



NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE II (NPSCUO) CAUSAM TOXICIDADE E ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM *Palaemon pandaliformis*

Kelly Tartas Olaia¹; Edison Barbieri²

Nº 22901

RESUMO - O camarão fantasma (*Palaemon pandaliformis*) é uma espécie amplamente distribuída na região costeira brasileira e desempenha importante papel econômico. Além disso, este organismo é considerado um indicador de poluição ambiental em estuários; no entanto, suas respostas fisiológicas aos poluentes ambientais tóxicos, incluindo nanopartículas, não são bem conhecidas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais efeitos tóxicos da nanopartícula de Cobre (NPsCuO) na toxicidade, no consumo de oxigênio e na excreção de amônia do *P. pandaliformis*. Para a avaliação da toxicidade (CL50) utilizou-se diferentes concentrações de NPsCuO (0,0; 1; 10; 20; 50; 100 e 300 µg/L). A CL50 nas 24, 48, 72 e 96h de exposição foram respectivamente 144,79; 80,21; 37,14 e 26,92 µg/L. Os resultados obtidos mostraram que, nas concentrações de NPsCuO e nos tempos de exposição utilizados, os camarões apresentaram alteração na toxicidade e no metabolismo. Os organismos expostos a NPsCuO nas concentrações de 10, 20 e 50 µg/L, aumentaram sua taxa metabólica em 66% e a excreção de N-amônia em 36%. Os dados obtidos no presente estudo podem fornecer informações úteis para ajudar a compreender melhor as respostas fisiológicas desta espécie para avaliar a poluição por nanopartículas.

1 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Oceanografia, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo; kelly.olaia@usp.br

2 Orientador: Pesquisador do Instituto de Pesca, Governo do Estado de São Paulo; edisonbarbieri@yahoo.com.br

ABSTRACT – *Palaemon pandaliformis* is a species widely distributed in the Brazilian coastal region and has an important economic role and can be used as an indicator of environmental pollution in estuaries; however their physiological responses to toxic environmental pollutants, including nanoparticles, are not well known. Thus, the aim of this study is to evaluate the potential toxic effects of copper nanoparticles (NPsCuO) on toxicity, oxygen consumption and ammonia excretion of *P. pandaliformis*. For the evaluation of toxicity (LC50) different concentrations of NPsCuO were used (0.0; 1; 10; 20; 50; 100 and 300 µg/L). The LC50 at 24, 48, 72 and 96h of exposure were respectively 144.79; 80.21; 37.14 and 26.92 µg/L. The results obtained showed that, in the concentrations of NPsCuO and in the exposure times used, the shrimp revealed changes in toxicity and metabolism. Organisms exposed to NPsCuO at concentrations of 10, 20 and 50 µg/L increased their metabolic rate by 66% and N-ammonia excretion by 36%. The data obtained in the present study may provide useful information for better understanding of the physiological responses of this species to nanoparticle pollution.

Keywords: Ecotoxicology, Aquatic organisms, Oxygen Consumption, Ammonia Excretion, *Palaemon pandaliformis*.

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas de cobre (NPsCuO) são aplicadas em diversas áreas devido à propriedades físico-químicas, que permitem a sua aplicação em ramos de importância industrial, tais como catálise bem como no controle de bactérias, devido as suas conhecidas propriedades antibacterianas (Eiras et al., 2022). Além disso as NPsCuO são amplamente usadas na indústria eletrônica, catalisadores, sensores, células solares (Galante et al., 2017), administração de medicamentos (Rajput et al., 2017), agricultura, preservação de alimentos (Montes et al., 2016), indústrias têxteis (Sedighi e Montazer, 2016), tintas anti-incrustante, revestimentos e tratamento de água (Ben-Sasson et al., 2016). O crescimento exponencial da produção e utilização de NPsCuO, inevitavelmente, levam à sua liberação para o ambiente aquático, representando um risco potencial para os organismos que vivem nesse ambiente (Wu et al., 2017). Ainda que as NPsCuO apresentem baixa solubilidade em água, podem causar efeitos tóxicos ao ficarem em contato com organismos aquáticos (Keller et al., 2017), principalmente os que vivem na comunidade bentônica. Na literatura, a discussão sobre a origem da toxicidade das NPsCuO é controverso, alguns estudos

fundamentam que a sua toxicidade pode ser exercida por efeitos específicos das NPs (Cronholm et al., 2013), pelos íons de cobre liberados (Jo et al., 2012) e pela morfologia da NPs bem como o seu tamanho (Xiao et al., 2015).

Várias espécies são utilizadas para medir a toxicidade de uma substância química. Os crustáceos são considerados bons bioindicadores de qualidade ambiental, por apresentarem sensibilidades às mudanças ambientais (De Melo et al., 2019). O *Palaemon pandaliformis* é um camarão tropical de água doce mas podem ser encontrados em ambientes estuáridos, São encontrados desde a Guatemala até a região sul do Brasil (de Melo, 2003). Vivem geralmente associados aos substratos próximos a raízes da vegetação de áreas marginais do mangue e, embora de pequeno porte, possui significativa importância ecológica estando envolvidos na ciclagem de nutrientes orgânicos e servindo de alimento para peixes e aves que habitam áreas estuarinas ou de água doce (Bond-Buckup e Buckup, 1999).

Camarões quando são expostos a estruturas em escala nanométrica podem absorver-las através da pele, mucosas, membranas celulares, por inalação e ingestão (Alves et al., 2022), causando diferentes efeitos. Efeitos fisiológicas como: alterações no consumo específico de oxigênio (de Melo et al., 2019), alterações na excreção de amônia (Barbieri, et al., 2018, Medeiros et al., 2020). Esses biomarcadores são de grande relevância, pois além de refletir as alterações metabólicas dos organismos, também possibilitam mensurar os danos causados ao ambiente (Campos-Garcia et al., 2015).

Apesar das características promissoras e do aumento da sua utilização, estudos sobre o efeito tóxicos das NPsCuO ainda é baixo quando comparada com outros óxidos metálicos (Silva et al., 2021; Eiras et al., 2022) e em se tratando do efeito de diferentes morfologias, as pesquisas são ainda escassas. À vista disso o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das nanoestruturas a base de óxido de cobre II com morfologia de nanobastões, sobre a toxicidade, consumo de oxigênio e excreção de amônia do camarão *P. pandaliformis*. Estabelecendo-se como hipótese que haveria diferença nas respostas metabólicas dose resposta em relação ao aumento da concentração das NPsCuO.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes foram utilizados diretamente sem purificação prévia, conforme fornecido pelo fornecedor. Os CuONPs com morfologia de nanobastões foram sintetizados no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional

de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Ambos foram utilizados em três diferentes diluições 1, 10, 20, 50, 100 e 300 µg/L, submetidos à sonicação por 10 minutos em banho ultrassônico (kondortech digital ultrasonic cleaner CD 4820), para suspender as nanopartículas, antes de serem inseridas em aquários.

2.1. Síntese dos Nanobastões de óxido de Cobre II

Os CuONPs utilizados neste estudo foram sintetizados a partir de uma versão modificada do método de Misra et al. (2014); o método de co-precipitação alcalina que é amplamente utilizado na preparação de óxidos metálicos. Para a preparação, 335 µL de ácido acético glacial foram adicionados a 100 ml de uma solução aquosa 0,02 M de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. O sistema foi aquecido a 100°C e então 0,45 g de hidróxido de sódio (NaOH) foram rapidamente adicionados à solução sob agitação e gás nitrogênio borbulhante (N_2). Após 15 minutos, o sistema foi resfriado à temperatura ambiente e o precipitado foi lavado em água corrente e separado por centrifugação a 5000 RPM por 10 minutos usando um rotor cônico e tubos falcon de 50 mL em uma centrífuga Eppendorf modelo 5810 R. Em seguida, as partículas foram ressuspensas em uma solução de citrato de sódio a 1% p/v e sonicadas por 20 minutos. Por fim, este processo de purificação: lavagem, centrifugação e ressuspensão foi repetido duas vezes onde na última etapa as NPsCuO foram então ressuspensas em água da torneira.

2.2. Caracterização das NPsCuO

As NPsCuO foram caracterizadas por técnicas de imagens como a microscopia eletrônica de transmissão (TEM). As imagens foram adquiridas em um microscópio JEOL modelo JEM 2100F, operado a 200 kV no modo Bright Field. A suspensão coloidal foi sonicada por 20 minutos e então uma pequena alíquota foi adicionada em uma grade de cobre (Cu) coberta com uma camada ultrafina de carbono (holey carbon 400 mesh). A amostra foi seca à temperatura ambiente durante a noite no dia anterior à análise.

Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta (ζ) dos nanobastões foi obtido usando Dynamic Light Scattering (DLS) e mobilidade eletroforética em um Zetasizer Ultra (Malvern, Reino Unido). Todas as medidas foram avaliadas a 25 °C e o cálculo do diâmetro das nanopartículas e ζ foram derivados da relação Einstein–Smoluchowski. As medições foram realizadas em dois

meios diferentes, água ultrapura e água da torneira utilizada nos experimentos, onde as nanoestruturas foram sintetizadas e onde foram realizados os testes toxicológicos, respectivamente. Os diferentes meios foram filtrados antes de realizar as medições. As medidas foram feitas em triplicata

2.3. CL50 e Percentual de letalidade dos organismos

Nos ensaios de toxicidade aguda foram utilizados 15 camarões por unidade experimental, tanto no grupo controle como nos demais tratamentos, totalizando 270 indivíduos para a substância testada, distribuídos em 6 aquários de 10 litros de água, aeração individual constante, e aclimatados durante 2h nestas condições antes de cada ensaio para atenuar estresse dos animais. Estes testes foram realizados em triplicatas.

Os métodos adotados para os ensaios de toxicidade aguda em camarões foram baseados no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA-American Public Health Association, 1998).

Os ensaios foram realizados em diferentes concentrações de Nanopartículas de Cobre (0,0; 1; 10; 20; 50; 100 e 300 µg/L).

Ao longo de todo o período de experimento foi observado o comportamento dos animais para avaliar o índice de letalidade dos indivíduos em cada concentração, tomando-se o cuidado de retirar e contar os espécimes mortos nas 24, 48, 72 e 96 h. Após 96 horas de experimentos, com os dados obtidos, foi possível determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀) – com 95% de limite de confiança – para os contaminantes nos camarões com o uso do método estatístico Trimmed Spearman Karber (HAMILTON *et al.*, 1977).

2.4. Taxa metabólica

A análise foi realizada através da técnica de respirimetria fechada. Foi utilizado um sistema composto por dois compartimentos com circulação contínua de água entre eles. No compartimento inferior, foram colocados 6 respirômetros. Após as 24 horas de exposição às NPsCuO nas concentrações de 10, 20 e 50 µg/L, além do controle, os animais foram transferidos individualmente aos respectivos respirômetros (numerados de 1 a 6) e mantidos com circulação contínua de água por 1 hora para

aclimação, esse processo é necessário para diminuir o estresse causado pelo manejo do peixe de um local para outro (Barbieri et al, 2013). Decorrido o tempo, o fluxo de água foi cessado e os respirômetros fechados com cuidado para não haver presença de bolhas de ar, e mantidos por 1 hora. Após este período, as amostras de água foram coletadas para análise da taxa metabólica, transferidas dos respirômetros para os respectivos frascos de coleta sempre evitando formação de bolhas de ar ao fechar o frasco. O oxigênio dissolvido foi determinado segundo o método de Winkler (1888).

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

2.5. Excreção específica de amônia

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

2.6. Análise estatística

Os dados de consumo específico de oxigênio e excreção específica de amônia foram analisados quanto a normalidade da distribuição utilizando-se o teste de Shapiro- Wilk e homocedasticidade das variâncias usando o teste de Levene. Como os resultados formam normais e homocedásticos, as diferenças entre as médias dos tratamentos foram avaliadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Os bastões a base de CuO foram caracterizados usando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET). É uma técnica poderosa e que é capaz de revelar detalhes da estrutura atômica do material em estudo bem como morfologia e tamanho das nanopartículas. As imagens das NPsCuO podem ser observadas na Figura 1. Os bastões apresentaram comprimento e espessura variados. Nas imagens do lado esquerdo da Figura 1 mostram imagens de algumas nanoestruturas de óxido de cobre, variando de 200-300 nm de comprimento bem como espessura de 50-100 nm.

As imagens MET revelaram que o método de síntese adotado se mostrou eficaz para obter morfologias do tipo bastonetes de óxido de cobre II. Ainda na Figura 1, a imagem maior mostra, a região destacada em amarelo, a estrutura em alta-resolução. Observa-se que a estrutura mostra diferentes contrastes (linhas claras e escuras) que formam um padrão de franjas, que correspondem os diferentes planos cristalinos da estrutura monoclinica do óxido de cobre II indicando que a partícula é policristalina. A estrutura cristalina pode ser comprovada a partir da Transformada de Fourier da imagem em alta-resolução que revela distancias interplanares correspondente ao padrão da estrutura monoclinica de óxido de cobre II.

Para avaliar a qualidade da dispersão destas partículas em meio aquoso, diâmetro hidrodinâmico foi determinado por DLS e a carga superficial por potencial zeta. Os valores de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta bem como o índice de polidispersividade são apresentados na figura 2 e sumarizados na Tabela 1. Maiores que os diâmetros observados nas imagens TEM. Este efeito pode ser explicado devido aos efeitos de aglomeração de partículas. Além disso, um maior valor de HD dos nanobastões (584,4 nm) foi observado em água ultrapura, em relação às mesmas estruturas em água de torneira (530,3 nm), (Tabela 1).

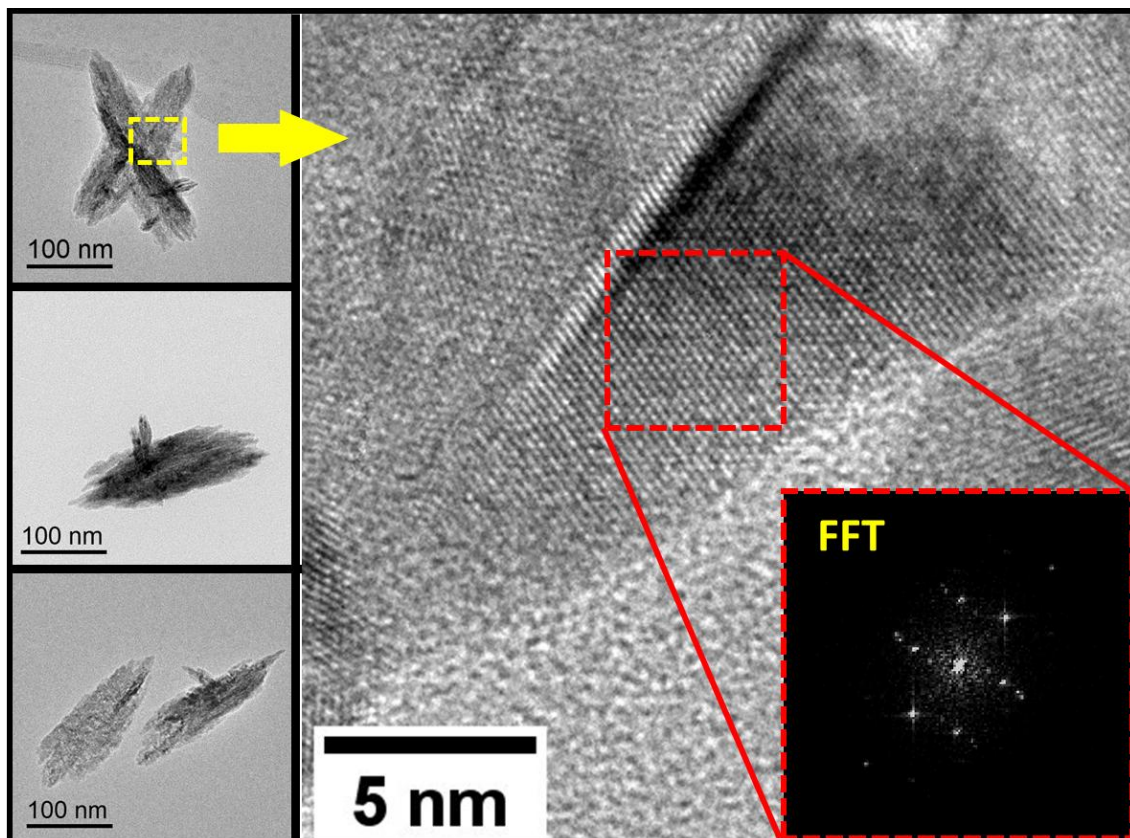
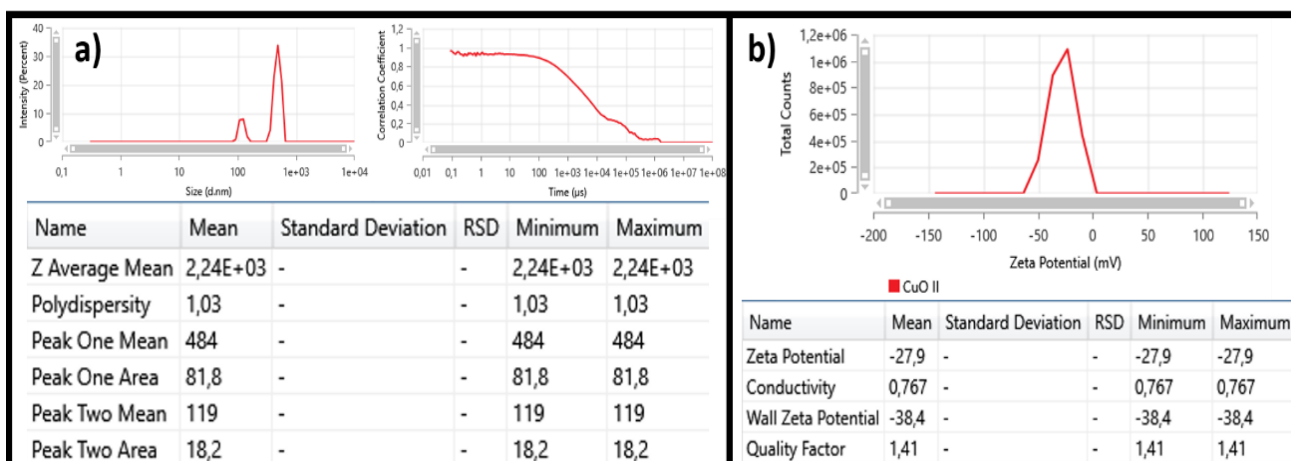


Figura 1: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos Nanobastões de CuO em diferentes magnificações. A imagem maior corresponde a imagem em alta resolução da região destacada em amarelo na imagem superior direita da figura. A Transformada de Fourier (destaque em vermelho) aponta uma estrutura cristalina corresponde a estrutura monoclinica do óxido de II.

A estabilidade de dispersão de nanomateriais tem uma influência importante na nanotoxicidade. Em geral, as superfícies dos nanomateriais possuem alta energia livre; portanto, forças motrizes termodinâmicas atuam para minimizar a energia de superfície e, conseqüentemente, os nanomateriais sofrerão transformações físicas e químicas, como dissolução, aglomeração e modificações químicas de superfície, ao interagir com meios biológicos e ambientais. Todas essas transformações dependem da composição do meio e das condições de exposição, incluindo pH da solução, força iônica e composição (Mudunkotuka et al., 2021) Embora HD não represente o tamanho real das nanoestruturas no formato de nanobastões, a análise DLS realizada não é capaz de distinguir eventos de agregação (ligações químicas fortes) de eventos de aglomeração (ligações de van der Waals), no entanto, pode fornecer informações interessantes que podem auxiliam no entendimento de parâmetros qualitativos referentes às mudanças na superfície das partículas (Franqui et al., 2019).



Em geral, valores negativos de potencial zeta indicam que as nanopartículas podem produzir dispersões coloidais eletrostaticamente estáveis (Lowry et al., 2016), Tabela 1. Observa-se que há uma pequena variação no HD e potencial zeta para valores que são mais positivos quando as nanoestruturas estão dispersas em água bruta. No entanto, esta modificação no meio não causou efeitos relevantes nem na HD nem na carga superficial dos materiais em estudo.

Tabela 1. Medidas de diâmetro hidrodinâmico (HD), índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta (ζ) da nanoestrutura de óxido de cobre de dispersões (10 mg L⁻¹) em água ultrapura e água da torneira a 25 °C.

	Nanobastões de CuO	
	Água ultra-pura	Água de torneira
<i>Diâmetro hidrodinâmico / nm</i>	584.4 ± 140.3	530.3 ± 198.7
<i>Índice de polidispersividade</i>	1.195 ± 0.773	1.571 ± 0.982
<i>Potencial Zeta (ζ) / mV</i>	-30.2 ± 1.3	-28.4 ± 1.7

Os resultados da exposição de *P. pandaliformis* nas concentrações de NPsCuO utilizadas neste experimento por até 96 h e sua concentração letal média (CL50 com 95% de limite de confiança) calculado por análise Spearman-Kärber, não demonstraram letalidade dos organismos (Tabela 2).

Tabela 2: Porcentagem de mortalidade (%) e CL₅₀ para *Palaemon pandaliformis* expostos aos nanopartículas de cobre (NPsCuO)

Concentração µg	24h	48h	72h	96h
Controle	0	0	0	0
1	0	0	0	0
10	0	0	0	0
20	1	1	3	5
50	0	3	5	8
100	2	5	10	10
300	10	10	10	10
LC50	144,79	80,21	37,14	26,92
Limite max e min	115,43-181,62	53-119,35	26,3-52,46	19,51-37,14

3.1. Consumo Específico de Oxigênio

Os valores das médias do consumo específico de oxigênio dos organismos expostos às diferentes concentrações de nanopartículas de cobre (NPsCuO), foram alterados significativamente em relação ao controle nas concentrações de 20 e 50 µg/L (Figura 3).

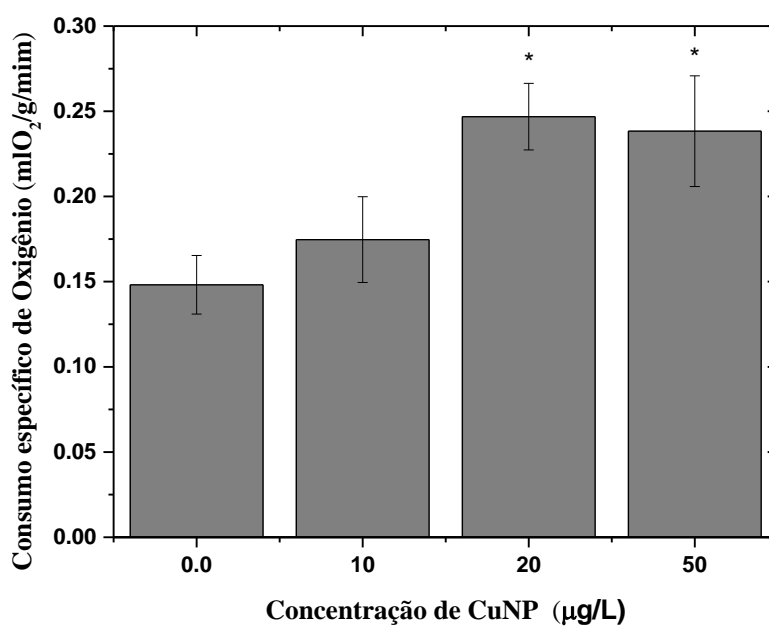


Figura 3 – Médias do consumo específico de oxigênio (mLO₂/g/h) conforme variação na concentração de nanopartículas de cobre (NPsCuO). Barras indicam os desvios padrões.(n=6). *estatisticamente diferentes (p<0.05).

3.2. Excreção de amônia

As médias de excreção de amônia de camarões expostos as concentrações de nanopartículas de cobre (NPsCuO) empregadas nos experimentos apresentaram diferença estatística em relação ao controle apenas na concentração de 50 µg/L (Figura 4).

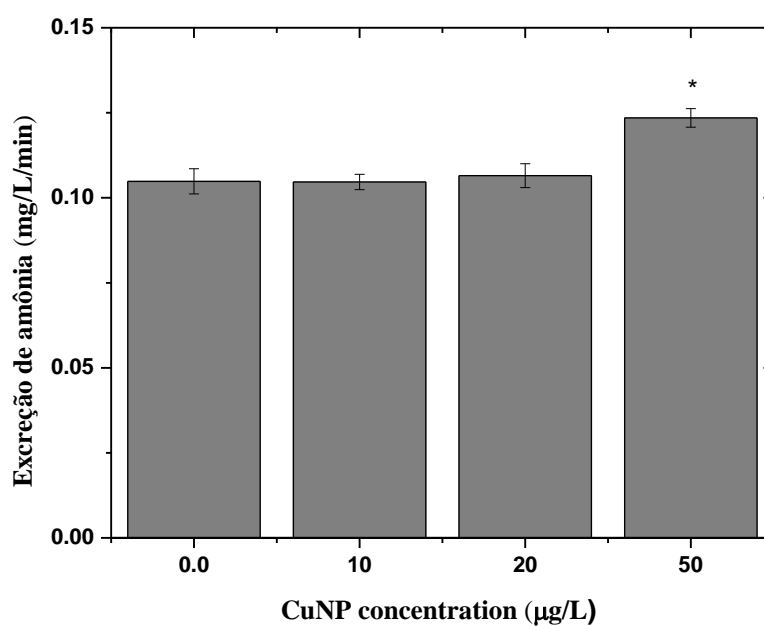


Figura 4 – Médias da excreção de amônia conforme variação na concentração de nanopartículas de cobre (NPsCuO). Barras indicam os desvios padrões.(n=6). *estatisticamente diferentes (p<0.05).

4. DISCUSSÃO

A toxicidade pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a concentração, o tempo de exposição, a interação da espécie química com outros elementos, bem como outros vários fatores biológicos dos espécimes estudados (Rezende et al., 2018). Ao avaliar respostas tóxicas, o poluente deve estar biodisponível, ou seja, ele deve atingir e interagir primeiramente com o seu sítio de ação biomolecular, propiciando reações ao nível molecular, podendo continuamente ser seguida de respostas nos tecidos, nos órgãos, no indivíduo, na população e na comunidade (Schoettger, 1996; USEPA, 2002).

Peralta-Videa et al. (2011) destacaram a importância do uso de invertebrados aquáticos em ensaios de toxicidade aguda e crônica de nanopartículas devido estes animais serem os destinatários finais da maioria dos contaminantes lançados no meio ambiente. Por esse motivo no presente estudo escolheu-se o camarão *P. pandaliformis*, por ser um organismo de ampla distribuição e ter demonstrado sensibilidade aos xenobiontes empregados e principalmente por interagir com os sedimentos e a coluna d'água.

Desta forma, os resultados obtidos nos testes de toxicidade foram essenciais para verificar a sensibilidade desta espécie na presença de NPsCuO utilizados e para calcular as concentrações aplicadas nos testes do consumo específico de oxigênio e excreção de amônia. Os ensaios de toxicidade realizados neste estudo são considerados testes agudos que envolvem caráter letal e objetivaram aferir a sensibilidade dos camarões da espécie *Palaemon pandaliformis* em contato com as substâncias testadas.

Nos ensaios do metabolismo de rotina com *P. pandaliformis* expostos ao NPsCuO, os resultados demonstraram que os camarões passaram a aumentar o consumo de oxigênio à medida que as concentrações aplicadas foram elevadas. O mesmo ocorreu em testes com camarões da espécie *Litopenaeus schmitti* expostos a concentrações de chumbo em diferentes salinidades quando observou-se o aumento do consumo de oxigênio (Santos et al., 2014, de Melo et al., 2019).

Xenobióticos podem afetar os processos de respiração dos organismos induzindo-os a usar outras fontes de energia, para serem empregadas nas reações de desintoxicação e estabilização de padrões metabólicos, o que pode explicar a redução no consumo específico de oxigênio e excreção de amônia na medida em que a concentração de NPsCuO foram elevadas (Alves et al., 2022).

Em organismos aquáticos, assim como nos camarões, a amônia é um dos produtos finais do catabolismo das proteínas (De Melo et al., 2020). O aumento da excreção de amônia nas maiores concentrações testadas demonstra o aumento do catabolismo dos aminoácidos (Schmidt-Nielsen, 1997). No presente estudo a excreção de amônia do *P. pandaliformis* aumentou quando os organismos foram expostos à maior concentração do NPsCuO, demonstrando um provável aumento do catabolismo das proteínas. Embora não haja uma análise mais aprofundada que confirme esta evidência, podemos atribuir a diminuição na excreção de amônia na presença de contaminantes a uma diminuição do metabolismo desses animais.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, K. V. B., MARTINEZ, D. S. T., ALVES, O. L., BARBIERI, E. Co-exposure of carbon nanotubes with carbofuran pesticide affects metabolic rate in *Palaemon pandaliformis* (shrimp). Chemosphere, v. 288, p. 132359, 2021

BARBIERI, E.. Effects of zinc and cadmium on oxygen consumption and ammonium excretion in pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967, Crustacea). Ecotoxicology (London), v. 18, p. 312-318, 2009

BARBIERI, E., BRANCO, J.O., SANTOS, M.D.F., HIDALGO, K.R., 2013a. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption and ammonia excretion of the sea-bob shrimp, according to temperature. Boletim do Instituto de Pesca 39, 299e309.

BARBIERI, E., MOREIRA, P., LUCHINI, L. A., HIDALGO, K. R., MUNOZ, A. Assessment of acute toxicity of carbofuran in *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) at different temperature levels. Toxicology and Industrial Health, v. 29, p. 1-8, 2013b.

BARBIERI, E., BONDOLI, A.C.V., DE MELO, C.B., HENRIQUES, M.B. Nitrite toxicity to *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture Research*, v. 48, p. n/a-n/a, 2014.

BARBIERI, E., FERRARINI, A. M. T., REZENDE, K. F. O., MARTINEZ, D. S. T. ; ALVES, O. L . Effects of multiwalled carbon nanotubes and carbofuran on metabolism in *Astyanax ribeirae*, a native species. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 44, p. 1-10, 2018

BEN-SASSON, M., LU, X., NEJATI, S., JARAMILLO, H., ELIMELECH, M. 2016. In situ surface functionalization of reverse osmosis membranes with biocidal copper nanoparticles. *Desalination* 388: 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.desal.2016.03.005>

BOND-BUCKUP, G., BUCKUP, L. 1999. Caridea (pitus, camarões de água doce e marinhos): 300-318 p. In: BUCKUP, L.; BOND-BUCKUP, G. (Eds.). *Os crustáceos do Rio Grande do Sul*. Ed. UFRGS, Porto Alegre.

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

DE MELO, C.B., CÔA, F., ALVES, O. L., MARTINEZ, D. S.T. ; BARBIERI, E. . Co-exposure of graphene oxide with trace elements: Effects on acute ecotoxicity and routine metabolism in *Palaemon pandaliformis* (shrimp). *Chemosphere*, v. 223, p. 1-10, 2019

CRONHOLM, P., KARISSON, H.L., HEDBERG, J.; LOWE, T.A.; WINNBERG, L.; ELIHN, K.; WALLINDER, I.O.; MOLLER, L. 2013. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: a comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small Weinheim an der Bergstrasse Germany*, 9(7): 970-982. <https://doi.org/10.1002/smll.201201069>

DE MELO, G. A. S. 2003. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. Edições Loyola

DURÁN, N., MARTINEZ, D. S. T., JUSTO, G. Z., DE LIMA, R., DE CASTRO, V. L., UMBUZEIRO, G. A., BARBIERI, E., DURÁN, M., MELO, P. S., ALVES, O. L., FÁVARO, W. J. Interlab study on nanotoxicology of representative graphene oxide. Journal of Physics. Conference Series (Print), v. 617, p. 012019-9, 2015.

EIRAS, M I O.,Da COSTA, L. S., BARBIERI, E. Copper II oxide nanoparticles (CuONPs) alter metabolic markers and swimming activity in zebra-fish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology, v. 258, p. 109343, 2022

FRANQUI, L.S., DE FARIAS, M.A., PORTUGAL, R.V., COSTA, C.A., DOMINGUES, R.R.; FILHO, A.G.S.; COLUCI, V.R.; LEME, A.F.P.; MARTINEZ, D.S.T.. Mater. Sci. Eng. C 2019, 100, 363–377

GALANTE, M.T., SANTIAGO, P.V.A., YUKUHIRO, V.Y., SILVA, L.A., DOS REIS, N.A., PIRES, C.T.G.V.M.T., MACEDO, N.G., COSTA, L.S., FERNANDEZ, P.S., LONGO, C. 2017. Aminopolysiloxane as Cu₂O Photocathode Overlayer: Photocorrosion Inhibitor and Low Overpotential CO₂-to-formate Selectivity Promoter. ChemCatChem. 2021,13, 859–8

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

KELLER, A.A., ADELEYE, A.S., CONWAY, J.R., GARNER K.L., ZHAO, L., CHERR, G.N., HONG, J., GARDEA-TORRESDEY, J.L., GODWIN, H.A.; HANNA, S., JI, Z., KAWETEERAWAT, C., LIN, S., LENIHAN, H.S., MILLER,

R.J., NEL, A.E., PERALTA-VIDEA, J.R., WALKER, S.L., ZUVERZA-MENA, N. 2017. Comparative environmental fate and toxicity of copper nanomaterials. Nano Impact, 7: 28-40. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.05.003>

LOWRY, G.V., HILL, R.J., HARPER, S., RAWLE, A.F., HENDREN, C.O., KLAESSIG, F., NOBBMANN, U., SAYRE, P., RUMBLE, J. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nano EHS. Environ. Sci. Nano 2016, 3, 953–965.

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

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

MUDUNKOTUWA, I.A.; GRASSIAN, V.H. Environ. Sci. Nano 2015, 2, 429–439. ----- L. S. da Costa, L. U. Khan, L. S. Franqui, F. de S. Delite, D. Muraca, D. S. T. Martinez and M. Knobel, J. Mater. Chem. B, 2021, 9, 428–439.]

PERALTA-VIDEA, Jose R. et al. Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008–2010. Journal of Hazardous Materials, v. 186, n. 1, p. 1-15, 2011

RAJPUT, V.D., MINKINA, T., SUSKOVA, S., MANDZHIEVA, S., TSITSUASHVILI, V., CHAPLIGIN, V., FEDORENKO, A. 2017. Effects of copper nanoparticles (CuONPs) on crop plants: a mini review. Bio Nanoscience 8(1): 36-42. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0466-3>

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

SANTOS, D. B., BARBIERI, E., BONDIOLI, A. C. V., de MELO, C. B. Effects of Lead in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) metabolism regarding salinity. O Mundo da Saúde, v. 36, n. 4, p. 594-601, 2014.

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

DA SILVA, F.L.F., ANDRADE NETO, D.M., MENEZES, F.L. SA, I.P., HIGUERA, J.M., .FECHINE, P.B.A., COSTA, L.S., NOGUEIRA, A.R.A., LOPES, G.S., .MATOS, W.O. 2021. Non-chromatographic arsenic speciation analyses in wild shrimp (*Farfantepenaeus brasiliensis*) using functionalized magnetic iron-nanoparticles. Food Chemistry Volume 345, 30 May 2021, 128781

SCHMIDT-NIELSEN, K.E.D. (2010) Animal Physiology: Adaptation and Environment. Cambridge University Press, Cambridge 607 pp.

SCHOETTGER, R.A. 1996. Problems of aquatic toxicology, biotesting and water quality management. USEPA.

USEPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. EPA-821-R-02-1: Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5 edição. Washigton.U.S.A 2002

VIMERCATI, L., CAVONE, D., CAPUTI, A., DE MARIA, L., TRIA, M., PRATO, E., FERRI, G.M.. 2020. Nanoparticles: An Experimental Study of Zinc Nanoparticles Toxicity on Marine Crustaceans. General Overview on the Health Implications in Humans. *Frontiers in Public Health*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00192>

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

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