



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Urutaí
Programa de Pós-Graduação em Conservação de
Recursos Naturais do Cerrado

**MUDANÇAS COMPORTAMENTAIS EM *Oreochromis
niloticus* COMO ENDPOINT DA TOXICIDADE DAS
NANOPARTÍCULAS DE ZnO**

RAPHAEL PIRES DE CAMPOS

**Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado
(Mestrado Profissional)**

Urutaí, GO
2019



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Reitor

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Campus Urutaí

Diretor Geral

Prof. Dr. Gilson Dourado, da Silva

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. André Luís, da Silva Castro

Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

Coordenador

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

RAPHAEL PIRES DE CAMPOS

MUDANÇAS COMPORTAMENTAIS EM *Oreochromis niloticus* COMO ENDPOINT DA TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE ZnO

Orientador

Prof. Dr. **Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes**

Coorientador

Prof. Dr. **Guilherme Malafaia**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado para obtenção do título de Mestre.

Urutaí, GO

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Urutaí

C198m Campos, Raphael Pires de.

Mudanças comportamentais em *Oreochromis Niloticus* como Endpoint da toxicidade das nanopartículas de ZnO. / Raphael Pires de Campos. -- Urutaí, GO: IF Goiano, 2019.

30 fls.

Orientador: Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Coorientador: Dr. Guilherme Malafaia Pinto

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado) – Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, 2019.

1. Nanotoxicologia. 2. Toxicologia ambiental. 3. Ecossistemas aquáticos. 4. Concentrações ambientais. 5. Peixes. I. Menezes, Ivandilson Pessoa Pinto de. II. Pinto, Guilherme Malafaia. III. Título.

CDU 57



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional | - Tipo: |

Nome Completo do Autor: Raphael Pires de Campos

Matrícula: 2017101330940123

Título do Trabalho: MUDANÇAS COMPORTAMENTAIS EM *Oreochromis niloticus* COMO ENDPOINT DA TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE ZnO

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 26/04/2019.

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Local Goiania, Data 26 / 04 /2019.

Raphael P. de Campos

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

[Assinatura]

Assinatura do(a) orientador(a)



FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Título da dissertação:	<i>Mudanças comportamentais em <i>Oreochromis niloticus</i> como endpoint da toxicidade das nanopartículas de ZnO.</i>
Orientador:	Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes
Coorientador:	Prof. Dr. Guilherme Malafaia
Autor:	Raphael Pires de Campos

Dissertação de Mestrado APROVADA em 27 de fevereiro de 2019, como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO, pela Banca Examinadora especificada a seguir:


Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Presidente


Prof. Dr. Estevão Alves da Silva
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Membro titular


Prof. Dr. Márcio da Silva Araújo
Universidade Estadual de Goiás – Campus Ipameri
Membro titular

AGRADECIMENTOS

Agradeço com carinho a minha mãe Nely Maria Fernandes e a minha vó Divina Maria Gomes pelo incentivo e reconhecimento aos anos dedicados à pesquisa.

A minha namorada Wanessa Fernandes Carvalho pela confiança e por acreditar que juntos venceríamos os desafios da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes pela oportunidade e confiança no meu trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Guilherme Malafaia pelo companherismo, dedicação, disponibilidade e incentivo durante a execução deste estudo.

Ao Instituto Federal Goiano campus Urutaí, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado pela formação de mestres profissionalizantes.

Agradeço ao Laboratório de Pesquisas Bilógicas e ao Laboratório de Genética Molecular pelo planejamento e desenvolvimento dos experimentos.

Aos meus amigos e pesquisadores do Laboratório de Pesquisas Bilógicas: Ms Carlos Mesak, Thales Quintão, Caroliny Paixão e Tenilce Gabriela da Silva pela contribuição neste estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	3
2.1. Animais e delineamento experimental.....	4
2.2. Análises comportamentais.....	4
2.2.1. Teste do campo aberto.....	5
2.2.2. Teste de transição claro/escuro.....	5
2.2.3. Teste de comportamento alimentar.....	6
2.2.4. Teste de resposta defensiva antipredatória – condição individual.....	7
2.2.5. Teste de resposta defensiva antipredatória – condição coletiva.....	8
2.3. Bioacumulação de Zn e parâmetros de qualidade da água.....	9
2.4. Análises dos dados.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4. CONCLUSÃO.....	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenhos esquemáticos e ordem sequencial de realização dos testes do campo aberto e de transição claro-escuro. (A) Representação do aparato utilizado no teste do campo aberto; (B-C) procedimentos sequenciais realizados logo depois do teste do campo aberto e (D) representação da realização do teste de transição claro-escuro. Os números indicados na figura indicam a sequência em que os procedimentos foram realizados. Os números iguais indicam que os eventos ocorreram simultaneamente e aqueles seguidos de (') indicam uma sequência mais avançada da realização de um mesmo procedimento. As cores são meramente ilustrativas.....5

Figura 2. Desenhos esquemáticos e ordem sequencial de realização dos testes de comportamento alimentar e de resposta defensiva antipredatória (condição individual). (A-B) Representação da dinâmica sequencial adotada para a realização do teste de comportamento alimentar. (C) Organização prévia do aparato para posterior realização do (D) teste de resposta defensiva antipredatória. Os números indicados na figura indicam a sequência em que os procedimentos foram realizados. Os números iguais indicam que os eventos ocorreram simultaneamente e aqueles seguidos de (') indicam uma sequência mais avançada da realização de um mesmo procedimento. As cores são meramente ilustrativas.....6

Figura 3. (A-C) Desenhos esquemáticos da ordem sequencial das sessões do teste de resposta defensiva antipredatória (condição coletiva): (A) habituação, (B) sessão com predador falso (iscas artificiais) e (C) com predador verdadeiro (*S. brasiliensis*). (D) e (E) demonstram as zonas e quadrantes traçados no fundo do aquário para cálculo dos índices de permanência na zona aversiva e de refúgio, bem como para a pontuação de cluster, respectivamente. As cores são meramente ilustrativas.....10

Figura 4. (A) Total de quadrantes cruzados, (B) distância (cm) percorrida e (C) índice de ansiedade de *Oreochromis niloticus* submetidos ou não às NPs de ZnO e submetidas ao teste do campo aberto. As barras indicam a média \pm desvio padrão. C: controle; NP-CA1x: 760 $\mu\text{g/L}$; NP-CA100x: 76000 $\mu\text{g/L}$. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade (n=16/cada grupo).....11 e 12

Figura 5. (A) Latência para a primeira ida ao compartimento claro, (B) frequência e (C) tempo de idas ao compartimento claro, bem como (D) total de cruzamento dos quadrantes traçados no fundo do aquário (proporcional ao tempo de permanência dos animais no compartimento claro) de *Oreochromis niloticus* submetidas ou não às NPs de ZnO. As barras indicam a média \pm desvio padrão. C: controle; NP-CA1x: 760 $\mu\text{g/L}$; NP-CA100x: 76000 $\mu\text{g/L}$. Em “A e D”, os dados foram submetidos ao teste não-paramétricos de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade. Já em “B e C”, os dados foram submetidos à one-way ANOVA, também à 5% de probabilidade (n=16/cada grupo).....13

Figura 6. (A) Latência para alimentação do primeiro pellet de ração, (B) distância percorrida antes da primeira alimentação e (C) escore de alimentação de *Oreochromis niloticus* submetidas ou não às NPs de ZnO. As barras indicam a média \pm desvio padrão. C: controle; NP-CA1x: 760 $\mu\text{g/L}$; NP-CA100x: 76000 $\mu\text{g/L}$. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétricos de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade, com pós-teste de Dunn’s, à 5% de probabilidade (n=16/cada grupo).....14

Figura 7. Índices de (A) evitamento, (B) fuga explosiva e (C) de comportamento territorialista registrados para *Oreochromis niloticus* (expostas ou não às NPs de ZnO) confrontadas com seu potencial predador *Salminus brasiliensis*. As barras indicam a média \pm desvio padrão. C: controle; NP-CA1x: 760 $\mu\text{g/L}$; NP-CA100x: 76000 $\mu\text{g/L}$. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétricos de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn’s, a 5% de probabilidade (n=16/cada grupo).....17

Figura 8. Índices de (A) permanência na zona de refúgio, (B) aversiva e (C) de cluster de agregação registrados para *Oreochromis niloticus* (expostas ou não às NPs de ZnO) submetidas ao teste de resposta defensiva antipredatória (condição coletiva). As barras indicam a média \pm desvio padrão. C: controle; NP-CA1x: 760 $\mu\text{g/L}$; NP-CA100x: 76000 $\mu\text{g/L}$. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétricos de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn’s, a 5% de probabilidade (n=16/cada grupo). Letras minúsculas, maiúsculas ou números distintas(os), indicam diferenças estatísticas entre as médias do grupo controle, NP-CA1x e NP-CA100x, respectivamente, nas diferentes sessões do teste.....18 e 19

Figura 9. Bioacumulação de Zn em pool de tecidos corporais de *Oreochromis niloticus* (expostas ou não às NPs de ZnO). As barras indicam a média \pm desvio padrão. C: controle; NP-CA1x: 760 $\mu\text{g/L}$; NP-CA100x: 76000 $\mu\text{g/L}$. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétricos de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's, a 5% de probabilidade Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (n=16/cada grupo).....21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos e químicos das águas contendo ou não diferentes concentrações de NPs de ZnO.....	16
--	----

MUDANÇAS COMPORTAMENTAIS EM *Oreochromis niloticus* COMO ENDPOINT DA TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE ZnO

RESUMO

A toxicidade das nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO) tem sido demonstrada em distintos modelos animais. No entanto, as concentrações testadas na maioria dos estudos são comumente muito superiores àquelas potencialmente identificadas no ambiente. Logo, isso limita as aplicações desses estudos na avaliação de risco ecotoxicológico desses nanopoluentes. Nesse sentido, utilizando indivíduos da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápias-do-Nilo) como sistema modelo, objetivamos avaliar os impactos das NPs de ZnO (em concentrações ambientalmente relevantes – 760 µg/L e 76000 µg/L, por 72h) sobre suas respostas comportamentais. Não evidenciamos efeitos prejudiciais das NPs sobre as habilidades locomotoras dos animais (avaliadas no teste do campo aberto e de transição claro-escuro), tampouco comportamentos preditivos de ansiedade. Por outro lado, a bioacumulação de Zn nos tecidos corporais das tilápias foi correlacionada com as alterações no comportamento alimentar (motivado por pellets de ração), assim como aos déficits de resposta defensiva antipredatória (em condições individuais e coletivas).

Quando confrontadas individualmente com seus potenciais predadores (*Salminus brasiliensis*), as tilápias expostas às NPs de ZnO apresentaram menores índices de evitamento, fuga e de comportamento territorialista. Já coletivamente, observamos a inabilidade dos animais de reconhecerem seus predadores, bem como de diferenciá-los de iscas artificiais (“falsos predadores”). Até onde vai nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a relatar impactos biológicos decorrentes da curta exposição de representantes do grupo dos peixes a NPs de ZnO. Assim, acreditamos que ele possa ser importante para o conhecimento acerca dos riscos ecotoxicológicos desses poluentes emergentes.

Palavras-chaves: Nanotoxicologia, toxicologia ambiental, ecossistemas aquáticos, concentrações ambientais, peixes.

BEHAVIORAL CHANGES IN *Oreochromis niloticus* AS ENDPOINT OF TOXICITY OF ZnO NANOPARTICLES

ABSTRACT

The toxicity of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) has been demonstrated in different animal models. However, the concentrations tested in most studies are commonly much higher than those potentially identified in the environment. Therefore, this limits the applications of these studies in the evaluation of the ecotoxicological risk of these nanopollutants. In this sense, using the *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) as a model system, we aimed to evaluate the impacts of ZnO NPs (in environmentally relevant concentrations - 760 $\mu\text{g} / \text{L}$ and 76000 $\mu\text{g} / \text{L}$, for 72 hours) on their responses behavioral. We did not evidence harmful effects of NPs on the locomotor abilities of the animals (evaluated in the open-field and light-dark transition test), nor predictive behavior of anxiety. On the other hand, the bioaccumulation of Zn in the body tissues of the tilapias was correlated with the alterations in the alimentary behavior (motivated by pellets of ration), as well as to the deficits of antipredatory defensive response (in individual and collective conditions). When confronted individually with their potential predators (*Salminus brasiliensis*), tilapia exposed to ZnO NPs presented lower rates of avoidance, flight and territorialist behavior. Already collectively, we observe the inability of animals to recognize their predators, as well as to differentiate them from artificial baits ("false predators"). To the best of our knowledge, the present study is the first to report biological impacts resulting from the short exposure of fish group representatives to ZnO NPs. Thus, we believe that it may be important for the knowledge about the ecotoxicological risks of these emerging pollutants.

Keywords: Nanotoxicology, environmental toxicology, aquatic ecosystems, environmental concentrations, fish.

1. INTRODUÇÃO

A poluição dos recursos hídricos constitui preocupação mundial, reflexo direto do descarte inadequado de resíduos nos ecossistemas aquáticos oriundos das mais diferentes atividades antropogênicas (Strokal et al. 2019). Mais recentemente, com o advento da nanotecnologia, uma vasta gama de novos produtos foi criada, beneficiando setores como a saúde, informática, agronegócio, dentre outros (Moreira et al. 2018; Bajorowicz et al. 2018; Alim et al. 2018; Khezri et al. 2018; Sharma et al. 2018). Por outro lado, o descarte inadequado de resíduos contendo nanopartículas (NPs) pode afetar a saúde humana, bem como o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas (Biswas & Sarkar, 2019). Conforme discutido por Hu et al. (2016), as características intrínsecas desses materiais, tais como tamanho, área superficial e capacidade de aglomeração/dispersão podem facilitar a translocação destes pelos sistemas orgânicos, ocasionando ou potencializando uma variedade de efeitos prejudiciais à biota.

Dentre os nanomateriais mais utilizados, as nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO) são mundialmente aplicadas em produtos eletrônicos, cosméticos, catalíticos, cerâmicas, pigmentos inorgânicos, talcos, tintas, xampus anticaspas, dentre (Piccinno et al. 2012; Parihar et al. 2018). Além disso, tem sido avaliada a utilização dessas NPs em processos de tratamento de água (Hong & He, 2012; Dimapilis et al. 2018) e esgoto doméstico (Zhang et al. 2017), remediação ambiental (Rajput et al. 2018; Goyal et al. 2018) e para fins medicinais (Mishra et al. 2017). Logo, é indiscutível as vantagens e aplicações benéficas desses nanomateriais. No entanto, seus potenciais riscos ecotoxicológicos ainda não são amplamente conhecidos.

Nesse sentido, vários estudos têm avaliado os efeitos da exposição de distintos organismos às NPs de ZnO (Rajput et al. 2018). Redução da atividade enzimática, diminuição do número total de bactérias heterotróficas cultiváveis e unidades formadoras de colônias de fungos, alterações na morfologia celular e impactos sobre a diversidade microbiana do solo são alguns dos efeitos tóxicos já relatados em microrganismos (Shen et al. 2015; Rashid et al. 2017; Manzoon et al. 2016 e Read et al. 2016; respectivamente). Em relação às plantas, já foram observados prejuízos na germinação e crescimento de sementes de *Brassica nigra* (Zafar et al. (2016); aumento da produção de reactive oxygen species em milho (Wang et al. 2016), reduzido conteúdo de clorofila nas folhas de *Pisum sativum* L. cultivadas em solo contendo NPs de ZnO (Mukherjee et al. 2014). Além disso, efeitos genotóxicos e

mutagênicos já foram relatadas em *Allium cepa*, *Vicia faba* e *Nicotiana tabacum* expostas a NPs ZnO via cultivo hidropônico (Ghosh et al. 2019).

Quanto aos vertebrados, também já foi relatada uma variedade de efeitos em mamíferos expostos às NP ZnO (Vandebriel & De Jong, 2012), assim como em representantes do grupo das aves (Mesak et al. 2018). Em relação aos peixes, já foi observado aumento do estresse oxidativo em diferentes órgãos de *Oreochromis niloticus* (Kaya et al. 2015; Abdelazin et al. 2018); alterações bioquímicas e efeitos histopatológicos em *Cyprinus carpio* L. (Chupani et al. 2018; Deepa et al. 2019); embriotoxicidade in *Mugilogobius chulae* (Li et al. 2018), efeitos hemato-imunológicos (Suganthi et al. 2018) e genotóxicos em *Oreochromis mossambicus* (Shahzad et al. 2019). Tais estudos constituem importantes contribuições para a identificação e compreensão dos efeitos causados pelas NPs de ZnO sobre os peixes.

Contudo, podemos notar que o foco dessas investigações (e de muitas outras, envolvendo o tema) não tem, definitivamente, levado em consideração os potenciais efeitos de concentrações consideradas ecologicamente relevantes. Estudos recentes, por meio de modelos preditivos sugerem que as NPs de ZnO estão presentes nas águas superficiais em concentrações nanométricas (Boxall et al. 2007; Gottschalk et al. 2009; Gottschalk et al. 2011; Sun et al. 2014; Dumont et al. 2015; Markus et al. 2016), isto é, muito inferior àquelas avaliadas nos estudos supracitados. Portanto, tais investigações podem estar fornecendo resultados superestimados sobre os efeitos desses nanomateriais sobre a biota aquática.

Outro ponto importante, refere-se à lacuna do conhecimento sobre a influência das NPs de ZnO no comportamento dos peixes. Conforme discutido por Gerhardt (2007), alterações sutis no comportamento dos organismos podem induzir mudanças significativas na dinâmica de suas populações e ocasionar flutuações nas comunidades locais/regionais. Logo, alterações nos comportamentos dos animais expostos às NPs de ZnO podem constituir biomarcadores de neurotoxicidade importantes para a identificação precoce de impactos da poluição, bem como subsídios para a proposição de medidas de mitigação ou remediação desses impactos. Nesse sentido, objetivamos avaliar se a curta exposição a NPs de ZnO pode constituir fator de risco à saúde dos peixes, utilizando indivíduos da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo) como sistema modelo. Partimos da hipótese de que baixas concentrações de NP de ZnO, por um curto período de exposição, induzem alterações locomotoras, preditivas de ansiedade, bem como de déficit alimentar e de resposta defensiva antipredatória.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e delineamento experimental

Utilizamos em nosso estudo 48 indivíduos juvenis ($0,70 \text{ g} \pm 0,04 \text{ g}$ e $2 \text{ cm} \pm 0,3 \text{ cm}$ de comprimento, de ambos os sexos) da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo; família Cichlidae, linhagem GIFT), a qual é originária do continente africano, tendo sido introduzida em diferentes países tropicais e subtropicais (Kolding et al. 1993; Duponchelle & Legendre, 2000). A escolha por esse sistema modelo deu-se em função de sua boa adaptabilidade a ambientes laboratoriais, alta resistência a doenças, fácil manejo e, sobretudo, por apresentar sensibilidade a diferentes poluentes [vide revisões de Henry (2015) e Yancheva et al. (2015)]. Os espécimes foram obtidos de criadouro comercial (Goiânia, Brasil) e trazidos para o biotério de peixes do Laboratório de Pesquisas Biológicas (IF Goiano, Urutaí, Brasil).

No laboratório (temperatura e iluminação controladas ($24 \pm 2^\circ \text{ C}$ e 12 h claro/12 h escuro), os animais foram mantidos em aquários de dimensões (40 cm de comprimento x 35 cm de largura e 17,8 cm de altura), com água desclorada (naturalmente), oxigenação constante, sem qualquer substrato de fundo. Os animais foram alimentados (quantidade equivalente à 3% da biomassa corporal [e.g.: Boscolo et al. (2018)] duas vezes ao dia, com ração comercial própria para a espécie, a qual continha os seguintes níveis de garantia: 45% (mín.) proteína bruta (PB), 14% (mín.) extrato etéreo (EE), 5% (mín.) fibra bruta (FB), 14% (máx.) matéria mineral (MM); e 87% (mín.) matéria seca (MS).

Após 30 dias de aclimação no laboratório, os animais foram contrabalanceados a partir da covariável “peso” para que, no início do experimento, não houvesse diferenças entre a biomassa corpórea dos peixes. Posteriormente, os peixes foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais ($n=16/\text{grupo}$): (i) grupo controle, composto por peixes mantidos em água isenta de qualquer tipo de NP; (ii) grupo NP-CA1x, formado por animais expostos à água contendo NPs de ZnO em concentração ambiental preditiva ($760 \mu\text{g/L}$) e (iii) grupo NP-CA100x, cuja concentração de NP de ZnO na água de exposição era 100 vezes superior à anterior ($76000 \mu\text{g/L} = 76 \text{ mg/L}$). Os animais foram expostos aos tratamentos por 72 horas. Além disso, adotamos um sistema estático de exposição, não tendo sido trocadas as águas ao longo do período experimental.

A concentração ambientalmente relevante definida em nosso estudo foi baseada no estudo de Boxal et al. (2007), os quais utilizaram algoritmos matemáticos para estimar a concentração de NP de ZnO em águas superficiais. Esses autores consideraram a fração

dessas NPs encontradas em produtos cosméticos, de higiene pessoal e tintas, prevendo que a concentração de 760 µg/L representava um cenário pessimista, o qual desconsiderava a possibilidade de remoção desses nanomateriais de rios poluídos e o tratamento de efluentes domésticos ou industriais antes de seus lançamentos nos corpos hídricos. Por outro lado, a concentração definida no grupo NP-CA100x pode representar uma situação ainda mais extrema representativa de um ambiente fluvial receptor de grandes quantidades de NPs de ZnO via, por exemplo, efluentes industriais/domésticos.

As NPs de ZnO que utilizamos foram adquiridas da Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA (CAS: 544906, 99% de pureza) (diâmetro de $68,96 \pm 33,71$ nm), cuja caracterização química foi realizada em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (Mesak et al. 2019).

2.2. Análises comportamentais

No último dia experimental, os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais, tidos como biomarcadores de neurotoxicidade das NPs de ZnO. Cada animal foi submetido aos testes de forma sequencial em um mesmo dia e aquário, afim de evitar estresse adicional em decorrência de manuseios excessivos, conforme proposto por Ramos et al. (2008) e realizado recentemente por Souza et al. (2018). Todos os testes foram realizados em sala específica com isolamento acústico, controle de temperatura e luminosidade.

2.2.1. Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi realizado a fim de avaliarmos possíveis efeitos dos tratamentos sobre a atividade locomotora geral dos animais e, em particular, sobre o comportamento exploratório, o qual constitui uma resposta crucial à novidade. Para isso, adotamos os procedimentos descritos por Baker et al. (2018), com algumas modificações. Brevemente, cada animal (individualmente) era introduzido no centro de um aquário (40 cm de comprimento x 35 cm de largura x 17,8 cm de altura – Figura 1A) contendo 10 L de água descolorada, cujas laterais eram opacas e brancas. Em seguida, os animais eram filmados por 3 min, permitindo-os explorar livremente toda a dimensão do aquário. Durante esse período foram registrados o total de cruzamentos dos quadrantes traçados no fundo do aquário, distância percorrida, bem como o índice de ansiedade. Esse último foi calculado com base em Estrela et al. (2015), composto pela razão entre a locomoção dos animais nos quadrantes centrais e a locomoção total.

2.2.2. Teste de transição claro/escuro

Na sequência do teste do campo aberto, os animais foram cuidadosamente levados para uma das extremidades do aquário, por uma divisória que os impedia de visualizar a movimentação dos pesquisadores na sala de teste. Nessa extremidade, os animais permaneciam por 2 min, tempo suficiente para que fosse acoplado ao aquário uma estrutura pré-moldada de cor preta que cobria metade do aquário (parte superior e suas laterais) (Figura 1B-C). Depois disso, a repartição que isolava o animal em uma das extremidades era retirada e, concomitantemente, a outra metade do aquário recebia intensa iluminação fornecida por um iluminador de LED de 6 watts (Figura 1D). Após 3 min de filmagem (contados a partir da retirada da divisória que dividia o aquário em dois compartimentos), os seguintes parâmetros foram registrados: latência (s) para primeira ida ao compartimento claro, frequência de idas e tempo (s) de permanência no compartimento claro e a atividade locomotora dos animais (aferida pelo total de cruzamentos dos quadrantes traçados no fundo do aquário, proporcionais ao tempo de permanência no compartimento iluminado).

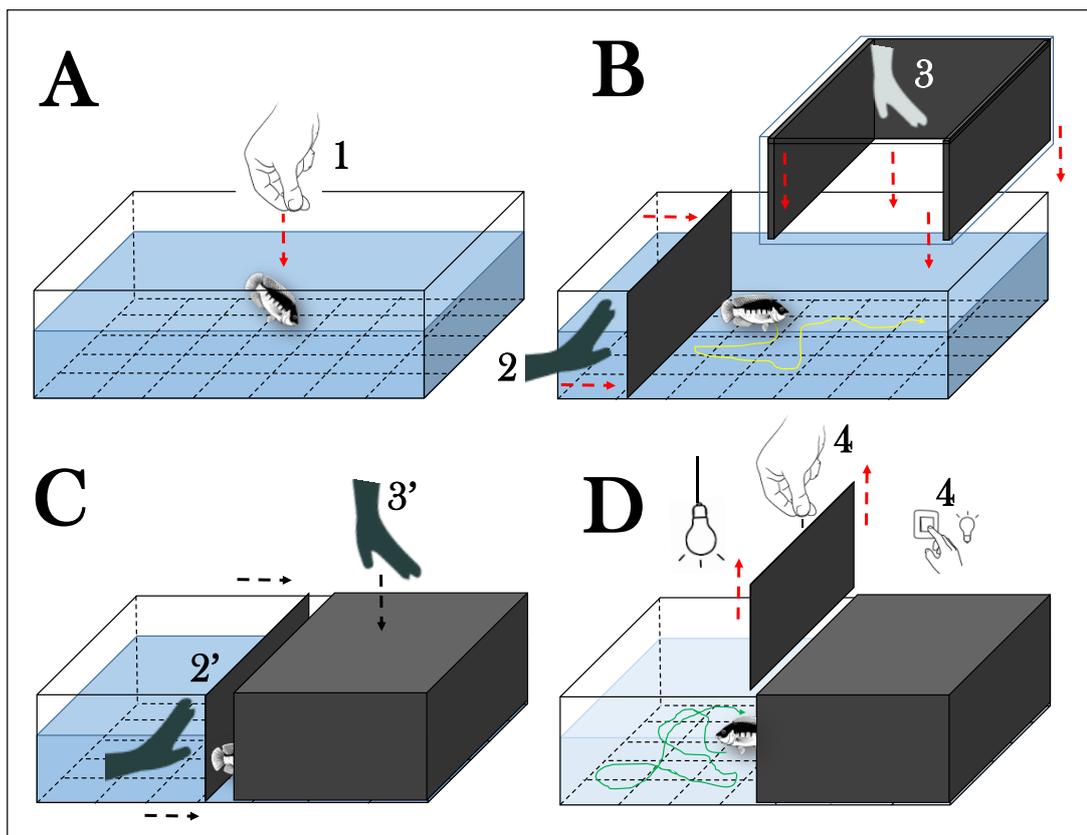


Figura 1. Desenhos esquemáticos e ordem sequencial de realização dos testes do campo aberto e de transição claro-escuro. (A) Representação do aparato utilizado no teste do campo aberto; (B-C) procedimentos sequenciais realizados logo depois do teste do campo aberto e (D) representação da realização do teste de transição claro-escuro. Os números indicados na figura indicam a sequência em que os procedimentos foram realizados. Os números iguais indicam que os eventos ocorreram simultaneamente e aqueles seguidos de (') indicam uma sequência mais avançada da realização de um mesmo procedimento. As cores são meramente ilustrativas.

2.2.3. Teste de comportamento alimentar

Neste teste avaliamos possível efeito dos tratamentos sobre o comportamento alimentar das tilápias, estimulado por pellets de ração comercial específica para a espécie, semelhantemente aos procedimentos adotados por Domingues et al. (2016). Para isso, logo após o teste anterior, os animais foram direcionados novamente para uma das extremidades do aquário (Figura 2A), onde permaneceram por 1 min. Na sequência, tal divisória foi removida imediatamente após a introdução de três pellets esférica de ração ($6,2 \text{ mg} \pm 1,5 \text{ mg/cada}$, totalizando $18,6 \text{ mg} \pm 3,8 \text{ mg}$ de ração; $143 \text{ mm} \pm 13,19 \text{ mm}$ de diâmetro) na região central da extremidade oposta do aquário (Figura 2B). Ao final de 3 min, os seguintes parâmetros foram avaliados: latência (s) para captura do primeiro pellet de ração, distância (cm) percorrida e escore de ingestão, tendo sido atribuída uma pontuação de 0 a 3, equivalente à quantidade de pellets de ração ingerida pelas tilápias durante o teste.

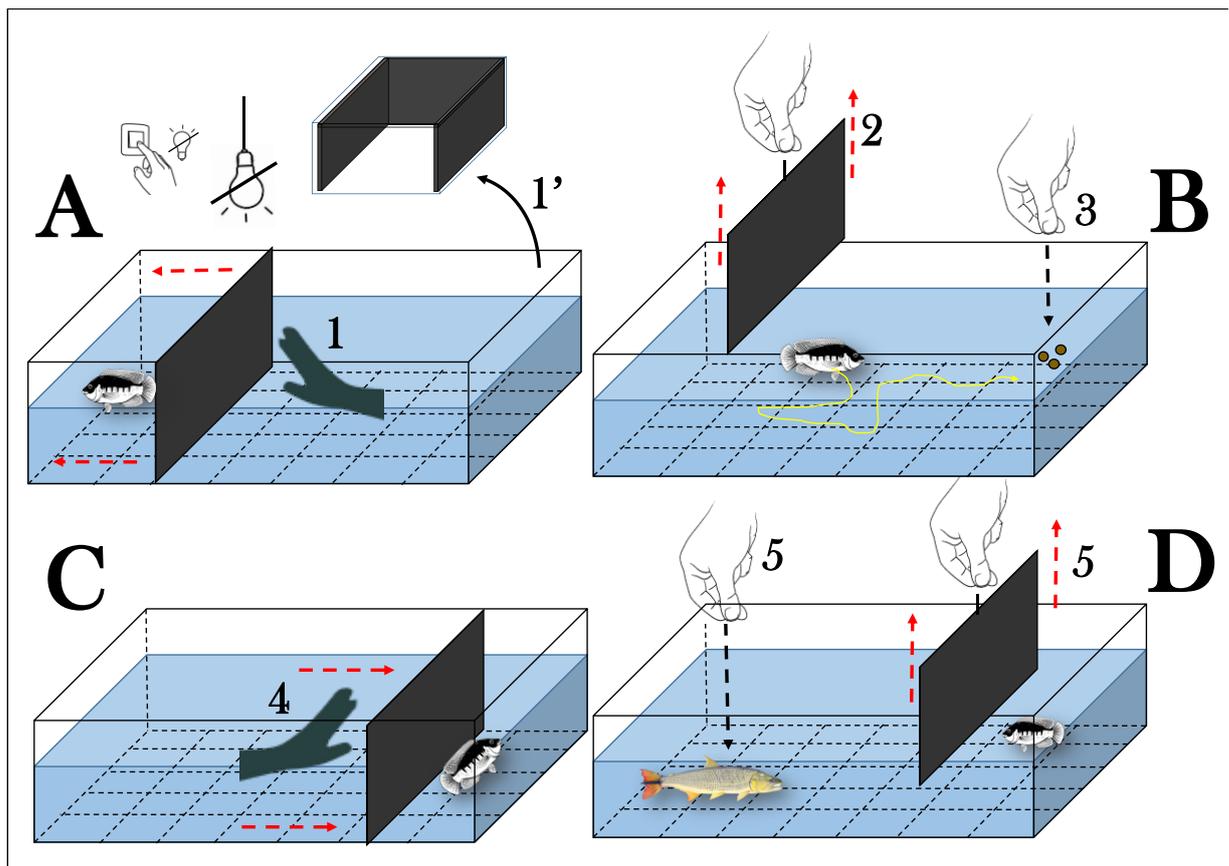


Figura 2. Desenhos esquemáticos e ordem sequencial de realização dos testes de comportamento alimentar e de resposta defensiva antipredatória (condição individual). (A-B) Representação da dinâmica sequencial adotada para a realização do teste de comportamento alimentar. (C) Organização prévia do aparato para posterior realização do (D) teste de resposta defensiva antipredatória. Os números indicados na figura indicam a sequência em que os procedimentos foram realizados. Os números iguais indicam que os eventos ocorreram simultaneamente e aqueles seguidos de (') indicam uma sequência mais avançada da realização de um mesmo procedimento. As cores são meramente ilustrativas.

2.2.4. Teste de resposta defensiva antipredatória – condição individual

Neste teste, nosso objetivo foi avaliar se os tratamentos afetaram as habilidades inatas defensivas dos animais, quando confrontados individualmente com um potencial predador. Assim, logo após o teste anterior, os peixes foram novamente direcionados à uma das extremidades do aquário, onde permaneceram por 1 min. Em seguida, na extremidade oposta, foi introduzido um juvenil da espécie *Salminus brasiliensis* e, concomitantemente, a divisória que isolava as tilápias foi removida. Vale salientar que os indivíduos de *S. brasiliensis* possuíam 10-11 cm de comprimento e 6,3 g de biomassa corpórea, isto é, aproximadamente cinco vezes mais compridos e quase dez vezes mais pesados que tilápias. Segundo Gubiani et al. (2010), tal espécie é reconhecida como predadora natural de pequenos peixes em ambientes naturais. Após isso, os animais foram filmados por 3 min, para posterior registro da frequência de exibição do comportamento de evitação, fuga explosiva e de territorialismo.

O comportamento de evitação foi registrado quando os indivíduos de *O. niloticus* claramente mudavam abruptamente sua rota de natação, evitando o confronto direto com seu predador. Já a fuga explosiva era registrada quando as tilápias, em confronto com o predador, saltavam ou nadavam velozmente e desorientadamente em direção oposta ao predador. Ambos comportamentos, foram avaliados, pois constituem parte do perfil de respostas defensivas naturais de várias espécies de peixes diante de uma potencial ameaça predatória (Gerlai et al. 2009; Ahmed et al. 2011). Por outro lado, o comportamento territorialista [típicos das tilápias – Barreto et al. (2011)] também foi avaliado. O registro de tal comportamento ocorria sempre que haviam interações agressivas, caracterizadas por ataques frontais ou laterais de *O. niloticus* em seus predadores (*S. brasiliensis*).

Vale ressaltar que os *S. brasiliensis* foram alimentados momentos antes de serem introduzidos no aquário teste a fim de não predarem as tilápias, servindo-se de estímulo visual, olfatório e sensorio-motor. A atividade locomotora desses animais também foi aferida pelo total de cruzamentos dos quadrantes traçados no fundo aquário. Assim, os comportamentos das tilápias foram apresentados de forma relativizada, a partir dos índices de evitação, fuga e de territorialismo, dado pela seguinte fórmula: $(I = F_{\text{presa}} / AL_{\text{predador}})$, onde “I” refere-se ao índice dado pela razão entre a frequência de exibição dos comportamentos da presa ($F_{\text{presa}} = O. niloticus$) e a atividade locomotora geral do predador ($AL_{\text{predador}} = S. brasiliensis$).

2.2.5. Teste de resposta defensiva antipredatória – condição coletiva

Logo após a finalização dos testes anteriores, os animais voltaram aos seus aquários residências (no biotério), onde permaneceram por 3 h, para somente depois pudéssemos avaliar possíveis efeitos negativos dos tratamentos sobre a resposta defensiva predatória coletiva. Em seguida, os grupos foram levados à sala de testes, tendo sido introduzidos em outro aquário (85 cm de comprimento x 40 cm de largura x 40 cm de altura – Figura 3A), contendo 50 L de água desclorada. Nesse aquário existiam dois compartimentos, sendo um deles denominado de “zona do predador” (Figura 3A), onde posteriormente seriam introduzidos os potenciais predadores das tilápias. Já o outro compartimento podia ser explorado livremente pelas tilápias.

Após introduzir todos os animais no aquário, estes permaneceram por um período de habituação de 3 min, sendo essa etapa a primeira sessão do teste (Figura 3A). Posteriormente, três peixes (iscas artificiais) de silicone inodoro de cor, tamanho e aparência semelhantes a um *S. brasiliensis* foram introduzidos na “zona do predador” (Figura 3B), sendo as tilápias filmadas por mais 3 min. Na sequência, os “falsos predadores” foram substituídos por três indivíduos de *S. brasiliensis* e, as tilápidas, filmadas por mais 3 min (Figura 3C). A segunda e última sessão foram importantes para avaliarmos se as tilápias responderiam a qualquer objeto introduzido no aquário ou se conseguiam reconhecer os *S. brasiliensis* como potenciais ameaças predatórias.

Para a análises dos parâmetros comportamentais, inicialmente o fundo do aquário foi dividido em três áreas (por meio de linhas virtuais), contendo 23,3 cm de comprimento/cada. A área mais próxima da “zona do predador” foi denominada de “zona aversiva” e a mais distante, “zona de refúgio” (Figura 3D) Para o cálculo dos índices de permanência nas zonas aversiva e de refúgio os vídeos de cada sessão do teste foram fotografados em intervalos de 10 s (totalizando 18 imagens/sessão/grupo), adotando-se a seguinte fórmula: $I = Nz/Nt$, onde “I” refere-se ao índice, “Nz” ao número de indivíduos localizados nas zonas aversiva ou de refúgio e “Nt” o número total de peixes no aquário, multiplicado por 100.

Além desses índices, calculamos os escores de cluster semelhantemente aos estudos de Parker et al. (2014) e de Faria et al. (2018). Para isso, o assoalho do aquário foi dividido em quadrantes virtuais de 11,5 cm x 10 cm (total de 24 quadrantes) (Figura 3E). Tais escores também foram calculados a partir das fotografias dos vídeos utilizadas anteriormente (i.e.: 18 imagens/grupo), os quais corresponderam à razão entre o número máximo de peixes em um

único quadrante e o total de quadrantes ocupados pelos peixes. Assim, para cada tempo de análise (de 10 em 10 s) obtínhamos uma pontuação de cluster, que refletia maior ou menor agregação dos grupos de peixes em resposta à presença ou ausência de seus potenciais predadores.

2.3. Bioacumulação de Zn e parâmetros de qualidade da água

A fim de correlacionarmos as possíveis alterações comportamentais das tilápias em decorrência da exposição às NPs de ZnO, ao final do experimento os animais foram eutanasiados para quantificação de Zn corporal, com base em Souza et al. (2018), com algumas modificações. Resumidamente, os animais foram macerados e digeridos em béqueres que continham 2 mL de solução de digestão (ácido nítrico a 75% (HNO₃): 70% de ácido perclórico (HClO₄) = 1: 1 v/v) e, posteriormente, colocados em uma placa aquecedora durante 6 h a 80° C. Após a digestão das amostras, os vidros relógios colocados acima dos béqueres foram removidos e o processo de aquecimento continuou a 80° C até a secagem total. Em seguida, adicionou-se 5% de HNO₃ para dissolver o resíduo da amostra, completando o volume final para 5 mL. A solução foi então analisada através de espectrometria de absorção atômica com chama, conforme procedimentos descritos por Dutra et al. (2006), utilizando os padrões de calibração 0,1, 1,0 e 10 mg/kg de Zn para validar o método. Os resultados foram expressos em mg/g de biomassa corpórea registrada ao final do experimento. Adicionalmente, monitoramos a qualidade físico química das águas de exposição duas vezes ao dia, utilizando um multiparâmetro portátil.

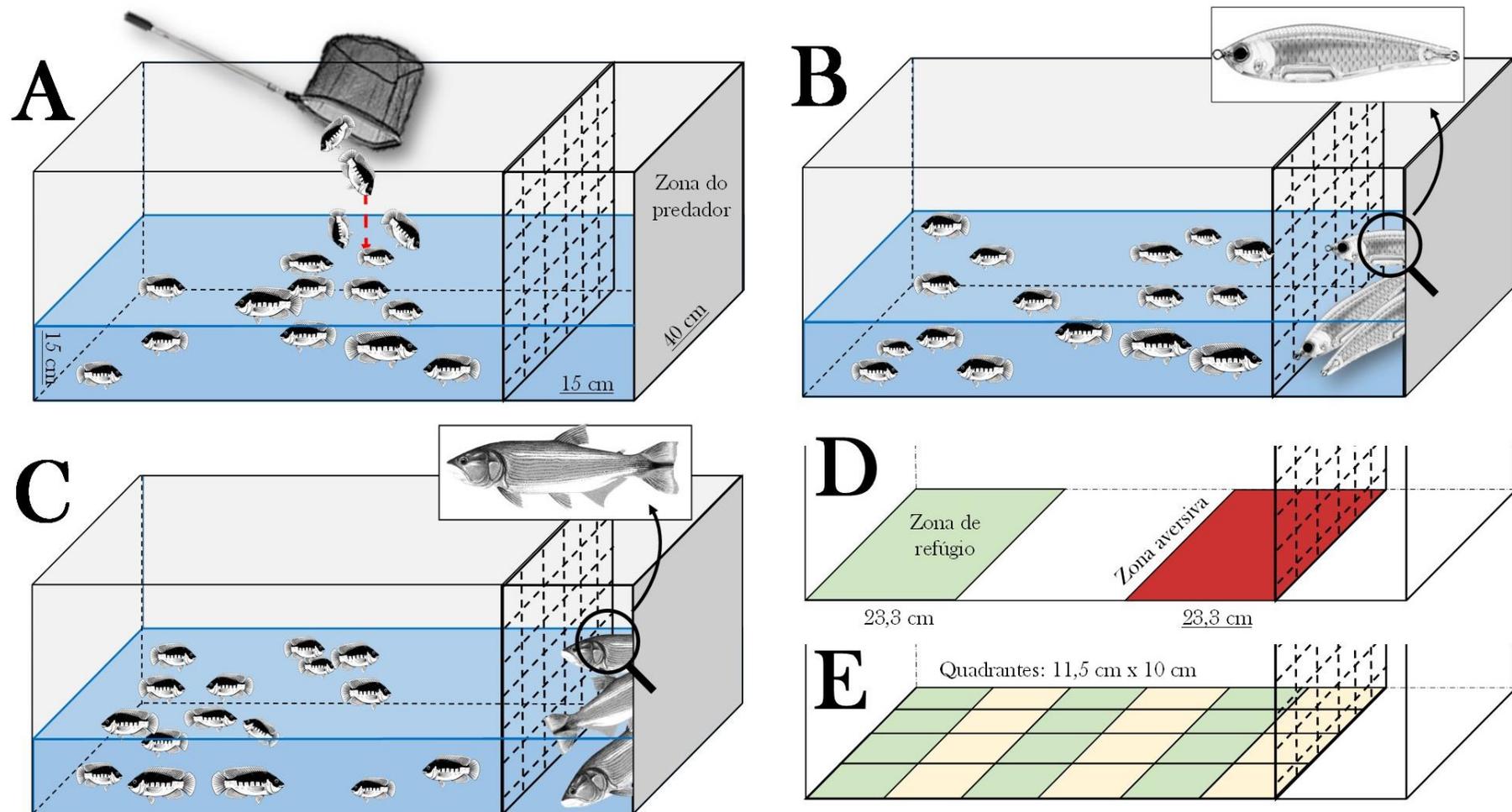


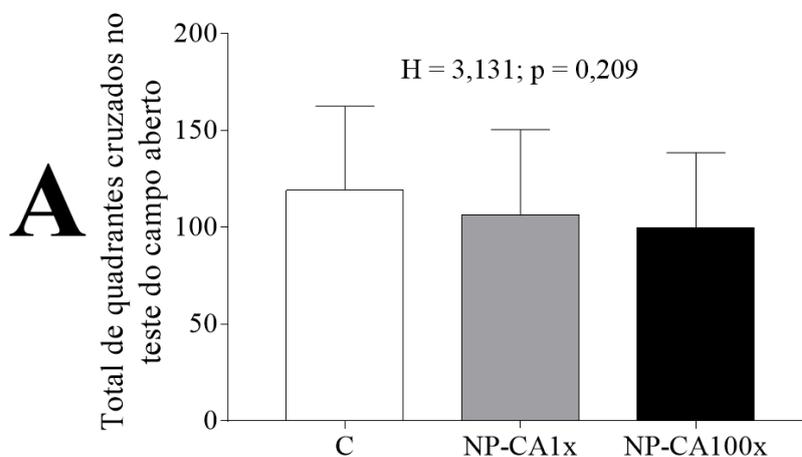
Figura 3. (A-C) Desenhos esquemáticos da ordem sequencial das sessões do teste de resposta defensiva antipredatória (condição coletiva): (A) habituação, (B) sessão com predador falso (iscas artificiais) e (C) com predador verdadeiro (*S. brasiliensis*). (D) e (E) demonstram as zonas e quadrantes traçados no fundo do aquário para cálculo dos índices de permanência na zona aversiva e de refúgio, bem como para a pontuação de cluster, respectivamente. As cores são meramente ilustrativas.

2.4. Análises dos dados

Inicialmente a normalidade residual de todos os dados foi verificada utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Já o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não-paramétricos, utilizando-se como pós-teste o teste de Dunn's, também a 5% de probabilidade. Além disso, análises de correlação também foram realizadas de acordo com o método de Spearman's. Ressalta-se que todos os vídeos dos testes comportamentais foram analisados utilizando-se o software OpenFLD. Já a análise e elaboração dos gráficos foram conduzidas no software GraphPad Prism (versão 7.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro teste que realizamos foi o do campo aberto, o qual tem sido extensivamente utilizado na avaliação da atividade exploratória geral de diferentes modelos animais [e.g.: roedores (Sturman et al. 2018), aves (Faria et al. 2018) e peixes (Carty et al. 2019)]. Tal teste é também comumente utilizado para avaliar efeitos ansiogênicos, ansiolíticos, sedativos ou estimulantes em animais submetidos à vários agentes tóxicos (Johnson & Hamilton, 2017). Em nosso estudo não observamos qualquer efeito nas habilidades locomotoras dos animais, considerando o total de quadrantes cruzados e a distância percorrida durante o teste (Figura 4A-B). Além disso, a proporção entre os cruzamentos de quadrantes percorridos na região central do aquário e o total de cruzamentos (índice de ansiedade – vide item 2.2.1) não revelou efeito ansiogênico ou ansiolítico das NPs de ZnO sobre as tilápias (Figura 4C).



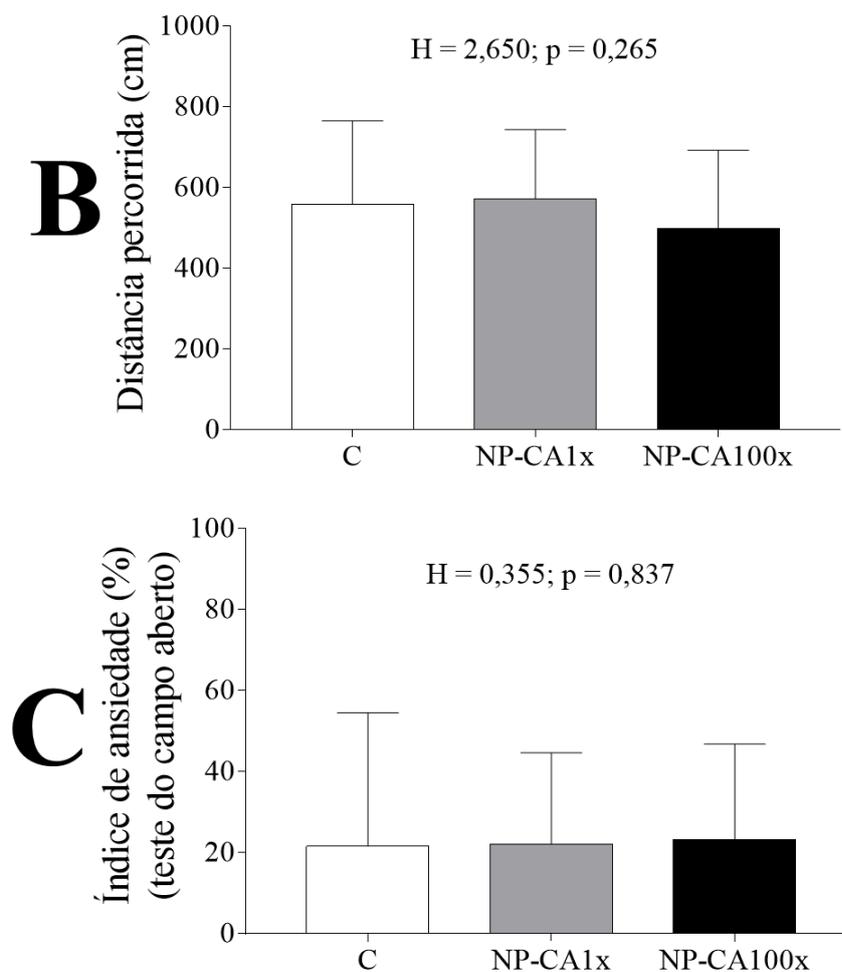


Figura 4. (A) Total de quadrantes cruzados, (B) distância (cm) percorrida e (C) índice de ansiedade de *Oreochromis niloticus* submetidos ou não às NPs de ZnO e submetidas ao teste do campo aberto. As barras indicam a média \pm desvio padrão. C: controle; NP-CA1x: 760 $\mu\text{g/L}$; NP-CA100x: 76000 $\mu\text{g/L}$. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade (n=16/cada grupo).

Também não observamos efeitos dos tratamentos sobre qualquer um dos parâmetros avaliados no teste de transição claro-escuro. A latência para locomoção até o compartimento claro, bem como o tempo e a frequência de idas neste compartimento não diferiram entre os grupos experimentais (Figura 5A-C). Além disso, a ausência de diferenças entre os grupos quanto ao total de cruzamento dos quadrantes traçados no fundo do aquário confirma que a exposição às NPs de ZnO não ocasionou hipo- ou hiperatividade nas tilápias (Figura D).

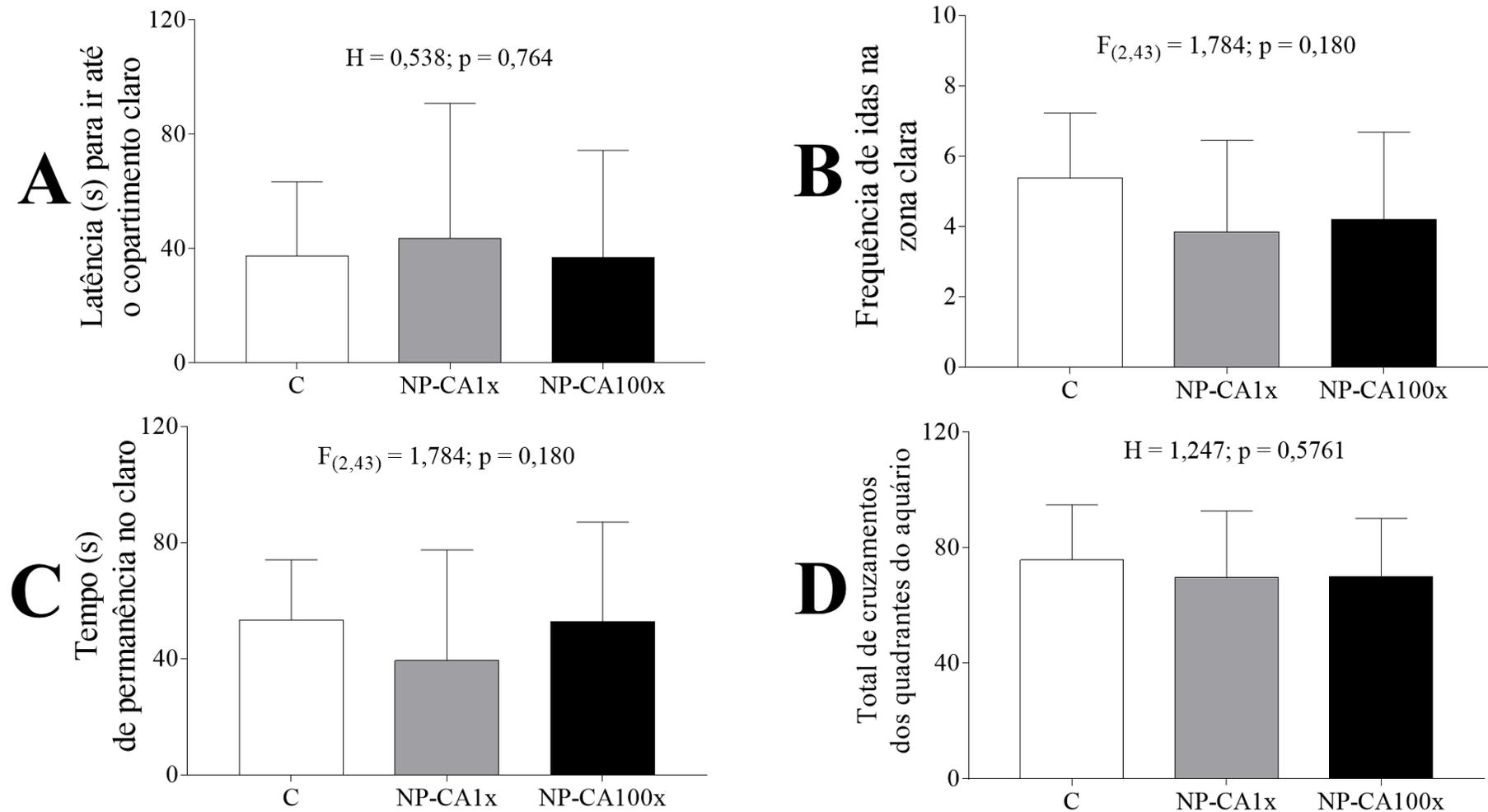


Figura 5. (A) Latência para a primeira ida ao compartimento claro, (B) frequência e (C) tempo de idas ao compartimento claro, bem como (D) total de cruzamento dos quadrantes traçados no fundo do aquário (proporcional ao tempo de permanência dos animais no compartimento claro) de *Oreochromis niloticus* submetidas ou não às NPs de ZnO. As barras indicam a média \pm desvio padrão. C: controle; NP-CA1x: 760 $\mu\text{g/L}$; NP-CA100x: 76000 $\mu\text{g/L}$. Em “A e D”, os dados foram submetidos ao teste não-paramétricos de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade. Já em “B e C”, os dados foram submetidos à one-way ANOVA, também à 5% de probabilidade (n=16/cada grupo).

Por outro lado, observamos diferenças significativas entre os parâmetros avaliados no teste de comportamento alimentar. Observamos que os animais expostos às NPs de ZnO apresentaram maior latência para se alimentar do primeiro pellet de ração (Figura 6A), maior distância percorrida no aquário antes da primeira alimentação (Figura 6B), bem como menor escore de alimentação (Figura 6C), quando comparados ao grupo controle.

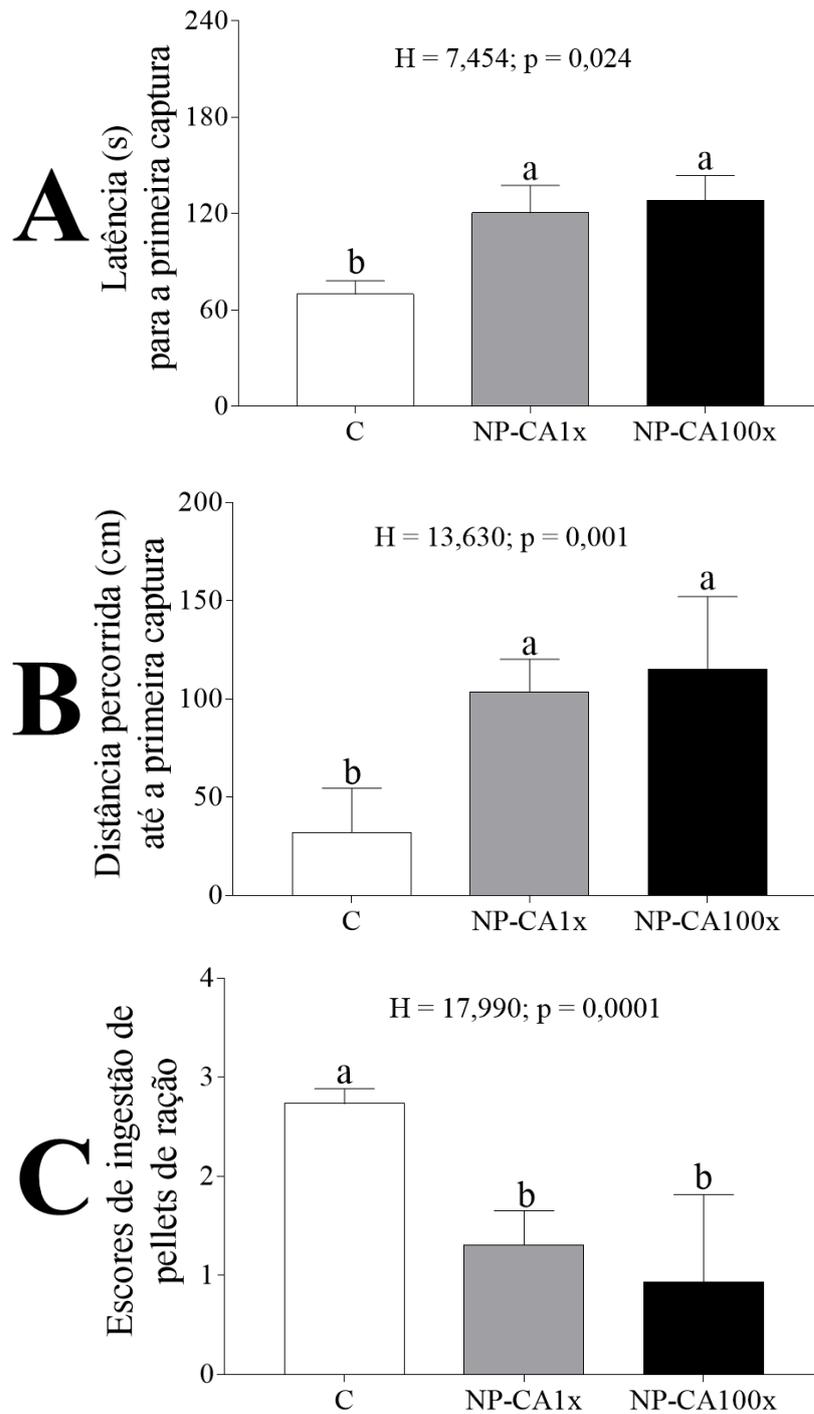


Figura 6. (A) Latência para alimentação do primeiro pellet de ração, (B) distância percorrida antes da primeira

alimentação e (C) escore de alimentação de *Oreochromis niloticus* submetidas ou não às NPs de ZnO. As barras indicam a média \pm desvio padrão. C: controle; NP-CA1x: 760 $\mu\text{g/L}$; NP-CA100x: 76000 $\mu\text{g/L}$. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétricos de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade, com pós-teste de Dunn's, à 5% de probabilidade (n=16/cada grupo).

Esses dados são particularmente interessantes, uma vez que alterações no comportamento alimentar podem ter consequências negativas nas relações presas-predadores, bem como nos indivíduos, diminuindo suas vantagens competitivas. Apesar de nunca ter sido relatado alterações semelhantes em peixes expostos a concentrações ambientais de NPs de ZnO, efeitos análogos já foram observados em espécies de peixes expostas a distintos poluentes, tais como farmacêuticos (Nassef et al. 2010; Santos et al. 2018); agrotóxicos (Baldwin et al. 2009), microplásticos (Lu et al. 2016), nanoplásticos (Cedervall et al. 2012), dentre outros [vide revisão de Kasumyan (2001)], cujos mecanismos de ação dos poluentes são dependentes dos sistema-modelos e de suas características químicas.

Em nosso estudo, não avaliamos os possíveis mecanismos de ação das NPs de ZnO e, portanto, estes constituem desafios para investigações futuras. Contudo, arriscamos sugerir que a desmotivação alimentar observada pode estar associada a aspectos biológicos que modulam o comportamento alimentar dos peixes. Nesse caso, uma possibilidade estaria relacionada às mudanças causadas pelas NPs de ZnO nos níveis de serotonina, um importante neurotransmissor que sabidamente medeia diferentes comportamentos nas tilápias, incluindo o comportamento alimentar (Cham et al. 2018). Obviamente, as causas dessas mudanças podem ser diversas, incluindo danos em rotas neuronais envolvendo regiões cerebrais importantes do sistema serotoninérgico dos animais (e.g.: glândula pineal, pretectal, núcleo periventricular do hipotálamo, assim como dos núcleos da rafe rostral e caudal). Também não podemos descartar a hipótese das NPs de ZnO terem agido em nível molecular, alterando, por exemplo, a expressão de genes específicos ligados à síntese de serotonina (e.g.: gene RNF38 – Cham et al. 2018) e/ou de seus receptores celulares. Além disso, é possível que as NPs possam ter causado mudanças nos níveis de mediadores químicos intracelulares importantes no funcionamento do sistema serotoninérgico, tal como o cAMP, o que afetaria diretamente os níveis de serotonina. O estudo de Tian et al. (2015) relatou que os níveis de cAMP hipocampal de camundongos expostos à NPs de ZnO foram significativamente reduzidos, o que reforça essa hipótese. Mecanismo alternativo também pode estar envolvido direta ou indiretamente à síntese ou liberação da pró-opiomelanocortina (POMC), hormônio ligado bioquimicamente a rotas de controle da saciedade, balanço energético, dentre outros (Cowley

et al. 2001). Em *Salmo salar*, Hampel et al. (2014) observaram que os níveis de RNAm de POMC aumentou significativamente após 5 dias de exposição ao poluente carbamazepina, demonstrando que essa rota pode ser afetada por um poluente aquático.

Por outro lado, é pouco provável que a exposição às NPs de ZnO tenha causado perda olfatória (anosmia) nos animais, o que explicaria a baixa motivação para a alimentação. Isso porque já foi demonstrado que a perda olfatória em peixes induz um estado ansiogênico Abreu et al. (2016), o qual teria sido observado nos testes do campo aberto e de transição claro-escuro. Além disso, podemos descartar a hipótese de que mudanças na qualidade físico-química das águas de exposição causadas pelas NPs de ZnO teriam prejudicado o comportamento alimentar das tilápias, como já observado em outros estudos envolvendo outros poluentes aquáticos [vide revisão de Kasumyan (2001)]. Conforme pode ser observado na Tabela 1, os parâmetros físico-químicos das águas de exposição não diferiram entre os tratamentos.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos e químicos das águas contendo ou não diferentes concentrações de NPs de ZnO.

Atributos	Grupos experimentais			Sumário das análises estatísticas
	C	NP-CA1x	NP-CA100x	
Temperatura (° C)	25,3 ± 0,17	25,7 ± 0,23	26,15 ± 0,33	H = 3,71; p = 0,170
Resistividade (mΩ/cm)	7,06 ± 0,90	7,24 ± 1,03	7,02 ± 0,68	H < 0,03; p > 0,999
Condutividade elétrica (mS/cm)	146,3 ± 22,38	145,8 ± 19,29	145,0 ± 12,32	H < 0,03; p > 0,999
Sólidos totais dissolvidos	72,63 ± 12,95	72,41 ± 9,31	70,05 ± 6,20	H = 0,01; p = 0,980
Salinidade (%)	0,25 ± 0,02	0,225 ± 0,04	0,20 ± 0,04	H = 0,81; p = 0,844
pH	8,4 ± 0,17	7,9 ± 0,05	7,9 ± 0,04	H = 4,21; p = 0,129
Oxigênio dissolvido (mg/L)	7,9 ± 0,23	7,6 ± 0,30	7,3 ± 0,49	H = 1,24; p = 0,572

Legenda: C: controle; NP-CA1x: 760 µg/L; NP-CA100x: 76000 µg/L. Os dados representam a média ± o desvio padrão, tendo sido submetidos ao teste não-paramétricos de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

Nós também observamos efeitos prejudiciais das NPs de ZnO sobre a resposta defensiva antipredatória das tilápias. Quando confrontadas individualmente com seus potenciais predadores, as tilápias expostas às NPs apresentaram menor índice de evitamento, menor fuga explosiva e menor comportamento territorialista, quando comparadas àquelas não

expostas (Figura 7A-C). Tais comportamentos evidenciam, portanto, claro déficit responsivo frente à potencial ameaça predatória representada pelos *S. brasiliensis*, o que sugere que outras regiões e/ou sistemas neuroendócrinos também podem ter sido afetados pela exposição às NPs de ZnO.

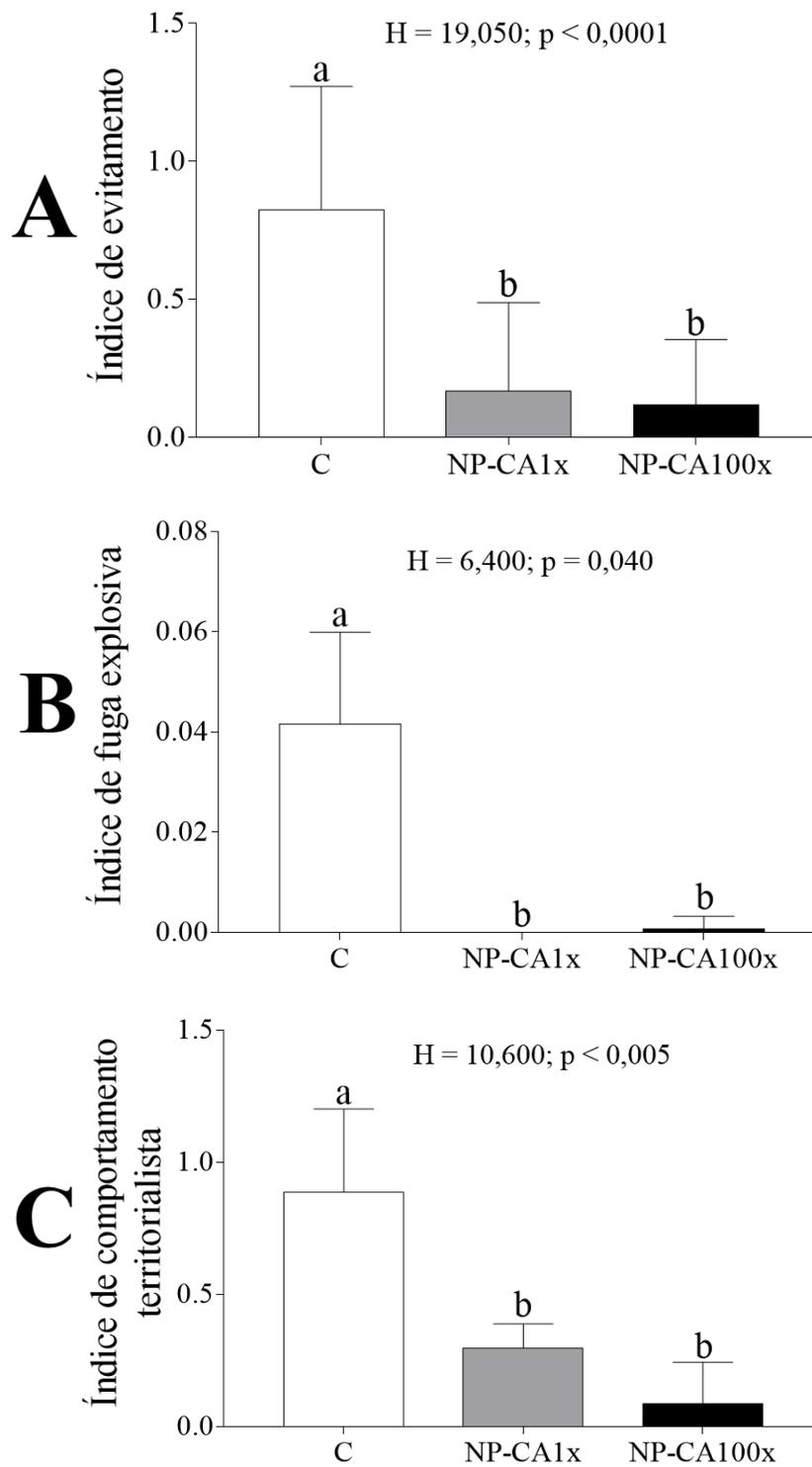
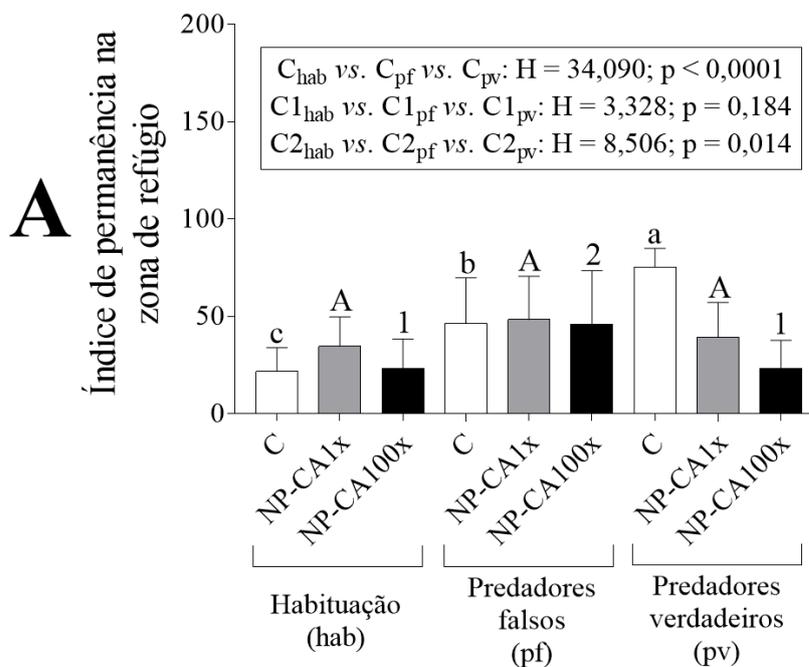


Figura 7. Índices de (A) evitamento, (B) fuga explosiva e (C) de comportamento territorialista registrados para *Oreochromis niloticus* (expostas ou não às NPs de ZnO) confrontadas com seu potencial predador *Salminus brasiliensis*. As barras indicam a média \pm desvio padrão. C: controle; NP-CA1x: 760 $\mu\text{g/L}$; NP-CA100x: 76000 $\mu\text{g/L}$. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétricos de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's, a 5% de probabilidade (n=16/cada grupo).

Déficit responsivo semelhante também foi observado na condição coletiva do teste de resposta ao predador. Enquanto os índices de permanência na zona de segurança registrados para os animais do grupo NP-CA1x foram estatisticamente iguais, nas distintas sessões do teste; no grupo NP-CA100x, este índice foi maior na presença do predador falso (Figura 8A). Outro indício de déficit responsivo é fornecido pelos índices de permanência na zona aversiva, tida como a mais próxima da zona do predador e, portanto, aquela que simularia maior risco de predação. Não observamos diferenças entre os índices dessa zona registrados na ausência de predador (sessão habituação) e na presença dos *S. brasiliensis* (grupo NP-CA1x, Figura 8B). Já as tilápias expostas à maior concentração de NPs de ZnO (grupo NP-CA100x), embora tenham permanecidas menos tempo na zona aversiva quando os *S. brasiliensis* foram introduzidos no aquário, tal índice não diferiu daquele registrado na presença dos falsos predadores. Logo, esses dados sugerem não apenas inabilidade dos reconhecerem *S. brasiliensis* como potenciais predadores, mas também de distingui-los de iscas artificiais.



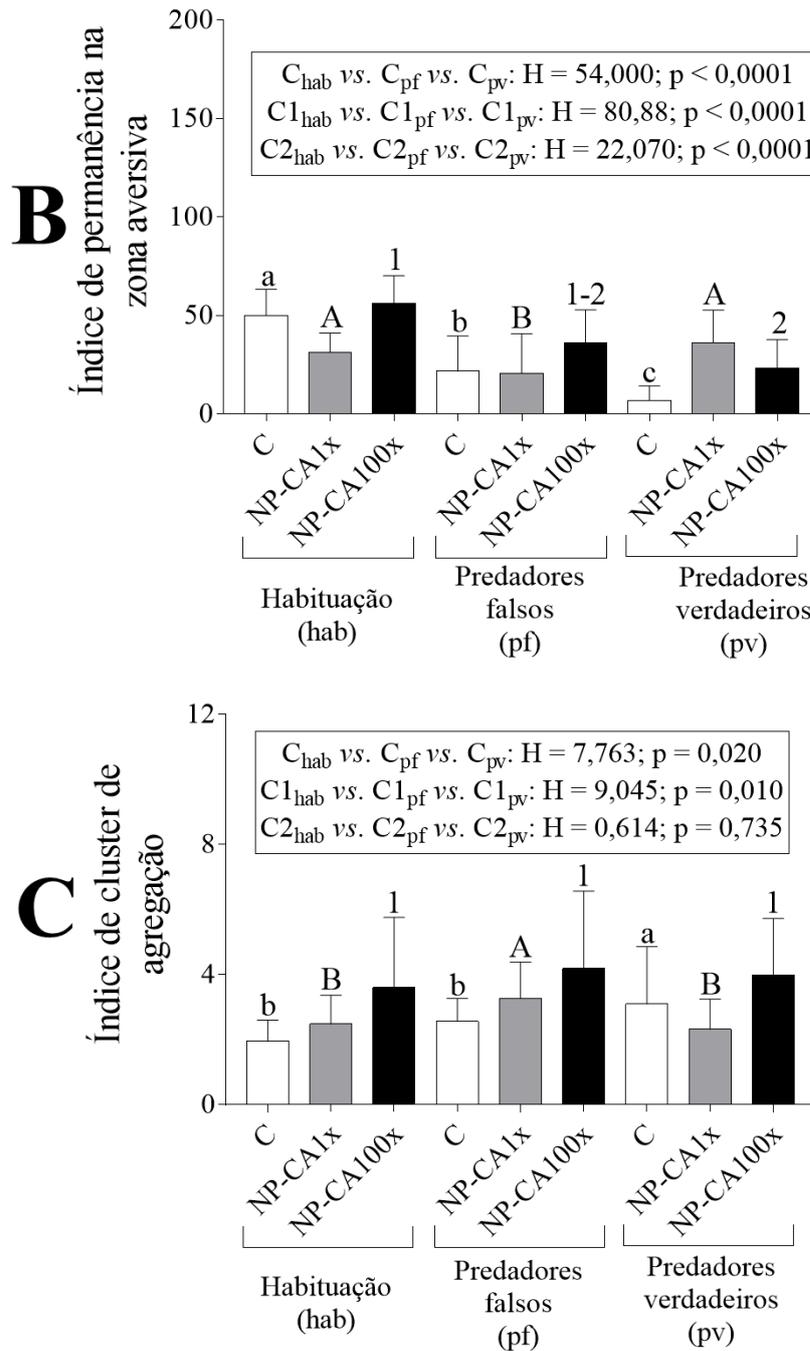


Figura 8. Índices de (A) permanência na zona de refúgio, (B) aversiva e (C) de cluster de agregação registrados para *Oreochromis niloticus* (expostas ou não às NPs de ZnO) submetidas ao teste de resposta defensiva antipredatória (condição coletiva). As barras indicam a média \pm desvio padrão. C: controle; NP-CA1x: 760 $\mu\text{g/L}$; NP-CA100x: 76000 $\mu\text{g/L}$. Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's, a 5% de probabilidade ($n=16$ /cada grupo). Letras minúsculas, maiúsculas ou números distintos (os), indicam diferenças estatísticas entre as médias do grupo controle, NP-CA1x e NP-CA100x, respectivamente, nas diferentes sessões do teste.

As análises de bioacumulação nos tecidos corporais das tilápias revelaram incremento linear da concentração de Zn na medida em que a concentração de NPs de ZnO nos grupos experimentais foi aumentada (isto é, efeito concentração-resposta) (Figura 9). Além disso,

observamos correlação negativa entre as variáveis “concentração de Zn (CZn) vs. latência para a primeira captura” ($r = -0,557$; $p = 0,002$), “CZn” vs. “distância percorrida até a primeira captura” ($r = -0,3813$; $p = 0,0450$), “CZn” vs. “escores de ingestão de pellets de ração” ($r = -0,5944$; $p = 0,0007$), “CZn” vs. “índice de evitamento” ($r = -0,549$; $p = 0,0024$) e “CZn” vs. índice de fuga explosiva ($r = -0,4022$; $p = 0,0416$). Logo, esses resultados reforçam que os distúrbios comportamentais observados em nosso estudo (tanto de déficit responsivo antipredatório, quanto de comportamento alimentar) estão relacionados, de fato, à exposição às NPs de ZnO.

É preciso ponderar que as concentrações de Zn que identificamos foram aquelas relativas à biomassa corpórea total das tilápias, o que inclui vísceras, brânquias, pele, escamas, dentre outros. Isso, obviamente, impossibilita inferências sobre o acúmulo das NPs em órgãos específicos dos animais estudados. Contudo, estudos prévios já demonstraram que esses nanomateriais podem ser distribuídos sistemicamente, sendo capazes de atravessar barreiras teciduais/celulares e se acumular em distintos órgãos. Kaya et al. (2015), por exemplo, ao examinarem o acúmulo de Zn em tilápias em decorrência da exposição às NPs de ZnO (1 e 10 mg/L – por 7 e 14 dias de exposição), reportaram alta concentração de Zn no intestino dos animais, seguido pelo fígado, rins, brânquias, cérebro e tecidos musculares. Por outro lado, Hao et al. (2012) observaram que as brânquias, fígado e cérebro de *Cyprinus carpio* podem ser órgãos de resposta mais sensíveis depois de 14 dias de exposição às NPs de ZnO (50 mg/L), sendo o intestino o órgão menos alterado, mesmo tendo maior potencial de acumulação. Já Souza et al. (2018), relataram acúmulo de Zn em tecidos encefálicos de camundongos que ingeriram água contendo NPs de ZnO em concentração milionésimas vezes inferior (300 ng/L) àquelas testadas nos estudos supracitadas. Na ocasião, a curta exposição a essas NPs (i.e., 5 dias) induziu comportamentos preditivos de ansiedade nos roedores.

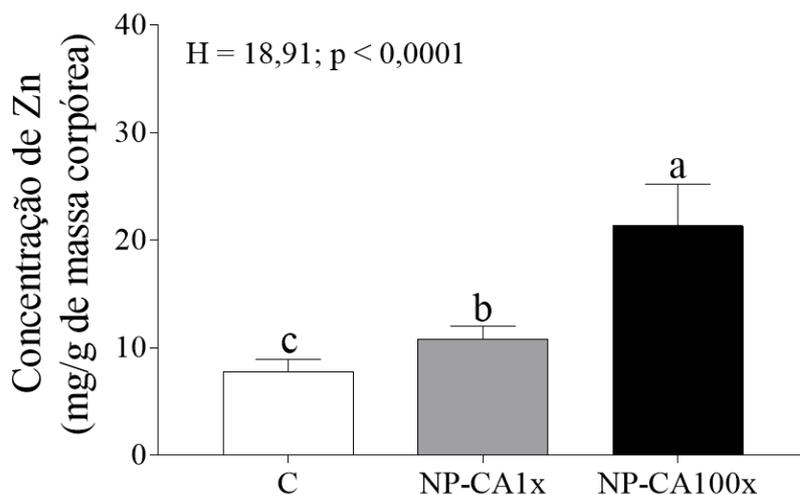


Figura 9. Bioacumulação de Zn em pool de tecidos corporais de *Oreochromis niloticus* (expostas ou não às NPs de ZnO). As barras indicam a média \pm desvio padrão. C: controle; NP-CA1x: 760 μ g/L; NP-CA100x: 76000 μ g/L. Os dados foram submetidos ao teste não paramétricos de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's, a 5% de probabilidade Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (n=16/cada grupo).

Nossos dados também revelam que as NPs de ZnO foram capazes de afetar aspectos biológicos que não são restritos à modulação do comportamento alimentar, mas também aqueles que influenciaram negativamente as habilidades das tilápias reconhecerem e avaliarem a ameaça de predação representada pelos *S. brasiliensis*. As respostas defensivas antipredatórias em peixes, semelhantes àquelas exibidas por outros animais, são dependentes de fatores que incluem as características do ambiente e da ameaça (podendo variar de predador para predador); distância entre a presa e seus potenciais predadores; tipos e intensidade de estímulos predatórios oferecidos aos peixes (visual, olfatório e/ou vibratório); experiência prévia dos animais com o estímulo e com o ambiente, dentre outros (Brown et al. 2006; Ylönen et al. 2007; Balaa & Blouin-Demers, 2011; Goulart & Young, 2013). Mas, é consenso que a utilização de substâncias químicas liberadas por seus predadores e por outras presas (como sinais de alarme e de perturbação) para mediar uma série de defesas comportamentais (Michell et al. 2017), constitui aspecto biológico conservado evolutivamente em várias espécies de peixes.

Assim, é plausível supor que as NPs de ZnO podem ter induzido alterações nos mecanismos de detecção de substâncias químicas predatórias que regulam o comportamento defensivo antipredatório das tilápias. Conforme discutido por Michel et al. (2017), a detecção de pistas potencialmente ameaçadoras é preponderante para a ativação da cascata de respostas defensivas que se inicia com sinalização neuronal e endócrina, podendo abranger alterações

na expressão gênica e sensibilização sináptica, culminando em mudanças fenotípicas associadas diretamente a uma resposta defensiva antipredatória. Nesse sentido, é possível que as NPs tenham ocasionado redução da função olfatória (hiposmia) nos animais, ao invés de disfunções permanentes (perda da visão) que teriam induzido comportamentos preditivos de ansiedade, conforme já demonstrado por Abreu et al. (2016). Estudos anteriores já relataram que distúrbios olfatórios provocados por poluentes podem impactar, além da habilidade responsiva, comportamentos importantes dos peixes, tais como aqueles sociais, reprodutivos, alimentares, locomotores, dentre outros [vide revisão de Olsén (2011)]. Assim, tanto a baixa motivação das tilápias para o estímulo alimentício ofertado (Figura 6), quanto o déficit de resposta defensiva antipredatória (individual ou coletivo), podem ter explicação relacionada aos efeitos danosos das NPs de ZnO no sistema olfatório.

Obviamente os circuitos neuronais, moleculares e celulares que podem ter sido alterados pelas NPs de ZnO devem ser elucidados futuramente. Assim, no estágio atual do nosso conhecimento sobre isso, não podemos negligenciar a possibilidade das NPs terem agido em mecanismos que controlam a expressão de receptores odorantes e a funcionalidade de neurônios de transdução de sinal do sistema olfativo para glomérulos-alvo no bulbo olfatório. Nesse caso, tanto a existência de rota olfativa de translocação bulbo olfatório-cérebro para as NPs de ZnO (Kao et al. 2012), quanto as investigações de Haubruge & Toutant (1997) e Scott et al. (2003) constituem background para a nossa presunção. Em ambos os trabalhos os autores reportaram déficits de resposta defensiva antipredatória em peixes com alterações no bulbo-olfatório provocadas por poluentes. Além disso, não podemos descartar a hipótese das NPs terem induzido alterações na integridade do epitélio olfativo das tilápias, assim como descrito por Gao et al. (2013) ao evidenciarem que a instilação intranasal desses nanopoluentes em ratos induziu ruptura das estruturas epiteliais olfatórias e inflamação.

Finalmente, é preciso reconhecer certas limitações do nosso estudo, as quais podem servir de ponto de partida para investigações futuras. Os efeitos observados em nosso estudo podem não ser, por exemplo, extrapolados para indivíduos adultos da espécie estudada ou serem similares em ambos os sexos. Apesar dos indivíduos terem sido randomizados quanto ao sexo, investigações futuras podem explorar a susceptibilidade gênero-específica aos efeitos das NPs de ZnO. Também devemos assumir que as respostas comportamentais de espécies nativas ou endêmicas de localidades receptoras de fontes poluidoras de NPs de ZnO podem ser diferentes das que observamos no presente estudo. Os efeitos que observamos podem ser

nessas espécies, mais abrangentes e prejudiciais. Além disso, uma abordagem investigativa fisiologicamente mais abrangente pode elucidar muitos mecanismos de ação desses poluentes, servindo de base importante para avaliação do risco ecotoxicológico das NPs de ZnO na biota aquática.

Por outro lado, deve-se considerar que até onde vai nosso conhecimento, o presente estudo é pioneiro em relatar efeitos comportamentais em representantes do grupo dos peixes expostos por curto prazo a concentração ambientalmente relevante de NPs de ZnO. Do ponto de vista experimental, as respostas comportamentais das tilápias mostraram-se sensíveis a baixa concentração das NPs (760 µg/L), o que abre perspectivas para melhor exploração deste sistema-modelo em estudos de toxicidade ambiental envolvendo nanopoluentes emergentes. Já as alterações no comportamento alimentar e de resposta defensiva antipredatória observadas nos animais expostos às NPs de ZnO podem ter grande significado ecológico, uma vez que podem causar prejuízos populacionais e ecossistêmicos inimagináveis.

4. CONCLUSÃO

Com base no que foi exposto, nosso estudo confirma parcialmente a hipótese inicial, demonstrando que apesar de não termos observado alterações locomotoras e indução de comportamento preditivo de ansiedade, as NPs de ZnO em concentração ambientalmente relevante (760 µg/L) causa déficit no comportamento alimentar e de resposta defensiva antipredatória em *O. niloticus*. Dado o pioneirismo do presente estudo, nossos dados constituem apenas a “ponta de um iceberg” que pode representar os riscos ecotoxicológicos associados ao descarte de NPs de ZnO nos ecossistemas dulcícolas. Portanto, sugerimos fortemente que estudos envolvendo concentrações ambientalmente relevantes dessas NPs e de outros nanopoluentes sejam conduzidos.

5. REFERÊNCIAS

ABDELAZIM, AM; SAADELDIN, IM; SWELUM, AA; AFIFI, MM; ALKALADI, A. **Oxidative Stress in the Muscles of the Fish Nile Tilapia Caused by Zinc Oxide Nanoparticles and Its Modulation by Vitamins C and E. Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, ID 69267, 1-9, 2018.

ABREU, MS; GIACOMINI, AC; KALUEFF, AV; BARCELLOS, LJ. **The smell of "anxiety": Behavioral modulation by experimental anosmia in zebrafish.** *Physiol Behav.* 2016 Apr 1;157:67-71. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.01.030. Epub 2016 Jan 25.

AHMED, O; SEGUIN, D; GERLAI, R. **Na automated predator avoidance task in zebrafish.** *Behav Brain Res*, 216(1): 166-171, 2011.

ALIM, S; VEJAYAN, J; YUSOFF, MM; KAFI, AKM. **Recent uses of carbon nanotubes & gold nanoparticles in electrochemistry with application in biosensing: A review.** *Biosensors and Bioelectronics*, 121: 125-136, 2018.

BAJOROWICZ, B; KOBYLAŃSKI, MP; GOŁĄBIEWSKA, A; NADOLNA, J; ZALESKA-MEDYNSKA, A; MALANKOWSKA, A. **Quantum dot-decorated semiconductor micro-and nanoparticles: A review of their synthesis, characterization and application in photocatalysis.** *Adv Colloid Interface Sci.* 2018 Jun;256:352-372. doi: 10.1016/j.cis.2018.02.003. Epub 2018 Feb 20.

BAKER, MR; GOODMAN, AC; SANTO, JB; WONG, RY. **Repeatability and reliability of exploratory behavior in proactive and reactive zebrafish, *Danio rerio*.** *Scientific Reports*, 8: 12114, 2018.

BALAA, RE; BLOUIN-DEMERS, G. **Anti-predatory behavior of wild-caught vs captive-bred freshwater angelfish, *Pterophyllum scalare*.** *J Appl Ichthyol*, 27: 1052-1056, 2011.

BALDWIN, DH; SPROMBERG, JA; COLLIER, TK; SCHOLZ, NL. **A fish of many scales: extrapolating sublethal pesticide exposures to the productivity of wild salmon populations.** *Ecological Applications*, 198(8): 2004-2015, 2009.

BARRETO, RE; CARVALHO, GG; VOLPATO, GL. **The aggressive behavior of Nile tilapia introduced into novel environments with variation in enrichment.** *Zoology (Jena)*. 2011 Feb;114(1):53-7. doi: 10.1016/j.zool.2010.09.001. EPUB 2010 DEC 31.

BISWAS, JK; SARKAR, D; **Nanopollution in the aquatic environmental and ecotoxicity: no nano issue!** Current Pollution Reports. <https://doi.org/10.1007/s40726-019-0104-5>, 2019.

BOSCOLO, CNP; PEREIRA, TSB; BATALHÃO, IG; DOURADO, PLR; SCHLENK, D; DE, ALMEIDA EA. **Diuron metabolites act as endocrine disruptors and alter aggressive behavior in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. Chemosphere. 2018 Jan;191:832-838. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.009. Epub 2017 Oct 3.

BOXALL, ABA; CHAUDHRY, Q; SINCLAIR, C; JONES, A; AITKEN, R; JEFFERSON, B; WATTS, C. **Current and Future Predicted Environmental Exposure to Engineered Nanoparticles**. Central Science Laboratory, York, 2007.

BROWN, GE; RIVE, AC; FERRARI MCO. **The Dynamic Nature of Antipredator Behavior: Prey Fish Integrate Threat-Sensitive Antipredator Responses within Background Levels of Predation Risk**. Behavioral Ecology and Sociobiology, 61(1): 9-16, 2006.

CARTY, DR; MILER, ZS; THORNTON, C; PANDELIDES, Z; KUTCHMA, ML; WILLETT, K. **Multigenerational consequences of early-life cannabinoid exposure in zebrafish**. Toxicology and Applied Pharmacology, 364: 133-143, 2019.

CEDERVALL, T; HANSSON, LA; LARD, M; FROHM, B; LINSE, S. **Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish**. PLoS, 7(2): e32254, 2012.

CHAI, HL; YAO, J; SUN, J; ZHANG, C; LIU, W; ZHU, M; CECCANTI, B. **The effect of metal oxide nanoparticles on functional bacteria and metabolic profiles in agricultural soil**. Bull Environ Contam Toxicol. 2015 Apr;94(4):490-5. doi: 10.1007/s00128-015-1485-9. Epub 2015 Jan 31.

CHAM, KL; SOGA, T; PARHAR, IS. **Expression of RING Finger Protein 38 in Serotonergic Neurons in the Brain of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus***. Front Neuroanat, 12: 109, 2018.

CHUPANI, L; NIKSIRAT, H; VELÍŠEK, J; STARÁ, A; HRADLOVÁ, Š; KOLAŘÍK, J; PANÁČEK, A; ZUSKOVÁ, E. **Chronic dietary toxicity of zinc oxide nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio L.*): Tissue accumulation and physiological responses**. Ecotoxicol Environ Saf. 2018 Jan;147:110-116. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.08.024. Epub 2017 Sep 14.

COWLEY, MA; SMART, JL; RUBINSTEIN, M; CERDÁN, MG; DIANO, S; HORVATH, TL; CONE, RD; LOW, MJ. **Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus.** *Nature*. May 24;411(6836):480-4, 2001.

DE FARIA, DBG; MONTALVÃO, MF; CHAGAS, TQ; ARAÚJO, APC; SOUZA, JM; MENDES, BO; RODRIGUES, ASL; MALAFAIA, G. **Behavioral changes in Japanese quails exposed to predicted environmentally relevant abamectin concentrations.** *Sci Total Environ*. 2018 Sep 15;636:1553-1564. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.293. Epub 2018 May 9.

DEEPA, S; MURUGANANTHKUMAR, RRAJ; GUPTA, Y; GOWDA, KSM; SENTHILKUMARAN, B. **Effects of zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate on the testis of common carp, *Cyprinus carpio*.** *Nanotoxicology*. Jan 21:1-18. doi: 10.1080/17435390.2018.1541259, 2019 [Epub ahead of print].

DIMAPILIS, EAS; HSU, CS; MENDOZA, RMO; LU, MC. **Zinc oxide nanoparticles for water disinfection.** *Sustainable Environment Research*, 28(2): 47-56, 2018.

DOMINGUES, I; OLIVEIRA, R; SOARES, AM; AMORIM, MJ. **Effects of ivermectin on *Danio rerio*: a multiple endpoint approach: behaviour, weight and subcellular markers.** *Ecotoxicology*. 2016 Apr;25(3):491-9. doi: 10.1007/s10646-015-1607-5. Epub 2016 Jan 14.

DUMONT, E; JOHNSON, AC; KELLER, VDJ; WILLIAMS, RJ. **Nano silver and nano zinc-oxide in surface waters e Exposure estimation for Europe at high spatial and temporal resolution.** *Environmental Pollution*, 196: 341-349, 2015.

DUPONCHELLE, F; LEGENDRE, M. ***Oreochromis niloticus* (Cichlidae) in Lake Ayame, Cote d'Ivoire: Life history traits of a strongly diminished population.** *Cybium: International Journal of Ichthyology*, 24(2): 161-172, 2000.

DUTRA, RL; CANTOS, GA; CARASEK, E. **Analysis of zinc in biological samples by flame atomic absorption spectrometry.** *Biological Trace Element Research*, 111(1-3): 265-279, 2006.

FAN, Z; LU, JG. **Zinc oxide nanostructures: synthesis and properties.** *J Nanosci Nanotechnol*; 5:1561–73, 2005 [PubMed].

FARIA, DBG; MONTALVÃO, MF; CHAGAS, TQ; ARAÚJO, APC; SOUZA, JM; MENDES, BO; RODRIGUES, ASL; MALAFAIA, G. **Behavioral changes in Japanese quails exposed to predicted environmentally relevant abamectin concentrations.** *Sci*

Total Environ. 2018 Sep 15;636:1553-1564. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.293. Epub 2018 May 9.

GAO, L; YANG, ST; LI, S; MENG, Y; WANG, H; LEI, H. **Acute toxicity of zinc oxide nanoparticles to the rat olfactory system after intranasal instillation.** J Appl Toxicol. 2013 Oct;33(10):1079-88. doi: 10.1002/jat.2842. Epub 2013 Jan 11.

GERHARDT, A. **Aquatic behavioral ecotoxicology – prospects and limitations.** Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 13(3): 481-491, 2007.

GERLAI, R; FERNANDES, Y; PEREIRA, T. **Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: towards the development of an automated aversive task.** Behav Brain Res. 2009 Aug 12;201(2):318-24. doi: 10.1016/j.bbr.2009.03.003. Epub 2009 Mar 17.

GHOSH, M; GHOSH, I; GODDERIS, L; HOET, P; MUKHERJEE, A. **Genotoxicity of engineered nanoparticles in higher plants, Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,** <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.01.002>, 2019.

GOTTSCHALK, F; ORT, C; SCHOLZ, RW; NOWACK, B. **Engineered nanomaterials in rivers--exposure scenarios for Switzerland at high spatial and temporal resolution.** Environ Pollut. 2011 Dec;159(12):3439-45. doi: 10.1016/j.envpol.2011.08.023. Epub 2011 Sep 3.

GOTTSCHALK, F; SONDERER, T; SCHOLZ, RW; NOWACK, B. **Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions.** Environmental Science & Technology, 43(24): 9216-9222, 2009.

GOULART, VDLR; YOUNG, RJ. **Selfish behaviour as an antipredator response in schooling fish?** Animal Behavior, 86(2): 443-450, 2013.

GOYAL, P; CHAKRABORTY, S; MISRA, SK. **Multifunctional Fe₃O₄-ZnO nanocomposites for environmental remediation applications.** Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 10: 28-35, 2018.

GUBIANI, EA; FRANA, VA; MACIEL, AL; BAUMGARTNER, D. **Occurrence of the non-native fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), in a global biodiversity ecoregion, Iguaçú River, Paraná River basin, Brazil.** Aquatic Invasions, 5(2): 223-227, 2010.

HAMPEL, M; BRON, JE; TAGGART, JB; LEAVER, MJ. **The antidepressant drug carbamazepine induces differential transcriptome expression in the brain of Atlantic**

salmon, *Salmo salar*. *Aquat Toxicol.* 2014 Jun;151:114-23. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.12.018. Epub 2013 Dec 24.

HAO, L; CHEN, L. **Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80,103–110, 2012.

HAO, L; CHEN, L; HAO, J; ZHONG, N. **Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): a comparative study with its bulk counterparts.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91, 52–60, 2013.

HAUBRUGE, E; TOUTANT, JP. **Acetylcholinesterase, in the olfactory organ of the common carp *Cyprinus carpio* (Teleost, Cyprinidae): characterization of molecular forms in vitro and in vivo inhibition by carbofuran.** *Belg J Zool*, 127(1): 63-73, 1997.

HENRY, TB. **Ecotoxicology of polychlorinated biphenyls in fish—a critical review.** *Critical Reviews in Toxicology*, 8(45): 643-661, 2015.

HONG, J; HE, Y. **Effects of nano sized zinc oxide on the performance of PVDF microfiltration membranes.** *Desalination*, 302(17): 71-79, 2012.

JOHNSON, A; HAMILTON, TJ. **Modafinil decreases anxiety-like behaviour in zebrafish.** *PeerJ*, 5: e2994, 2017.

KAO, YY; CHENG, TJ; YANG, DM; WANG, CT; CHIUNG, YM; LIU, PS. **Demonstration of an olfactory bulb-brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent cells in vitro and in vivo.** *J Mol Neurosci.* 2012 Oct;48(2):464-71. Epub 2012 Apr 15.

KASUMYAN, AO. **Effects of chemical pollutants on foraging behavior and sensitivity of fish to food stimuli.** *Journal of Ichthyology*, 41(1): 82-95, 2001.

KAYA, H; AYDIN, F; GÜRKAN, M; YILMAZ, S; ATES, M; DEMIR, V; ARSLAN, Z. **Effects of zinc oxide nanoparticles on bioaccumulation and oxidative stress in different organs of tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(3): 936-947, 2015.

KAYA, H; AYDIN, F; GÜRKAN, M; YILMAZ, S; ATES, M; DEMIR, V; ARSLAN, Z. **Effects of zinc oxide nanoparticles on bioaccumulation and oxidative stress in different organs of tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40: 936-947, 2015.

KAYA, H; AYDIN, F; GÜRKAN, M; YILMAZ, S; ATES, M; DEMIR, V; ARSLAN, Z. **Effects of zinc oxide nanoparticles on bioaccumulation and oxidative stress in different organs of tilapia (nronmental Toxicology and Pharmacology, 40(3): 936-947, 2015.**

KHEZRI, K; SAEEDI, M; MALEKI, DIZAJ. S. **Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations.** Biomed Pharmacother. 2018 Oct;106:1499-1505. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.084. Epub 2018 Jul 24.

KOLDING, J. **Population dynamics and life-history styles of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in Ferguson's Gulf, Lake TuOreochromis niloticus).** *Envirkana, Kenya.* Environmental Biology of Fishes, 37(1): 25-46, 1993.

LI, J; CHEN, Z; HUANG, R; MIAO, Z; CAI, L; DU, Q. **Toxicity assessment and histopathological analysis of nano-ZnO against marine fish (*Mugilogobius chulae*) embryos.** Journal of Environmental Sciences, 73: 78-88, 2018.

LU, Y; ZHANG, Y; DENG, Y; JIANG, W; ZHAO, Y; GENG, J; DING, L; REN, HQ. **Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver.** Environmental Science & Technology, 50(70): 4054-4060, 2016.

MARKUS, A.A; PARSONS, J.R; ROEX, E.W; VOOGT, P. De, LAANE, R.W. **Modelling the transport of engineered metallic nanoparticles in the river Rhine.** Water Res. 2016 Mar 15;91:214-24. doi: 10.1016/j.watres.2016.01.003. Epub 2016 Jan 9.

MICHELL, M.D; BAIROS-NOVAK, K.R; FERRARI, C.O.M. **Mechanisms underlying the control of responses to predator odours in aquatic prey.** Journal of Experimental Biology, 220: 1937-1946, 2017.

MISHRA, P.K; MISHRA, H; EKIELSKI, A; TALEGAONKAR, S; VAIDYA, B. **Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications.** Drug Discov Today. 2017 Dec;22(12):1825-1834. doi: 10.1016/j.drudis.2017.08.006. Epub 2017 Aug 25.

MOREIRA, A.F; RODRIGUES, C.F; REIS, C.A; COSTA, E.C; CORREIA, I.J. **Gold-core silica shell nanoparticles application in imaging and therapy: a review.** Microporous and Mesoporous Materials, 270: 168-179, 2018.

NASSEF, M; MATSUMOTO, S; SEKI, M; KHALIL, F; KANG,IJ; SHIMASAKI, Y; OSHIMA, Y; HONJO T. **Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*).** Chemosphere. 2010 Aug;80(9):1095-100. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.04.073. Epub 2010 May 26.

OLSÉN, K. H. “Effects of pollutants on olfactory mediated behaviors in fish and crustaceans,” in **Chemical Communication in Crustaceans**, eds T. Breithaupt and M. Thiel (New York, NY: Springer), 507–529, 2011.

PARIHAR, V; RAJA, M; PAULOSE, R. **A brief review of structural, electrical and electrochemical properties of zinc oxide nanoparticles.** Rev Adv Mater Sci, 53: 119-130, 2018.

PARKER, MO; ANNAN, LV; KANELLOPOULOS, AH; BROCK, AJ; COMBE, FJ; BAIAMONTE, M; THE, MT; BRENNAN, CH. **The utility of zebrafish to study the mechanisms by which ethanol affects social behavior and anxiety during early brain development.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014 Dec 3;55:94-100. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.03.011. Epub 2014 Mar 30.

PAVLOV, D.S. AND KASUMYAN, A.O. **Sensory Bases of Feeding Behavior in Fish,** *Vopr. Ikhtiolog.*, vol. 30, no. 5, pp. 720-732, 1990.

PICCINNO, F; GOTTSCHALK, F; SEEGER, S; NOWACK, B. **Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials for Europe and the world.** J.Nanopart. Res. 14, 1–11, 2012.

RAJPUT, VD; MINKINA, TM; BEHAL, A; SUSHKOVA, SN; MANDZHIEVA, S; SINGH, R; GOROVTSOV, A; TSITSUASHVIL, VS; PURVIS, WO; CGAZARYAN, KA; MOVSESYAN, HS. **Effects of zinc-oxide nanoparticles on soil, plants, animals and soil organisms: A review.** Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 9: 76-84, 2018.

RAJPUT, VD; MINKINA, TM; BEHAL, A; SUSHKOVA, SN; MANDZHIEVA, S; SINGH, R; GOROVTSOV, A; TSITSUASHVILI, VS; PURVIS, WO; GHAZARYAN, KA; MOVSESYAN, HS. **Effects of zinc-oxide nanoparticle on soil, plants, animals and soil organisms: a review.** Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 9: 76-84, 2018.

SANTOS, NS; OLIVEIRA, R; LISBOA, CA; PINTO, JM; SOUSA-MOURA, D; CAMARGO, NS; PERILLO, V; OLIVEIRA, M; GRIUSOLLA, CK; DOMINGUES, I. **Chronic effects of carbamezepine on zebrafish: behavioral, reproductive and biochemical endpoints.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 164: 297-304, 2010.

SCOTT, GR; SLOMAN, KA; ROULEAU, C; WOOD, CM. **Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Journal of Experimental Biology, 206: 1779-1790, 2003.

SHAHZAD, K; KHAN, MN; JABEEN, F; KOSOUR, N; CHAUDHRY, AS; SOHAIL, M; AHMAND, N. **Toxicity of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): tissue accumulation, oxidative stress, histopathology and genotoxicity.** International Journal of Environmental Science and Technology. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1807-7>, 2019.

SHARMA, M; PANDEY, C; SHARMA, N; KAMAL, MA; SAYEED, U; AKHTAR, S. **Cancer Nanotechnology - An Excursion on Drug Delivery Systems.** Anticancer Agents Med Chem. Jul 20. doi: 10.2174/1871520618666180720164015. 2018 [Epub ahead of print]

STROKAL, M; SPANIER, JE; KROEZE, C; KOELMANS, AA; FLÖRKE, M; FRANSSSEN, W; HOFSTRA, N; LANGAN, S; TANG, T; VLIET, MTH; WADA, Y; WANG, M; WIJNEN, J; WILLIAMS, R. **Global multi-pollutant modelling of water quality: scientific challenges and future directions.** Current Opinion in Environmental Sustainability, 36: 116-125, 2019.

STURMAN, O; GERMAIN, PL; BOHACEK, J. **Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test.** The International Journal on the Biology of Stress, 21(5): 443-452, 2018.

SUGANTHI, P; MURALI, M; ATHIF, P; SADIQ, Bulhari A; SYED, Mohamed H; BASU, H; SINGHAL, RK. **Haemato-immunological studies in ZnO and TiO₂ nanoparticles exposed euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*.** Environ Toxicol Pharmacol. Dec 19;66:55-61. doi: 10.1016/j.etap.2018.12.011. 2018 [Epub ahead of print].

SUN, TY; GOTTSCHALK, F; HUNGERBUHLER, K; NOWACK, B. **Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials.** Environ. Pollut. 185, 69e76, 2014.

TIAN, L; LIN, B; WU, L; LI, K; LIU, H; YAN, J; LIU, X; XI, Z. **Neurotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles: age-related differences and interaction.** Scientific Reports, 5: 16117, 2015.

VANDEBRIEL, RJ; JONG, WH DE. **A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles.** Nanotechnol Sci Appl. 15;5:61-71. doi: 10.2147/NSA.S23932, Aug 2012.

YANCHEVA, V; VELCHEVA, I; STOYANOVA, S; GEORGIEVA, E. **Fish in ecotoxicology studies.** Ecologia Balkanica, 7(1): 149-169, 2015.

YLÖNEN, H; KORTET, R; MYNTTI, J; VAINIKKA, A. **Predator odor recognition and antipredatory response in fish: does the prey know the predator diel rhythm?** *Acta Oecologica*, 31(1): 1-7, 2007.

ZHANG, DQ; ENG, CY; STUCKEY, DC; ZHOU, Y. **Effects of ZnO nanoparticle exposure on wastewater treatment and soluble microbial products (SMPs) in an anoxic-aerobic membrane bioreactor.** *Chemosphere*, 171: 446-459, 2017.