalagens de alimento, tecidos, filtros para tratamento de água, entre muitos outros. Essa ampla utilização facilita a sua chegada nos ambientes aquáticos, podendo alterar a saúde dos organismos ali presentes. Diversos efeitos em peixes já foram induzidos por NPAg sintéticas, porém pouco se sabe do potencial tóxico das NPAg de fonte biogênica. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar os efeitos da prata nas formas NPAg biogênica (AgNPb), produzida por meio do fungo *Fusarium oxysporum*, e iônica (AgNO<sub>3</sub>), na concentração 10 µg L<sup>-1</sup> de prata total, no teleósteo Neotropical *Prochilodus lineatus* após 24 e 96 horas. Foi avaliado a bioacumulação de prata em diferentes tecidos, a indução de proteínas metalotioneínas, parâmetros hematológicos, concentração de glicose, proteínas plasmáticas, e dos íons (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), a atividade das ATPases e anidrase carbônica (AC), molécula e enzimas antioxidantes, danos aos lipídios e atividade da acetilcolinesterase (AChE). A entrada dos íons prata e das NPs na célula alteram sua permeabilidade, gerando desbalanço iônico e aumento do hematócrito. A grande interação da Ag com biomoléculas ocasionam a inibição da enzima AC de forma competitiva ou não competitiva pelo sítio de ligação do Zn, redução da GSH, e até o aumento da GST, pela grande produção de metabólitos durante essa interação. A bioacumulação de Ag no músculo induziu o aumento da atividade H<sup>+</sup> ATPase, decorrente da necessidade de homeostase do balanço iônico, e redução da atividade da AChE, que pode ocasionar alterações comportamentais aos animais. A bioacumulação da Ag foi observada em diferentes tecidos (sangue, brânquias, cérebro e músculo) e tempos de exposição, e se mostrou mais evidente nos grupos expostos a AgNO<sub>3</sub> do que nos expostos a AgNPb, isso pode estar relacionado a fácil absorção dos íons prata pelo animal. A quantidade de Ag dissolvida em ambos grupos se mostraram similares, mas foram encontradas diferentes alterações fisiológicas e bioquímicas entre os grupos, evidenciando o potencial tóxico da AgNPb em *P. lineatus*, mesmo a baixa concentração de Ag total e curtos tempos de exposição, exigindo cuidados na manipulação das AgNPs e na sua inserção em produtos.

**Palavras-chave:** acetilcolinesterase; anidrase carbônica; bioacumulação; *Fusarium oxysporum*; metalotioneínas.

Ferroni, Hellen Ingrid. **Effects and accumulation of silver and nano-silver on *Prochilodus lineatus***: biochemical and physiological biomarkers. 2020. 88 s. Dissertation (Master's in Biological Sciences) - Londrina State University, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNP) have a high microbicidal potential, which is why they make up more than 400 products, where many of them are used daily such as cosmetics, food packaging, fabrics, filters for water treatment, among many others. This wide use facilitates their arrival in the aquatic environments, being able to alter the health of the organisms present there. Several effects on fish have already been induced by synthetic NPAg, but little is known about the toxic potential of NPAg from a biogenic source. In this context, the objective of this work was to evaluate and compare the effects of silver in biogenic NPAg (AgNPb) forms, produced by the fungus *Fusarium oxysporum*, and ionic ( $\text{AgNO}_3$ ), in the concentration  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  of total silver, in the teleost Neotropical *Prochilodus lineatus* after 24 and 96 hours. Silver bioaccumulation in different tissues, induction of metallothionein proteins, hematological parameters, glucose concentration, plasma proteins, and ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), ATPase activity and carbonic anhydrase (AC), molecule and antioxidant enzymes, damage to lipids and acetylcholinesterase (AChE) activity were evaluated. The entry of silver ions and NPs in the cell changes its permeability, generating ionic imbalance and an increase in hematocrit. The great interaction of Ag with biomolecules causes the inhibition of the enzyme AC in a competitive or non-competitive way by the Zn binding site, reduction of GSH, and even the increase in GST, due to the large production of metabolites during this interaction. The bioaccumulation of Ag in the muscle induced an increase in  $\text{H}^+$  ATPase activity, due to the need for homeostasis of ionic balance, and a reduction in AChE activity, which can cause behavioral changes in animals. Ag bioaccumulation was observed in different tissues (blood, gills, brain and muscle) and exposure times, and was more evident in groups exposed to  $\text{AgNO}_3$  than in those exposed to AgNPb, this may be related to the easy absorption of silver ions animal fur. The amount of dissolved Ag in both groups was similar, but different physiological and biochemical changes were found between the groups, showing the toxic potential of AgNPb in *P. lineatus*, even the low concentration of total Ag and short exposure times, requiring care in the manipulation of AgNPs and their insertion in products.

**Keywords:** Acetylcholinesterase; Carbonic anhydrase; Bioaccumulation; *Fusarium oxysporum*; Metallothioneins.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1** - Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus*..... 30

### CAPÍTULO II

**Figura 1** - Bioacumulação de Prata (Ag) (média ± DP, n= 5-8) em sangue, brânquias, fígado, cérebro, músculo e rim de *Prochilodus lineatus* expostos a 10 µg L<sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h (A) e 96 h (B)..... 57

**Figura 2** - Concentração de metalotioneínas (média ± DP, n= 5-8) hepática, cerebral e muscular de *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h..... 58

**Figura 3** - Concentração de hemoglobina (A), hematócrito (B) e número de eritrócitos (C) (média ± DP, n= 7-8) de *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h..... 59

**Figura 4** - Concentração de glicose (A) e proteínas totais (B) mensuradas no plasma (média ± DP, n= 7-8) de *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h..... 60

**Figura 5** - Concentrações plasmáticas dos íons (média ± DP, n= 7-8) Na<sup>+</sup> (A), K<sup>+</sup> (B), Cl<sup>-</sup> (C), Mg<sup>2+</sup> (D) e Ca<sup>2+</sup> (E) de *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h..... 61

**Figura 6** - Atividade enzimática branquial (média ± DP, n= 5-8) da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (A), H<sup>+</sup> ATPase (B), Ca<sup>2+</sup> ATPase (C) e anidrase carbônica (D) de *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h..... 62

**Figura 7** - Concentração branquial (média ± DP, n= 6-8) de GSH (A), atividade da enzima antioxidante CAT (B), enzima de biotransformação GST (C) e lipoperoxidação (D) em

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
|                   | Prochilodus lineatus expostos a concentração de 10 µg L <sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h.....  | 63 |
| <b>Figura 8 -</b> | Concentração hepática (média ± DP, n= 6-8) de GSH (A), atividade das enzimas antioxidantes CAT (B), GPx (C), SOD (D), enzima de biotransformação GST (E) e lipoperoxidação (F) em <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a concentração de 10 µg L <sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h..... | 64 |
| <b>Figura 9 -</b> | Atividade enzimática da acetilcolinesterase (média ± DP, n= 7-8) cerebral (A) e muscular (B) de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a concentração de 10 µg L <sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h.....   | 65 |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Concentração de prata ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) nas amostras de água coletadas no início e no final das exposições..... 55
- Tabela 2** - Alterações significativas em biomarcadores de *P. lineatus* expostos a concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ag, em sua forma de nanopartícula biogênica e nitrato de prata, por 24 e 96 h ..... 65

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| AC                             | Anidrase carbônica                       |
| AChE                           | Acetilcolinesterase                      |
| ADP                            | Adenosina difosfato                      |
| Ag                             | Prata                                    |
| AgNO <sub>3</sub>              | Nitrato de prata                         |
| AgNP                           | Nanopartícula de prata                   |
| AgNPb                          | Nanopartícula de prata biogênica         |
| Al                             | Alumínio                                 |
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | Óxido de alumínio                        |
| ATP                            | Adenosina trifosfato                     |
| BSA                            | Albumina de soro bovino                  |
| Ca <sup>2+</sup>               | Cálcio                                   |
| CaCl <sub>2</sub>              | Cloreto de cálcio                        |
| CaA                            | Cálcio ATPase (Ca <sup>2+</sup> -ATPase) |
| CAT                            | Catalase                                 |
| Cd <sup>2+</sup>               | Cádmio iônico                            |
| CDNB                           | 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno               |
| Cl <sup>-</sup>                | Cloreto                                  |
| CL <sub>50</sub>               | Concentração letal media                 |
| CO <sub>2</sub>                | Dióxido de carbono                       |
| Co <sup>2+</sup>               | Cobalto iônico                           |
| CONAMA                         | Conselho Nacional do Meio Ambiente       |
| Cu                             | Cobre                                    |
| CuONP                          | Nanopartícula de óxido de cobre          |
| DTNB                           | Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)   |
| EDTA                           | Ácido etilenodiamino tetra-acético       |
| ERO                            | Espécie reativa de oxigênio              |
| ERP                            | Estuário do Rio da Prata                 |
| Fe                             | Ferro                                    |
| GPx                            | Glutathiona peroxidase                   |
| GR                             | Glutathiona redutase                     |
| GSSG                           | Glutathiona oxidada                      |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| GSH                              | Glutathiona  |
| GST                              | Glutathiona S-transferase                                      |
| H <sup>+</sup>                   | Próton   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>    | Peróxido de hidrogênio   |
| HA                               | Bomba de prótons ou próton ATPase (H <sup>+</sup> -ATPase)     |
| Hb                               | Hemoglobina  |
| HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>    | Bicarbonato  |
| H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>   | Ácido carbônico  |
| HNO <sub>3</sub>                 | Ácido nítrico  |
| HRP                              | Rio Alto Paraná  |
| Ht                               | Hematócrito  |
| K <sup>+</sup>                   | Potássio   |
| LPO                              | Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica                        |
| MDA                              | Malondialdeído   |
| Mg <sup>2+</sup>                 | Magnésio   |
| MgCl <sub>2</sub>                | Cloreto de magnésio  |
| Mn                               | Manganês   |
| MPR                              | Rio Médio Paraná   |
| MT                               | Metalotioneínas  |
| Na <sup>+</sup>                  | Sódio  |
| NaCl                             | Cloreto de sódio   |
| NADH                             | Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido                    |
| NADPH                            | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato                      |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Fosfato de sódio monobásico                                    |
| NEM                              | N-ethyl-maleimide  |
| Ni                               | Níquel   |
| NKA                              | Bomba sódio-potássio (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase) |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>     | Ânion superóxido   |
| Pi                               | Fosfato inorgânico   |
| RBC                              | Número de eritrócitos  |
| SH                               | Grupo sulfidril  |
| SOD                              | Superóxido dismutase   |
| TBA                              | Ácido tiobarbitúrico   |
| TBARS                            | Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico                |

|                     |                                     |
|---------------------|-------------------------------------|
| TC                  | Taxa de catalisação                 |
| TiO <sub>2</sub> NP | Nanopartícula de dióxido de titânio |
| TNB                 | Ânion tiolato                       |
| TNC                 | Taxa não catalisada                 |
| TRIS                | tris-(hidroximetil)-aminometano     |
| Zn                  | Zinco                               |
| ZnNP                | Nanopartícula de zinco              |

## SUMÁRIO

|          |   |    |
|----------|---|----|
|          | <b>APRESENTAÇÃO</b> .....   | 18 |
|          | <b>CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL</b> .....   | 19 |
| 1.1      | CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR METAIS .....  | 19 |
| 1.2      | PRATA .....   | 20 |
| 1.3      | RESOLUÇÃO CONAMA 357/2005.....  | 21 |
| 1.4      | NANOPARTÍCULAS METÁLICAS .....  | 22 |
| 1.4.1    | Nanopartícula de prata.....   | 23 |
| 1.5      | BIOMARCADORES EM PEIXES .....   | 26 |
| 1.6      | <i>PROCHILODUS LINEATUS</i> COMO MODELO BIOLÓGICO.....  | 30 |
| <b>2</b> | <b>HIPÓTESES</b> .....  | 32 |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 33 |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL.....   | 33 |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 33 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 34 |
|          | <b>CAPÍTULO II: ACÚMULO E FEITOS DA NANOPARTÍCULA DE PRATA BIOGÊNICA NO PEIXE NEOTROPICAL <i>Prochilodus lineatus</i></b> ..... | 43 |
|          | <b>RESUMO</b> .....   | 44 |
|          | <b>RESUMO GRÁFICO</b> .....   | 45 |
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 46 |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 48 |
| 2.1      | MEIO DE EXPOSIÇÃO.....  | 48 |
| 2.2      | DESENHO EXPERIMENTAL.....   | 48 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.3      | DETERMINAÇÃO DA PRATA NA ÁGUA E NOS TECIDOS .....   | 49        |
| 2.4      | PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....   | 49        |
| 2.5      | DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS NO PLASMA E NA ÁGUA.....   | 50        |
| 2.6      | CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....  | 50        |
| 2.7      | ATIVIDADE DAS ATPASES E DA ANIDRASE CARBÔNICA BRANQUIAL .....   | 51        |
| 2.8      | DEFESAS ANTIOXIDANTES, LIPOPEROXIDAÇÃO E ENZIMA DE<br>BIOTRANSFORMAÇÃO GLUTATIONA-S-TRANSFERASE ..... | 52        |
| 2.9      | CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS .....   | 53        |
| 2.10     | ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE .....  | 53        |
| 2.11     | CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....   | 54        |
| 2.12     | ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 54        |
| <b>3</b> | <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>55</b> |
| 3.1      | CONCENTRAÇÃO DE METAIS NA ÁGUA .....  | 55        |
| 3.2      | BIOACUMULAÇÃO DE AG E CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS.....  | 56        |
| 3.3      | PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....   | 58        |
| 3.4      | CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....  | 60        |
| 3.5      | CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÍONS.....  | 60        |
| 3.6      | ATIVIDADE DAS ATPASES E DA ANIDRASE CARBÔNICA.....  | 61        |
| 3.7      | DEFESAS ANTIOXIDANTES, LIPOPEROXIDAÇÃO E ENZIMA DE<br>BIOTRANSFORMAÇÃO GLUTATIONA S-TRANSFERASE.....  | 62        |
| 3.8      | ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE .....  | 64        |
| <b>4</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>  | <b>66</b> |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>  | <b>75</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>76</b> |
|          | <b>CAPÍTULO III: CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>   | <b>87</b> |
|          | <b>ANEXO A .....</b>  | <b>88</b> |

## APRESENTAÇÃO

---

Esta dissertação foi organizada de modo a atender às exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Ela é composta por três capítulos, onde o primeiro (Capítulo I), é referente a introdução geral que contempla a contextualização do trabalho desenvolvido, as hipóteses levantadas e objetivos traçados. O Capítulo II refere-se ao manuscrito intitulado “Acúmulo e efeitos da nanopartícula de prata biogênica no peixe Neotropical *Prochilodus lineatus*”, a ser submetido no periódico Science of the Total Environment, e abrange a bioacumulação de prata e as respostas de biomarcadores bioquímicos e fisiológicos analisados no peixe *Prochilodus lineatus*. E por fim o Capítulo III, que é composto pelas considerações finais do trabalho desenvolvido, nas quais as hipóteses são verificadas e são descritas possíveis lacunas para estudos futuros com nanopartículas de prata.



## CAPÍTULO I

---

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

#### 1.1 Contaminação Aquática por Metais

O crescimento populacional junto as atividades antropogênicas como agricultura, industrialização, produção, consumo e eliminação de resíduos, leva a presença de inúmeras substâncias tóxicas no meio aquático, que atingem organismos, populações e até mesmo ecossistemas inteiros (SHANKAR MURTHY et al., 2013). Dentre estas substâncias se encontra os metais, que apesar de estarem naturalmente no ambiente, eles podem ter suas concentrações aumentadas devido às atividades humanas, como a sua extração (MOISEENKO; KUDRYAVTSEVA, 2001; PYLE; RAJOTTE; COUTURE, 2005), uso industrial, na composição de fertilizantes (DHARMA-WARDANA, 2018) e pesticidas (REBOREDO et al., 2019), entre outros produtos, chegando facilmente aos corpos d'água por meio de lançamento de efluentes, escoamento, precipitação e carreamento atmosférico (YAN et al., 2018).

Os metais não podem ser criados nem destruídos, portanto, uma vez extraídos dos minérios, eles permanecem dispersos no ambiente. São divididos em essenciais e não essenciais. Os metais essenciais devido à sua participação em reações metabólicas, como cofatores ou partes integrais de enzimas (WOOD; FARRELL; BRAUNER, 2011) são fundamentais para a vida biológica, porém em altas concentrações se tornam tóxicos (SIMONATO et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2018). Os metais não essenciais apresentam toxicidade mesmo em baixas concentrações (RIBEIRO et al., 2014), já que não tem função biológica, porém eles podem competir com os metais essenciais e serem incorporados nos organismos (NIYOGI; WOOD, 2004).

Quando no ambiente aquático, os metais podem ser adsorvidos por partículas finas, agregar-se e formar complexos com carbonatos, óxidos de ferro e manganês, carbono e sulfetos (TRAMONTE et al., 2016). A maior parte dos contaminantes adsorvidos nos sedimentos não estão prontamente disponíveis para os organismos aquáticos, embora a variação de algumas características físicas e

químicas da água, como pH, salinidade, potencial redox e teores de quelatos orgânicos, possam provocar a remobilização destes metais para a fase aquosa (FREIRE et al., 2008) e assim tornar-se disponíveis.

## 1.2 Prata

A prata (Ag) é um metal não essencial, conhecido e explorado há milhares de anos (WOOD; FARRELL; BRAUNER, 2011), muito utilizada para confecção de jóias, baterias, catalisadores, espelhos, ferramentas e eletrônicos, por ser ótimo condutor elétrico (NORDBERG et al., 2007), além de muito conhecida pelo seu potencial antimicrobiano, compondo medicamentos como pomadas para queimaduras, colírios, entre outros (MAILLARD; HARTEMANN, 2013).

No ambiente aquático a prata se apresenta principalmente nas formas de sulfeto, cloreto e complexos orgânicos de prata, grande parte devido ao fotoprocessamento e descarga de efluentes (BEHRA et al., 2013; FABREGA et al., 2011). Sua toxicidade está relacionada a sua forma livre ( $\text{Ag}^+$ ), não à sua concentração total, sendo o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) o composto mais tóxico, pela sua dissociação na água e liberação dos íons prata (MAILLARD; HARTEMANN, 2013), forma de maior absorção dos animais (DOLEŽELOVÁ et al., 2008).

A avaliação da toxicidade da prata em suas diferentes formas, como a prata iônica por meio do nitrato de prata, tiosulfato de prata e cloreto de prata, em *Oncorhynchus mykiss* após 168 h, evidenciou a letalidade da prata iônica por meio da concentração letal média ( $\text{CL}_{50}$ ) encontrada de de  $9,13 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ag, enquanto a  $\text{CL}_{50}$  do tiosulfato foi de  $137.000 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ag e não desencadeou mortalidade quando exposta a cloreto de prata (HOGSTRAND et al., 1996). Assim, a especiação da prata é um fator essencial para avaliar o potencial tóxico aos animais aquáticos, e risco ambiental (MAILLARD; HARTEMANN, 2013).

A toxicidade das diferentes formas de prata encontradas no meio aquático, pode ser modificada pelos parâmetros físicos e químicos da água, como a temperatura, concentração de carbono orgânico, dureza da água, pH, capacidade de troca de cátions, quantidades de iodo e argila (BEHRA et al., 2013; LEVARD et al., 2012). Os elementos presentes na água como os íons podem competir com a  $\text{Ag}^+$  para se ligarem a membrana das brânquias, dificultando o acesso do metal ao tecido (WOOD; PLAYLE; HOGSTRAND, 1999), ou até mesmo se complexarem a Ag

reduzindo sua disponibilidade aos organismos e conseqüentemente sua toxicidade (BIELMYER; BRIX; GROSELL, 2008).

Na literatura, já são bem documentados os efeitos da Ag em peixes, como seu acúmulo nos tecidos e aumento da expressão de metalotioneínas (MARTIN et al., 2017), distúrbios ionoregulatórios (CLARK; SHAW; HANDY, 2018; MORGAN; WOOD, 2004), inibições enzimáticas (ATLI et al., 2006; GALVEZ; WOOD, 2002) e até danos a lípidios (KHAN et al., 2017). Em um estudo de Atli e Canli (2011), a Ag<sup>+</sup> afetou o funcionamento das ATPases (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase e Mg<sup>2+</sup>-ATPase) inibindo sua atividade nas brânquias em exposição de 96 h a baixas concentrações (0,1, 0,5, 1, 1,5 µg/ mL). Outra interferência da prata é a alteração na atividade da anidrase carbônica, uma vez que a inibição desta enzima desencadeia alterações no pH, podendo comprometer as funções celulares (KAYA; SÖYÜT; BEYDEMIR, 2015).

### 1.3 Resolução CONAMA 357/2005

Considerando a necessidade de controle e qualidade da água para o bem-estar humano, bem como o equilíbrio ecológico, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) dispõe da Resolução 357/2005, onde classifica os corpos d'água de acordo com a possibilidade de uso e estabelece condições e padrões dos efluentes, indicando concentrações limites de cada substância, relacionada a classe do corpo d'água.

A água doce possui 5 classificações: Classe especial, onde para seu uso é preciso apenas desinfecção; ambientes aquáticos com essa classificação necessita de unidade de conservação para proteção integral. Classe I, necessário tratamento simples para consumo humano, uso para recreação e irrigação. Classe II, necessita de tratamento convencional para consumo humano, uso para irrigação e atividade de pesca. Classe III, uso para consumo humano após tratamento convencional ou avançado. Classe IV, apenas para navegação e harmonia paisagística.

Entre as substâncias reguladas se encontra a prata, que em ambiente aquático, nessa resolução, sua concentração pode chegar a 10 µg L<sup>-1</sup> em águas de Classe I e II e 50 µg L<sup>-1</sup> em corpos d'água de classe III e IV. Estudos

realizados evidenciam a presença deste metal na água, sedimento e muitas vezes acumulados a organismos nativos. No trabalho de Sampaio (2003), a concentração de Ag em diferentes pontos da bacia do alto do Paraguai variou entre 3 e 6  $\mu\text{g L}^{-1}$  Ag.

Em um estudo realizado na bacia do Prata, não houve detecção de Ag em amostra de água nos pontos de coleta, mas foi detectado Ag no sedimento ( $0,28 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dW}$ ) no ponto localizado no Rio médio Paraná (MPR), e em tecidos de *Prochilodus lineatus* coletados, como na brânquia ( $0,030 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ WW}$ ) no ponto do estuário do Rio da Prata (ERP) e no fígado nos pontos MPR, RPE e Rio alto Paraná (HRP) (AVIGLIANO et al., 2019). Evidenciando a presença deste contaminante no ambiente aquático, muitas vezes em concentrações de difícil detecção na água, mas que considerando os hábitos, o tempo de vida e a cadeia trófica dos animais ali presentes esta contaminação pode desencadear alterações e patologias.

#### 1.4 Nanopartículas Metálicas

A nanotecnologia é uma área em expansão, e o número de produtos contendo nanopartículas (NPs) aumentou exponencialmente nas últimas décadas (KLAINÉ et al., 2008). Segundo a Nanodatabase ([www.nanodb.dk](http://www.nanodb.dk)) já são 3.060 produtos contendo nanopartículas. Estes produtos contemplam diversos setores, tais como alimentício (ARAÚJO et al., 2015), eletrônico, farmacêutico (DE OLIVEIRA et al., 2016), cosmético e agrícola (LIU et al., 2020).

As NPs são definidas como materiais com um tamanho entre 1 e 100 nm em pelo menos uma dimensão (MCSHAN; RAY; YU, 2014), com propriedades físico-químicas únicas que diferem do seu estado bruto devido à sua maior área de superfície em relação ao volume (VALE et al., 2016). Estas partículas já são conhecidas há muitos anos como colóides (KLAINÉ et al., 2008), porém atualmente seu uso cresceu, já que suas propriedades como alta superfície de contato, pequeno volume, grande reatividade, permitem serem utilizadas em diferentes setores. As NPs são enquadradas como contaminantes de preocupação emergente, que são substâncias cuja ocorrência ou preocupação no ambiente foi constatada recentemente, e que não são contemplados pela legislação (TIJANI et al., 2016).

No ambiente aquático as NPs são expostas a condições dinâmicas, como alterações de pH, quantidade de água (períodos de seca e cheia), revolvimento do sedimento, mudanças de temperatura, luminosidade, presença de matéria orgânica, e compostos inorgânicos (FABREGA et al., 2011). Estas condições podem modificar as propriedades físico-químicas das NPs como o tamanho, forma (proporção) e carga superficial (SHAW; HANDY, 2011). Além de gerar dissolução, agregação e sedimentação das NPs, determinando suas formas no espaço e no tempo (especialização dinâmica) e sua biodisponibilidade (VALE et al., 2016).

#### 1.4.1 Nanopartícula de prata

Uma das nanopartículas que se destaca no mercado, é a nanopartícula de prata (AgNP) que já compõem mais de 500 produtos segundo a Nanodatabase ([www.nanodb.dk](http://www.nanodb.dk)). Dentre eles, dispositivos médicos, tecidos, embalagens de alimentos, cosméticos, filtros para tratamento de água, sensores e produtos farmacêuticos em geral (OBERHOLSTER et al., 2011). O uso na medicina se destaca, pois, a prata na sua forma de nanopartícula tem seu potencial antimicrobiano aumentado, já que partículas menores possuem maior superfície de contato, o que facilita sua fixação em membranas e entrada nas células (LIU; JIANG, 2015).

As nanopartículas possuem duas rotas de síntese: sintética e biogênica. Ambas as rotas são baseadas na redução de íons prata ( $\text{Ag}^+$ ) ao estado de oxidação zero ( $\text{Ag}^0$ ), formando as AgNPs. A produção sintética é a mais utilizada, pois possibilita o maior controle do tamanho da NPs obtidas (DURÁN et al., 2019) e emprega muitas vezes reagentes tóxicos para redução química, tais como citrato de sódio, borohidreto de sódio, hidrozinas, formaldeídos, hidroxilaminas, álcoois e açúcares (ZAHRA et al., 2016), além de ser necessário o controle de temperatura e pressão (DURÁN et al., 2019). Após isso, essas nanopartículas necessitam de agentes de revestimento e dispersão, a fim de evitar a oxidação das nanopartículas e sua aglomeração (DURÁN et al., 2019).

A produção biogênica vem se destacando atualmente por ser uma opção economicamente e ecologicamente viável, já que é considerada simples, de baixo custo, rápida, sustentável (SEABRA; DURÁN, 2015) e pode ser realizada sob

temperatura e pressão ambientes, sem uso de agentes estabilizantes externos (ELEMIKE et al., 2017). A redução é feita por meio de microorganismos como bactérias (QUINTEROS et al., 2019), fungos (GUILGER-CASAGRANDE et al., 2019) e extratos de plantas (SALMEN; ALHARBI, 2020; VELSANKAR et al., 2020), além de estudo recente relatar a redução da Ag por meio do ácido húmico, presente em ambientes naturais (DONG et al., 2020). Neste tipo de produção, o agente redutor também é responsável pelo revestimento da nanopartícula, interação nanopartícula-proteínas do agente redutor, que aumenta a estabilidade e evitar aglomeração das nanopartículas (DURÁN et al., 2019).

A chegada das AgNPs no ambiente aquático se dá durante a sua produção, no processo de fabricação, reciclagem e descarte das NPs e de seus produtos (GOTTSCHALK; NOWACK, 2011), sendo a maior parte liberada durante o uso. Produtos como sprays desinfetantes, meias resistentes ao odor, plásticos antimicrobianos e têxteis, estão sujeitos a lavagem frequente, abrasão mecânica e seu envelhecimento, liberando as AgNPs para o ambiente natural. A quantidade dessas AgNPs liberadas dependem da vida útil do produto, a forma de uso, e como as NPs estão incorporadas (LIU; JIANG, 2015).

No ambiente aquático, as nanopartículas estão sujeitas a grandes desafios analíticos, visto que faltam abordagens para uma detecção quantitativa e qualitativa para a sua determinação (GOTTSCHALK; NOWACK, 2011). Por isso, estudos realizam estimativas com base na produção, uso e descarte das NPs, para avaliar a quantidade aproximada que está chegando deste material no ambiente.

Blaser e colaboradores (2008), baseados na chegada de plásticos e tecidos nano-funcionalizados contendo Ag no rio Reno, estimaram concentrações por volta de 2-18  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Ag em tratamento de águas residuais, 30-40  $\text{ng L}^{-1}$  de Ag em rios, 9-70  $\text{ng L}^{-1}$  de Ag em água intersticial do sedimento e 2-14  $\text{mg Kg}^{-1}$  de sedimentos fluviais para o ano de 2010. Já Sun e colaboradores (2016), estimaram a concentração de AgNP em compartimentos ambientais, baseados em um modelo de fluxo de material probabilístico dinâmico personalizado, considerando fluxos de massa anteriores, atuais e futuros (1990-2020) supondo concentrações ambientais de aproximadamente de 1,5  $\text{ng L}^{-1}$  em águas superficiais e de 30,1  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  no sedimento. Estimativas muito diferentes são encontradas devido as metodologias e fatores considerados por cada autor, isso evidencia a dificuldade em saber as verdadeiras concentrações de AgNPs no ambiente aquático.

Quando essas AgNPs chegam no ambiente aquático, elas podem sofrer alterações como a perda de seu revestimento, que causa instabilidade nas NPs e pode acarretar em sua aglomeração ou sedimentação, ou até mesmo sofrer oxidação de sua superfície pelo oxigênio molecular ou outros compostos redox ativos, liberando  $\text{Ag}^+$  (MCSHAN; RAY; YU, 2014). Essas alterações podem facilitar a aderência das NPs e sua absorção por meio dos organismos aquáticos.

Uma vez presente nos corpos d'água, as AgNPs podem afetar toda a biota. Entre os organismos mais suscetíveis estão os peixes que podem incorporar os contaminantes por diferentes vias como: pela alimentação, pele e principalmente pelas brânquias, que são um dos principais locais de contato direto dos peixes com os contaminantes presentes na água.

As AgNPs podem se aderir ao epitélio das brânquias e serem interiorizados através da endocitose (CANTON; BATTAGLIA, 2012). O estudo de Yue e colaboradores (2017), confirmou por microscopia eletrônica de transmissão, aglomerado ou unidade de AgNPs, localizados em endossomos e lisossomos em células de peixe, comprovando a interiorização das NPs por meio da endocitose. Essas NPs também podem se aderir a membrana e não serem interiorizadas, mas ficarem liberando íons prata localmente, sendo estes íons absorvidos, visto que a prata na sua forma iônica facilmente entra nas células por transportadores de cobre ou canais de sódio (WOOD; FARRELL; BRAUNER, 2011).

Após a entrada das NPs nas células, as proteínas do meio biológico podem se ligar às nanopartículas devido a carga de sua superfície, ou a outras proteínas presentes em seu revestimento, formando camadas. Estas camadas de proteínas na superfície das NPs, são denominadas proteínas corona (NEL et al., 2009), isto é, quando em contato com fluidos biológicos as NPs recebem revestimento proteico de acordo com sua carga superficial (SAFI et al., 2011). Essa interação das NPs com as proteínas, pode levá-las a perda de suas propriedades e funções (YUE et al., 2017), alguns estudos relacionam a inibição de enzimas, geradas em exposição a NPs, com este processo (ATLI; CANLI, 2011).

Diversos efeitos das AgNPs em organismos aquáticos já foram relatados na literatura, além da sua letalidade. Em estudo com o peixe *Prochilodus lineatus* a  $\text{CL}_{50}$  (96h) foi de  $53,84 \mu\text{g L}^{-1}$  NPAg sintética (ALE et al., 2018b), quando exposto a concentrações subletais ( $2,5$  e  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  AgNP) durante 5 e 15 dias, foi observado bioacumulação de Ag em brânquias, fígado, intestino e cérebro, além de

estresse oxidativo branquial, aumento de glicogênio hepático e muscular e diminuição de proteínas musculares (ALE et al., 2018a, 2018b). Naguib e colaboradores (2020), constataram além do acúmulo de prata no fígado, hiperglicemia, aumento nos níveis de lipídios sericos totais e hipoproteinemia em *Clarias gariepinus* expostos as concentrações de 10 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de AgNP sintética e  $\text{AgNO}_3$  por 15 dias.

Os embriões de peixe também podem ser afetados pelas AgNPs, como visto no estudo de Lee e colaboradores (2019), que realizou exposições de embriões de *Danio rerio* por 4 h a 1 e 5  $\text{mg L}^{-1}$  de AgNP e verificou diminuição nos íons sódio, potássio e cálcio. Nesse mesmo trabalho, ocorreu uma segunda exposição de 96 h, onde além das alterações iônicas, foi constatado uma taxa de mortalidade de 50% dos embriões expostos a 5  $\text{mg L}^{-1}$  de AgNP e morte total dos expostos a 10  $\text{mg L}^{-1}$  evidenciando alta toxicidade nessas concentrações.

As concentrações utilizadas em exposições de embriões mostram uma sensibilidade mais baixa do embrião quando comparado a sua fase larval, podendo ser devida a presença do córion, que pode funcionar como uma barreira a substâncias químicas de alto peso molecular e de acentuado efeito tóxico (ANSARI; ANSARI, 2015).

Poucos estudos são encontrados sobre a toxicidade de nanopartículas de prata biogênica. Krishnaraj e colaboradores (2016), avaliaram a exposição do peixe *Danio rerio* a AgNP produzida por meio de extrato de folhas de *Malva crispa*, e identificou uma  $\text{CL}_{50}$  de 142,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  em 96 h. Em uma segunda exposição com a metade da  $\text{CL}_{50}$  (71,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foi verificado estresse oxidativo e efeito genotóxico em células sanguíneas do peixe *D. rerio*. A mesma espécie foi utilizada em outro estudo, que determinou a  $\text{CL}_{50}$  do sal  $\text{AgNO}_3$ , AgNP sintética e AgNP biogênica, por meio de extrato de *Psidium guajava*, sendo 100, 80 e 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  em 96 h, respectivamente (SARKAR et al., 2014). Essas concentrações mostram uma menor toxicidade da AgNP biogênica ao organismo modelo, podendo vir a ser uma alternativa menos prejudicial ao ambiente, de baixo custo e que atenda a demanda, visto seu potencial antimicrobiano.

## 1.5 Biomarcadores em Peixes

A ecotoxicologia é a ciência que busca conhecer e entender os

efeitos dos contaminantes em pequena e grande escala nos organismos, avaliando efeitos citológicos, fisiológicos e bioquímicos, muito observados em exposições agudas, até efeitos na população, comunidade ou ecossistema (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). A análise das alterações geradas por exposições a substâncias estranhas (xenobióticos) nos organismos, podem ser definidas como biomarcadores, ferramentas importantes, pois muitos indicam efeitos subletais antes da ocorrência de danos irreversíveis (NIKINMAA, 2014). O uso em conjunto de vários biomarcadores possibilita esclarecer o modo de ação e a toxicidade de muitos contaminantes (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

A absorção dos contaminantes pelos peixes viventes nos corpos d'água se dá principalmente por duas vias: pela ingestão, junto ao sedimento ou no alimento, ou por meio das brânquias, órgão que apresenta grande superfície para proporcionar as trocas gasosas, e neste processo de troca pode absorver outras substâncias, como nanopartículas metálicas e compostos orgânicos, que interagem com as células das brânquias e eventualmente passam para a corrente sanguínea e são distribuídas para os demais órgãos (cérebro, musculo, fígado, rim). A absorção, distribuição, biotransformação e excreção de xenobióticos pelos peixes são importantes determinantes da toxicidade química de um contaminante (DI GIULIO, RICHARD T. HINTON, 2008). Caso o organismo não consiga excretar esses compostos eles podem bioacumular nos tecidos do animal.

As metalotioneínas (MT) são proteínas com baixo peso molecular e alto teor de sulfidril, que atua principalmente na homeostase dos metais essenciais, porém em contaminações por metais não essenciais elas podem realizar a neutralização destes e atuar na defesa antioxidante (MAO; WANG; YANG, 2012; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Diversos estudos apresentam seu aumento em peixes após exposições a metais (DE OLIVEIRA et al., 2018; VINCENT et al., 2019).

As brânquias, são responsáveis por diversas funções no organismo, como trocas gasosas, equilíbrio iônico, manutenção do pH e excreção (ATLI; CANLI, 2011). Análises que avaliem o funcionamento deste órgão são necessárias em exposições a metais, já que eles alteram principalmente a ionoregulação dos peixes (ALSOP; WOOD, 2011). Diversos estudos observaram desequilíbrio iônico gerado por metais, como cádmio e o zinco que afetam a captação e homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  (HOGSTRAND et al., 1996) e já o íon cobre pode interferir na captação e

homeostase do Na<sup>+</sup> (WOOD; FARRELL; BRAUNER, 2011). Além disso, os metais podem promover inibição das ATPase em brânquias e rim (ATLI; CANLI, 2011; RIBEIRO et al., 2014), e da anidrase carbônica (SILVA; MARTINEZ, 2014).

A aderência dos metais nas brânquias e sua interação com as células podem atrapalhar a captação de oxigênio, uma das formas de verificar este tipo de efeito é por meio dos parâmetros hematológicos como concentração de hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (RBC) e hematócrito (Ht). Khangarot e Ray (1988) demonstraram que a toxicidade dos metais para peixes, podem causar danos nas brânquias e isso alterar a captação de oxigênio. Alteração hematológicas com diminuição do Ht, RBC e Hb foram observadas em um estudo com a espécie *Clarias gariepinus* expostos a AgNP, nanopartícula de óxido de cobre (CuONP) e a mistura das NPs por 28 dias (OGUNSUYI et al., 2019).

A interiorização de contaminantes pode induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e com isso alterar a concentração e a atividade de moléculas antioxidantes, como as enzimas: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), e superóxido dismutase (SOD); o tripeptídeo glutathione (GSH) e outras moléculas antioxidantes. Essas alterações podem desencadear o chamado estresse oxidativo, definido como um aumento transitório ou persistente do nível de ERO, perturbando as funções celulares e vias de sinalização, que pode culminar na morte celular por necrose ou apoptose (LUSHCHAK, 2016).

A GSH é um importante antioxidante não enzimático e está muitas vezes envolvida no processo inicial de defesa do organismo, além de ser substrato para outras enzimas, como a GPx, enzima antioxidante, e a Glutathione S-transferase (GST) enzima envolvida no processo de biotransformação (LUSHCHAK, 2012). Essa biotransformação, nada mais é, que a eliminação de contaminantes ou produtos metabólicos por eles gerados (NIKINMAA, 2014), esse processo leva a diminuição da meia vida biológica do contaminante e minimiza seu potencial tóxico (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006) .

As ERO quando não neutralizadas pelas defesas antioxidantes, podem se ligar a outras moléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, e causar danos. A lipoperoxidação é um dos possíveis danos gerados por elas, e pode ser quantificada por diversos métodos, produtos primários, secundários ou até por meio de produtos finais da peroxidação lipídica (LUSHCHAK, 2011). Em exposição a 5 mg L<sup>-1</sup> de zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe), individualmente, por 96h, foi

visto que Mn e Fe promoveram lipoperoxidação no fígado do peixe *Prochilodus lineatus* (DE OLIVEIRA et al., 2018). No estudo de ALE e colaboradores (2018b), com o mesmo animal modelo utilizado no trabalho citado anteriormente, mas exposto a AgNP, também foi constatado lipoperoxidação, mas desta vez nas brânquias do *P. lineatus*, mostrando ser recorrente danos aos animais expostos aos metais.

A contaminação aquática pode desencadear, nos organismos expostos, um estresse metabólico. O contato a um xenobiótico (agente estressor) leva a liberação de catecolaminas e cortisol na corrente sanguínea, que acelera os batimentos cardíacos, aumenta a absorção de oxigênio e induz a mobilização de fontes energéticas por meio da gliconeogênese e glicogenólise, afim de aumentar a concentração de glicose disponível para se adaptar a condição de estresse (NELSON E COX, 2014; LIMA et al., 2007). Tanto os contaminantes orgânicos quanto os inorgânicos causam este aumento de glicose, visto que este é um dos primeiros mecanismos desencadeados pela contaminação.

Diversos metais pode induzir efeitos neurotóxicos em organismos aquáticos (BANAEE et al., 2019; BERNAL-REY et al., 2020), a avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), envolvida na transmissão sináptica, pode detectar neurotoxicidade. Durante a transmissão de impulsos nervosos, a acetilcolina é liberada na fenda sináptica ou junções neuromusculares, se ligando aos seus receptores nicotínicos, realizando a abertura de canais de sódio e potássio desencadeando um potencial de ação propagando o impulso nervoso (AIRES, 2008). Para cessar este impulso a enzima acetilcolinesterase (AChE) realiza a hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético, interrompendo a transmissão contínua do impulso nervoso (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A presença de contaminantes no ambiente pode inibir a função da AChE, fazendo com que o impulso não cesse, superestimulando os receptores da célula pós-sináptica podendo alterar seu comportamento, locomoção, equilíbrio, natação, apetite e reprodução (BRETAUD et al., 2000; KIRBY et al., 2000). Sendo assim, a avaliação desta enzima pode indicar um comprometimento de funções que podem afetar a população como um todo. Vários trabalhos já mostraram a interferência dos metais na atividade da AChE (BANAEE et al., 2019; SILVA et al., 2013; SIMONATO et al., 2016).

## 1.6 *Prochilodus Lineatus* como Modelo Biológico

Peixes e outros organismos aquáticos são expostos a contaminantes, por meio da água, alimentos e sedimentos. Os peixes se destacam, por apresentarem alterações em biomarcadores, mesmo em baixas concentrações de poluentes, sendo comumente empregados em ensaios ecotoxicológicos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O teleósteo dulcícola *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), popularmente conhecido como Curimba ou Curimbatá (Figura 1), é um peixe nativo da região neotropical, da ordem Characiformes, família Prochilodontidae, com grande distribuição, habitando bacias do Paraguai, Paraná, Uruguai, rio Paraíba do Sul e Jacuí (SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTÍ, 2001).



**Figura 1.** Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus*. Foto: LEFA/UEL.

Esta espécie possui comportamento migratório e hábito alimentar detritívoro (BOWEN, 1983; COLOMBO et al., 2000), o que favorece sua exposição aos contaminantes, sendo vulnerável aos compostos diluídos ou suspensos na água e os depositados no sedimento (COLOMBO et al., 2007). Já se mostrou sensível a diversas classes de contaminantes: como os agrotóxicos diflubenzuron (PEREIRA MADUENHO; MARTINEZ, 2008), lambda cialotrina (VIEIRA; MARTINEZ, 2018), imidaclopride (ALVIM; MARTINEZ, 2019; VIEIRA et al., 2018), glifosato (LANGIANO; MARTINEZ, 2008), atrazina (SANTOS; MARTINEZ, 2012), e clomazone (PEREIRA; FERNANDES; MARTINEZ, 2013). E aos metais como o alumínio (GALINDO et al., 2010), cádmio (SILVA; MARTINEZ, 2014), cobre (SIMONATO et al., 2016), níquel (PALERMO et al., 2015), chumbo (RIBEIRO et al., 2014), além de zinco, manganês e ferro (DE OLIVEIRA et al., 2018). E recentemente, aos contaminantes de

preocupação emergente como a cafeína (SANTOS-SILVA; MONTAGNER; MARTINEZ, 2018), o microplástico (RODA et al., 2020), atrazina nanoencapsulada (ANDRADE et al., 2019), nanopartícula de dióxido de titânio (CARMO et al., 2019), nanopartícula de cobre (TESSER et al., 2020) e de prata (ALE et al., 2018a, 2018b).

Devido a sua abundância e ampla distribuição, esta espécie é bastante utilizada na alimentação humana (PESOA; SCHULZ, 2010). Sua importância econômica e ecológica unida a sua sensibilidade a diferentes contaminantes a torna em ótimo bioindicador em análises toxicológicas.

## 2 HIPÓTESES

- A nanopartícula de prata biogênica apresentará menor potencial tóxico ao peixe *Prochilodus lineatus* do que o nitrato de prata;
- Quanto maior o tempo de exposição, maiores serão as alterações nos biomarcadores analisados nos diferentes tecidos do animal experimental;

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Identificar os efeitos da prata nas formas de nanopartícula de prata biogênica (AgNPb) e nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), na concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> nos tempos de exposição (24 e 96 horas) na espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o acúmulo de prata total e a concentração de proteínas metalotioneínas em diferentes tecidos do peixe *P. lineatus*;
- Identificar se a AgNPb e o AgNO<sub>3</sub> promovem alterações nos parâmetros hematológicos (hemoglobina, hematócrito e no número de eritrócitos) no organismo teste;
- Determinar se após as exposições ocorrerá alterações nas concentrações de glicose, e dos íons sódio, potássio, cálcio, magnésio e cloreto no plasma;
- Identificar se a AgNPb e o AgNO<sub>3</sub> podem causar alterações na atividade das enzimas Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> ATPase, H<sup>+</sup> ATPase, Ca<sup>2+</sup> ATPase e anidrase carbônica nas brânquias de *P. lineatus*;
- Demonstrar se os períodos de exposição e as concentrações de bNPAg promoverá alterações na atividade da enzima de biotransformação GST e na concentração de GSH, assim como alterações nas defesas enzimáticas antioxidantes (CAT, GPx e SOD) em *P. lineatus*.
- Verificar se a AgNPb causa danos em lipídios (LPO) em brânquia e fígado do organismo teste nas diferentes exposições;
- Identificar se após as exposições ocorrerá alterações na atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro e músculo em *P. lineatus*;

## REFERÊNCIAS

- ARIES, M.M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ALE, A. et al. Integrative assessment of silver nanoparticles toxicity in *Prochilodus lineatus* fish. **Ecological Indicators**, v. 93, p. 1190–1198, 2018a.
- ALE, A. et al. Nanosilver toxicity in gills of a neotropical fish: Metal accumulation, oxidative stress, histopathology and other physiological effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 976–984, 2018b.
- ALSOP, D.; WOOD, C. M. Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: Common mechanisms across multiple metals. **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 385–393, 2011.
- ALVIM, T. T.; MARTINEZ, C. B. DOS R. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, p. 85–93, 2019.
- ANDRADE, L. L. DE et al. Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. **Science of the Total Environment**, v. 663, p. 548–559, 2019.
- ANSARI, S.; ANSARI, B. A. Effects of Heavy Metals on the Embryo and Larvae of Zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae). **Scholars Academic Journal of Biosciences**, v. 3, p. 52–56, 2015.
- ARAÚJO, E. A. et al. Sanitização de cenoura minimamente processada com nanopartículas de prata. **Ciencia Rural**, v. 45, p. 1681–1687, 2015.
- ATLI, G. et al. Response of catalase activity to Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 218–224, 2006.
- ATLI, G.; CANLI, M. Alterations in ion levels of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures to five heavy metals. **Turkish Journal of Zoology**, v. 35, p. 725–736, 2011.
- AVIGLIANO, E. et al. Distribution and bioaccumulation of 12 trace elements in water, sediment and tissues of the main fishery from different environments of the La Plata basin (South America): Risk assessment for human consumption. **Chemosphere**, v. 236, p. 124394, 2019.
- BANAEE, M. et al. Evaluation of single and combined effects of cadmium and microplastic particles on biochemical and immunological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). **Chemosphere**, v. 236, p. 124335, 2019.
- BEHRA, R. et al. Bioavailability of silver nanoparticles and ions: From a chemical and biochemical perspective. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 10, n. 87, 2013.

BERNAL-REY, D. L. et al. Seasonal variations in the dose-response relationship of acetylcholinesterase activity in freshwater fish exposed to chlorpyrifos and glyphosate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 187, p. 109673, 2020.

BIELMYER, G. K.; BRIX, K. V.; GROSELL, M. Is Cl<sup>-</sup> protection against silver toxicity due to chemical speciation? **Aquatic Toxicology**, v. 87, n. 2, p. 81–87, 2008.

BLASER, S. A. et al. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. **Science of The Total Environment**, v. 390, n. 2–3, p. 396–409, 2008.

BOWEN, S. H. Detritivory in neotropical fish communities. **Environmental Biology of Fishes**, v. 9, p. 137–144, 1983.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J.P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 47, p. 117-124, 2000.

CANTON, I.; BATTAGLIA, G. Endocytosis at the nanoscale. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2718–2739, 2012.

CARMO, T. L. L. et al. Overview of the toxic effects of titanium dioxide nanoparticles in blood, liver, muscles, and brain of a Neotropical detritivorous fish. **Environmental Toxicology**, v. 34, p. 457–468, 2019.

CLARK, N. J.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Low hazard of silver nanoparticles and silver nitrate to the haematopoietic system of rainbow trout. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 152, n. January, p. 121–131, 2018.

COLOMBO, J. C. et al. Detritivorous fish contamination in the Rio de la Plata estuary: A critical accumulation pathway in the cycle of anthropogenic compounds. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 57, p. 1139–1150, 2000.

COLOMBO, J. C. et al. Bioaccumulation of anthropogenic contaminants by detritivorous fish in the Río de la Plata estuary: 1-Aliphatic hydrocarbons. **Chemosphere**, v. 68, p. 2128–2135, 2007.

CONAMA. Ministério do Meio Ambiente/Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução 357**. 2005 Acesso: mar 2020. <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>.

DE OLIVEIRA, L. F. et al. Functionalized Silica Nanoparticles As an Alternative Platform for Targeted Drug-Delivery of Water Insoluble Drugs. **Langmuir**, v. 32, p. 3217–3225, 2016.

DE OLIVEIRA, L. F. et al. Triple-mixture of Zn, Mn, and Fe increases bioaccumulation and causes oxidative stress in freshwater neotropical fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 6, p. 1749–1756, 2018.

DHARMA-WARDANA, M. W. C. Fertilizer usage and cadmium in soils, crops and food. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 40, n. 6, p. 2739–2759, 2018.

DI GIULIO, RICHARD T. HINTON, D. E. **The Toxicology of Fishes**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.

DOLEŽELOVÁ, P. et al. Comparison of the sensitivity of *Danio rerio* and *Poecilia reticulata* to silver nitrate in short-term tests. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 1, p. 200–202, 2008.

DONG, B. et al. Transformation of silver ions to silver nanoparticles mediated by humic acid under dark conditions at ambient temperature. **Journal of Hazardous Materials**, v. 383, p. 121190, 2020.

DURÁN, N. et al. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**. v. 42, p. 206–213, 2019.

ELEMIKE, E. E. et al. Plant-mediated biosynthesis of silver nanoparticles by leaf extracts of *Lasienthra africanum* and a study of the influence of kinetic parameters. **Bulletin of Materials Science**, v. 40, p. 129–137, 2017.

FABREGA, J. et al. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment International**, v. 37, n. 2, p. 517–531, 2011.

FREIRE, M. M. et al. Biomarcadores Na Avaliação Da Saúde Ambiental Dos Ecossistemas Aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, p. 347–354, 2008.

GALINDO, B. A. et al. Genotoxic effects of aluminum on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 212, n. 1–4, p. 419–428, 2010.

GALVEZ, F.; WOOD, C. M. The mechanisms and costs of physiological and toxicological acclimation to waterborne silver in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 172, p. 587–597, 2002.

GOTTSCHALK, F.; NOWACK, B. The release of engineered nanomaterials to the environment. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 1145–1155, 2011.

GUILGER-CASAGRANDE, M. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1–9, 2019.

HOGSTRAND, C. et al. Mechanisms of zinc uptake in gills of freshwater rainbow trout: Interplay with calcium transport. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 270, p. 1141–1147, 1996.

KAYA, E. D.; SÖYÜT, H.; BEYDEMİR, Ş. The toxicological impacts of some heavy metals on carbonic anhydrase from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) gills.

**Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 825–832, 1 Mar. 2015.

KHAN, M. S. et al. Eco-Friendly Synthesis of Silver Nanoparticles Through Economical Methods and Assessment of Toxicity Through Oxidative Stress Analysis in the *Labeo Rohita*. **Biological Trace Element Research**, v. 176, p. 416–428, 2017.

KHANGAROT, B. S.; RAY, P. K. The acute toxicity of silver to some freshwater fishes. **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, v. 16, p. 541–545, 1988.

KLAINE, S. J. et al. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, p. 1825–1851, 2008.

KIRBY, M.F. et al. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, p. 780-791, 2000.

KRISHNARAJ, C.; HARPER, S. L.; YUN, S.-I. In Vivo toxicological assessment of biologically synthesized silver nanoparticles in adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Hazardous Materials**, v. 301, p. 480–491, 2016.

LANGIANO, V. DO C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 147, p. 222–231, 2008.

LEE, C.-Y. et al. Silver nanoparticle exposure impairs ion regulation in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 214, p. 105263, 2019.

LEVARD, C. et al. Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 13, p. 6900–6914, 2012.

LIMA, L. C. et al. Stress in fishes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, p. 113–117, 2007.

LIU, B. et al. TiO<sub>2</sub>/Cu<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nanocomposite as efficient antimicrobials for inactivation of crop pathogens in agriculture. **Materials Science and Engineering: C**, v. 107, p. 110344, 2020.

Liu, J.; Jiang, G. (Eds). **Silver nanoparticles**. Ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 152, 2015.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 13–30, 2011.

LUSHCHAK, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. **Journal of Amino Acids**, v. 2012, p. 1–26, 2012.

LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 711–747, 2016.

MAILLARD, J. Y.; HARTEMANN, P. Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. **Critical reviews in microbiology**, v. 39, n. 4, p. 373–383, 2013.

MAO, H.; WANG, D. H.; YANG, W. X. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. **Aquatic Toxicology**, v. 110–111, p. 208–213, 2012.

MARTIN, J. D. et al. Biomarkers of exposure to nanosilver and silver accumulation in yellow perch (*Perca flavescens*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, p. 1211–1220, 2017.

MCSHAN, D.; RAY, P. C.; YU, H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, p. 116–127, 2014.

MOISEENKO, T. I.; KUDRYAVTSEVA, L. P. Trace metal accumulation and fish pathologies in areas affected by mining and metallurgical enterprises in the Kola Region, Russia. **Environmental Pollution**, v. 114, p. 285–297, 2001.

MORGAN, T. P.; WOOD, C. M. A relationship between gill silver accumulation and acute silver toxicity in the freshwater rainbow trout: Support for the acute silver biotic ligand model. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 1261–1267, 2004.

NAGUIB, M. et al. Hepatotoxic effects of silver nanoparticles on *Clarias gariepinus*; Biochemical, histopathological, and histochemical studies. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 133–141, 2020.

NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Materials**, v. 8, p. 543–557, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIKINMAA, MIKKO. **An introduction to aquatic toxicology**. United States of America: Academic Press, 2014.

NIYOGI, S.; WOOD, C. M. Kinetic analyses of waterborne Ca and Cd transport and their interactions in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and yellow perch (*Perca flavescens*), two species differing greatly in acute waterborne Cd sensitivity. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 174, p. 243–253, 2004.

Nordberg, G. F. et al. **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3. ed. Academic Press: California, 2007.

OBERHOLSTER, P. J. et al. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. **Ecotoxicology and**

**Environmental Safety**, v. 74, p. 416–423, 2011.

OGUNSUYI, O. I. et al. Genetic and systemic toxicity induced by silver and copper oxide nanoparticles, and their mixture in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 27470–27481, 2019.

PALERMO, F. F. et al. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 116, p. 19–28, 2015.

PEREIRA, L.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 1–8, 2013.

PEREIRA MADUENHO, L.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of diflufenburon on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 148, p. 265–272, 2008.

PESOA, N. A.; SCHULZ, U. H. Diel and seasonal movements of grumetã *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) in the Sinos River, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4 SUPPL., p. 1169–1177, 2010.

PYLE, G. G.; RAJOTTE, J. W.; COUTURE, P. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 287–312, 2005.

QUINTEROS, M. A. et al. Biogenic nanoparticles: Synthesis, stability and biocompatibility mediated by proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 184, p. 110517, 2019.

REBOREDO, F. et al. Metal content in edible crops and agricultural soils due to intensive use of fertilizers and pesticides in Terras da Costa de Caparica (Portugal). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 2512–2522, 2019.

RIBEIRO, A. M. et al. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 645–657, 2014.

RODA, J. F. B. et al. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 242, p. 110659, 2020.

SAFI, M. et al. The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 9353–9363, 2011.

SALMEN, S. H.; ALHARBI, S. A. Silver nanoparticles synthesized biogenically from *Aloe fleurentinorum* extract: characterization and antibacterial activity. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 13, p. 1–5, 2020.

SAMPAIO, A. C. S. **Metais Pesados Na Água E Sedimentos**. 2003. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2003.

SANTOS-SILVA, T. G.; MONTAGNER, C. C.; MARTINEZ, C. B. R. Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 237–242, 2018.

SANTOS, T. G.; MARTINEZ, C. B. R. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. **Chemosphere**, v. 89, p. 1118–1125, 2012.

SARKAR, B. et al. Toxicity Evaluation of Chemically and Plant Derived Silver Nanoparticles on Zebrafish (*Danio rerio*). **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 84, p. 885–892, 2014.

SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Nanotoxicology of metal oxide nanoparticles. **Metals**, v. 5, p. 934–975, 2015.

SHANKAR MURTHY, K. et al. A review on toxicity of pesticides in Fish. **International Journal of Open Scientific Research**, v. 1, p. 15–36, 2013.

SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. **Environment International**, v. 37, p. 1083–1097, 1 Aug. 2011.

SILVA, A. O. F. DA; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. **Aquatic Toxicology**, v. 156, p. 161–168, 2014.

SILVA, K. C. C. et al. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 191–197, 2013.

SIMONATO, J. D. et al. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 31–41, 2016.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, p. 407–417, 2001.

SUN, T. Y. et al. Dynamic Probabilistic Modeling of Environmental Emissions of Engineered Nanomaterials. **Environmental Science and Technology**, v. 50, p. 4701–4711, 2016.

TESSER, M. E. et al. Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: A comparative approach. **Science of The Total Environment**, v. 704, p. 135332, 2020.

TIJANI, J. O. et al. Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 14, p. 27–49, 2016.

TRAMONTE, K. M. et al. Evaluation of metals availability in sediments of the Bertioiga Channel (Santos Estuarine Complex - SP - Brazil): A tool for chemical pollution monitoring. **Journal of Integrated Coastal Zone Management**, v. 16, p. 289–297, 2016.

VALE, G. et al. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 162–174, 2016.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57–149, 2003.

VELSANKAR, K. et al. Effect of cytotoxicity and antibacterial activity of biosynthesis of ZnO hexagonal shaped nanoparticles by *Echinochloa frumentacea* grains extract as a reducing agent. **Materials Chemistry and Physics**, v. 239, p. 121976, 2020.

VIEIRA, C. E. D. et al. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 195, p. 125–134, 2018.

VIEIRA, C. E. D.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. The pyrethroid  $\Lambda$ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 210, p. 958–967, 2018.

VINCENT, S. et al. Metallothionein Induced Time Dependent Histomorphometric Analysis of *Clarias gariepinus* Exposed to Cadmium. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, p. 32–38, 2019.

WOOD, C. M.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. **Homeostasis and toxicology of essential metals**. [s.l.] Elsevier Inc., v. 31, 2011.

WOOD, C. M.; PLAYLE, R. C.; HOGSTRAND, C. Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, p. 71–83, 1999.

YAN, X. et al. How human activities affect heavy metal contamination of soil and sediment in a long-term reclaimed area of the Liaohe River Delta, North China. **Sustainability (Switzerland)**, v. 10, p. 1–19, 2018.

YUE, Y. et al. Interaction of silver nanoparticles with algae and fish cells: A side by side comparison. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, p. 1–11, 2017.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.

ZAHRA, Q. et al. A Mini Review on the Synthesis of Ag-Nanoparticles by Chemical Reduction Method and their Biomedical Applications. **NUST Journal of Engineering Sciences**, v. 9, p. 1–7, 2016.



## CAPÍTULO II

---

### **Acúmulo e efeitos da nanopartícula de prata biogênica no peixe Neotropical *Prochilodus lineatus***

**Hellen Ingrid Ferroni<sup>a</sup>, Vanessa Bezerra<sup>a</sup>, Wagner Ezequiel Risso<sup>a</sup>, Luciano  
Aparecido Panagio<sup>b</sup>, Claudia B R Martinez<sup>a</sup>, Juliana Delatim Simonato<sup>a</sup>.**

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid (PR-445), Km 380, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid (PR-445), Km 380, Londrina, Paraná, Brasil.

Artigo a ser submetido ao periódico Science of the Total Environment –  
<https://www.elsevier.com/journals/science-of-the-total-environment/0048-9697/guide-for-authors>

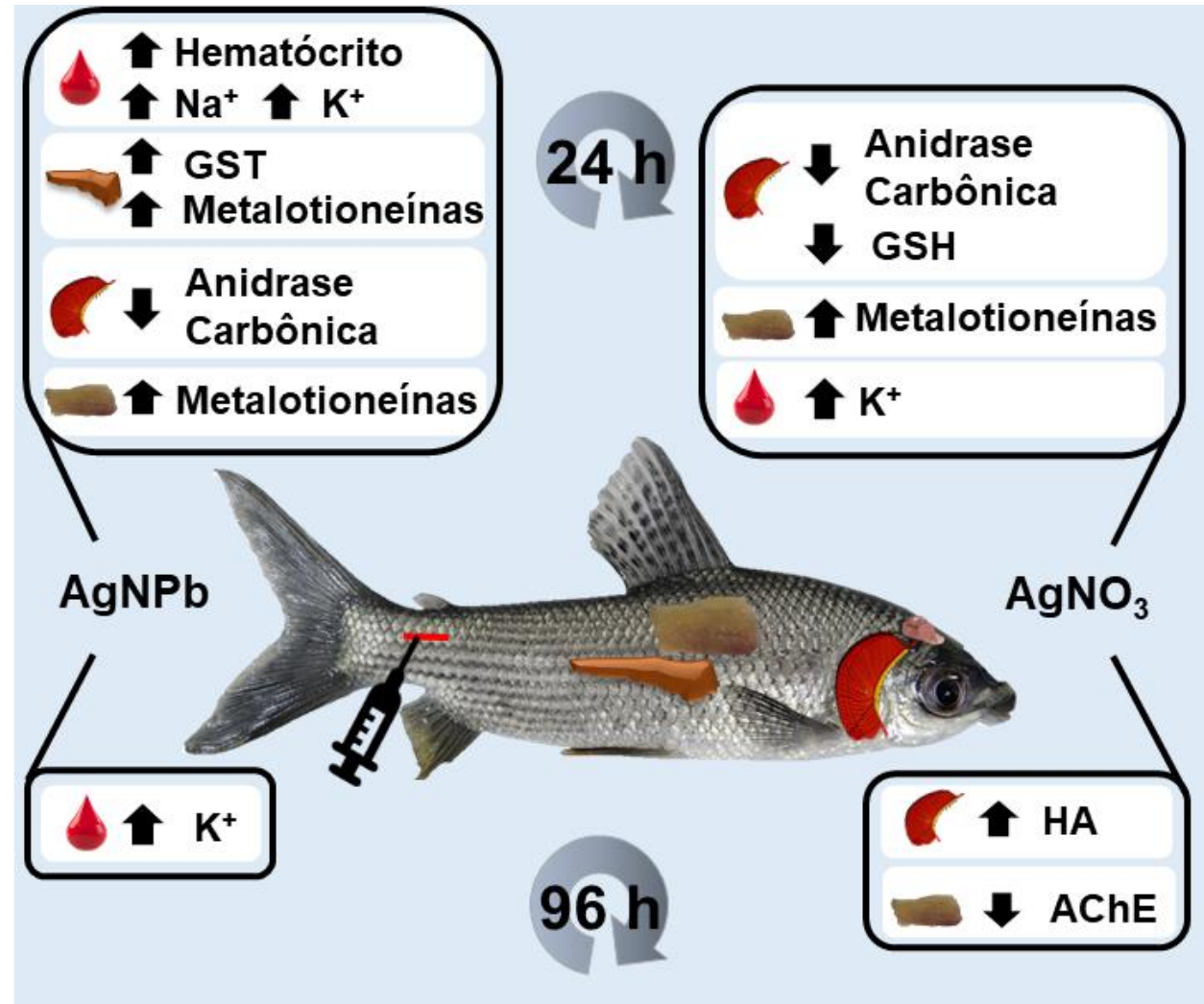
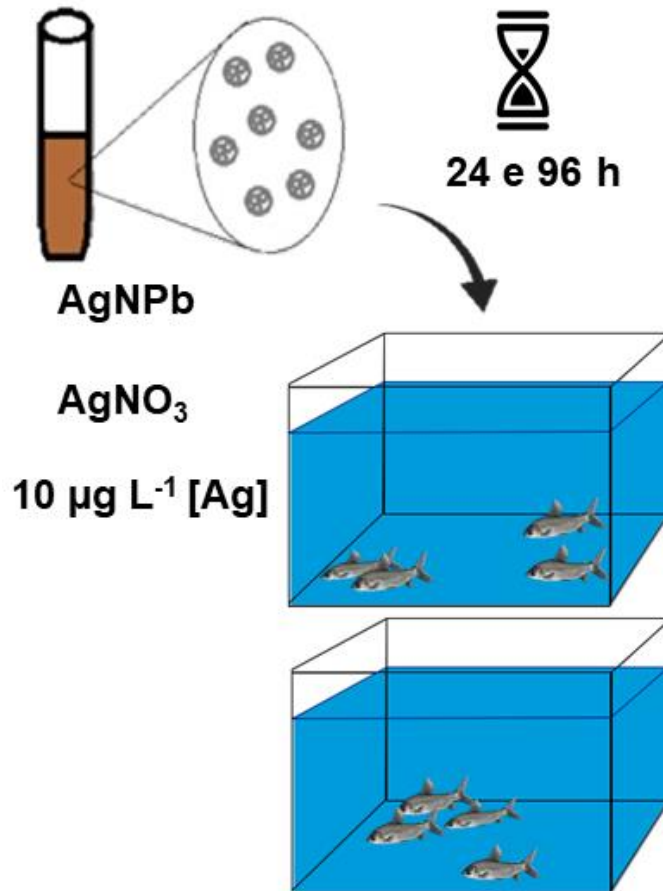
## RESUMO

As nanopartículas de prata (AgNPs) compõem centenas de produtos atualmente, devido ao seu potencial microbicida, que gerou crescente uso e produção desses materiais nos últimos anos. A chegada das AgNPs ao ambiente aquático, pode se dar durante todo seu processo de fabricação, uso e descarte das NPs e de seus produtos, podendo afetar os organismos aquáticos. Diversos efeitos em peixes já foram induzidos por AgNPs sintéticas, porém pouco se sabe do potencial tóxico das AgNPs de fonte biogênica. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar os efeitos da prata nas formas de AgNP biogênica (AgNPb) e iônica ( $\text{AgNO}_3$ ), no teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus*. Exemplares deste peixe foram expostos durante 24 e 96 horas, a concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de prata total. Após exposição foram avaliados o acúmulo de Ag nos tecidos, a indução de metalotioneínas, parâmetros hematológicos, concentração de glicose, proteínas plasmáticas, e dos íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), a atividade das ATPases e anidrase carbônica (AC), molécula e enzimas antioxidantes, danos aos lipídios e atividade da acetilcolinesterase (AChE). A prata bioacumulou em sangue, brânquias, cérebro e no maior tempo de exposição no músculo. A sua presença nos diferentes órgãos desencadeou aumento de metalotioneínas em fígado e músculo, hipercalemia e inibição da AC em ambos os tratamentos. Apenas no grupo exposto a AgNPb foi observado aumento do hematócrito e da atividade da glutatona S-transferase hepática. Já na exposição ao  $\text{AgNO}_3$  foi encontrado a diminuição da concentração de glutatona branquial, e após 96 h o aumento na atividade da  $\text{H}^+$  ATPase e a inibição da AChE muscular. Muitas dessas alterações, em *P. lineatus*, podem estar relacionadas a liberação de íons prata, porém é possível observar efeitos específicos da presença das AgNPb, já que a quantidade de prata dissolvida em ambos grupos se mostraram similares, mas foram encontradas diferentes alterações fisiológicas e bioquímicas entre os grupos.

**Palavras-chave:** Acetilcolinesterase; Bioacumulação; *Fusarium oxysporum*; Hipercalemia;

### Highlights

- O acúmulo de prata se deu em diferentes tecidos do peixe *Prochilodus lineatus*, porém no músculo este acúmulo só foi detectado após 96h nos animais expostos a  $\text{AgNO}_3$ ;
- Os efeitos subletais da AgNPb foi investigado em diferentes tempos de exposição, e grande parte das alterações foram observadas após 24 h e normalizadas após 96 h;
- A Ag causa hipercalemia em *P. lineatus*, e foi observada principalmente nos animais expostos a AgNPb;
- A AgNPb gerou mais alterações bioquímicas e fisiológicas que o  $\text{AgNO}_3$ ;



## 1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas de prata (AgNPs) são destaque no mercado, visto seu potencial microbicida (Valerio-García et al., 2017), elas compõe mais de 500 produtos, segundo a Nanodatabase ([www.nanodb.dk](http://www.nanodb.dk)), entre eles se destacam dispositivos médicos, tecidos, embalagens de alimentos, cosméticos, filtros para tratamento de água, sensores e produtos farmacêuticos em geral (McGillicuddy et al., 2017; Oberholster et al., 2011).

A chegada das AgNPs no ambiente aquático ocorre durante a sua produção, no processo de fabricação, uso, reciclagem e descarte das NPs e de seus produtos (Gottschalk e Nowack, 2011), mas a liberação em maior escala deste contaminante se dá durante o uso. Visto que produtos como meias resistentes ao odor, plásticos antimicrobianos e têxteis, estão sujeitos a lavagem frequente, abrasão mecânica e seu envelhecimento, liberando as AgNPs para o ambiente natural. A quantidade dessas AgNPs liberadas depende da vida útil do produto, a forma de uso, e como a NP está incorporada (Liu e Jiang, 2015). Mesmo assim, a concentração das NPs nos ambientes naturais não são conhecidas, devido à falta de métodos confiáveis para sua quantificação em baixas concentrações (Valerio-García et al., 2017). Desse modo estudos calcularam uma estimativa da concentração existente, e em relação a AgNPs acreditam que esteja em uma faixa de 1,5 a 40 ng L<sup>-1</sup> (Blaser et al., 2008; Sun et al., 2016).

As nanopartículas podem ser produzidas de forma sintética ou biogênica. A produção sintética, é a mais utilizada atualmente e emprega muitas vezes reagentes tóxicos para redução do metal a uma escala nanométrica. Já a biogênica, a redução é feita por meio de microrganismos como bactérias (Quinteros et al., 2019), fungos (Guilger-Casagrande et al., 2019) ou até por meio de extratos de plantas (Velsankar et al., 2020). Em organismos aquáticos, já foram relatados diversos efeitos subletais em peixes por exposições a AgNP sintética, porém pouco se sabe sobre as NPs produzidas de forma biogênica, que pode vir a ser uma alternativa para a indústria e uma forma menos tóxica aos organismos aquáticos, já que não utiliza agentes químicos para redução do metal.

Estudos mostram que a exposição de peixes a AgNPs sintéticas leva a bioacumulação da prata em sangue, brânquias, fígado, cérebro, rim, intestino (Johari et al., 2015), músculo (Sayed et al., 2020) e até mesmo nos ossos (Al-Sid-

Cheikh et al., 2019). Essas NPs induzem o aumento de proteínas metalotioneínas (Martin et al., 2017), acarretam o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), desencadeia estresse oxidativo (Ale et al., 2018a, 2018b), desequilíbrio iônico, lipoperoxidação (Bacchetta et al., 2017; Martin et al., 2017) e neurotoxicidade (Bacchetta et al., 2016). Além disso, estudos já constataram indução à hipóxia, anemia (Ogunsuyi et al., 2019) e hemólise no sangue (Chen et al., 2015).

Embriões de peixes também estão sujeitos a alterações quando expostos a nanopartículas de prata. Estudos com embriões de *Danio rerio* expostos a AgNP evidenciam a distribuição desta nanopartícula no cérebro, coração e sangue dos embriões (Asharani et al., 2008), além de desencadear desequilíbrio iônico e mortalidade (Lee et al., 2019).

O peixe *Prochilodus lineatus* se mostra sensível a diferentes classes de contaminantes (Roda et al., 2020; Andrade et al., 2019; Santos-Silva et al., 2018; Simonato et al., 2016), inclusive as nanopartículas (Tesser et al., 2020). Estudos com este organismo quando exposto a AgNP sintética (2,5 e 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) por 5 e 15 dias mostrou acúmulo de prata em diferentes tecidos (brânquia, fígado, intestino e cérebro), aumento da atividade de enzimas antioxidantes e de biotransformação, alterações no número de eritrócitos e concentração de glicose, além de lipoperoxidação no maior tempo de exposição (Ale et al., 2018a, 2018b).

Na literatura, pouco se encontra sobre estudos que avaliem o potencial tóxico de nanopartículas de prata de origem biogênica. Estudos como o de Sarkar e colaboradores (2014), com o peixe *Danio rerio* mostram uma concentração letal média ( $CL_{50}$ ) de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  do sal  $\text{AgNO}_3$ , 80  $\mu\text{g L}^{-1}$  da AgNP sintética e 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  da AgNP biogênica sintetizadas por meio de extrato de *Psidium guajava*, em 96 h. Essas concentrações mostram uma menor toxicidade da AgNP biogênica, podendo vir a ser uma alternativa menos prejudicial ao ambiente. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a resposta tóxica da AgNP biogênica (AgNPb), produzida por meio do fungo *Fusarium oxysporum*, e do sal nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* por meio de diferentes biomarcadores e tempos experimentais. Perante as hipóteses de que a AgNPb apresente um menor potencial tóxico que o  $\text{AgNO}_3$  e que de acordo com o tempo de exposição as alterações nos biomarcadores sejam diferentes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Meio de Exposição

Os animais foram expostos a meios contendo separadamente AgNPb e AgNO<sub>3</sub> na concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> de prata total, esta concentração está prevista na resolução CONAMA 357 (2005) para águas de Classe I e II. A nanopartícula de prata biogênica utilizada foi produzida pelo Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal da Universidade Estadual de Londrina, por meio do fungo *Fusarium oxysporum*, sendo utilizado uma solução com concentração de 1,197g L<sup>-1</sup> (0,0111 M). Já o nitrato de prata foi adquirido comercialmente (PM 169,87, Avi-cenna, Brasil) e utilizado para preparação de uma solução-mãe de 640 mg de prata total, com água ultrapura. Sendo utilizado volumes apropriados para atingir a concentração determinada.

### 2.2 Desenho Experimental

Juvenis de *P. lineatus* (média ± DP; comprimento total: 18,49 ± 0,20 cm; peso: 65,63 ± 2,30 g; n = 80) foram adquiridos comercialmente de piscicultura regional e transportados para o laboratório de bioensaios, onde foram aclimatados por 7 dias em tanques de 500 L, contendo água desclorada, aeração constante e fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro. Os animais foram alimentados a cada 48 h com ração comercial 36% de proteína, suspensa 24 h antes dos experimentos e os parâmetros físicos e químicos da água foram constantemente monitorados por um medidor multiparâmetro (Horiba U-52, Japão) (temperatura = 22,9 ± 0,9 °C; pH = 8,1 ± 0,8; Oxigênio Dissolvido = 5,8 ± 0,2 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>; condutividade = 117 ± 4 µS cm<sup>-1</sup>; Turbidez = 0,4 ± 0,6 NTU).

Após aclimação os animais foram submetidos a ensaios de toxicidade com período de exposição de 24 h em teste estático e a 96 h semi-estático, isso é, com renovação de 50% da água após 48 h de exposição. Os peixes foram divididos em 3 tratamentos (n = 8): apenas água desclorada (**CTR**); nanopartícula de prata biogênica (**B10**); e nitrato de prata (**N10**). Cada tratamento foi composto por 2 aquários de 50 litros, com 4 animais por aquário, onde foram monitorados os parâmetros da água (temperatura = 24,4 ± 1,0 °C; pH = 8,3 ± 0,2;

Oxigênio Dissolvido =  $6,3 \pm 0,4$  mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>; condutividade =  $120 \pm 10$  μS cm<sup>-1</sup>; Turbidez =  $3,9 \pm 2,9$  NTU), além da concentração de íons (Na<sup>+</sup>  $0,131 \pm 0,003$  mM, K<sup>+</sup>  $0,0197 \pm 0,0019$  mM, Ca<sup>2+</sup>  $0,0973 \pm 0,003$  mM). A dureza nos grupos experimentais ( $29,64 \pm 1,24$  mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) foi determinada pelo método titrimétrico do EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Todos os experimentos realizados foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Londrina (Processo CEUA/UEL 24009.2016.93).

Após o período de exposição os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L<sup>-1</sup>), medidos e pesados para controle biométrico e uma amostra de sangue foi retirada da veia caudal para análise de parâmetros hematológicos e plasmáticos. Em seguida os animais foram mortos por secção medular para retirada dos órgãos: brânquia, fígado, cérebro, músculo e rim, que foram armazenados em ultrafreezer a -70°C até o momento das análises.

### 2.3 Determinação da Prata na Água e nos Tecidos

As concentrações de prata total e dissolvida na água foram medidas no início e final da exposição e entre as renovações da água dos aquários. Para verificação da prata total, a água foi coletada e fixada com ácido nítrico (1% HNO<sub>3</sub>), para determinação da prata dissolvida a água coletada foi filtrada (filtro de 0,45 μm) e igualmente fixada. Todas as amostras foram analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica (AA 700, Perkin Elmet, Estados Unidos) em forno de grafite.

Foram coletadas amostras de sangue, fígado, brânquia, cérebro, músculo e rim para determinação da concentração de prata, os tecidos com exceção do sangue foram lavados com solução salina (PBS Sigma), posteriormente todas as amostras foram armazenadas em tubos criogênicos, previamente lavados com solução de ácido nítrico 10% durante 24h para descontaminação de metais. Todos os tecidos foram secos em estufa e posteriormente submetidos à digestão ácida com ácido nítrico ultrapuro 5 N, em estufa a 60° C por 48h. Após a digestão, a leitura foi feita em espectrofotômetro de absorção atômica com ionização eletrotérmica (AA 700, Perkin Elmet, Estados Unidos) acoplado a forno de grafite.

### 2.4 Parâmetros Hematológicos

A concentração de hemoglobina (Hb) foi realizada através do método colorimétrico de cianometahemoglobina, utilizando kit comercial (Labtest Diagnostica, Brasil), mensurada em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido) a 540 nm e expressa em  $\text{g dL}^{-1}$ . A determinação da porcentagem de células vermelhas, hematócrito (Ht), foi feita através de tubo capilar heparinizado com amostra sanguínea, centrifugado a 1200 g, durante 7 min, em centrífuga de microhematócrito (Luguimac S.R.L., Modelo LC 5, Argentina), e posteriormente lido em cartão próprio. Para a contagem de eritrócitos (RBC) 5  $\mu\text{L}$  de sangue foi adicionado a 1 mL de tampão formol-citrato (130 mM citrato de sódio em formol 0,4%), a contagem ocorreu por meio de câmara de Neubauer em microscópio óptico e o resultado foi expresso em número de células  $\text{mm}^3$ .

## 2.5 Determinação da Concentração de Íons no Plasma e na Água

Os íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) foram quantificados no plasma e na água em fotômetro de chama (DM-62, Digimed, Brasil), o plasma foi diluído (1:100) em água deionizada para leitura. A determinação da concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica (AA 700, Perkin Elmer, Estados Unidos) na chama, o plasma foi diluído (1:50) em água deionizada. O cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) foi quantificado por meio de kit comercial (Quibasa, Brasil), através do método do tiocianato de mercúrio com leitura em espectrofotômetro de placas (Victor  $\text{TM}^3$ , Perkin Elmer, Estados Unidos) em 490 nm. As concentrações dos íons foram expressas em mM.

## 2.6 Concentração de Glicose e Proteínas Plasmáticas

A concentração de glicose foi determinada utilizando um kit comercial colorimétrico (Laborclin, Brasil), com base no método da glicose oxidase, lida em espectrofotômetro (Victor  $\text{TM}^3$ , Perkin Elmer, Estados Unidos) a 505 nm e expressa em  $\text{mg dL}^{-1}$ . A determinação das proteínas totais plasmáticas foi realizado pelo método de Bradford (1976), para isso o plasma foi diluído (1:75) lido em leitora de microplaca (ELX 800, Bio-Tek Instruments, Estados Unidos) a 590 nm, e sua proteína expressa em  $\text{mg mL}^{-1}$ .

## 2.7 Atividade das ATPases e da Anidrase Carbônica Branquial

Para determinação da atividade das ATPases foram utilizados quatro arcos branquiais que foram armazenados em tampão SEI (150 mM Sacarose, 10 mM EDTA, 50 mM Imidazol, pH 7,5). Posteriormente foram homogeneizados (1:5) em tampão SEID (150 mM Sacarose, 10 mM EDTA, 50 mM Imidazol, 2,4 mM Deoxicolato de sódio), e centrifugados (Hettich®, Universal 320R, Reino Unido) por 20 min, a 10.000 g, 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (NKA), H<sup>+</sup> ATPase (HA), Ca<sup>2+</sup> ATPase (CaA) e anidrase carbônica (AC).

A atividade da NKA e HA foi determinada pelo método descrito por Gibbs e Somero (1989), onde a atividade é realizada de forma indireta, pelo declínio da absorvância em virtude da quebra do ATP. As amostras foram mensuradas de forma a conter 1 mg. L<sup>-1</sup> de proteína e posteriormente incubadas em meio de reação (1 mM ATP, 0,2 mM NADH, 3 U mL<sup>-1</sup> piruvato quinase, 2 U mL<sup>-1</sup> lactato desidrogenase, 0,1 mM frutose-1,6-difosfato, 2 mM fosfenolpiruvato, pH 9,0). Para determinar a atividade individual de cada ATPase, parte deste meio de reação não continha inibidores, parte foi adicionado ouabaína (2 mM), inibidor da NKA, e parte N-ethyl-maleimide (NEM, 2 mM), inibidor da HA. A leitura foi realizada durante 15 min, em espectrofotômetro de microplaca (Victor <sup>TM</sup>3, Perkin Elmer, Estados Unidos), a 340 nm. A atividade foi calculada pela diferença da atividade entre os meios contendo ou não inibidor e expressa em μmol ADP h<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>.

A atividade da CaA foi determinada de acordo com o método de Vijayavel e colaboradores (2007), de forma indireta, pela produção do fosfato inorgânico (Pi) proveniente da quebra de ATP durante o intervalo de 20 minutos. As amostras foram incubadas em solução reativa (189 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM ouabaína, pH 7,6), parte desta solução sem ATP, para determinação do Pi basal, e parte com ATP (3 mM), sendo a atividade determinada pela diferença de absorvância entre as amostras com ATP e sem ATP, pela quantificação do Pi liberado usando uma solução de coloração (Ames, 1966) em leitora de microplacas (ELX 800, Bio-Tek Instruments, Estados Unidos) a 620 nm e expressa em μmol Pi min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>.

A determinação da atividade da AC foi realizada de acordo com Vitale et al. (1999), que consiste em analisar a catálise da solução saturada de CO<sub>2</sub>

com correspondente liberação de  $H^+$  e conseqüente decaimento do pH. As amostras foram adicionadas a um tampão de reação (225 mM manitol, 75 mM sacarose, 10 mM tris, 10 mM  $NaH_2PO_4$ , pH 7,4) e água saturada com  $CO_2$ . A atividade catalítica foi mensurada pelo decaimento do pH a cada 4 segundos durante 20 segundos nas amostras, que forneceu a taxa de catalisação (TC), e na ausência de amostra que forneceu a taxa não catalisada (TNC). A atividade da AC foi expressa  $[(TC/TNC)^{-1}] \text{ min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1}$ .

## 2.8 Defesas Antioxidantes, Lipoperoxidação e Enzima de Biotransformação Glutathiona-S-Transferase

Amostras de brânquia e fígado foram pesadas, homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, (1:5 – m/v para as brânquias e 1:10 – m/v para o fígado) e posteriormente centrifugadas (Hettich®, Universal 320R, Reino Unido) a 16000 g, por 20 min a 4°C, sendo o sobrenadante separado e utilizado para as análises bioquímicas e quantificação de proteínas totais.

A concentração do tripeptídeo glutathiona (GSH) foi estimada de acordo com o método de Beutler e colaboradores (1963), através da reação dos grupamentos -SH com o substrato 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB), quantificado em espectrofotômetro (Victor  $TM^3$ , Perkin Elmer, Estados Unidos) a 412 nm e expresso em  $\mu\text{g GSH mg de proteina}^{-1}$ .

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada através da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), onde foi avaliado o decréscimo de absorbância em espectrofotômetro (SpectraMax, Plus 384, Estados Unidos) a 240 nm (Beutler, 1975) e essa atividade foi expressa em  $\mu\text{mol de } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteina}^{-1}$ . A atividade de glutathiona peroxidase (GPx) foi estimada através da oxidação do NADPH na presença de GSH,  $H_2O_2$  e Glutathiona redutase (GR), formando o substrato glutathiona oxidada (GSSG), de acordo com o método de Hopkins e Tudhope (1973). A atividade da GPx foi lida em espectrofotômetro (SpectraMax, Plus 384, Estados Unidos) a 340 nm e expressa em  $\mu\text{mol de NADPH oxidado min}^{-1} \text{ mg de proteina}^{-1}$ .

A atividade da Superóxido dismutase (SOD) foi estimada pela taxa de redução do citocromo *c* inibida pelo ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), de acordo com McCord e Fridovich (1969). A atividade da SOD foi quantificada em

espectrofotômetro (SpectraMax, Plus 384, Estados Unidos) a 550nm, sendo expressa em U de SOD mg proteína<sup>-1</sup>, onde U representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c.

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada por meio do ensaio TBARS, que quantifica o malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica, através da sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Camejo et al., 1998), em espectrofluorímetro de microplacas (Victor <sub>TM</sub><sup>3</sup>, Perkin Elmer, Estados Unidos) excitação 535 nm e emissão 590 nm. A peroxidação lipídica foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de MDA mg de proteína<sup>-1</sup>.

A atividade da glutathione-S-transferase (GST), enzima envolvida no processo de biotransformação, foi determinada pela complexação do tripeptídeo glutathione (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) de acordo com Keen e colaboradores (1976), lida em espectrofotômetro (Victor <sub>TM</sub><sup>3</sup>, Perkin Elmer, Estados Unidos) a 340 nm, por 15 minutos e expressa em nmol CDNB conjugado min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>.

## 2.9 Concentração de metalotioneínas

A concentração de metalotioneínas (MT) em cérebro, músculo e fígado foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Viarengo e colaboradores (1997). Os órgãos foram homogeneizados, individualmente, em tampão (0,5 M sacarose, 26 mM Tris, 0,5 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 1,3 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) e centrifugado por 45 min (18.000 g, 4 °C). O sobrenadante foi suspenso em etanol/clorofórmio para obtenção de uma fração de metaloproteínas parcialmente purificadas. Nesta fração os grupos sulfidril (-SH) foram quantificados em espectrofotômetro a 412 nm. A GSH foi usada como padrão e o conteúdo de metalotioneína foi expresso em  $\mu\text{mol}$  GSH mg de proteína<sup>-1</sup>.

## 2.10 Atividade da Acetilcolinesterase

Amostras de cérebro e músculo foram pesadas, homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, (1:10) e posteriormente centrifugadas (Hettich®, Universal 320R, Reino Unido) a 16000 g, por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) através do método descrito por Ellman et al. (1961) e adaptado por Alves-

Costa et al. (2007) para leitura em espectrofotômetro de microplacas (Victor <sup>TM</sup>3, Perkin Elmer, Estados Unidos) a 415 nm. A quantificação da atividade da AChE foi por meio do produto gerado da degradação do iodeto de acetilcolina que reage com o DTNB formando nitrobenzoato, que foi mensurado em 0, 3 e 6 minutos. A atividade foi expressa em nmol DTNB min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>.

### 2.11 Concentração de Proteínas Totais

A concentração de proteína totais em brânquia, fígado, cérebro e músculo foi realizada para expressão do resultados por meio do método de Bradford (Bradford, 1976) que se baseia na reação das proteínas com o corante Coomassie (Brilliant Blue) G250, utilizando como padrão proteico albumina sérica bovina (BSA) sendo a leitura feita em leitora de microplaca (ELX 800, Bio-Tek Instruments, Estados Unidos) a 590 nm e expressa em mg mL<sup>-1</sup>.

### 2.12 Análise Estatística

Os resultados de cada um dos parâmetros analisados foram comparados entre os diferentes grupos (CTR X B10 X N10) para cada tempo experimental (24 e 96 h). Os dados foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade e em seguida, foram submetidos a uma análise de variância paramétrica (One-Way ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguida de um teste de comparação múltipla (teste de Newman-Keuls ou Dunns), quando indicado. Foram consideradas significativas diferenças cujo  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Concentração de Metais na Água

As concentrações de prata total e dissolvida determinada nas amostras de água coletadas durante as exposições (Tabela 1) se mostraram abaixo da concentração nominal estabelecida ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). As variações entre a concentração nominal e a determinada no tempo inicial (t 0), quando avaliada a concentração de Ag total, foi de aproximadamente 40% menor nos grupos experimentais de 24 h e 30% nos grupos de 96 h. Já em relação a Ag dissolvida, essa variação foi de 70% menor na exposição de 24 h e 60% menor na de 96 h. Também se observou que a concentração de Ag total e dissolvida sofreu alterações em relação ao tempo inicial (t 0) e final (t 24 e t 96). No período de 24 h a Ag total diminuiu aproximadamente 11% no grupo B10 e 13% no N10. Já a Ag dissolvida aumentou 3% no grupo B10 e 8% no N10. Em 96 h a queda da concentração de Ag total foi de 40% nos dois grupos (B10 e N10), mesmo com a renovação de 50% do meio de exposição após 48 h. Em relação a concentração de Ag dissolvida, essa apresentou redução de 12% no grupo B10 e 26% no grupo N10 quando comparado ao t 0. Não foram observadas alterações na coloração da água dos aquário e não ocorreu sedimentação visível da prata.

**Tabela 1** – Concentração de prata ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) nas amostras de água coletadas no início e no final das exposições.

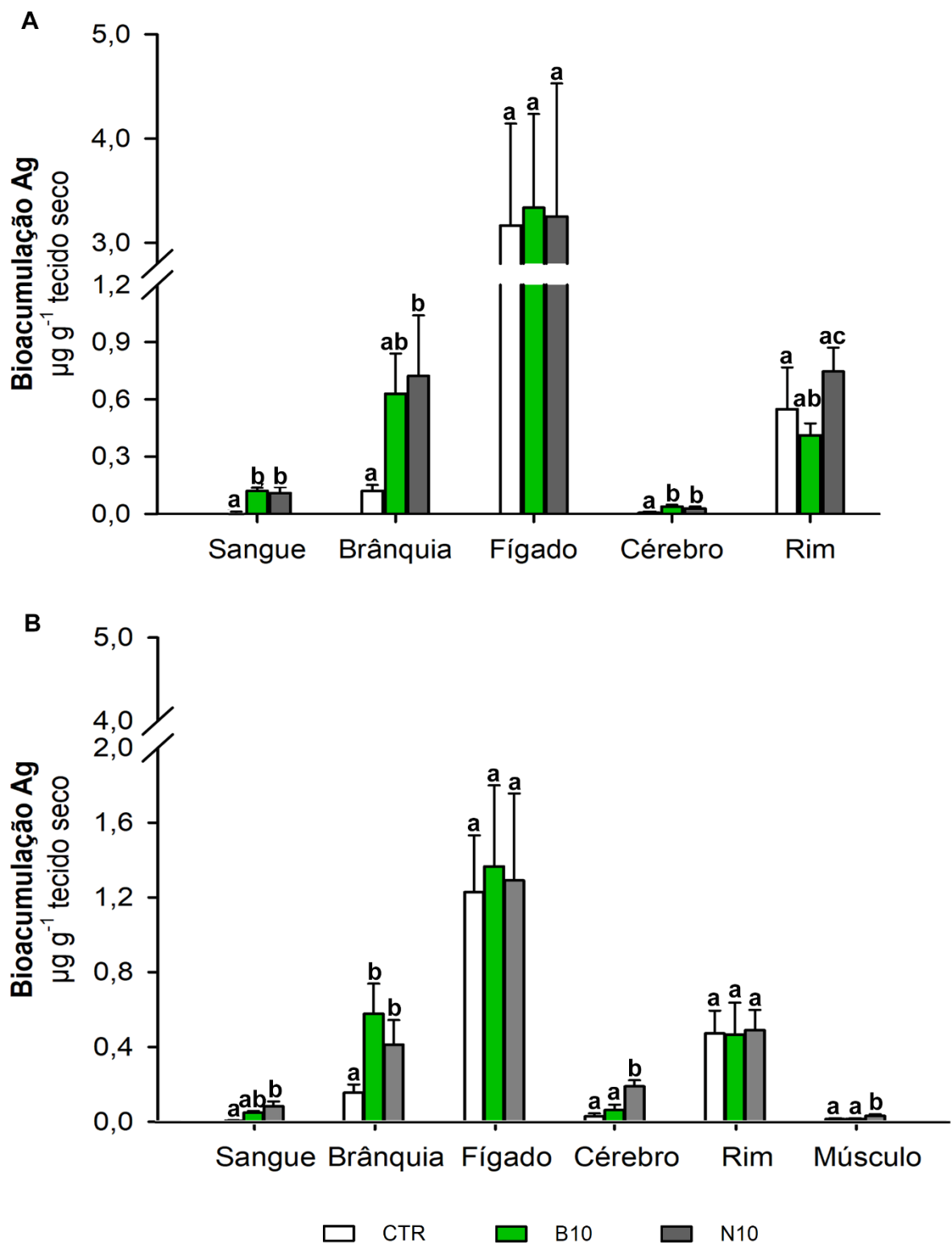
|     |                      | Inicial         |                   | Final           |                 |
|-----|----------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
|     |                      | Ag total        | Ag dissolvida     | Ag total        | Ag dissolvida   |
| 24h | CTR                  | $0,12 \pm 0,07$ | $0,001 \pm 0,002$ | $0,07 \pm 0,1$  | < LD            |
|     | bNPAg 10             | $5,94 \pm 0,04$ | $3,65 \pm 0,04$   | $5,3 \pm 1,18$  | $3,76 \pm 0,58$ |
|     | AgNO <sub>3</sub> 10 | $5,98 \pm 0,36$ | $3,32 \pm 0,08$   | $5,2 \pm 1,44$  | $3,59 \pm 0,18$ |
| 96h | CTR                  | $0,02 \pm 0,03$ | $0,12 \pm 0,02$   | $0,1 \pm 0,06$  | $0,12 \pm 0,02$ |
|     | bNPAg 10             | $7,26 \pm 1,28$ | $4,55 \pm 0,08$   | $4,34 \pm 0,53$ | $3,98 \pm 0,62$ |
|     | AgNO <sub>3</sub> 10 | $7,12 \pm 1,07$ | $4,21 \pm 0,52$   | $4,17 \pm 0,96$ | $3,09 \pm 0,71$ |

Valores de média  $\pm$  desvio padrão (DP). LD: Limite de detecção – Ag:  $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.2 Bioacumulação de Ag e Concentração de Metalotioneínas

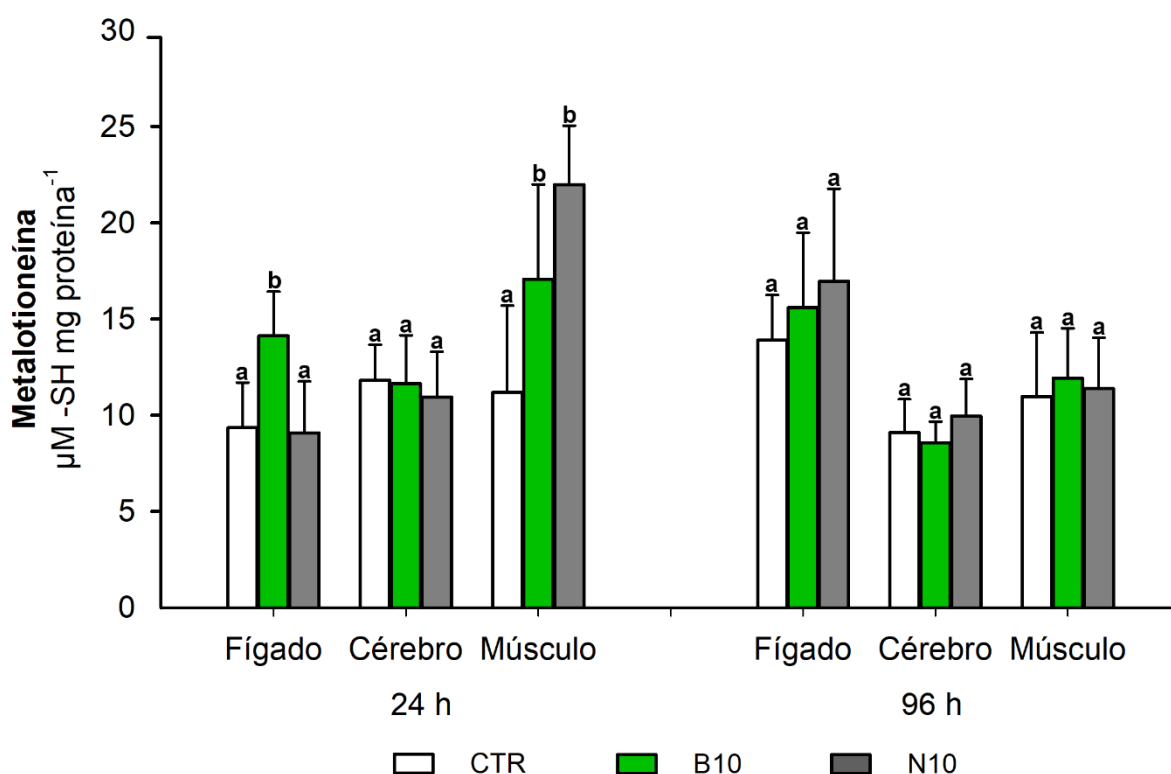
Em ambos períodos de exposição (24 e 96h) houve acúmulo de prata em diferentes tecidos (Fig. 1). Após 24 h de exposição (Fig. 1 A) foi constatado bioacumulação de Ag no sangue, em ambos os tratamentos ( $H = 13,80$ ;  $P < 0,001$ ), nas brânquias no grupo N10 ( $H = 11,34$ ;  $P < 0,003$ ) e no cérebro em todos os grupos experimentais ( $H = 14,05$ ;  $P < 0,001$ ) em relação a seus respectivos controles. O rim e o fígado não apresentaram diferenças significativas da concentração de prata entre os grupos experimentais e o controle. Já o músculo, também foi analisado, porém não foi detectado Ag em nenhum dos grupos (limite de detecção da Ag:  $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ ). As concentrações do metal nos diferentes tecidos seguiram a ordem: brânquias > cérebro > sangue.

Após 96 h (Fig. 1 B), foi detectado bioacumulação de prata no sangue ( $H = 16,19$ ;  $P < 0,001$ ) no grupo N10, nas brânquias ( $H = 16,03$ ;  $P < 0,001$ ) em ambos tratamentos (B10 e N10), no cérebro ( $F = 54,60$ ;  $P < 0,001$ ) e no músculo ( $H = 14,64$ ;  $P < 0,001$ ) no grupo N10. O fígado e o rim também foram analisados, porém não apresentaram bioacumulação de prata significativa nos grupos experimentais em relação ao controle. Assim, as concentrações do metal nos diferentes tecidos seguiram: sangue > cérebro > brânquias > músculo.



**Fig.1:** Bioacumulação de Prata (Ag) (média ± DP, n= 5-8) em sangue, brânquias, fígado, cérebro, músculo e rim de *Prochilodus lineatus* expostos a 10 µg L<sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h (A) e 96 h (B). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p ≤ 0,05) de um mesmo tecido e tempo experimental.

A concentração de proteínas metalotioneínas (Fig. 2), após exposição de 24 h, se mostrou aumentada no fígado ( $F = 7,90$ ;  $P = 0,005$ ) no grupo B10 e no músculo ( $F = 7,92$ ;  $P = 0,006$ ) em ambos tratamentos (B10 e N10), sendo este aumento aproximadamente o dobro no grupo N10 em relação ao controle. Já o cérebro não apresentou diferenças significativas em 24 h. Após exposição de 96 h a concentração de metalotioneínas se mostrou estatisticamente inalterada em fígado, cérebro e músculo.

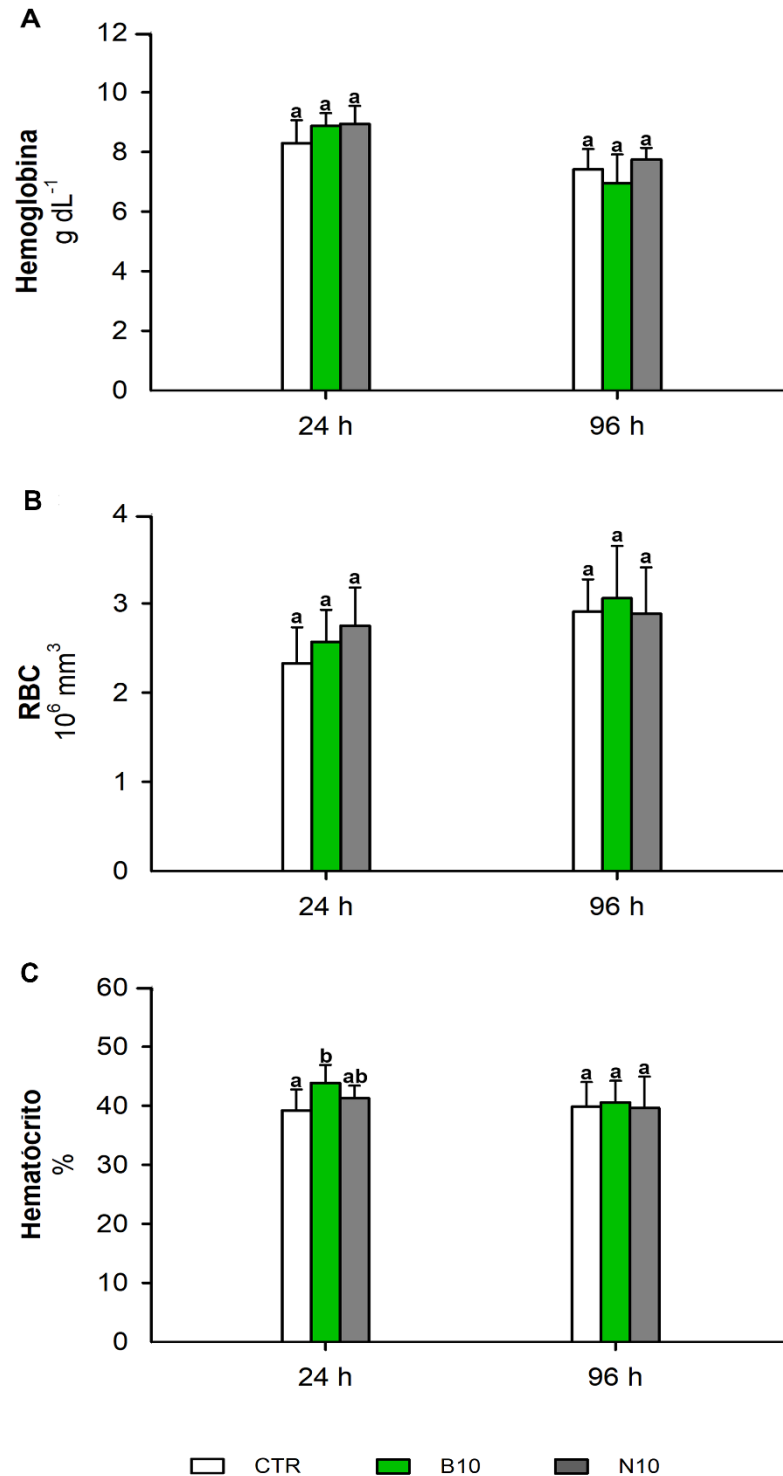


**Fig. 2:** Concentração de metalotioneínas (média  $\pm$  DP,  $n = 5-8$ ) hepática, cerebral e muscular de *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ) de um mesmo tecido e tempo experimental.

### 3.3 Parâmetros Hematológicos

Dentre os parâmetros hematológicos analisados, hemoglobina (Fig. 3 A) e RBC (Fig. 3 B) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais e seus respectivos controles em ambos os tempos de exposição (24 e 96 h). Porém, em relação ao hematócrito (Fig. 3 C) notou-se que após 24 h de exposição, o grupo B10 apresentou um aumento pontual na percentagem de volume

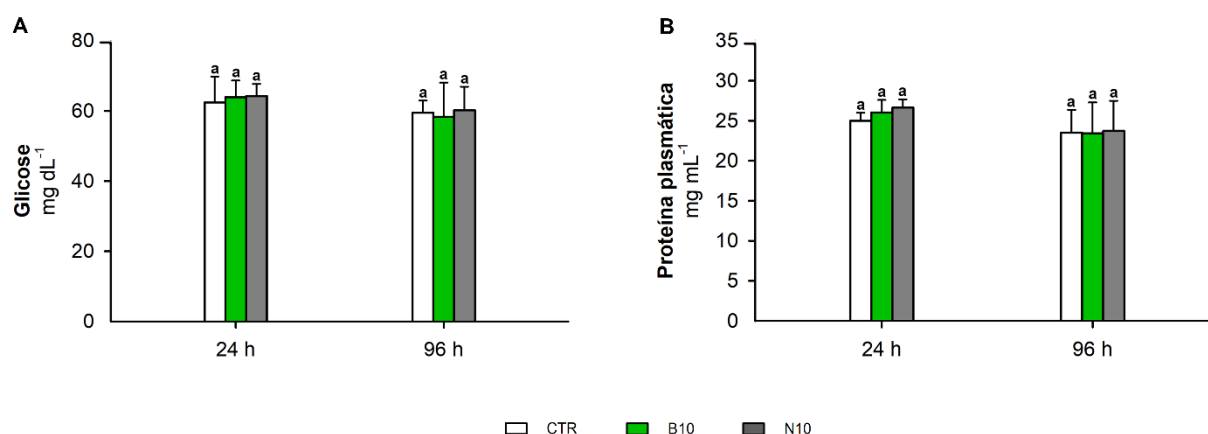
das células ( $F = 4,16$ ;  $P = 0,034$ ), já no período de 96 h os eritrócitos não sofreram alterações.



**Fig. 3:** Concentração de hemoglobina (A), hematócrito (B) e número de eritrócitos (C) (média ± DP, n= 7-8) de *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ) de um mesmo tempo experimental.

### 3.4 Concentração de Glicose e Proteínas Plasmáticas

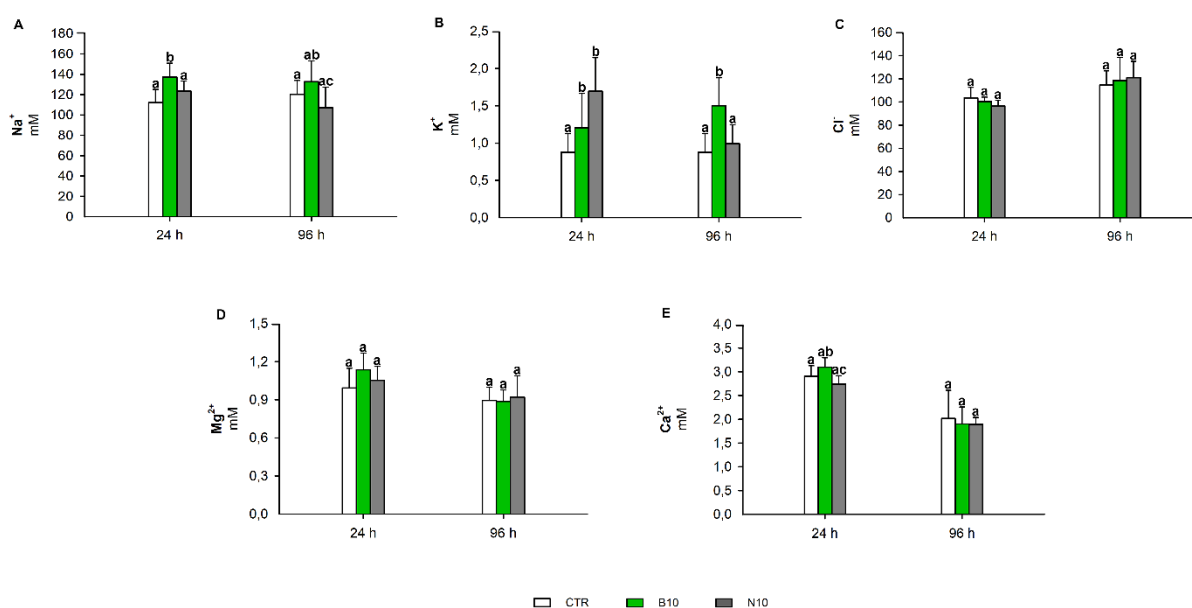
As concentrações plasmáticas de glicose (Fig. 4 A) e proteínas totais (Fig. 4 B) não apresentaram alterações significativas entre os grupos experimentais em relação ao seus respectivos controles, assim como nos períodos de exposição (24 e 96 h).



**Fig. 4:** Concentração de glicose (A) e proteínas totais (B) mensuradas no plasma (média  $\pm$  DP, n= 7-8) de *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ) de um mesmo tempo experimental.

### 3.5 Concentração Plasmática de Íons

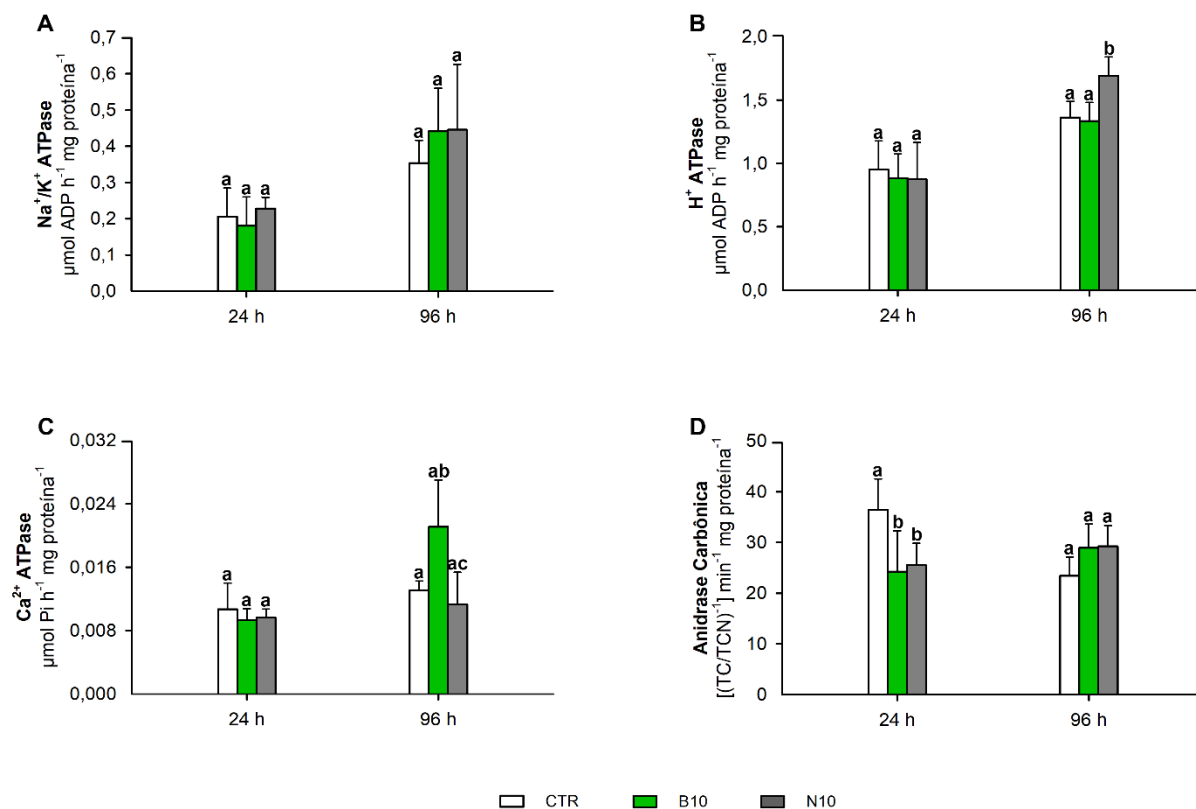
A concentração plasmática de  $\text{Na}^+$  aumentou ( $F = 8,18$ ;  $P = 0,002$ ) no grupo B10 em relação ao controle no tempo de exposição de 24 h (Fig. 5 A), porém em 96 h não houve alterações significativas entre os grupos. O  $\text{K}^+$  (Fig. 5 B) apresentou aumento ( $F = 7,87$ ;  $P = 0,003$ ) de 37% no grupo B10 e de 93% no N10 em 24h. Já em 96 h, o aumento se manteve apenas no grupo B10 sendo de 71% ( $F = 9,53$ ;  $P = 0,001$ ). O cloreto (Fig. 5 C), o magnésio (Fig. 5 D) e o cálcio (Fig. 5 E) mensurados não apresentaram diferenças significativas em ambos os tempos experimentais (24 h e 96 h) nem entre os tratamentos e seus respectivos controles.



**Fig. 5:** Concentrações plasmáticas dos íons (média ± DP, n = 7-8) Na<sup>+</sup> (A), K<sup>+</sup> (B), Cl<sup>-</sup> (C), Mg<sup>2+</sup> (D) e Ca<sup>2+</sup> (E) de *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p ≤ 0,05) de um mesmo tempo experimental.

### 3.6 Atividade das ATPases e da Anidrase Carbônica

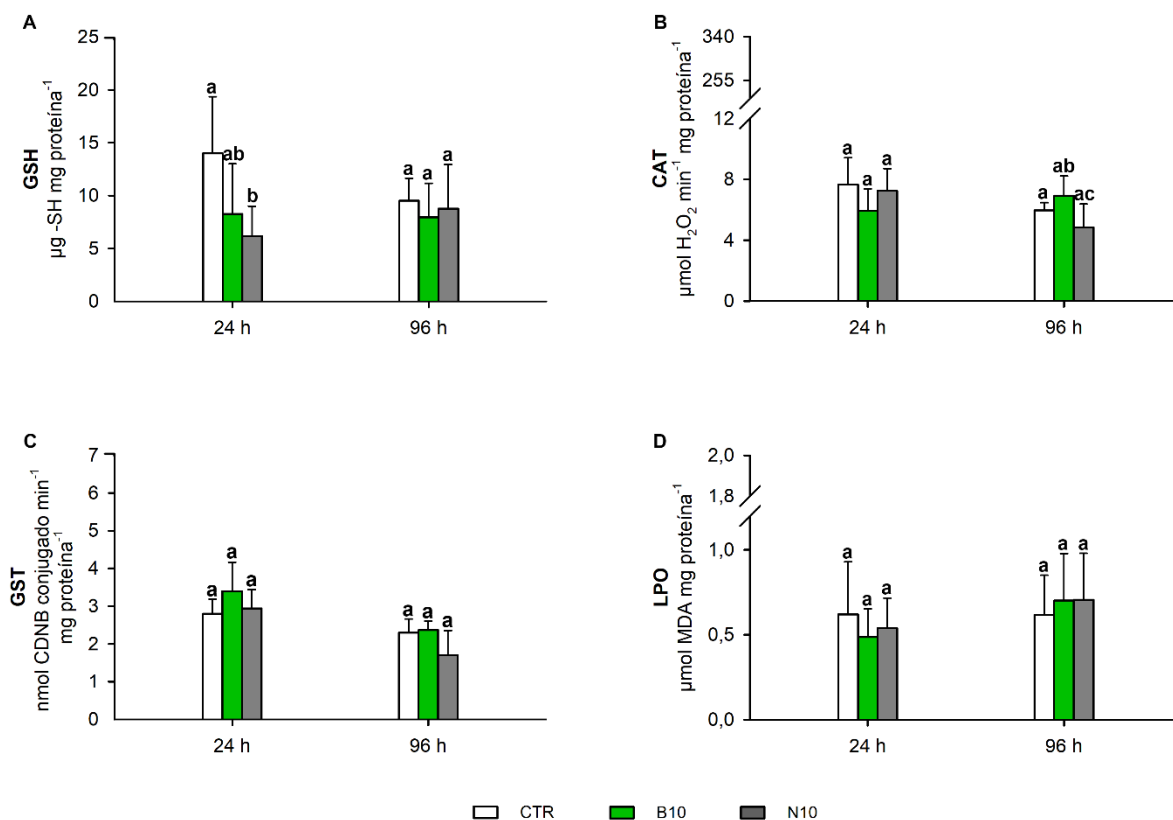
A atividade da NKA (Fig. 6 A) e da CaA (Fig. 6 C) não apresentaram alterações após ambos períodos de exposição (24 e 96 h), porém a atividade da HA (Fig. 6 B) se mostrou aumentada entorno de 24% (F = 10,57; P = 0,002) no grupo N10 após o tempo de 96 h de exposição. Já em relação à anidrase carbônica (Fig 6 D), sua atividade se apresentou reduzida (F = 6,71; P = 0,009) nos grupos B10 e N10 em relação ao controle após 24 h de exposição, porém em 96 h não foram observadas alterações.



**Fig. 6:** Atividade enzimática branquial (média  $\pm$  DP,  $n = 5-8$ ) da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (A),  $\text{H}^+$  ATPase (B),  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (C) e anidrase carbônica (D) de *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ) de um mesmo tempo experimental.

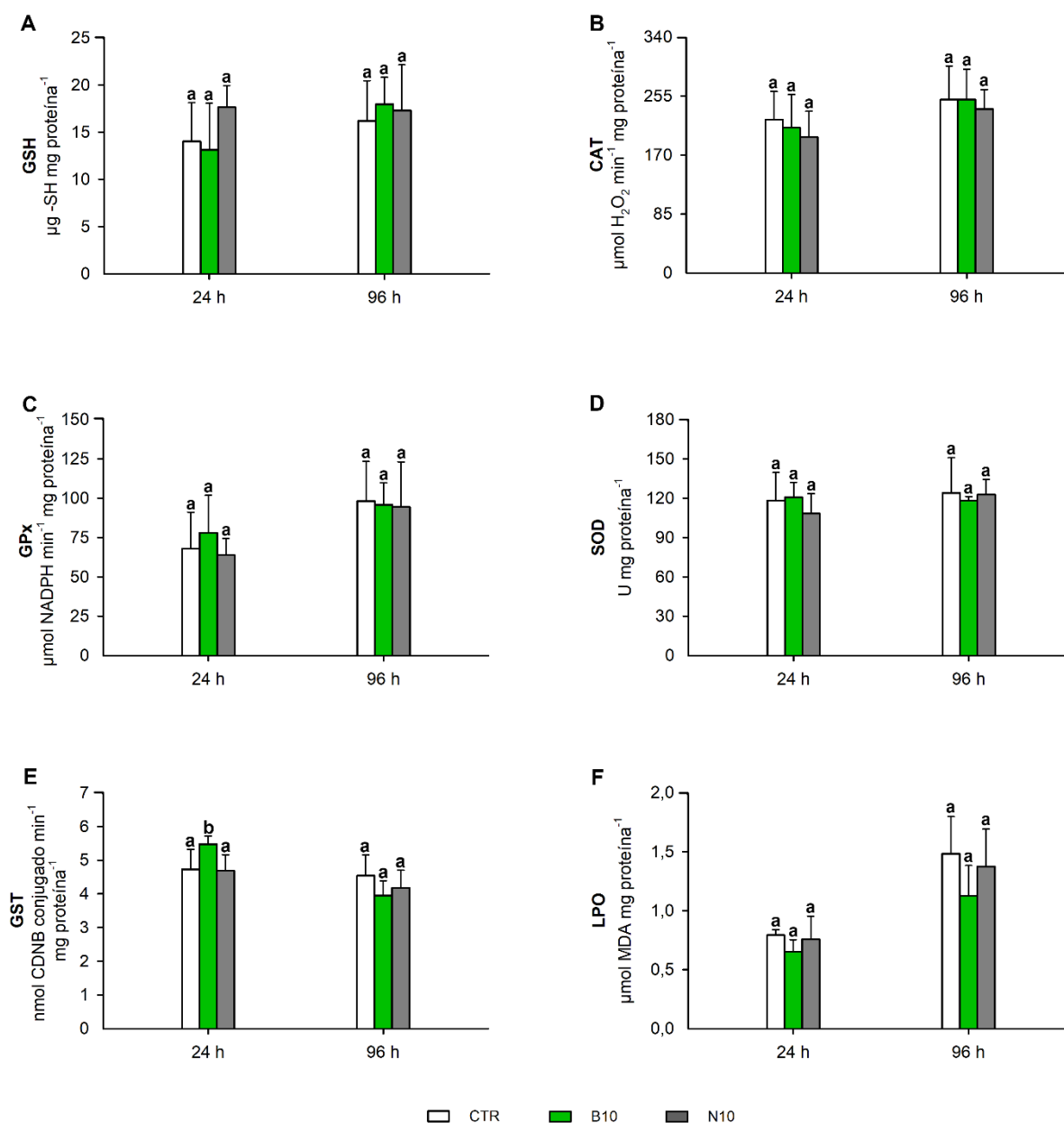
### 3.7 Defesas Antioxidantes, Lipoperoxidação e Enzima de Biotransformação Glutationa S-Transferase

Nas brânquias a concentração de GSH (Fig. 7 A) diminuiu significativamente apenas no grupo N10 ( $F = 4,61$ ;  $P = 0,031$ ) após 24 h, sendo esta redução de aproximadamente 40%, já em 96 h sua concentração se mostrou inalterada. A atividade das enzimas CAT (Fig 7 B) e GST (Fig. 7 C) não sofreram alterações em nenhum grupo ou tempo experimental, assim como a ocorrência de lipoperoxidação (Fig. 7 D).



**Fig. 7:** Concentração branquial (média ± DP, n= 6-8) de GSH (A), atividade da enzima antioxidante CAT (B), enzima de biotransformação GST (C) e lipoperoxidação (D) em *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p ≤ 0,05) de um mesmo tempo experimental.

No fígado, a concentração de GSH (Fig. 8 A) e a atividade das enzimas CAT (Fig. 8 B), GPx (Fig. 8 C) e SOD (Fig. 8 D) não apresentaram alterações em relação ao controle nos diferentes grupos e tempos de exposição. Já a enzima GST (Fig. 8 E) apresentou aumento (F = 5,68; P < 0,014) de 15% no grupo B10 após 24 h de exposição, e em 96 h não houve alterações. Além disso, em ambos os períodos de exposição (24 e 96 h) não foi constatado lipoperoxidação no fígado (Fig. 8 F).

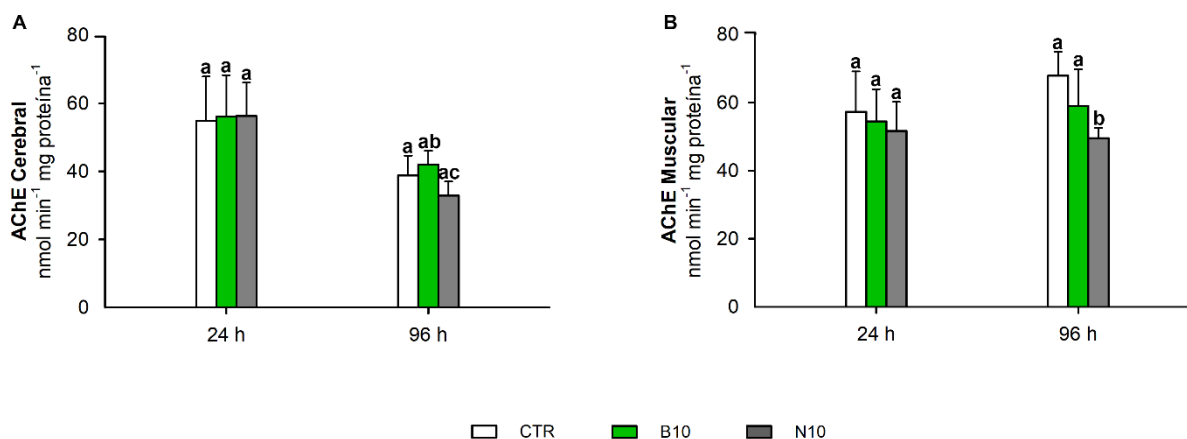


**Fig. 8:** Concentração hepática (média  $\pm$  DP, n= 6-8) de GSH (A), atividade das enzimas antioxidantes CAT (B), GPx (C), SOD (D), enzima de biotransformação GST (E) e lipoperoxidação (F) em *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ) de um mesmo tempo experimental.

### 3.8 Atividade da Acetilcolinesterase

A atividade da enzima AChE foi analisada no cérebro (Fig. 9 A) e no músculo (Fig. 9 B). No cérebro, a variação de sua atividade não se mostrou significativamente alterada entre os tratamentos e tempos testados. No músculo, após 24 h de exposição também não houve alterações, porém após 96 h a atividade

da AChE se mostrou inibida ( $F = 9,86$ ;  $P = 0,002$ ) no grupo N10 quando comparado ao controle.



**Fig. 9:** Atividade enzimática da acetilcolinesterase (média  $\pm$  DP,  $n = 7-8$ ) cerebral (A) e muscular (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ag (B10 e N10) ou água (CTR) por 24 h e 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ) de um mesmo tempo experimental.

**Tabela 2** - Alterações significativas em biomarcadores de *P. lineatus* expostos a concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ag, em sua forma de nanopartícula biogênica e nitrato de prata, por 24 e 96 h.

|      |                 | 24 h |     | 96 h |     |
|------|-----------------|------|-----|------|-----|
|      |                 | B10  | N10 | B10  | N10 |
| [Ag] | Sangue          | ↑    | ↑   | =    | ↑   |
|      | Brânquia        | =    | ↑   | ↑    | ↑   |
|      | Cérebro         | ↑    | ↑   | =    | ↑   |
|      | Músculo         | =    | =   | =    | ↑   |
| MT   | Fígado          | ↑    | =   | =    | =   |
|      | Músculo         | ↑    | ↑   | =    | =   |
|      | Ht              | ↑    | =   | =    | =   |
|      | Na <sup>+</sup> | ↑    | =   | =    | =   |
|      | K <sup>+</sup>  | ↑    | ↑   | ↑    | =   |
|      | HA              | =    | =   | =    | ↑   |
|      | AC              | ↓    | ↓   | =    | =   |
|      | GSH branquial   | =    | ↓   | =    | =   |
|      | GST hepática    | ↑    | =   | =    | =   |
|      | AChE muscular   | =    | =   | =    | ↓   |

As setas indicam aumento ou diminuição significativa nos biomarcadores.

## 4 DISCUSSÃO

Ambas as formas de Ag, nanoparticulada (AgNPb) e a iônica, por meio do AgNO<sub>3</sub>, desencadearam alterações no peixe *Prochilodus lineatus*. Dentre essas alterações o acúmulo de Ag nos tecidos, o aumento de metalotioneínas, as alterações iônicas e a inibição da enzima AC se mostraram marcantes e evidenciaram o potencial tóxico da AgNP de origem biogênica. Grande parte dessas alterações foram encontradas apenas após o período de 24 h de exposição, porém depois de 96 h foi observado o acúmulo de Ag no músculo, aumento na concentração de metalotioneínas e a inibição da enzima AChE no grupo N10 neste órgão. O tempo experimental se mostra relevante, visto que o organismo logo nas primeiras horas de exposição já desencadeia alterações em níveis celulares e moleculares, muitas dessas normalizadas após 96 h.

Durante os tempos experimentais, as concentrações de prata nos meios de exposição, foram de 30-40% menores do que o valor nominal em relação a prata total e de 60-70% menor em relação a prata dissolvida. A redução na concentração nominal esperada já foi relatada em outros trabalhos com exposições a Ag e AgNP (Griffitt et al., 2013; Hawkins et al., 2015). Ela pode estar relacionada a baixa estabilidade da Ag e alta especiação quando livre (Ag<sup>+</sup>), isso é, facilmente ela se complexa a outras moléculas (Hogstrand e Wood, 1998), o que facilita sua agregação e sedimentação.

Em relação a concentração de Ag observada quando comparado o início e final das exposições, o aumento da prata dissolvida após 24 h pode decorrer da dissolução do AgNO<sub>3</sub> no meio aquoso assim como das AgNPs (Furtado et al., 2016). Já a diminuição da Ag total nos períodos experimentais pode indicar tanto a aglomeração e sedimentação da Ag ao longo do tempo, quanto a absorção dos animais ali expostos, visto que a forma iônica possui alta reatividade, e é a forma de fácil absorção pelos animais (Doleželová et al., 2008).

Em exposições de Ag via água, a bioacumulação em peixe se mostra frequente em brânquias, fígado e rim (Al-Sid-Cheikh et al., 2019; Lacave et al., 2018). Neste estudo, a prata foi encontrada em brânquias, sangue, cérebro, e no período mais longo de exposição no músculo. Assim, o acúmulo de Ag nos tecidos ajudam a traçar o caminho do metal no organismo teste e diagnosticar os órgãos mais afetados.

A concentração de Ag nas brânquias se mostrou similar em relação as formas (AgNPb e AgNO<sub>3</sub>) após 96 h, porém em 24 h este acúmulo só ocorreu no grupo N10. Sabe-se que as brânquias são interfaces importantes, devido à sua grande superfície, que proporciona interação direta com os compostos presentes na água (Yue et al., 2017). Quando em contato com a Ag<sup>+</sup>, esta é facilmente absorvida por meio de canais de sódio ou transportadores de cobre (Wood et al., 2011a). Já as AgNPs se mostram grandes para usarem transportadores de íons ou vias de difusão paracelular, porém podem se aderir as brânquias e entrar por meio das vias endocíticas (Shaw e Handy, 2011; Yue et al., 2017), essa internalização se mostra mais demorada.

O acúmulo de Ag nas brânquias já foi observado em diferentes espécies, concentrações e tempos experimentais. No estudo de Farmen et al. (2012), o peixe *Salmo salar* bioacumulou Ag nas brânquias quando exposto ao AgNO<sub>3</sub> na concentração de 20 µg L<sup>-1</sup> e a AgNP sintética nas concentrações de 20 e 100 µg L<sup>-1</sup> em exposições de 48 h. Já o peixe *Danio rerio*, apresentou acúmulo neste órgão quando exposto a AgNP por 24 h nas concentrações de 50 e 100 µg L<sup>-1</sup> (Bacchetta et al., 2016), e também em exposições a 5, 15, 25 e 50 µg L<sup>-1</sup> por 7, 14, 21 e 28 dias (Griffitt et al., 2013). *P. lineatus* quando exposto a AgNP sintética nas concentrações de 2,5 e 25 µg L<sup>-1</sup> apresentou acúmulo de Ag nas brânquias em ambas as concentrações após 5 dias de exposição e na maior concentração após 15 dias (Ale et al., 2018a). Estes resultados demonstram a sensibilidade das brânquias frente a exposições a Ag, sendo uma importante via de entrada de metais e outros compostos.

O tecido branquial de um peixe constitui um órgão multifuncional que atua na respiração, regulação de íons, regulação do equilíbrio ácido-base e excreção de resíduos nitrogenados (Atli e Canli, 2011). A entrada e acúmulo da metais neste órgão, pode acarretar em inibição das ATPases comprometendo a captação de íons, além de alterar o equilíbrio ácido-base (Silva e Martinez, 2014).

Um efeito muito bem documentado da Ag é a inibição da atividade da NKA, onde a Ag<sup>+</sup> ocupa o local de ligação do Mg<sup>2+</sup>, impossibilitando o funcionamento da enzima (Wood et al., 1999). Essa inibição da NKA é também relatada em exposições a AgNP (Griffitt et al., 2009; Farmen et al., 2012; Xiang et al., 2020). Em um estudo imunohistoquímico foi observado a diminuição da imunorreatividade da NKA após exposição de 96 h a dois tipos de AgNP sintética

(Hawkins et al., 2015). Porém, a inibição desta bomba não se mostrou alterada neste trabalho, foi encontrado apenas um aumento da atividade da HA após exposição 96 h a  $\text{AgNO}_3$ .

A HA ou bomba de próton, é uma proteína de membrana que efetua o transporte ativo de  $\text{H}^+$  através da membrana celular ou mitocondrial contra seu gradiente de concentração. Ela está envolvida no balanço iônico intracelular, na força motriz para importação de íons, além de sua atividade auxiliar no equilíbrio ácido-base (Nelson e Cox, 2014). O aumento de sua atividade pode decorrer da manutenção do balanço iônico após a entrada de  $\text{Ag}^+$  nas células branquiais, ou até mesmo ser um mecanismo envolvido na homeostase de  $\text{K}^+$ , visto que no grupo e período experimental em que houve aumento da atividade da  $\text{H}^+$  ATPase o potássio não se mostrou elevado no plasma. Estudo com *Cyprinus carpio* exposto a Cu e Cd, apresentou comprometimento da homeostase de  $\text{Na}^+$  e conseqüentemente do  $\text{K}^+$ , sendo um caminho de manutenção iônica o aumento da expressão da  $\text{H}^+$  ATPase (Castaldo et al., 2020).

Outra enzima fundamental para a manutenção do equilíbrio ácido-base é a AC, ela catalisa reversivelmente a formação de ácido carbônico que rapidamente se dissocia nos íons hidrogênio e bicarbonato que atuam como contra-íons na captura de elementos fundamentais da célula. Estudos com metais mostram o seu potencial inibitório em relação a AC de forma competitiva, pela ligação de metais ao sítio ativo da enzima, ou de forma não competitiva, pela ligação de metais a outros sítios de ligação da enzima (Lionetto et al., 2016).

Neste estudo, após 24h de exposição, a  $\text{Ag}^+$  desecadeou a inibição da AC em ambos os tratamentos. Já foi relatado na literatura sua inibição por meio de exposições a  $\text{Ag}^+$  relacionando-a como um possível metal deslocador do cofator  $\text{Zn}^{2+}$  (Wood et al., 1999), gerando um efeito inibitório competitivo, mas outra possibilidade seria a ligação da  $\text{Ag}^+$  a outros sítios de ligação da enzima AC (efeito inibitório não competitivo). No estudo de Kaya et al. (2015), a AC foi purificada de brânquias de *Sparus aurata* e os metais avaliados foram  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Ag}^+$ , dentre eles o que exerceu maior efeito inibitório não competitivo na enzima foi  $\text{Ag}^+$  ( $\text{Ag}^+ > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ ).

Os íons metálicos apresentam grande interação com moléculas que possuem grupamentos sulfidríla (-SH), podendo causar sua depleção (Atli e Canli, 2011). Uma molécula de grande interação com estes íons é a GSH, um tiol não

proteico, que atua na defesa antioxidante celular de forma direta ou como co-fator enzimático, além de auxiliar na desintoxicação de xenobióticos e seus metabólitos (Balendiran et al., 2004; Lu, 2013). A exposição ao  $\text{AgNO}_3$  levou a redução da concentração branquial de GSH em *P. lineatus*, após 24 h, sendo esta redução possivelmente ocasionada pela interação da  $\text{Ag}^+$  com essas moléculas ou pela produção de ERO, ambas desencadeando a oxidação da GSH (Balendiran et al., 2004).

Em um trabalho com sangue humano, foi avaliado o efeito do  $\text{AgNO}_3$  para o tripeptídeo GSH e observou que a Ag desencadeia a oxidação dessa molécula de forma direta de acordo com a concentração e tempo de exposição (Khan et al., 2011). Já em um estudo com cultura de células expostas a AgNP a diminuição da GSH foi relacionada ao aumento de ERO, visto que foi encontrado alterações no funcionamento de enzimas antioxidantes e lipoperoxidação (Arora et al., 2008). Neste estudo, esta redução se mostrou pontual, não sendo observada em outro tempo experimental nem na exposição a AgNPb. Sabe-se que em 24h não foi detectado acúmulo de Ag nas brânquias no grupo exposto a AgNPb, e a renovação da GSH citosólica ocorre entre horas, podendo se apresentar normalizada após 96 h de exposição.

Após a interiorização das diferentes formas de Ag pelo tecido branquial, este metal facilmente atinge à corrente sanguínea, devido sua grande perfusão (Di Giulio e Hinton, 2008). Alterações nos parâmetros hematológicos e concentrações de íons plasmáticos são desencadeados pela presença de diversos metais (Chalasan et al., 2020; Shabrangharehdasht et al., 2020; Tesser et al., 2020). Neste estudo, foi observado aumento de hematócrito nos animais expostos a AgNPb, além de aumento do  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  plasmático.

Trabalhos que avaliaram a exposição de *Oncorhynchus mykiss* a AgNP relacionaram o aumento do hematócrito, junto a alteração de outros parâmetros hematológicos, a uma maior demanda de oxigênio causada por trocas gasosas prejudicada, oriundas do acúmulo e lesões branquiais (Shabrangharehdasht et al., 2020) e devido a alterações iônicas plasmáticas (Clark et al., 2018). Neste estudo, não há indícios que a AgNPb tenha causado hipóxia em *P. lineatus*, visto que outros parâmetros, como RBC e concentração de Hb, não se mostraram alterados e normalmente sofrem aumento em casos de hipóxia. Porém, foram observadas alterações iônicas, que podem desencadear alterações na

osmolaridade extracelular e gerar inchaço osmótico nos eritrócitos causando o aumento do Ht (Clark et al., 2018).

O aumento de  $\text{Na}^+$  plasmático em 24 h no grupo exposto a AgNPb contraria estudos realizados com exposição a  $\text{Ag}^+$  e AgNP, pois muitos trabalhos relatam a diminuição do  $\text{Na}^+$  ocasionada pela Ag (Clark et al., 2018; Lee et al., 2019; Schultz et al., 2012), visto que uma via de entrada desse metal se dá por meio de canais  $\text{Na}^+$  (Wood et al., 2011b) e este metal muitas vezes inibe a atividade da NKA (Xiang et al., 2020). Assim, esse aumento na concentração pode ter ocorrido de forma pontual e transitória em decorrência da presença da Ag.

O  $\text{K}^+$  auxilia na transmissão de impulsos nervosos para contração muscular, na manutenção do volume celular, e está presente em maior concentração no interior das células. O aumento de  $\text{K}^+$  plasmático sugere hemólise, porém não foi observado diminuição no número de eritrócitos e hematócrito, assim esta alteração pode ter ocorrido devido a uma interferência na permeabilidade da membrana, visto que a  $\text{Ag}^+$  pode apresenta esta característica (Chen et al., 2015). Estudo com eritrócitos humanos também relatou esta hipercalemia após exposição a AgNPs, decorrente de sua entrada ou interação com os eritrócitos, desencadeando possíveis alterações na permeabilidade da membrana (Adragna et al., 2019). Porém, os mecanismos usados pelas NPs para esta interferência na permeabilidade dos eritrócitos ainda não foram elucidados.

Outra possibilidade é o efeito do pH, tanto intra quanto extracelular, sobre os canais de  $\text{K}^+$ . Um estudo de Peña-Münzenmayer et al. (2014), avaliou que o aumento  $\text{CO}_2$  modifica o pH e induz alterações em alguns tipos de canais de  $\text{K}^+$ . No presente estudo, foi observada a inibição da AC, esta enzima catalisa a conversão de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e água em ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), que facilmente se dissocia em íons  $\text{H}^+$  e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), moléculas importantes para manutenção do equilíbrio ácido-base, assim sua inibição pode ocasionar variações no pH e acarretar em aumento do potássio plasmático.

A  $\text{Ag}^+$  e as AgNPs quando no sangue são distribuídas a diferentes tecidos do organismo, principalmente ao fígado que possui alta atividade metabólica e grande concentração de enzimas e outras moléculas relacionadas a eliminação de contaminantes (Çoğun et al., 2006). No presente estudo, a bioacumulação da Ag no fígado não foi observada, porém o trabalho de Ale e colaboradores (2018b), utilizando o mesmo organismo teste nas concentrações de 5 e 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ , mas em

maiores tempos de exposição detectou baixo acúmulo mesmo após 5 dias e alta bioacumulação somente após 15 dias em exposição a  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  de NPAg sintética. Outro trabalho também observou acúmulo no fígado de *Cyprinus carpio* após exposição à AgNP sintética e ao nitrato de prata após 21 dias (Khosravi-Katuli et al., 2018). Assim, os tempos de 24 h e 96 h de exposição a AgNPb se mostraram pequenos para detectar o acúmulo neste órgão.

As metalotioneínas são proteínas com baixo peso molecular e alto teor de sulfidril, que atua principalmente na homeostase dos metais essenciais, porém em contaminações por metais não essenciais elas podem realizar a neutralização destes e atuar na defesa antioxidante (Mao et al., 2012; Van der Oost et al., 2003). Foi observado no fígado o aumento de sua concentração após exposição AgNPb por 24 h, mesmo não ocorrendo bioacumulação de Ag significativa neste órgão. Em estudo na bacia hidrográfica do Rio Reedy (Estados Unidos), foi observado o aumento da concentração desta enzima em *Micropterus salmoides* em um ponto onde não ocorreu concentração elevada de nenhum metal, considerando o local de referência utilizado (Otter et al., 2012). Assim, essa alteração pode ser atribuída a outros fatores já levantados em outros estudos, como o aumento de hormônios glicocorticóides e peptídeos (Moltó et al., 2005; Van der Oost et al., 2003).

A excreção de metais não ocorre por meio da via de biotransformação de xenobióticos, mas a entrada da Ag e sua reatividade pode gerar metabólitos a serem excretados por essa via. Uma enzima que participa desse processo é a GST, que catalisa a conjugação da GSH a uma ampla variedade de compostos eletrofílicos endógenos e exógenos, incluindo a estabilização de moléculas oxidantes, além de poder se ligar a metabólitos e funcionar como proteínas de transporte (Chae et al., 2009). O aumento de sua atividade pode decorrer da interação das AgNPs com biomoléculas gerando composto a serem biotransformados para sua excreção. Trabalhos com AgNP sintética mostram este aumento na atividade da GST após 15 dias de exposição a  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  em *P. lineatus* (Ale et al., 2018b) e após 96 h a  $50, 100$  e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  em *Cyprinus carpio* (Lee et al., 2012). Outras nanopartículas também aumentam a atividade desta enzima, como na exposição de *Pangasianodon hypophthalmus* a ZnNP biogênica em exposição a  $20, 24$  e  $30 \text{ mg L}^{-1}$  por 96 h (Kumar et al., 2020) e *P. lineatus* quando exposto a  $\text{TiO}_2\text{NP}$  por 14 dias (Carmo et al., 2019).

Os metais, na forma iônica, podem ser responsáveis pelo impacto biológico direto, mas sabe-se que as NPs realizam o transporte do metal para as células e órgãos e com isso, pode aumentar localmente as concentrações de íons metálicos (Lead et al., 2018), já que elas atuam como “veículo de entrega” para estes íons, isso é, elas transportam o metal até diversos órgãos e ali há a liberação dos íons metálicos (Shaw and Handy, 2011).

O cérebro apresenta uma barreira hematoencefálica (BBB), isso é, uma membrana seletiva, a fim de controlar o transporte de compostos químicos e outros agentes para o tecido cerebral. Estudos afirmam que as AgNPs atravessam facilmente essa barreira, e se acumulam no cérebro causando neurotoxicidade (Ale et al., 2018b; Bacchetta et al., 2016; Rahman et al., 2009). Segundo Zhao e colaboradores (2019) a exposição à AgNP sintética promoveu danos em circuitos neurais, incluindo neurotransmissores dopaminérgicos, transmissão sináptica e atividades motoras, pois induzem propriedades elétricas anormais da membrana, levando à respostas disfuncionais ao toque e respostas locomotoras de escape em embriões de *Danio rerio*.

O acúmulo de Ag no cérebro foi encontrado em ambos os grupos de exposição, neste estudo, podendo indicar a passagem da Ag pela BBB. Assim como em exposições a AgNP sintética, que também observaram acúmulo neste órgão em *P. lineatus* após exposição a 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  AgNP por 15 dias (Ale et al., 2018b) e em *Piaractus mesopotamicus* quando exposto a 10 e 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  AgNP por 24 h (Bacchetta et al., 2017). Porém, para Yokel (2020), é necessário o uso de metodologias mais específicas para afirmar a passagem de NPs pela BBB, visto que o cérebro possui uma extensa vasculatura que o permeia, e é possível que as NPs estejam no sangue ou associado a componentes da barreira BBB, ao invés de no parênquima cerebral.

Estudos com culturas de células neurais, mostra a vulnerabilidade do cérebro em relação a NPs, caso ocorra a chegada das AgNPs as células neurais, induzindo estresse oxidativo e modificações na morfologia dos astrócitos, podendo causar alteração nos processos funcionais em redes neuronais (Haase et al., 2012), assim como a diminuição do efluxo de dopamina e maior citotoxicidade em neurônios em desenvolvimento (Zhang et al., 2020).

O músculo é o tecido com menor poder de acúmulo de metais devido seu grande volume (Alves e Wood, 2006; Klavins et al., 2009) porém, nesse

estudo, foi observado acúmulo de Ag neste tecido no grupo N10 após 96 h. Trabalhos realizados com *Perca flavescens* expostas a AgNP por 2 anos (Martin et al., 2018) e a AgNP e AgNO<sub>3</sub> por 96h e 10 dias (Martin et al., 2017) também observaram o acúmulo de Ag no músculo, e constataram que este acúmulo se dá de forma muito mais rápida quando expostos a Ag<sup>+</sup> do que as AgNP. A bioacumulação de prata neste tecido causa alerta, principalmente em peixes, já que muitas espécie tem grande importância comercial e alimentícia para a população.

Em decorrência do acúmulo de Ag muscular, os animais expostos ao AgNO<sub>3</sub> por 96 h, apresentaram também redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE), uma importante enzima envolvida no processo de transmissão do impulso nervoso, que realiza a quebra do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica em colina e ácido acético, interrompendo a transmissão contínua do impulso nervoso (Van der Oost et al., 2003). Alterações no seu funcionamento, como a redução de sua atividade, pode desencadear hiperexcitação do animal, pela estimulação pós sináptica contínua, essa hiperexcitação pode promover distúrbios nas atividades do animal, como na locomoção e equilíbrio, alimentação, fuga de predadores e comportamento reprodutivo (Pessoa et al., 2011).

Em estudo in vitro, a inibição desta enzima se mostrou induzida por NPs de SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al, Cu, Cu revestido de carbono, mostrando uma alta relação entre a adsorção das NPs e a inibição desta enzima (Wang et al., 2009). No estudo de Khatoon e colaboradores (2018), a AgNP, produzida por meio de um extrato da planta *Mentha piperita*, também desencadeou este efeito inibitório da AChE, mostrando ser dependente da concentração de exposição. Em análise cinética, foi visto que a inibição dessa enzima pode ocorrer tanto pela ligação direta da NP à enzima livre (AChE) quanto ao complexo enzima-substrato (AChE-acetilcolina) (Khatoon et al., 2018).

Apesar do acúmulo de Ag no músculo se mostrar significativo apenas após 96 h no grupo N10, foi constatado o aumento de metalotioneínas em ambos os grupos logo após 24 h. O aumento da expressão desta proteína, já foi relatado em outros estudos, após exposições a curto prazo a Ag<sup>+</sup> e AgNP (Chae et al., 2009; Martin et al., 2017), estando relacionada ao tempo de exposição a Ag, visto que sua expressão se mostra abrupta, e não prolongada, sendo normalizada em exposições maiores que 4 dias (Chae et al., 2009). A presença da Ag no tecido muscular, mesmo que a baixas concentrações, pode desencadear o aumento de sua

concentração já que as metalotioneínas apresentam grande afinidade aos metais atuando em sua desintoxicação, além de estar envolvida na defesa antioxidante, podendo seu aumento ser decorrente do aumento de ERO no tecido (Chae et al., 2009; Viarengo et al., 1999). Porém, análises referentes a estresse oxidativo não foram realizadas neste tecido.

Após 24 h de exposição à AgNPb e AgNO<sub>3</sub>, a bioacumulação do metal se mostrou em maior concentração em brânquias > cérebro > sangue, já após 96h esta distribuição muda para sangue > cérebro > brânquia > músculo. O acúmulo de Ag nas brânquias, evidencia este órgão como a principal via de entrada do metal, que se dá pela grande perfusão e superfície exposta deste tecido, assim facilmente os contaminantes do meio aquático atingem a corrente sanguínea ocorrendo sua distribuição sistêmica por meio do sangue (Al-Sid-Cheikh et al., 2019). O cérebro necessita de grande aporte sanguíneo e se apresenta bastante susceptível ao acúmulo de Ag, além desse metal ter potencial indutório de neurotoxicidade (Khatoon et al., 2018). Nos músculos, a indução de metalotioneínas em 24 h, o acúmulo de Ag e a inibição da AChE em 96h, indicam que, apesar deste tecido não se mostrar alvo dos metais em peixes (Sayed et al., 2020), ele pode sofrer alterações, o que causa alerta, visto que é um produto de consumo humano.

A bioacumulação de Ag nos diferentes tecidos e tempos de exposição, se mostrou mais evidente nos grupos expostos a AgNO<sub>3</sub> do que nos expostos a AgNPb. Outros estudos constataram esta diferença na bioacumulação em exposições a AgNO<sub>3</sub> e AgNPs (Lacave et al., 2018; Martin et al., 2017). Isso está relacionado a mais fácil absorção dos íons prata do que das AgNPb, porém, é possível observar efeitos específicos da presença das AgNPb, já que a quantidade de Ag dissolvida em ambos grupos se mostraram similares, mas foram encontradas diferentes alterações fisiológicas e bioquímicas entre os grupos.

## 5 CONCLUSÃO

O peixe *Prochilodus lineatus* é uma espécie nativa Neotropical de grande importância econômica e alimentícia, sua exposição a AgNPb induziu alterações iônicas, principalmente relacionadas ao K<sup>+</sup> celular, inibição da anidrase carbônica, aumento de metalotioneínas, hematócrito e atividade da GST além de biocumulação de Ag em diferentes tecidos, evidenciando seu potencial tóxico mesmo a baixa concentração de Ag total e curtos tempos de exposição. É notório, que muitas dessas alterações podem estar relacionadas a liberação de íons Ag pelas NPs, porém foi observado diferenças entre os efeitos Ag<sup>+</sup> (AgNO<sub>3</sub>) e da AgNPb, visto que apenas nos animais expostos a AgNO<sub>3</sub> encontrou-se alterações na atividade da HA e da AChE. Em relação ao tempo experimental, este se mostrou relevante, já que em 24 h foram desencadeadas diversas alterações nos biomarcadores bioquímicos e fisiológicos que em 96 h se mostram normalizados. Vale ressaltar que com a diversidade de AgNPs produzidas de forma sintética e biogênica, é difícil definir padrões de toxicidade ou concentrações seguras para os organismos aquáticos, por isso, é válido o estudo do maior número de NPs e o conhecimento dos seus efeitos em espécies nativas.

## REFERÊNCIAS

- Adragna, N.C., Allaa, P.K., Pavel-Sizmoreb, I.E., Yaklicc, A.S.L.P.J., Laufa, P.K., 2019. Assessment of Silver-Nanoparticles- Induced Erythrocyte Cytotoxicity through Ion Transport Studies. *Cell. Physiol. Biochem.* 45435, 532–549.
- Al-Sid-Cheikh, M., Rouleau, C., Bussolaro, D., Oliveira Ribeiro, C.A., Pelletier, E., 2019. Tissue Distribution of Radiolabeled 110mAg Nanoparticles in Fish: Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Sci. Technol.* 53, 12043–12053.
- Ale, A., Bacchetta, C., Rossi, A.S., Galdopórpora, J., Desimone, M.F., de la Torre, F.R., Gervasio, S., Cazenave, J., 2018a. Nanosilver toxicity in gills of a neotropical fish: Metal accumulation, oxidative stress, histopathology and other physiological effects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148, 976–984.
- Ale, A., Rossi, A.S., Bacchetta, C., Gervasio, S., de la Torre, F.R., Cazenave, J., 2018b. Integrative assessment of silver nanoparticles toxicity in *Prochilodus lineatus* fish. *Ecol. Indic.* 93, 1190–1198.
- Alves-Costa, J. R. M., Mela, M., de Assis, H. C. D. S., Pelletier, É., Randi, M. A. F., & de Oliveira Ribeiro, C. A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(1), 82-88.
- Alves, L.C., Wood, C.M., 2006. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquat. Toxicol.* 78, 217–232.
- Andrade, L.L. de, do Espirito Santo Pereira, A., Fernandes Fraceto, L., Bueno dos Reis Martinez, C., 2019. Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. *Sci. Total Environ.* 663, 548–559.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M., 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol. Lett.* 179, 93–100.
- Asharani, P. V., Lian Wu, Y., Gong, Z., Valiyaveetil, S., 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology.* 19, 255102.
- Atli, G., Canli, M., 2011. Alterations in ion levels of freshwater fish *Oreochromis*

- niloticus* following acute and chronic exposures to five heavy metals. Turkish J. Zool. 35, 725–736.
- Bacchetta, C., Ale, A., Simoniello, M.F., Gervasio, S., Davico, C., Rossi, A.S., Desimone, M.F., Poletta, G., López, G., Monserrat, J.M., Cazenave, J., 2017. Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles. Ecol. Indic. 76, 230–239.
- Bacchetta, C., López, G., Pagano, G., Muratt, D.T., de Carvalho, L.M., Monserrat, J.M., 2016. Toxicological Effects Induced by Silver Nanoparticles in Zebra Fish (*Danio Rerio*) and in the Bacteria Communities Living at Their Surface. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 97, 456–462.
- Balendiran, G.K., Dabur, R., Fraser, D., 2004. The role of glutathione in cancer. Cell Biochem. Funct. 22, 343–352.
- Beutler, E., 1975. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. Grune and Stratton, New York.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. J. Lab. Clin. Med. 61, 882–888.
- Blaser, S.A., Scheringer, M., MacLeod, M., Hungerbühler, K., 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. Sci. Total Environ. 390, 396–409.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M., 1998. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiterplates. In: Armstrong, D. (Ed.), Free Radical and Antioxidants Protocols. Humana Press, New Jersey, pp. 377–387.
- Carmo, T.L.L., Siqueira, P.R., Azevedo, V.C., Tavares, D., Pesenti, E.C., Cestari, M.M., Martinez, C.B.R., Fernandes, M.N., 2019. Overview of the toxic effects of titanium dioxide nanoparticles in blood, liver, muscles, and brain of a Neotropical detritivorous fish. Environ. Toxicol. 34, 457–468.
- Castaldo, G., Flipkens, G., Pillet, M., Town, R.M., Bervoets, L., Blust, R., De Boeck,

- G., 2020. Antagonistic bioaccumulation of waterborne Cu(II) and Cd(II) in common carp (*Cyprinus carpio*) and effects on ion-homeostasis and defensive mechanisms. *Aquat. Toxicol.* 226, 105561.
- Chae, Y.J., Pham, C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., Gu, M.B., 2009. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 94, 320–327.
- Chalasanani, M., Rao, L.M., Chakravarty, M.S., 2020. Lead-induced effects on hematological parameters and red cell indices of cirrhinus mrigala (Hamilton, 1822) and ctenopharyngodon idella (steindachner, 1866). *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 8, 94–98.
- Chen, L.Q., Fang, L., Ling, J., Ding, C.Z., Kang, B., Huang, C.Z., 2015. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: Size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 501–509.
- Clark, N.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2018. Low hazard of silver nanoparticles and silver nitrate to the haematopoietic system of rainbow trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 152, 121–131.
- CONAMA 357 - Resolução 357, 2005. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente Disponível em:  
<<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acesso: 2020.
- Çoğun, H.Y., Yüzereroğlu, T.A., Firat, Ö., Gök, G., Kargin, F., 2006. Metal concentrations in fish species from the Northeast Mediterranean Sea. *Environ. Monit. Assess.*
- Di Giulio, Richard T. Hinton, D.E., 2008. *The Toxicology of Fishes*, Taylor & Francis Group.
- Doleželová, P., Mácová, S., Pištěková, V., Svobodová, Z., Bedáňová, I., Voslářová, E., 2008. Comparison of the sensitivity of *Danio rerio* and *Poecilia reticulata* to silver nitrate in short-term tests. *Interdiscip. Toxicol.* 1, 200–202.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical*

pharmacology, 7(2), 88-95.

- Farmen, E., Mikkelsen, N., Evensen, Ø., Einset, J., Heier, L.S., Rosseland, B.O., Salbu, B., Tollefsen, K.E., Oughton, D.H., 2012. Acute and sub-lethal effects in juvenile Atlantic salmon exposed to low µg/L concentrations of Ag nanoparticles. *Aquat. Toxicol.* 108, 78–84.
- Furtado, L.M., Bundschuh, M., Metcalfe, C.D., 2016. Monitoring the Fate and Transformation of Silver Nanoparticles in Natural Waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 449–455.
- Gibbs, A., Somero, G.N., 1989. Pressure adaptation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gills of marine teleosts. *J. Exp. Biol.* 143, 475–942.
- Gottschalk, F., Nowack, B., 2011. The release of engineered nanomaterials to the environment. *J. Environ. Monit.* 13, 1145–1155.
- Griffitt, R.J., Hyndman, K., Denslow, N.D., Barber, D.S., 2009. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 107, 404–415.
- Griffitt, R.J., Lavelle, C.M., Kane, A.S., Denslow, N.D., Barber, D.S., 2013. Chronic nanoparticulate silver exposure results in tissue accumulation and transcriptomic changes in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 130–131, 192–200.
- Guilger-Casagrande, M., Germano-Costa, T., Pasquoto-Stigliani, T., Fraceto, L.F., Lima, R. de, 2019. Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Sci. Rep.* 9, 1–9.
- Haase, A., Rott, S., Mantion, A., Graf, P., Plendl, J., Thünemann, A.F., Meier, W.P., Taubert, A., Luch, A., Reiser, G., 2012. Effects of silver nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: Uptake, oxidative stress and acute calcium responses. *Toxicol. Sci.* 126, 457–468.
- Hawkins, A.D., Thornton, C., Kennedy, A.J., Bu, K., Cizdziel, J., Jones, B.W., Steevens, J.A., Willett, K.L., 2015. Gill histopathologies following exposure to nanosilver or silver nitrate. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr.* 78, 301–315.
- Hogstrand, C., Wood, C.M., 1998. Toward a better understanding of the

- bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: Implications for water quality criteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 547–561.
- Johari, S.A., Kalbassi, M.R., Yu, I.J., Lee, J.H., 2015. Chronic effect of waterborne silver nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histopathology and bioaccumulation. *Comp. Clin. Path.* 24, 995–1007.
- Kaya, E.D., Söyüt, H., Beydemir, Ş., 2015. The toxicological impacts of some heavy metals on carbonic anhydrase from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) gills. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 825–832.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* 20, 6183–6188.
- Khan, H., Khan, M.F., Asim-Ur-Rehman, Jan, S.U., Ullah, N., 2011. The protective role of glutathione in silver induced toxicity in blood components. *Pak. J. Pharm. Sci.* 24, 123–128.
- Khatoon, A., Khan, F., Ahmad, N., Shaikh, S., Rizvi, S.M.D., Shakil, S., Al-Qahtani, M.H., Abuzenadah, A.M., Tabrez, S., Ahmed, A.B.F., Alafnan, A., Islam, H., Iqbal, D., Dutta, R., 2018. Silver nanoparticles from leaf extract of *Mentha piperita*: Eco-friendly synthesis and effect on acetylcholinesterase activity. *Life Sci.* 209, 430–434.
- Khosravi-Katuli, K., Shabani, A., Paknejad, H., Imanpoor, M.R., 2018. Comparative toxicity of silver nanoparticle and ionic silver in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*): Accumulation, physiology and histopathology. *J. Hazard. Mater.* 359, 373–381.
- Klavins, M., Potapovics, O., Rodinov, V., 2009. Heavy metals in fish from lakes in Latvia: Concentrations and trends of changes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 96–100.
- Kumar, N., Chandan, N.K., Wakchaure, G., Singh, N.P., 2020. Synergistic effect of zinc nanoparticles and temperature on acute toxicity with response to biochemical markers and histopathological attributes in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 229, 108678.
- Lacave, J.M., Vicario-Parés, U., Bilbao, E., Gilliland, D., Mura, F., Dini, L., Cajaraville,

- M.P., Orbea, A., 2018. Waterborne exposure of adult zebrafish to silver nanoparticles and to ionic silver results in differential silver accumulation and effects at cellular and molecular levels. *Sci. Total Environ.* 642, 1209–1220.
- Lead, J.R., Batley, G.E., Alvarez, P.J.J., Croteau, M.N., Handy, R.D., McLaughlin, M.J., Judy, J.D., Schirmer, K., 2018. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects—An updated review. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 2029–2063.
- Lee, B., Duong, C.N., Cho, J., Lee, J., Kim, K., Seo, Y., Kim, P., Choi, K., Yoon, J., 2012. Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Biomed. Biotechnol.* 2012.
- Lee, C.-Y., Horng, J.-L., Chen, P.-Y., Lin, L.-Y., 2019. Silver nanoparticle exposure impairs ion regulation in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 214, 105263.
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., Schettino, T., 2016. The complex relationship between metals and carbonic anhydrase: New insights and perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 127.
- Liu, J., Jiang, G. 2015. Silver nanoparticles. Ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 152 .
- Lu, S.C., 2013. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 3143–3153.
- Mao, H., Wang, D.H., Yang, W.X., 2012. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 110–111, 208–213.
- Martin, J.D., Colson, T.L.L., Langlois, V.S., Metcalfe, C.D., 2017. Biomarkers of exposure to nanosilver and silver accumulation in yellow perch (*Perca flavescens*). *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 1211–1220.
- Martin, J.D., Frost, P.C., Hintelmann, H., Newman, K., Paterson, M.J., Hayhurst, L., Rennie, M.D., Xenopoulos, M.A., Yargeau, V., Metcalfe, C.D., 2018. Accumulation of Silver in Yellow Perch (*Perca flavescens*) and Northern Pike (*Esox lucius*) from a Lake Dosed with Nanosilver. *Environ. Sci. Technol.* 52, 11114–11122.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for

- erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- McGillicuddy, E., Murray, I., Kavanagh, S., Morrison, L., Fogarty, A., Cormican, M., Dockery, P., Prendergast, M., Rowan, N., Morris, D., 2017. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Sci. Total Environ.* 575, 231–246.
- Moltó, E., Bonzón-Kulichenko, E., Del Arco, A., López-Alañón, D.M., Carrillo, O., Gallardo, N., Andrés, A., 2005. Cloning, tissue expression and metal inducibility of an ubiquitous metallothionein from *Panulirus argus*. *Gene* 361, 140–148.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 2014. *Principios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed.
- Oberholster, P.J., Musee, N., Botha, A.-M., Chelule, P.K., Focke, W.W., Ashton, P.J., 2011. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 416–423.
- Ogunsuyi, O.I., Fadoju, O.M., Akanni, O.O., Alabi, O.A., Alimba, C.G., Cambier, S., Eswara, S., Gutleb, A.C., Adaramoye, O.A., Bakare, A.A., 2019. Genetic and systemic toxicity induced by silver and copper oxide nanoparticles, and their mixture in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 27470–27481.
- Otter, R.R., Schreiber, E.A., van den Hurk, P., Klaine, S.J., 2012. Assessment of heavy metal and PAH exposure in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in the Reedy River watershed, South Carolina, USA: A multi-season assessment of metallothionein and bile fluorescence. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2763–2770.
- Peña-Münzenmayer, G., Niemeyer, M.I., Sepúlveda, F. V., Cid, L.P., 2014. Zebrafish and mouse TASK-2 K<sup>+</sup> channels are inhibited by increased CO<sub>2</sub> and intracellular acidification. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 466, 1317–1327.
- Pessoa, P.C., Luchmann, K.H., Ribeiro, A.B., Veras, M.M., Correa, J.R.M.B., Nogueira, A.J., Bairy, A.C.D., Carvalho, P.S.M., 2011. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquat. Toxicol.* 105, 312–320.
- Quinteros, M.A., Bonilla, J.O., Albores, S. V, Villegas, L.B., Páez, P.L., 2019.

- Biogenic Nanoparticles: Synthesis, Stability and Biocompatibility Mediated by Proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 184, 110517.
- Rahman, M.F., Wang, J., Patterson, T.A., Saini, U.T., Robinson, B.L., Newport, G.D., Murdock, R.C., Schlager, J.J., Hussain, S.M., Ali, S.F., 2009. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 187, 15–21.
- Roda, J.F.B., Lauer, M.M., Risso, W.E., Martinez, C.B.R., 2020. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction? *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 242, 110659.
- Santos-Silva, T.G., Montagner, C.C., Martinez, C.B.R., 2018. Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 58, 237–242.
- Sarkar, B., Netam, S.P., Mahanty, A., Saha, A., Bosu, R., Krishnani, K.K., 2014. Toxicity Evaluation of Chemically and Plant Derived Silver Nanoparticles on Zebrafish (*Danio rerio*). *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol. Sci.* 84, 885–892.
- Sayed, A.E.-D.H., Mekkawy, I.A., Mahmoud, U.M., Nagiub, M., 2020. Histopathological and histochemical effects of silver nanoparticles on the gills and muscles of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Sci. African* 7, e00230.
- Schultz, A.G., Ong, K.J., MacCormack, T., Ma, G., Veinot, J.G.C., Goss, G.G., 2012. Silver nanoparticles inhibit sodium uptake in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Technol.* 46, 10295–10301.
- Shabrangharehdasht, M., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., 2020. Effects of nanosilver on hematologic, histologic and molecular parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 225.
- Shaw, B.J., Handy, R.D., 2011. Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. *Environ. Int.* 37, 1083–1097.
- Silva, A.O.F. da, Martinez, C.B.R., 2014. Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity

- and plasma ions. *Aquat. Toxicol.* 156, 161–168.
- Simonato, J.D., Mela, M., Doria, H.B., Guiloski, I.C., Randi, M.A.F., Carvalho, P.S.M., Meletti, P.C., Silva de Assis, H.C., Bianchini, A., Martinez, C.B.R., 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 170, 31–41.
- Sun, T.Y., Bornhöft, N.A., Hungerbühler, K., Nowack, B., 2016. Dynamic Probabilistic Modeling of Environmental Emissions of Engineered Nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 50, 4701–4711.
- Tesser, M.E., de Paula, A.A., Risso, W.E., Monteiro, R.A., Pereira, A.E.S., Fraceto, L.F., Martinez, C.B.R., 2020. Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: A comparative approach. *Sci. Total Environ.* 704, 135332.
- Valerio-García, R.C., Carbajal-Hernández, A.L., Martínez-Ruíz, E.B., Jarquín-Díaz, V.H., Haro-Pérez, C., Martínez-Jerónimo, F., 2017. Exposure to silver nanoparticles produces oxidative stress and affects macromolecular and metabolic biomarkers in the goodeid fish *Chapalichthys pardalis*. *Sci. Total Environ.* 583, 308–318.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Velsankar, K., Sudhakar, S., Parvathy, G., Kalliammal, R., 2020. Effect of cytotoxicity and antibacterial activity of biosynthesis of ZnO hexagonal shaped nanoparticles by *Echinochloa frumentacea* grains extract as a reducing agent. *Mater. Chem. Phys.* 239, 121976.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277, 1612–1619.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R. 1997. A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44

(1), 69-84.

- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Balasubramanian, M.P., 2007. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere*. 69, 979–986.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* 122, 121–129.
- Wang, Z., Zhao, J., Li, F., Gao, D., Xing, B., 2009. Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. *Chemosphere*. 77, 67–73.
- Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J., 2011a. *Fish Physiology*. EUA. Elsevier Inc. 31A, 54-110.
- Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J., 2011b. *Fish Physiology*. EUA. Elsevier Inc. 31B, 2-54.
- Wood, C.M., Playle, R.C., Hogstrand, C., 1999. Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 71–83.
- Xiang, Q.-Q., Wang, D., Zhang, J.-L., Ding, C.-Z., Luo, X., Tao, J., Ling, J., Shea, D., Chen, L.-Q., 2020. Effect of silver nanoparticles on gill membranes of common carp: Modification of fatty acid profile, lipid peroxidation and membrane fluidity. *Environ. Pollut.* 256, 113504.
- Yokel, R.A., 2020. Nanoparticle brain delivery: A guide to verification methods. *Nanomedicine*. 15, 409–432.
- Yue, Y., Li, X., Sigg, L., Suter, M.J.F., Pillai, S., Behra, R., Schirmer, K., 2017. Interaction of silver nanoparticles with algae and fish cells: A side by side comparison. *J. Nanobiotechnology*. 15, 1–11.
- Zhang, B., Liu, N., Liu, Q.S., Zhang, J., Zhou, Q., Jiang, G., 2020. Silver nanoparticles induce size-dependent and particle-specific neurotoxicity to primary cultures of rat cerebral cortical neurons. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 198,

110674.

Zhao, G., Wang, Z., Xu, L., Xia, C.-X., Liu, J.-X., 2019. Silver nanoparticles induce abnormal touch responses by damaging neural circuits in zebrafish embryos. *Chemosphere* 229, 169–180.



## CAPÍTULO III

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

➤ Neste estudo, a nanopartícula de prata biogênica (bNPAg), produzida pelo fungo *Fusarium oxysporum*, apesar de ser uma alternativa com produção menos tóxica a indústria, desencadeou toxicidade ao peixe *Prochilodus lineatus* mesmo a baixa concentração e curto tempo experimental, exigindo cuidados em sua manipulação e sua inserção em produtos.

➤ A legislação autoriza a concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ag total nas águas de classe I e II, sendo essas águas destinadas a consumo, recreação, irrigação e pesca. Este trabalho evidencia que esta concentração não se mostra segura, visto as alterações e bioacumulação causadas no peixe *P. lineatus*, mesmo em concentrações a baixo da nominal determinada neste estudo.

➤ O tempo experimental se mostra relevante, visto que o organismo teste logo após 24 h já apresentou alterações em níveis celulares e moleculares, e muitas dessas alterações se mostraram normalizadas após 96 h. Porém, sabe-se que quanto maior o tempo de exposição maiores as chances dos contaminantes ocasionarem danos irreversíveis, podendo no ambiente aquático prejudicar todo o ecossistema local.

➤ O acúmulo de prata no cérebro e os possíveis efeitos neurotóxicos gerados pelas NPAg encontrados na literatura, indicam a necessidade de estudar mais a fundo os efeitos das NPs neste órgão.

➤ As formas da Ag estudadas, se mostraram efetoras de alterações iônicas, análises envolvidas nesse processo são bons biomarcadores em exposições a NPAg.

➤ O acúmulo de Ag no músculo se mostra um risco em potencial, visto que este animal tem grande importância alimentícia e comercial devido sua abundância, e atua como uma espécie condutora de energia e biomassa de níveis inferiores para níveis superiores na cadeia trófica. Este acúmulo, no ambiente natural, pode desencadear biomagnificação em organismos topo de cadeia;

## ANEXO A



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 35/2017

Londrina, 20 de Março de 2017.

Prezada Pesquisadora,

Certificamos que o projeto intitulado "**Comparação da avaliação ecotoxicológica na espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus* exposta às nanopartículas de prata sintética e biológica e ao nitrato de prata**", protocolo (CEUA nº **24009.2016.93**), sob a responsabilidade de **Juliana Delatim Simonato Rocha**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL), em reunião realizada em **07/03/2017**.

O objetivo do projeto é avaliar e comparar o acúmulo e os efeitos da prata (em concentrações máximas permitidas pela Resolução CONAMA 357, 2005) nas formas de nanopartícula de prata biológica (bNPAg) e sintética (sNPAg) e de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) em biomarcadores de diferentes níveis biológicos e comportamentais da espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Os animais trazidos da EPUEL serão aclimatados durante 7 (sete) dias, em tanques de 300 L contendo água livre de cloro, aeração constante e serão alimentados com ração comercial com 36% de proteína (Guabi, Brasil) cada 48 h. Após a aclimação, os peixes serão submetidos aos testes de toxicidade semi-estáticos. As concentrações efetivas dos meios de exposição contendo a bNPAg, a sNPAg e o AgNO<sub>3</sub> serão equivalentes às concentrações de 5, 10 e 50 µg L<sup>-1</sup> de prata total. A água dos testes será renovada (80%) a cada 24 h. Os animais serão alimentados com ração comercial com 36% de proteína (Guabi, Brasil) cada 48 h, antes da renovação. Os animais serão colocados em aquários de vidro de 100 L contendo água livre de cloro e continuamente aerados, após serem retirados dos aquários, os animais serão anestesiados com benzocaína (0,1 g L<sup>-1</sup> de água) para a coleta de sangue, pela veia caudal. Após, serão mortos pela depressão do sistema nervoso central durante imersão em anestésico (0,4 g benzocaína L<sup>-1</sup> de água). GI 1.

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Vigência do Projeto        | 01/11/2016 a 01/11/2019                           |
| Espécie/linhagem           | Peixe / <i>Prochilodus lineatus</i>               |
| Nº de animais              | 576   |
| Peso/Idade                 | 10 g / Juvenil                                    |
| Sexo                       | Machos e Fêmeas                                   |
| Origem                     | Estação de Piscicultura / UEL                     |
| Amostras a serem coletadas | Sangue, brânquias, fígado, rim, encéfalo, músculo |

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UDEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
Coordenadora da CEUA/UDEL

Ilma. Sra.

**Profa. Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha**

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Coordenação da Estação de Piscicultura / UEL; Chefe do Departamento de Ciências

Fisiológicas e **Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas**