



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

ALINE VANESSA GOULART

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA O
MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna* - UM ESTUDO DE MÚLTIPLAS
GERAÇÕES**

Erechim – RS

2020

ALINE VANESSA GOULART

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA O
MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna* – UM ESTUDO DE MÚLTIPLAS
GERAÇÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS -
Campus Erechim, como requisito para a obtenção do
título de bacharel em Engenharia Ambiental e
Sanitária.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristiane Funghetto Fuzinatto

Erechim – RS

2020

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Goulart, Aline Vanessa
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PARA O MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna* - UM ESTUDO DE
MÚLTIPLAS GERAÇÕES / Aline Vanessa Goulart. -- 2020.
47 f.

Orientadora: Doutora Cristiane Funghetto Fuzinato

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária,
Erechim, RS, 2020.

1. Toxicidade Nanoparticulas de Prata. 2. Efeitos
multigeracionais. 3. Efeitos pós exposição. I.
Fuzinato, Cristiane Funghetto, orient. II. Universidade
Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ALINE VANESSA GOULART

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA O
MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna* – UM ESTUDO DE MÚLTIPLAS
GERAÇÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS - Campus Erechim, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristiane Funghetto Fuzinatto

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado em 17/09/2020

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Cristiane Funghetto Fuzinatto
UFFS – Erechim/RS

Prof.^o Dr. Marlon Luiz Neves da Silva
UFFS – Chapecó/SC

Prof.^a Dra. Marília Teresinha Hartmann
UFFS – Erechim/RS

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus por ter me guiado e me protegido em toda a minha caminhada e por não ter me deixado desanimar e nem desistir.

À minha família que é o meu porto seguro, estando sempre ao meu lado em todos os momentos. Ao meu namorado que me ajudou e acompanhou os testes do TCC, obrigada por todo o amor a paciência de sempre, sou imensamente grata pela parceria e amizade nesses 8 anos.

Agradeço a minha mãe, (in memoriam) que foi uma mãe maravilhosa. Hoje não posso dar-lhe um abraço apertado, mas posso fazer o meu agradecimento através dos pensamentos bons, sei que está no caminho da luz. Obrigada minha mãe, por ter cuidado tão bem de mim, a saudade está grande, amo você!

Agradeço a família do meu namorado, que sempre me apoiaram e me deram suporte e carinho em todos os momentos.

Agradeço também à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Cristiane Funghetto Fuzinato pela orientação, por todo conhecimento repassado, pela paciência e por sempre afirmar “que eu sou capaz, que eu consigo”. Quero agradecer de coração, por ter me ajudado e me apoiado nos meus momentos mais difíceis, não me deixando desanimar.

Às colegas de laboratório que de uma forma ou outra me ajudaram durante a realização do trabalho, Caroline Bettio e Julia Schneider.

À Universidade Federal da Fronteira Sul pela infraestrutura.

Agradeço a todos os professores pelos ensinamentos durante a graduação!

Meu sincero, muito obrigada!

A árvore vigorosa não cresceu de improviso.
A cidade em que renascestes não se levantou de repente.
Tudo se desenvolve, minuto a minuto...
A vida impõe-te “agora” as consequências do “antes”.
Somos hoje, no espaço e no tempo, a projeção do que fomos.
(XAVIER, 1998).

RESUMO

A nanotecnologia busca o desenvolvimento de novas metodologias para produção de produtos em nanoescala, auxiliando na resolução de problemas globais. Entretanto, com a enorme gama de produtos existentes atualmente utilizando nanopartículas (NP) é considerável a quantidade liberada nos ecossistemas aquáticos. Como exemplo de NP temos a prata, que é o metal mais tóxico encontrado nos corpos hídricos, podendo causar graves danos ao ser humano e ao meio ambiente. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda e crônica de suspensões de nanopartículas de prata (AgNP), além de avaliar efeitos multigeracionais e os efeitos pós exposição ao agente tóxico, utilizando como organismo teste o microcrustáceo *Daphnia magna*. A síntese e caracterização das AgNP consistiu na metodologia tradicional de síntese química utilizando o PVA como agente estabilizante. A caracterização da NP mostrou que a suspensão de AgNP não estava em estado de aglomeração, confirmou-se o formato esférico característico às AgNP através do comprimento de onda de 401 nm e diâmetro médio de 4,6 nm. Os testes de toxicidade agudos indicaram valores de $CE_{50,48h}$ média de $0,13 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Partindo deste resultado realizaram-se os testes crônicos, para a geração parental (F0) onde foram verificados efeitos significativos para o parâmetro longevidade, sendo a concentração de efeito observado (CEO) $0,065 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e na fecundidade com o aumento do número médio de filhotes/postura apresentando CEO $0,055 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Diferente de F0, nos testes de toxicidade crônica pós exposição (F0^{PE}), percebeu-se efeitos significativos na longevidade com redução no número de organismos nas menores concentrações, porém nas maiores houve a redução de praticamente 50% dos organismos, sendo assim obteve-se como CEO $0,025 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Já na fecundidade e no número médio de posturas os organismos conseguiram retomar o número de filhotes, podendo entender esse aumento como um efeito de recuperação dos organismos. Os testes de toxicidade crônica para múltiplas gerações, foram definidos como primeira geração (F1) de neonatos da geração F0 e F4 a quarta geração. Ambas gerações se tornaram mais resistentes ao agente tóxico do que a geração F0, em decorrência do maior tempo em exposição das mães. Quanto a fecundidade, os organismos sofreram efeitos estressores, no qual ocasionou no aumento da reprodução, a fim de perpetuar a espécie. Os testes de pós exposição da multigeração, geração F1^{PE} e F4^{PE}, os organismos possuíam maior sensibilidade ao agente tóxico desde pequenas doses, ainda a taxa de sobrevivência foi menor do que os descendentes, visto o maior tempo em meio de teste, além de efeitos tóxicos no número médio de posturas. Assim, com base no estudo pôde-se concluir que os resultados refletem em efeitos multigeracionais e de pós exposição, visto as gerações apresentarem consequências em seu ciclo de vida.

Palavras-chave: *D. magna*. Nanopartículas de prata. Toxicidade aguda. Toxicidade crônica. Pós exposição.

ABSTRACT

Nanotechnology seeks to develop new methodologies for the production of nanoscale products, helping to solve global problems. However, with the huge range of products currently using nanoparticles (NPs), the amount released into aquatic ecosystems is considerable. As an example of NP we have silver, which is the most toxic metal found in water bodies, and can cause serious damage to humans and the environment. Thus, the present study aimed to evaluate the acute and chronic toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) suspensions, in addition to evaluating multigenerational effects and the post-exposure effects to the toxic agent, using the crustacean *Daphnia magna* as a test organism. The AgNPs synthesis and characterization consisted of the traditional chemical synthesis methodology using PVA as a stabilizing agent. The NPs characterization showed that the AgNPs suspension was not in a state of agglomeration, and the spherical shape, characteristic of the AgNPs, was confirmed through a wavelength of 401 nm and an average diameter of 4.6 nm. Acute toxicity tests indicated mean $EC_{50,48h}$ values of $0.13 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Based on this result, chronic tests were performed for the F0 generation, where significant effects were verified for the longevity parameter, with the observed effect concentration (OEC) of $0.065 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and fertility with an increase in the average number of babies/posture and OEC of $0.055 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Unlike F0, in the post-exposure chronic toxicity tests (F0^{PE}), exposed only in M4 medium, significant effects on longevity were observed with a reduction in the number of organisms in the lowest concentrations, however in the largest there was a reduction of practically 50% of the organisms. Thus, $0.025 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ was obtained as OEC. In terms of fertility and the average number of postures, the organisms managed to recover the number of babies, being able to understand this increase as an effect of the organism recovery. The chronic toxicity tests for multiple generations were defined as F1 the first generation of neonates of the generation F0, and F4 the fourth generation. Both generations became more resistant to the toxic agent than the F0 generation, due to the longer exposure time of mothers. As for fertility, the organisms suffered stressful effects, which caused an increase in reproduction in order to perpetuate the species. In the post-exposure tests of the multigeneration, generation F1^{PE} and F4^{PE}, the organisms had greater sensitivity to the toxic agent since small doses, and the survival rate was lower than the descendants, given the longer exposure time in the test medium, in addition to toxic effects in the average number of postures. Thus, based on this study, it was concluded that the results reflect multi-generational and post-exposure effects, since the generations have consequences in their life cycle.

Keywords: *D. magna*. Silver nanoparticles. Acute toxicity. Chronic toxicity. Post-exposure.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MATERIAIS E MÉTODOS	15
	2.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	15
	2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	16
	2.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	16
	2.2.2 Espectroscopia de absorção UV-VIS	17
	2.2.3 Potencial Zeta	17
	2.3 TESTE DE SENSIBILIDADE DO MICROCRUSTÁCEO <i>Daphnia magna</i>	17
	2.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA	18
	2.5 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA.....	18
	2.6 TESTE DE MÚLTIPLAS GERAÇÕES	20
	2.7 TESTE PÓS EXPOSIÇÃO A SUSPENSÃO AgNP.....	20
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
	3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	21
	3.1.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	21
	3.1.2 Espectroscopia de absorção UV-VIS	22
	3.1.3 Potencial Zeta	22
	3.2 TESTES DE SENSIBILIDADE COM <i>Daphnia magna</i>	24
	3.3 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>Daphnia magna</i>	24
	3.4 TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA COM <i>Daphnia magna</i>	25
	3.4.2 Teste de toxicidade crônica geração parental F0	25
	3.4.3 Teste de toxicidade crônica pós exposição (F0^{PE})	31
	3.4.3 Teste de toxicidade crônica para múltiplas gerações, geração F1 e F4 do microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	34
	3.4.4 Teste pós exposição da multigeração, geração F1^{PE} e F4^{PE} - Descendentes da geração F0	38
4	CONCLUSÕES	41
5	RECOMENDAÇÕES	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O ser humano busca constantemente pelo aperfeiçoamento das tecnologias para que seja possível usufruir ao máximo dos recursos da natureza (SANTOS, 2014). Desta forma surge a nanotecnologia, uma tecnologia nova e em expansão com as principais aplicações no desenvolvimento de metodologias inovadoras para a produção de novos produtos, auxiliando na resolução de problemas globais (NASROLLAHZADEH et al., 2019)

A nanotecnologia é a ciência dedicada ao uso de materiais em nanoescala, abrangendo aplicações tanto em sistemas químicos, físicos e biológicos (NASROLLAHZADEH et al., 2019).

A nanotecnologia viabiliza produtos finais melhores, mais eficientes, leves, e principalmente buscando a redução do custo, muitos destes materiais encontram em fase de comercialização em cosméticos, eletrodomésticos, vestimentas e em diversos utensílios e equipamentos (MACIEL et al., 2014).

O avanço tecnológico nesta ciência proporcionou ao meio científico a produção de diversas publicações que chegam a mais de 1 milhão de resultados. Ao buscar na base de dados Science Direct, utilizando a palavra-chave “nanotecnologia” são encontradas mais de 4 milhões de referências. Em inglês, quando a palavra-chave “nanotechnology” é utilizada, são encontrados mais de 9 milhões de resultados. Porém ao pesquisar na mesma base de dados pelo termo “multiple generations *Daphnia magna*” resultam um pouco mais de 3.000 pesquisas, assim como “multigenerational nanoparticles” que apenas 130 resultados são apresentados. Aprofundando as buscas, ao procurar especificamente pelo termo anterior, porém com nanopartículas de prata, são exibidos meramente 7 resultados. Ainda ao investigar por “recovery *Daphnia magna*” os resultados são de 73 estudos, porém ao incluir o termo nanopartícula de prata, os resultados são praticamente nulos.

Porém quando comparamos alguns dos trabalhos que já foram realizados *in vitro* nos deparamos com a noção do comportamento destas partículas, porém *in vivo* ainda são poucos os trabalhos que demonstram relação entre a quantidade e as consequências das exposições (DHAWAN; SHARMA, 2010; MATHIAS et al., 2014).

As nanopartículas de prata (AgNP) que serão empregadas no estudo desta pesquisa, se destacam pela sua ampla utilização mundial. Esta ampla utilização é

principalmente devido a características antifúngicas e antibacterianas deste material (SCHULZ et al., 2002; LOPES, 2015). Sendo utilizados também no meio ambiente para processos de biorremediação (MUKHERJEE et al. 2017 ,YADAV et al. 2017) e no tratamento de águas residuais (MOUSTAFA, 2017 , KUHR et al. 2018).

Segundo Antony et al. (2015) e Weinberg et al. (2011) as AgNP são produzidas comercialmente em larga escala e afirmam que neste ano de 2020 estima-se que serão fabricadas muito além de 5 milhões de toneladas em todo o planeta. Ainda conforme Nikmatin et al. (2017) as AgNPs apresentaram bom funcionamento na aplicabilidade eletrônica e elétrica, desta forma afirmam que a demanda nessa área deve aumentar muito até 2022.

Sendo assim, visto a enorme gama de produtos existentes atualmente utilizando as AgNPs, pode-se afirmar que a quantidade de nanopartículas liberadas nos ecossistemas aquáticos é considerável, causando preocupação em relação a saúde humana e a capacidade de ocasionar efeitos adversos (JIANG et al. 2017).

Segundo Ribeiro et al. (2014) e Kleiven et al. (2019) dentre todos os metais encontrados na água, a prata é a mais tóxica, e, contudo, ainda não existem estudos aprofundados em relação as AgNP, visto que a toxicidade está diretamente relacionada as propriedades físico-químicas como tamanho e carga superficial. Assim como também pelas condições em que a mesma é exposta, relacionando-a com a composição do meio, pH e temperatura, desta forma torna-se imprescindível a sua pesquisa (KLEIVEN et al. 2019).

Desta forma conforme Bhutada e Tang (2019) a ingestão da prata em altas concentrações pelo ser humano causam algumas disfunções tais como, problemas neurológicos, nos rins, indigestão, dores de cabeça e a Argiria, que é uma condição causada por exposição imprópria a compostos de prata que causa o azulamento da pele. Sendo assim a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA,1991), publicou a dose de referência para prata no qual não teria efeitos deletérios, estimativa oral diária de $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$, ao exceder esta concentração tem-se o azulamento da pele e outros efeitos nos sistemas orgânicos.

Mundialmente a legislação referente aos lançamentos das AgNPs nos corpos hídricos é inexistente, apenas possuindo alguns limites para metais. No Brasil a Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente)

estabelece que “o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente”.

Com a inexistência de legislação mundial no controle da emissão de nanopartículas, iniciou-se em 2013 o projeto proposto pela União Européia, denominado NaNoREG, no qual busca a regulamentação internacional da nanotecnologia, fundamentando-se no potencial econômico e inovador dos nanomateriais (NM), e a estudos referente a efeitos toxicológicos da exposição aos NM, porém não possuindo dados suficientes para fins regulatórios. O Brasil aderiu ao projeto em 2014, e conforme sítio do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (BRASIL,2019) brasileiro o projeto possui como metas:

1. Disponibilizar aos legisladores um conjunto de ferramentas de avaliação de risco e instrumentos de tomada de decisão a curto e médio prazo, através da análise de dados e realização de avaliação de risco, incluindo a exposição, monitoramento e controle, para um número selecionado de nanomateriais já utilizados em produtos;
2. Desenvolver, a longo prazo, novas estratégias de ensaio adaptadas a um elevado número de nanomateriais em que muitos fatores podem afetar o seu impacto ambiental e de saúde;
3. Estabelecer estreita colaboração entre governos e indústria no que diz respeito ao conhecimento necessário para a gestão adequada dos riscos, e criar a base para abordagens comuns, conjuntos de dados mutuamente aceitáveis e práticas de gestão de risco.

Além disso, segundo a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) em agosto de 2017 o Brasil e a Argentina firmaram acordo para desenvolver políticas públicas capazes de avaliar os nanoproductos em ambos os países, estabelecendo parcerias nas áreas de ciência, tecnologia e inovação no prazo de cinco anos, através do Centro Brasileiro-Argentino de Nanotecnologia (CBAN) (BRASIL, 2017).

A toxicologia tem sido definida como o corpo da ciência que se dedica a investigar os efeitos nocivos produzidos através de compostos químicos aos organismos vivos (COSTA, 2018). Em testes toxicológicos é fundamental determinar qual o organismo teste mais se adequa, a fim de identificar a forma em que seus efeitos são manifestados. O microcrustáceo *Daphnia magna* é sensível a substâncias tóxicas e são de fácil cultivo em laboratório, desta forma são modelo úteis nessa área (BOWNIK, 2017).

Conforme Hu et al., (2018) foi partir da nomeação dada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, em 1978 que este organismo começou a tornar representativo em testes toxicológicos.

Porém de acordo com Bownik (2017) a maior parte das pesquisas toxicológicas utilizam a *Daphnia magna* apenas para testes de toxicidade aguda em sua concentração letal mediana (CL50) e para a concentração efetiva média (CE50). Os testes crônicos por sua vez muitas vezes não são utilizados com frequência devido ao maior período de exposição (21 dias) dos organismos (SAKKA et al., 2016).

Ainda conforme Maselli et al., (2017) apenas estes dois testes citados anteriormente não representam uma avaliação precisa das substâncias tóxicas presentes no meio aquático. Tem-se a necessidade de buscar estudos de longo prazo e exposição.

Sendo assim surge um importante teste para avaliar o efeito toxicológico prolongado das substâncias tóxicas, são os testes de multigerações. Segundo Barata et al., (2017) “os efeitos observados dentro de uma geração desconsideram potenciais efeitos prejudiciais que podem aparecer através das gerações”.

Os testes de multigerações são testes que demandam maior tempo e muito trabalho, entretanto, quando confrontados com os testes de toxicidade aguda ou o teste de toxicidade crônico de uma geração, permitem com que se tenha melhores resultados do risco potencial real do objeto de estudo (MASELLI et al., 2017).

Entretanto os efeitos toxicológicos do contaminante podem diminuir ou aumentar entre as gerações ou até mesmo se manterem inalterados, sendo necessário avaliar também a fase pós exposição dos organismos. De acordo com Campos et al., (2016), grande parte dos procedimentos realizados em testes toxicológicos visam exclusivamente a avaliação dos efeitos observados no período de apenas uma geração, menosprezando os efeitos potenciais que podem surgir entre as multigerações.

Ainda Marczylo et al. (2016) afirmam que pode ocorrer também com que o efeito toxicológico se manifeste através das gerações, não sendo perceptível na primeira geração de exposição, além do mais em muitos casos ocorre que as substâncias tóxicas afetam tanto os organismos expostos quanto a sua progênie, sendo assim os efeitos podem ser mais críticos nas subseqüentes análises (MARCZYLO et al., 2016).

Além da escassez de informações referente aos testes multigeracionais a fase de pós exposição também possui poucos estudos, a comunidade científica busca entender qual o efeito nos organismos após a exposição ser removida e se estes efeitos continuam

nas gerações futuras, e como esta exposição contínua poderá afetar os organismos (GONÇALVES et al., 2018).

Por conseguinte, a justificativa do presente estudo se fundamenta na crescente evolução na pesquisa das nanopartículas e principalmente a nanopartícula de prata e as incertezas de seus efeitos posteriores em organismos aquáticos. Além de contribuir para elucidar quais os efeitos toxicológicos que as suspensões de AgNP ocasionam para o microcrustáceo *D. magna* e também para múltiplas gerações deste organismo em fase de exposição e de pós exposição a suspensão de AgNP. Além disso, as informações referentes a testes de multigeração e pós exposição são extremamente escassas no meio científico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese de AgNP foi realizada de acordo com o descrito por Fernandes (2014), com algumas modificações, pois foi considerado o processo de síntese através da redução do AgNO₃ pelo agente redutor NaBH₄. Desta forma inicialmente foi solubilizado 1g de PVA (1% m/v) em 50mL de água de osmose reversa. A solubilização ocorreu em agitação média/intensa e à temperatura entre 80 e 90°C durante o período de 1 hora. Após a solubilização completa, o PVA foi mantido na geladeira, visando seu resfriamento.

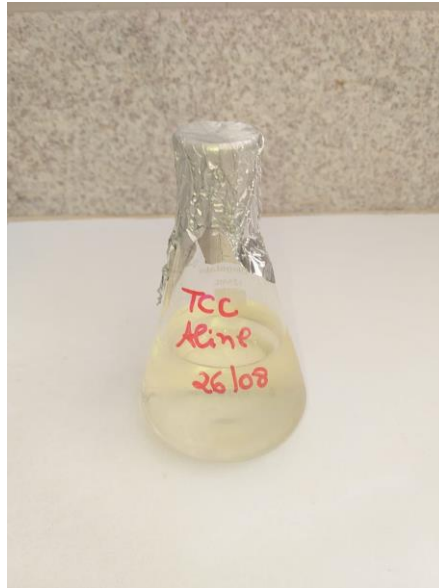
Na sequência foi diluído 3,15x10⁻³g de AgNO₃ (1mM) em 25mL de água de osmose reversa na temperatura de aproximadamente 3°C e 1,4x10⁻³g de NaBH₄ (2mM) em 25mL de água de osmose resfriada (±3°C). Posteriormente, o PVA foi colocado em um erlenmeyer, sob banho de gelo e com agitação constante, sequencialmente foi adicionado o NaBH₄ diluído ao erlenmeyer.

O AgNO₃ diluído foi colocado em uma bureta sendo gotejado no erlenmeyer à vazão constante de aproximadamente 1 gota por segundo. Sucessivamente, foi mantido o erlenmeyer sob agitação por mais 10 min. visando a homogeneização completa da solução.

A última etapa do processo envolveu a vedação do erlenmeyer com papel alumínio a fim de conservá-lo em geladeira a 4°C até o momento do uso. O processo de síntese foi efetuado a cada 30 dias, pois com o passar dos dias a suspensão de AgNP pode aglomerar, o que influenciaria nos resultados dos testes. Além disso, foi utilizada a suspensão de

AgNP para testes após decorrido um dia da síntese, devido ao fato de que neste período de tempo ainda poderia ocorrer uma reação residual de formação de AgNP.

Figura 1: Suspensão de AgNP com concentração de 2 mg. L^{-1} representada pela cor levemente amarelada, característica da síntese.



Fonte: A Autora (2020)

2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas de prata foram caracterizadas por técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia de absorção UV-VIS e potencial zeta. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Central (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) por meio da colaboração do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) também da UFSC.

2.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Como descrito por Oscar (2015), a AgNP foi colocada em uma película de carbono sobre uma grade de cobre. A amostra permaneceu conservada à temperatura de 25°C por 24h, sendo que decorrido o tempo foi analisada na MET (JEM-1011 MET-100KV).

Após a análise na MET, a mesma forneceu uma imagem onde foi possível determinar o diâmetro médio das AgNP, além da sua área superficial.

2.2.2 Espectroscopia de absorção UV-VIS

Neste procedimento foi possível analisar as bandas de absorção que representam as AgNP, ou seja, a absorção máxima da AgNP e o seu respectivo comprimento de onda, assim como a distribuição do tamanho de partícula (SÁ, 2015).

Conforme Sá (2015), foi ajustado o comprimento de onda na faixa de 300 a 600 nm, e a amostra disposta em cubetas de ensaio que foram lidas no espectrofotômetro, (Spectro 3000W, Marte Científica).

2.2.3 Potencial Zeta

Quanto ao potencial Zeta, o mesmo foi utilizado para analisar as cargas superficiais das NP, relacionando se as mesmas poderiam se ligar com outras substâncias. O equipamento que foi utilizado para realizar essa análise será o Zetasizer Nano ZS com ângulo de retroespelhamento de 173° e temperatura de 25°C (VARENNE et al., 2018).

2.3 TESTE DE SENSIBILIDADE DO MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna*

Os testes de sensibilidade foram realizados para assegurar a qualificação dos neonatos e garantir a validação dos testes desta pesquisa. A metodologia dos teste de utilizando *D. magna* como organismo-teste foi realizada de acordo com a NBR 12.713 (ABNT, 2016) e consistiu na exposição de neonatos (2 até 26 horas de vida) ao meio básico (meio ISO), e com a utilização da substância de referência, o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) 10 mg. L⁻¹ por um curto período (24 horas).

Desta forma os testes foram realizados mensalmente, durante o período de testes de toxicidade aguda e no início do teste de toxicidade crônica.

Após finalizado o teste, verificou-se quantos organismos estavam imóveis em cada béquer e o valor de cada leitura anotado na ficha de controle. Enfim calculou-se o valor da CE_{50,24h} para verificar sensibilidade através do software *Graphpad Prism versão 6.0*.

A norma NBR 12.713/2016 (ABNT, 2016), orienta para a elaboração da carta controle, que apresenta um Limite Central (LC), que é a média do valores obtidos, considerando dois (02) desvios padrão, Limite Superior (LS), sendo o valor máximo para a sensibilidade e o Limite Inferior (LI), com valor mínimo para a sensibilidade.

A faixa adequada para a sensibilidade dos organismos, conforme a ISO 6341/2012 é entre 0,6 mg. L⁻¹ a 1,7 mg. L⁻¹, utilizando como substância de referência, o dicromato

de potássio.

2.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

A metodologia do teste de toxicidade aguda utilizando *D. magna* como organismo-teste foi realizada de acordo com a NBR 12.713 (ABNT, 2016) e consistiu na exposição de 10 neonatos de forma individual (2 até 26 horas de vida) a uma série de diluições da substância a ser testada por um curto intervalo de tempo (48 horas)

As concentrações para realizar os testes preliminares partiram das análises feitas por Wolf (2018), sendo a faixa determinada: 1µg. L⁻¹; 0,5µg. L⁻¹; 0,25µg. L⁻¹; 0,125µg. L⁻¹; 0,062µg. L⁻¹ e 0,031µg. L⁻¹. Para o ensaio definitivo, foi calculado por meio da Equação 1, descrita por Atkins e Jones (2012), os volumes necessários para formar cada uma das concentrações citadas anteriormente, partindo da solução-mãe de concentração conhecida.

$$V_{inicial} = \frac{C_{final} \cdot V_{final}}{C_{inicial}} \quad \text{Equação (1)}$$

Os volumes da suspensão de AgNP que foram calculados anteriormente foram dispostos em balões de 50 mL, onde o volume não preenchido com a solução foi preenchido com o meio ISO. Após a homogeneização, cada uma das cinco soluções foram divididas em dois béqueres, e adicionou-se os neonatos, assim como na amostra controle que continha apenas o meio ISO.

Posteriormente o teste foi coberto e mantido em temperatura de 20±2°C durante o período de 48 horas, em ambiente com fotoperíodo de 16h de luz difusa. Os organismos não foram alimentados. Após terminado o teste, foi analisado o número de móveis e imóveis e registrado em fichas de controle de teste. Para calcular a CE_{50,48h} (Concentração Efetiva que causa Imobilidade em 50% dos organismos expostos considerando um período de 48 horas de exposição), foi utilizado o software *Graphpad Prism versão 6.0*.

2.5 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA

Para o teste crônico foram utilizadas metodologias descritas nas normativas nº 211/2012 da OECD (OECD, 2012) e ISO 10.706/2000 (ISO, 2000). O teste de toxicidade crônica teve como objetivo a verificação da longevidade, reprodução e crescimento do microcrustáceo *D. magna*. O teste teve duração de 21 dias e consistiu na exposição de 10 neonatos de forma individual a diferentes concentrações de nanopartículas de prata, além

de um controle negativo. Os testes de toxicidade crônica foram realizados em triplicata.

Após o resultado da concentração efetiva (concentração que causou a imobilidade em 50% dos organismos expostos) obtida no teste de toxicidade aguda, foi definido as diluições com valores menores que o resultado da concentração da $CE_{50,48h}$, visto que estas não apresentariam efeitos letais, assim as concentrações foram: $0,025\mu\text{g. L}^{-1}$; $0,035\mu\text{g. L}^{-1}$; $0,045\mu\text{g. L}^{-1}$; $0,055\mu\text{g. L}^{-1}$; $0,065\mu\text{g. L}^{-1}$ e $0,075\mu\text{g. L}^{-1}$. O teste conteve no total sessenta (60) réplicas, sendo dez (10) réplicas para cada concentração e dez (10) para o controle negativo.

Por meio da Equação 1 foram determinados os volumes necessários da suspensão de AgNP. Cada volume foi disposto em balões volumétricos de 250 mL sendo o restante preenchido com M4, e após divididos em 10 béqueres, nos controles negativos os organismos estavam em contato apenas com o meio M4. Posteriormente, adicionou-se em cada recipiente 1 neonato com idade máxima de 24h, totalizando 10 organismos por diluição.

Cada teste crônico durou 21 dias, sendo um teste semi-estático com manutenção (higienização dos béqueres de cultivo, troca do meio M4 e alimentação dos organismos) realizada três (03) vezes por semana. Neste período o mesmo foi mantido à luz difusa (fotoperíodo de 16h diárias) e com temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Esta metodologia é diferenciada dos testes agudos, visto que neste é adicionado alimento aos organismos, 10^6 céls. ml^{-1} por indivíduo conforme sugere DIN 38412 (DIN, 1989).

Durante a execução do teste foram observados os parâmetros de longevidade, reprodução, tempo para a primeira prole e crescimento. A longevidade foi verificada através do acompanhamento de organismos móveis e retirada de organismos imóveis do teste.

A reprodução foi acompanhada diariamente, sendo que após o início do período reprodutivo os neonatos foram contabilizados e para a primeira e penúltima postura utilizados para os testes de multiplas gerações. O restante das posturas foi contabilizado e descartado.

Assim como a reprodução, o tempo para a primeira prole foi acompanhado diariamente, após os neonatos foram contabilizados e as informações anotadas para posterior análise.

No final do teste crônico, cada organismo foi analisado por meio de uma lupa de aumento 40x, a fim de medir seu tamanho e verificar alterações morfológicas, após as *D. Magna* adultas foram dispostas no teste de pós exposição. Todas as informações

necessárias para análise foram anotadas em fichas de controle de teste.

Assim como no teste agudo, o software utilizado para a obtenção dos resultados foi o *Graphpad Prism versão 6.0*. Por meio do teste ANOVA, empregando o teste de Dunnett, pode-se comparar os resultados obtidos no controle com as concentrações analisadas, possibilitando determinar a diferença significativa de 95% entre as mesmas. Além disso foi analisado a menor concentração que causa efeitos deletérios estatisticamente significativos nos organismos (CEO), e a maior concentração do agente tóxico que não causa efeito deletério (CENO)

2.6 TESTE DE MÚLTIPLAS GERAÇÕES

A metodologia utilizada para os testes de múltiplas gerações se baseou em Gonçalves et al., 2018 com pequenas adaptações. De acordo com tal metodologia as concentrações utilizadas no teste de múltiplas gerações foram as mesmas realizadas no teste crônico. O teste teve duração de 21 dias e foram mantidos expostos a suspensão de AgNP, após foram analisados alguns parâmetros tais como, o crescimento e a longevidade, o tempo até a primeira prole, o número de neonatos, e estes comparados com os do controle.

Para cada concentração foram utilizados 1 neonato (<24h) por replica contendo 25 mL do meio de teste. Foram mantidos os testes nas mesmas condições da cultura/teste crônico, ou seja, com temperatura ambiente controlada de 20° C(±2°C) e fotoperíodo de 16 horas. A cada dois dias foram renovados os meios das amostras e do controle negativo, e os indivíduos foram alimentados com uma suspensão da alga *D. subspicatus*. A nomenclatura utilizada inicialmente para o teste parental foi F0, para a primeira geração de neonatos nascidos entre o 10° e o 12° dia de teste foi denominada como F1, e os organismos nascidos no 19° e 20° (quarta postura) como F4.

Após finalizado o teste, os dados obtidos foram processados estatisticamente por meio do teste ANOVA empregando o teste de Dunnett com o auxílio do software GraphPad Prisma versão 6.0.

2.7 TESTE PÓS EXPOSIÇÃO A SUSPENSÃO AgNP

A metodologia de pós exposição foi realizada de acordo com Barata et al., (2017) com algumas modificações. As *Daphnias* adultas provenientes de testes crônicos e dos testes de multigeração com exposição a AgNPs foram expostas ao M4 (meio de cultura)

e realizado o mesmo procedimento de manutenção e acompanhamento do teste crônico, ou seja um teste semi-estático, com trocas do meio/substância de exposição três vezes por semana, fotoperíodo (16/8 – claro/escuro) temperatura controlada (20°C), alimentação e duração de 21 dias. O parâmetro de reprodução foi avaliado e comparado aos efeitos das *D. magna* durante e após cessar o contato com as AgNPs.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

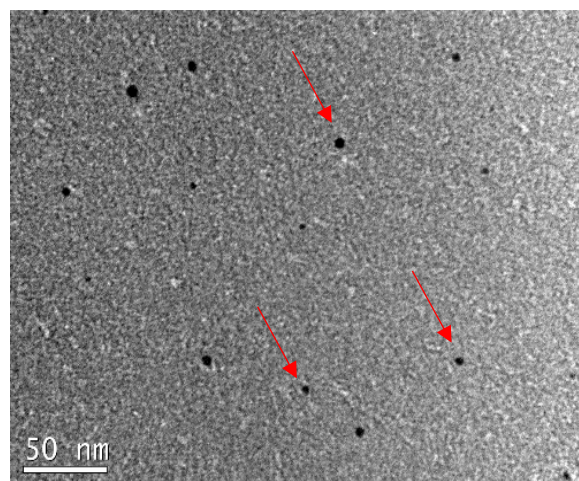
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

3.1.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os pontos destacados em coloração preta, apresentados na Figura 2, representam as AgNP. Desta forma, foi possível definir que as AgNP sintetizadas para o presente estudo, possuem forma esférica e estão dispersas no meio. Além disso, o tamanho médio das nanopartículas individuais foi calculado a partir da medida de 100 (cem) nanopartículas aleatoriamente, por meio do Software Imagem J. Desta forma conclui-se que o diâmetro que prevalece de partículas é de dimensão 4,6 nm (Figura 2).

Resultado semelhante aos observados nos estudos de Lin et al. (2020), Kudryashov et al. (2020), Prymak et al. (2018) e Baláž et al. (2017), atestando a confiabilidade do resultado obtido nesse estudo. Além disso, considerando a dispersão das nanopartículas, pode-se indicar que as mesmas não estão em estado de aglomeração, como também verificado por Majeed et al. (2018).

Figura 2: Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão obtida para a suspensão das AgNP.



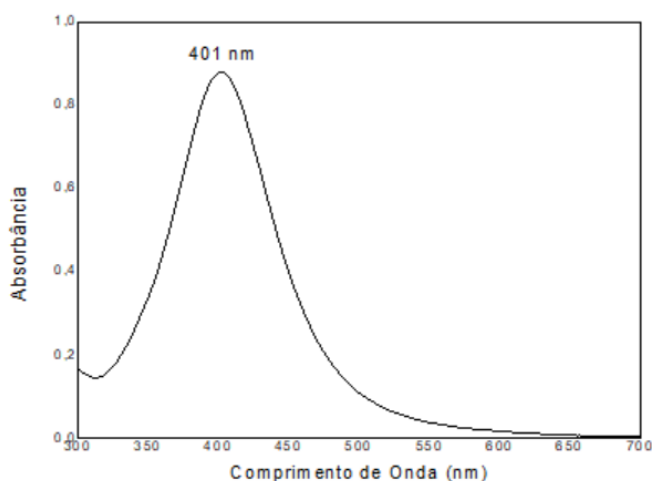
Fonte: Laboratório de Microscopia Central da UFSC.

3.1.2 Espectroscopia de absorção UV-VIS

Através da Figura 3, é possível visualizar a curva característica de AgNPs no espectro UV-VIS, no qual relaciona a absorbância com o comprimento de onda. Desta forma, pode-se obter o resultado da absorção máxima e a distribuição do tamanho de partículas. No presente estudo, a absorbância máxima transcorreu no comprimento de onda de 401nm, confirmando o formato esférico característico às AgNP, em conformidade com Badineni et al. (2020) e Rosa et al. (2017).

Becaro et al. (2015) realizaram a síntese da AgNP por meio da redução química e utilizaram o PVA como agente estabilizante, e assim assemelhando, obtiveram a absorbância máxima em 400nm. Do mesmo modo, Prymak et al. (2018) obteve uma absorbância máxima em 406nm, com as mesmas rotas químicas e agente estabilizante. Rosa et al. (2017), também comprovaram os resultados semelhantes aos desta pesquisa, e obtiveram a absorbância centrada em 420 nm. Ainda assim, conforme Hegazy et al. (2018) o formato equivalente a gaussiana do pico, demonstra uma adequada distribuição de tamanho de partícula.

Figura 3: Curva da AgNP no espectro no UV-VIS, relação da absorbância e do comprimento de onda.



Fonte: Laboratório de Microscopia Central da UFSC.

3.1.3 Potencial Zeta

Segundo Uskokovic et al. (2011) o Potencial Zeta (PZ) permite determinar a carga superficial das AgNPs, e pode ser utilizado como indicador da estabilidade das

suspensões. Desta forma considerou-se três (03) meios diferentes para análise: AgNP pura, AgNP diluída em M4, e AgNP diluída em meio ISO, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados das medidas de PZ e pH em três meios de análise.

AgNP	pH	PZ ± DP (mV)
H ₂ O OR	7,7	-0,95 ± 0,08
M4	7,9	-4,80 ± 0,39
ISO	7,9	-4,39 ± 0,35

Fonte: A Autora (2020)

Além disso, segundo Ahmed et al. (2017), a carga superficial interfere na toxicidade dos AgNPs e nas suas relações com os organismos. Desta forma, conforme Bechtold (2011), quando o valor do PZ for menor ou igual a -30mV e maior ou igual a 30mV, as partículas podem ser consideradas estáveis, não ocorrendo aglomerações das AgNP. Ainda assim, quando o valor do PZ está próximo de 0mV, a velocidade de aglomeração aumenta (BECHTOLD, 2011).

Desta forma, analisando a Tabela 1, pode-se perceber que todas as análises encontram-se fora da faixa apresentada por Bechtold (2011), compreendendo assim que as partículas possuem certo grau de instabilidade. Em razão disso, as maiores aglomerações ocorreram na AgNP pura, as demais condições, distaram significativamente do ponto isoelétrico (ponto menos estável), estando mais estável quando diluída no meio ISO ou M4.

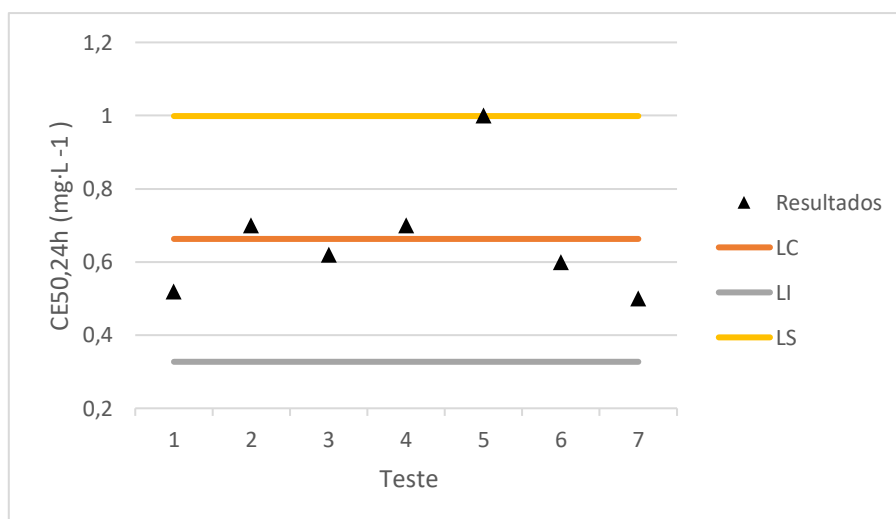
Assim sendo, os resultados obtidos nesta pesquisa em relação a NP pura são semelhantes aos resultados apresentados por Becaro et al. (2015), sendo assim, mesmo que o valor do potencial Zeta esteja discrepante com a literatura, a estabilização esférica da suspensão da AgNP pode ser considerada pela presença do PVA, justificando o valor reduzido da carga superficial, através do potencial de estabilização da mesma.

Ainda assim, de acordo com Zawrah et al. 2016 a análise do pH torna-se essencial na avaliação do PZ, sendo que as NP estáveis, encontram-se afastadas do ponto isoelétrico, visto que neste ponto a atração entre as partículas é maximizada. Desta forma ao mudar alterando o pH ocorrerá a mudança da carga superficial na superfície das nanopartículas e as mesmas exercerão uma força repulsiva entre elas (KHAIRUL et al., 2016).

3.2 TESTES DE SENSIBILIDADE COM *Daphnia magna*

Na Figura 4, estão apresentados os resultados dos testes de sensibilidade realizados durante o período de execução dos testes de toxicidade aguda, e inicialmente ao teste crônico. Neste período a sensibilidade variou de 0,50 mg. L⁻¹ a 1,00 mg. L⁻¹, sendo assim não foram utilizados os neonatos do período de teste que apresentaram valores fora da faixa recomendada pela ISO 6341/2012 (ISO, 2012).

Figura 4: Carta-control de sensibilidade do organismo teste *Daphnia magna* considerando como substância de referência o dicromato de potássio 10 mg. L⁻¹.



Fonte: A Autora (2020)

Desta forma, como apresentado na Figura 4, os resultados obtidos estão representados pelos triângulos em preto, o Limite Central (LC), que reproduz a média dos resultados, o Limite Inferior (LI) calculado por meio da média menos dois desvios padrão e o Limite Superior (LS) calculado somando-se a média com dois desvios padrão.

Sendo assim, obteve-se uma CE_{50,24h} média de 0,66 mg. L⁻¹ e o desvio padrão foi aproximadamente 0,17 mg. L⁻¹, estando na faixa ideal para a realização dos testes, estabelecida pela norma ISO 6341/2012 (ISO, 2012).

3.3 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM *Daphnia magna*

Para a obtenção da CE_{50,48h} foram realizados sete (07) testes de toxicidade aguda com *D. magna*, sendo assim, na Tabela 2 estão apresentados os respectivos resultados, conjuntamente com o intervalo de confiança (IC) de 95%. A análise estatística foi realizada no programa *GraphPad Prism versão 6.0*.

Tabela 2: Parâmetros registrados de pH e OD e valores de $CE_{50,48h}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) calculados com base nos resultados dos testes de toxicidade com *Daphnia magna*, para IC de 95%.

Teste	pH	Oxigênio Dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$CE_{50,48h}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	IC (95%)
1	11,50	7,15	0,13	$0,10 \pm 0,16$
2	6,80	6,50	0,19	$0,15 \pm 0,23$
3	8,12	7,90	0,13	$0,10 \pm 0,16$
4	7,37	7,45	0,08	$0,06 \pm 0,10$
5	6,97	7,60	0,19	$0,17 \pm 0,16$
6	7,36	7,89	0,11	$0,07 \pm 1,17$
7	8,16	6,67	0,08	$0,07 \pm 0,09$
		MÉDIA	0,13	$0,11 \pm 0,17$

Fonte: A Autora (2020)

Analisando a Tabela 2, pode-se perceber que a os valores apresentaram resultados variados entre $0,08 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (testes 4 e 7) e $0,19 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (testes 2 e 6) com uma média global da $CE_{50,48h}$ de $0,13 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Pode-se afirmar que a variação da $CE_{50,48h}$ está relacionada com o comportamento instável da AgNP em testes e condições de exposição. Dessa forma a alteração do pH (YIN et al., 2014) e a estabilidade da força iônica influenciam diretamente na rota e na toxicidade das AgNPs (AKAIGHE et al. 2012). Além disso segundo Yue et al. (2015) quando ocorre agregação de AgNP e aumenta a liberação de íons de prata, consequentemente aumenta a força iônica, e desta forma causando maior toxicidade.

Ainda assim, segundo Durán et al. (2018) devido à instabilidade das AgNP, há possibilidade de ocorrer oxidação para formação de Ag^+ , quando expostas a água e ao oxigênio. Além disso a área superficial influencia diretamente na toxicidade das NPs de Ag, visto que uma maior área consequentemente poderá proporcionar maior liberação de íons Ag^+ .

3.4 TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA COM *Daphnia magna*

3.4.2 Teste de toxicidade crônica geração parental F0

Os resultados para longevidade, fecundidade, início da primeira postura, número médio de posturas e crescimento obtidos nos testes estão apresentados na Tabela 3, e foram comparados com o controle negativo por meio da ANOVA empregando o teste de

Dunnett, com efeitos significativos de 95% ($p < 0,05$), 99% ($p < 0,01$) e 99,9% ($p < 0,001$).

Desta forma, pode-se determinar a CEO e a CENO.

Tabela 3: Resultados para o teste de toxicidade crônica da geração parental F0 com a suspensão de AgNP utilizando como organismo teste o microcrustáceo *Daphnia magna*.

F0	Concentração (µg/L)	Longevidade (%)	n	Fecundidade	n	Início da primeira postura (dias)	n	Número médio de posturas	n	Crescimento (mm)	n
AgNP	Controle negativo	100	30	9,80 ± 4,95	30	12,83 ± 1,99	30	2,40±1,07	30	2,76 ± 0,14	30
	0,025	83,33	30	8,65 ± 2,13	26	12,19 ± 2,00	26	2,77±0,65	26	2,71 ± 0,09	24
	0,035	83,33	30	9,22 ± 2,31	27	12,19 ± 1,41	27	2,67±0,48	27	2,70 ±0,11	26
	0,045	83,33	30	9,36 ± 3,53	22	12,77 ± 2,04	22	2,73±0,76	22	2,70 ±0,12	22
	0,055	60,00**	30	11,56 ± 3,15***	18	12,39 ± 2,06	18	2,89±0,90	18	2,81 ± 0,11	18
	0,065	56,67***	30	12,44 ± 3,19***	18	12,47 ± 2,76	19	3,00±0,84	18	2,83 ± 0,12	15
CEO		0,055		0,055		SE		SE		SE	
CENO		0,045		0,045		SE		SE		SE	

Obs.: os asteriscos correspondem ao grau de significância, sendo que: *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001**

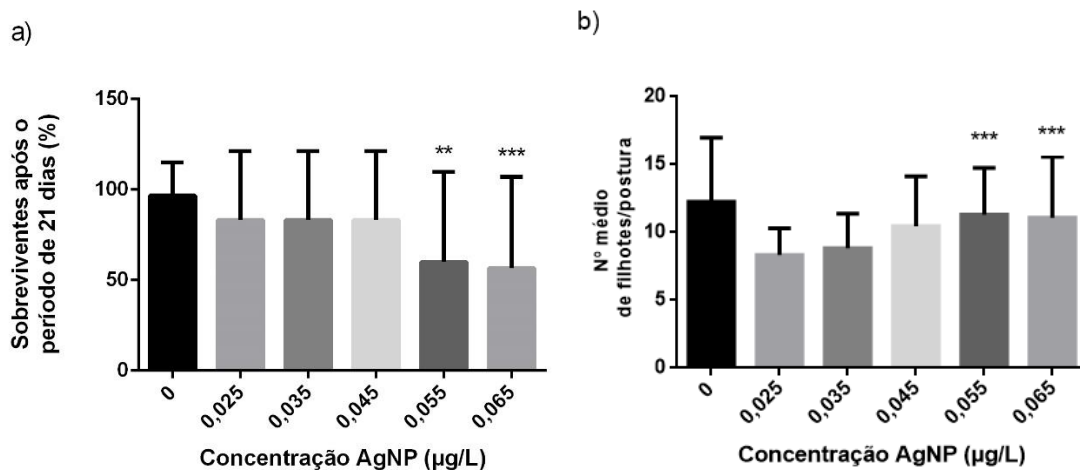
Legenda: n: número de organismos representantes da amostra, SE: Sem Efeito e ND: Não Determinado

Fonte: A Autora (2020).

A partir dos resultados obtidos e dispostos na Tabela 3, analisou-se que o teste F0 apresentou efeitos estaticamente relevantes para o parâmetro longevidade e fecundidade. Em relação ao parâmetro longevidade, ao fim de 21 dias (período de teste) percebeu-se nas maiores concentrações a redução do número de organismos expostos à suspensão de AgNP quando comparado com o controle negativo (CN), como é possível observar na Figura 4a. Sendo assim, a CEO para a longevidade é de 0,055 $\mu\text{g. L}^{-1}$ a CENO 0,045 $\mu\text{g. L}^{-1}$.

Distinto a longevidade, no parâmetro fecundidade o número médio de filhotes/postura aumentou gradativamente conforme o aumento da concentração, ao comparar com o controle negativo, conforme Figura 4b. Desta forma a CEO para a fecundidade é de 0,055 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e a CENO 0,045 $\mu\text{g. L}^{-1}$.

Figura 4: Efeito crônico na geração F0 para o parâmetro longevidade (a) e fecundidade (b), após contato com a suspensão de AgNP e utilizando o organismo teste o microcrustáceo *Daphnia magna*



Obs: os asteriscos correspondem ao grau de significância, sendo que: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Fonte: A Autora (2020)

Sakka et al. (2016), realizaram testes crônicos de duas nanopartículas de prata com estabilizações diferentes, com tamanho de 143 nm e 96 nm, respectivamente, utilizando também o organismo teste *D. magna*. Os resultados obtidos por Sakka et al. (2016) indicaram que a mortalidade dos organismos aumentou nas concentrações mais elevadas (19,2 e 38,5 $\mu\text{g. L}^{-1}$) de AgNP, o que corrobora os resultados do presente estudo.

Da mesma forma, Mackevica et al. (2015) apresentaram resultados acerca da taxa de sobrevivência da *D. magna*, sendo que a mortalidade aumentou 60% na concentração mais alta de 1,6 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de AgNP, assim como o observado neste estudo, através da avaliação percentual no parâmetro longevidade.

Ainda assim Hu et al. (2018) estudaram a faixa de exposição de 0,1-3,2 e 10-320 $\mu\text{g. AgNP L}^{-1}$ e também encontraram alterações na taxa de sobrevivência, onde o número de organismos diminuiu com o aumento da concentração de exposição, sendo a taxa de sobrevivência de 45% na concentração mais alta.

Segundo Rossetto et al. (2014), o aumento da fecundidade nas concentrações mais altas em comparação ao controle negativo, pode ser justificado pela exposição às AgNP, na qual causam uma situação adversa ou estressante aos organismos. Nessas circunstâncias de desequilíbrio os organismos se reproduzem em maiores quantidades para continuidade de sua espécie, sendo assim, essa alteração é uma resposta frente a uma perturbação.

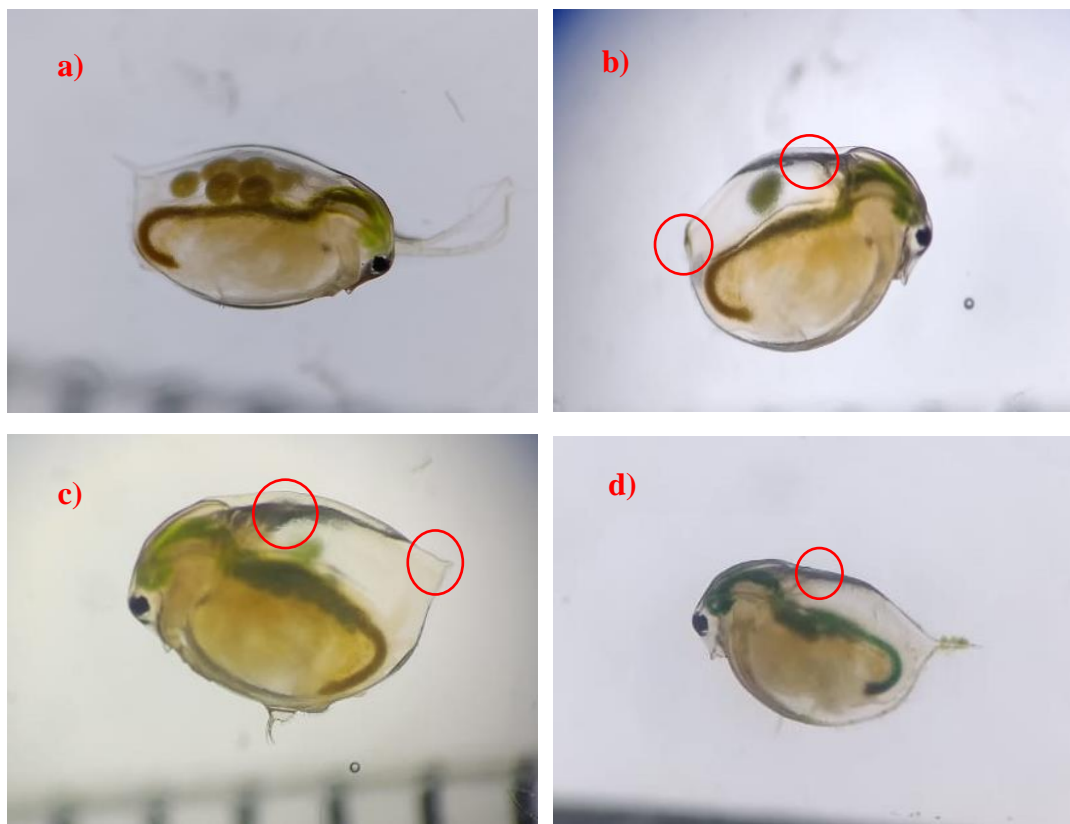
Ainda assim, como identificado neste estudo, Sorensen et al. (2016) verificaram que após a exposição dos indivíduos para a faixa de tratamento de 10, 50 e 200 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de AgNP obteve-se dados em que o número de neonatos aumentou estatisticamente insuficiente com a concentração de AgNP. Esse resultado também foi relatado por Mackevica et al. (2015), para o mesmo tipo de AgNP a 10 $\mu\text{g Ag L}^{-1}$.

Entretanto, Sakka et al. (2016), investigaram a exposição dos indivíduos na faixa de tratamento de 5, 10, 15, 30 e 60 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de AgNP e perceberam que nas maiores concentrações (19,2 e 38,5 $\mu\text{g. L}^{-1}$ para AgNP estabilizadas com citrato e 27,5 $\mu\text{g. L}^{-1}$ estabilizadas com detergente), o número de neonatos diminuiu abaixo dos níveis do controle negativo, contrariando os dados estudados na pesquisa, visto o aumento da reprodução em 0,055 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e 0,065 $\mu\text{g. L}^{-1}$. Apesar disso, como também pôde ser verificado neste estudo, Sakka et al. (2016), perceberam que o número de posturas e a data de início da reprodução não foram estatisticamente significativos em comparação ao controle negativo.

Assim como nesta pesquisa, Sakka et al. (2016) e Sorensen et al. (2016) não encontraram efeitos significativos no comprimento do corpo, não existindo diferenças entre o controle e todas as concentrações testadas de AgNP. Entretanto, Hu et al. (2018), encontraram efeitos no comprimento da *D. magna* nas maiores concentrações testadas.

Além dos efeitos apresentados anteriormente, no final do período de teste verificou-se alterações morfológicas nos organismos, como mostrado na Figura 5.

Figura 5: Alterações morfológicas visualizadas na *D. magna* após o período de teste crônico da geração parental F0. a) organismo do controle negativo; b) e c) organismos da concentração 0,055 $\mu\text{g. L}^{-1}$, d) organismo da concentração 0,065 $\mu\text{g. L}^{-1}$



Fonte: A Autora (2020)

A partir das imagens apresentadas na Figura 5, pode-se perceber alterações na morfologia dos organismos em razão da exposição a AgNP. Ao comparar o organismo do controle negativo (Figura 5a) com os demais organismos, nota-se redução do espinho apical, assinalados com um círculo (Figura 5b e 5c). Além disso foram visualizados organismos com manchas escuras na bolsa incubadora (Figura 5a, 5b e 5c) ou em outra parte do corpo, podendo ser indicativo de acúmulo de AgNP.

Ainda assim, essa alteração morfológica também foi percebida por Becaro et al. (2015), onde tanto em indivíduos jovens como adultos verificou-se aglomerações de AgNP em partes do corpo no período de teste.

Avaliando os organismos de cada concentração testadas, pôde-se verificar as alterações indicadas superior a 35% dos organismos. Sendo assim, constata-se que as

alterações morfológicas provenientes da exposição à AgNP podem ser consideradas graves.

Foi verificado durante o decorrer do teste o surgimento de ovos de resistência (anomalia oriunda de condições desfavoráveis como falta de alimento, temperatura, e agentes tóxicos, sendo assim fêmeas diploides produzem assexuadamente fêmeas e machos diplóides que sexuadamente produzem ovos de resistências, os efípios) na concentração $0,065 \mu\text{g. L}^{-1}$, no qual surgiram em decorrência de condições adversas em que o organismo estava exposto.

3.4.3 Teste de toxicidade crônica pós exposição ($F0^{PE}$)

Os organismos dos testes de toxicidade crônicos pós exposição, são provenientes da geração parental $F0$, onde após a finalização do teste crônico, os organismos sobreviventes foram dispostos em meio M4 permanecendo durante o período de 21 dias, realizando a manutenção três (03) vezes na semana.

Foram comparados o CN com a geração $F0$ e a $F0^{PE}$ nos parâmetros longevidade, fecundidade, número médio de posturas e crescimento, apresentados na Tabela 4. A análise estatística ocorreu por meio da ANOVA e o teste de Dunnett com efeitos significativos de 95% ($p < 0,05$), 99% ($p < 0,01$) e 99,9% ($p < 0,001$). Desta forma, pode-se determinar a CEO e a CENO.

Tabela 4: Resultados do teste de toxicidade do crônico pós exposição (F0^{PE}) para a geração parental (F0) mantido em meio M4 pelo período de 21 dias, utilizando o organismo teste o microcrustáceo *Daphnia magna*.

F0 e F0 ^{PE}	Concentração (µg/L)	Longevidade F0 ^{PE} (%)	n	Longevidade F0 (%)	n	Fecundidade F0 ^{PE}	n	Fecundidade F0	n	Número médio de posturas F0 ^{PE}	n	Número médio de posturas F0	n	Crescimento F0 ^{PE} (mm)	n	Crescimento F0 (mm)	n
AgNP	Controle negativo	83,33	30	100	30	8,04 ± 3,49	25	9,80 ± 4,95	30	2,79 ± 1,23	28	2,40±1,07	30	2,89 ± 0,07	25	2,76 ± 0,14	30
	0,025	46,67*	30	83,33	30	8,00 ± 3,01	14	8,65 ± 2,13	24	3,00 ± 1,45	21	2,77±0,65	26	2,85 ± 0,10	14	2,71 ± 0,09	24
	0,035	46,67*	30	83,33	30	8,86 ± 3,25	14	9,22 ± 2,31	25	2,91 ± 1,44	23	2,67±0,48	27	2,89 ± 0,12	14	2,70 ± 0,11	26
	0,045	70,00	30	83,33	30	10,44 ± 4,37	18	9,36 ± 3,53	21	3,60 ± 1,35	20	2,73±0,76	22	2,85 ± 0,17	20	2,73 ± 0,12	22
	0,055	53,33	30	60,00**	30	12,87 ± 4,66***	15	11,56 ± 3,15***	17	4,00 ± 1,37*	17	2,89±0,90	18	2,87 ± 0,13	15	2,81 ± 0,11	18
	0,065	53,33	30	56,67***	30	11,50 ± 2,90*	14	12,44 ± 31,89***	17	3,37 ± 1,41	16	3,00±0,84	18	2,83 ± 0,10	14	2,83 ± 0,12	15
CEO		0,025		0,055		0,055		0,055		0,055		SE		SE		SE	
CENO		0,045		0,045		0,045		0,045		0,045		SE		SE		SE	

Obs.: os asteriscos correspondem ao grau de significância, sendo que: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001
 Legenda: n: número de organismos representantes da amostra, SE: Sem Efeito e ND: Não Determinado.

Fonte: A Autora (2020)

A partir dos resultados expostos na Tabela 4 percebeu-se que para esta condição de pós exposição ($F0^{PE}$) houveram efeitos significativos para os parâmetros longevidade, fecundidade e no número médio de posturas. Em relação a longevidade pode-se perceber redução no número de organismos no final do período de 21 dias em relação ao CN, nas concentrações $0,025 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,035 \mu\text{g.L}^{-1}$ como é possível verificar na Figura 5a, entretanto nas maiores concentrações pode-se perceber redução de praticamente 50% dos organismos. Sendo assim obteve-se como CEO $0,025 \mu\text{g.L}^{-1}$, e os efeitos não foram observados, a partir da concentração, $0,045 \mu\text{g.L}^{-1}$, desta forma definida como a CENO.

Ainda assim, divergente dos resultados da geração F0, onde os organismos foram afetados significativamente nas maiores concentrações, em $F0^{PE}$ houveram reduções nas menores concentrações, porém, essa dissemelhança é minimizada quando analisado o tempo de vida dos organismos. As *D. magnas* completaram 42 dias de vida, desta forma ocorreu a mortalidade natural das mesmas, assim como também pôde ser verificado no controle negativo. Desta maneira como afirma EPA (2002), o ciclo de vida médio da *D. magna* é de 40 dias em condições de temperatura na faixa de 25°C e de 56 dias para temperatura de 20°C .

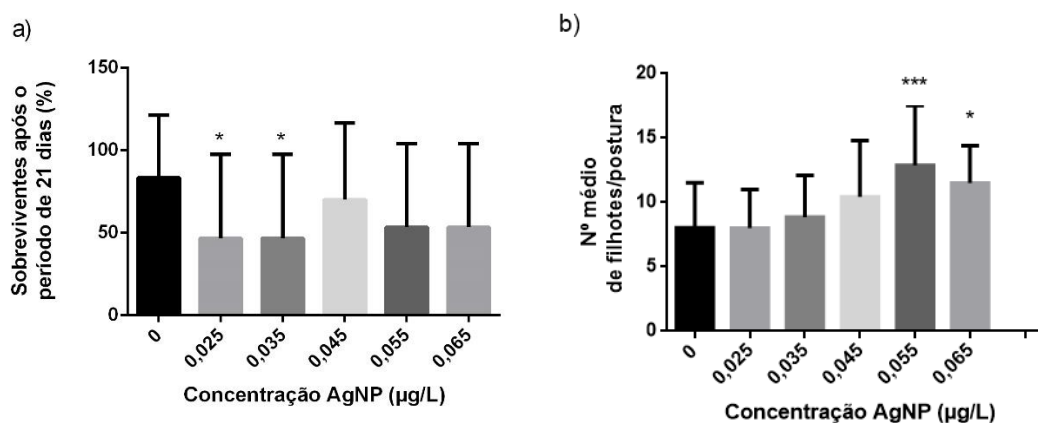
Já em relação a fecundidade, foram observados efeitos a partir da concentração de $0,055 \mu\text{g.L}^{-1}$, sendo assim foi definida como CEO para a fecundidade. Abaixo desta concentração, não foram observados efeitos, logo a CENO é $0,045 \mu\text{g.L}^{-1}$, conforme Figura 5b. Além disso ao comparar a geração F0 com $F0^{PE}$ pode-se perceber o aumento gradativo no número de filhotes na geração pós exposição, em relação ao CN. Esse resultado revela que os organismos em ambiente não tóxico, conseguiram retomar o número de filhotes, podendo entender esse aumento como um efeito de recuperação dos organismos. Nas concentrações mais baixas onde os organismos não foram significativamente afetados na pós exposição não obteve-se efeitos estatisticamente relevantes, em razão dos mesmos conseguirem se manter nas condições de contato com baixas concentrações de NP.

Quanto ao número médio de posturas, análogo aos dados obtidos da fecundidade em F0, os organismos tiveram resultado superior em relação a prole, quando comparado com o CN, compreendendo assim que as menores concentrações não são tão prejudiciais ao longo do tempo. Ainda assim pode-se perceber que na geração F0 o número médio de posturas aumentou ligeiramente, porém sem efeito significativo, mas ao analisar a $F0^{PE}$,

em todas as concentrações houve o aumento da prole, entendendo assim como um efeito positivo em relação a recuperação dos organismos.

O parâmetro crescimento aumentou ligeiramente em F0^{PE} ao comparar com F0, ambos sem efeitos significativos, entretanto esse resultado é favorável para a recuperação dos organismos ao longo do tempo.

Figura 5: Resultado gráfico do teste crônico pós exposição (F0^{PE}) em meio M4, com o organismo teste o microcrustáceo *Daphnia magna* para a) Longevidade e b) Fecundidade.



Obs: os asteriscos correspondem ao grau de significância, sendo que: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Fonte: A Autora (2020)

3.4.3 Teste de toxicidade crônica para múltiplas gerações, geração F1 e F4 do microcrustáceo *Daphnia magna*

Na Tabela 5 e 6 estão apresentados os resultados referentes ao teste de múltiplas gerações, realizado com a primeira geração (F1) e a penúltima geração (F4) de neonatos da geração parental (F0) do microcrustáceo *D. magna*. A fim de avaliar os parâmetros de longevidade, fecundidade, número total de posturas, primeira prole e crescimento.

Tabela 5: Resultado do teste de multigeração com suspensão da AgNP, após 21 dias de exposição, utilizando o organismo teste o microcrustáceo *Daphnia magna*

$\mu\text{g. L}^{-1}$	Longevidade (%)						Crescimento (mm)					
	F0	n	F1	n	F4	n	F0	n	F1	n	F4	n
CN	100	30	96,67	30	93,33	30	$2,76 \pm 0,14$	30	$2,71 \pm 0,18$	29	$2,77 \pm 0,23$	28
0,025	83,33	30	86,67	30	80,00	30	$2,71 \pm 0,09$	24	$2,74 \pm 0,09$	25	$2,74 \pm 0,14$	24
0,035	83,33	30	73,33	30	90,00	30	$2,70 \pm 0,11$	26	$2,75 \pm 0,13$	22	$2,73 \pm 0,10$	27
0,045	83,33	30	80,00	30	90,00	30	$2,73 \pm 0,12$	22	$2,72 \pm 0,16$	22	$2,76 \pm 0,09$	26
0,055	60,00**	30	73,33	30	86,67	30	$2,81 \pm 0,11$	18	$2,76 \pm 0,09$	22	$2,82 \pm 0,09$	26
0,065	56,67***	30	93,33	30	80,00	30	$2,83 \pm 0,12$	15	$2,77 \pm 0,15$	28	$2,81 \pm 0,10$	24

* = diferente significativamente em relação ao controle

Fonte: A Autora (2020)

Tabela 6: Resultado do teste de toxicidade crônica de multigeração com suspensão da AgNP, após 21 dias de exposição, utilizando o organismo teste o microcrustáceo *Daphnia magna*

$\mu\text{g. L}^{-1}$	Fecundidade						Número total de posturas						Início da primeira Postura (dias)					
	F0	n	F1	n	F4	n	F0	n	F1	n	F4	n	F0	n	F1	n	F4	n
CN	$9,80 \pm 4,95$	30	$7,72 \pm 2,14$	29	$5,57 \pm 2,59$	28	72	30	66	29	64	27	$12,83 \pm 1,99$	30	$13,48 \pm 0,95$	29	$13,00 \pm 1,30$	26
0,025	$8,65 \pm 2,13$	26	$10,58 \pm 3,57^{**}$	26	$7,58 \pm 4,44^{**}$	20	72	26	79	28	53	20	$12,19 \pm 2,00$	26	$12,32 \pm 1,52$	28	$12,20 \pm 1,82$	20
0,035	$9,22 \pm 2,31$	27	$8,27 \pm 3,10$	22	$8,14 \pm 3,65^{*}$	26	72	27	61	23	73	28	$12,19 \pm 1,41$	27	$13,68 \pm 2,23$	22	$12,57 \pm 2,36$	28
0,045	$9,36 \pm 3,53$	22	$8,67 \pm 4,10$	24	$10,19 \pm 3,48^{****}$	26	60	22	57	25	78	29	$12,77 \pm 2,04$	22	$14,52 \pm 2,79$	25	$11,36 \pm 0,91^{**}$	28
0,055	$11,56 \pm 3,15^{***}$	18	$9,09 \pm 3,78$	22	$7,89 \pm 5,34^{**}$	24	52	18	56	24	65	26	$12,39 \pm 2,06$	18	$13,67 \pm 2,26$	24	$11,00 \pm 2,27^{***}$	25
0,065	$12,44 \pm 31,89^{***}$	18	$9,50 \pm 3,45$	28	$8,87 \pm 8,50^{****}$	15	54	18	78	29	50*	15	$12,47 \pm 2,76$	19	$13,70 \pm 2,77$	29	$11,93 \pm 2,06$	14

* = diferente significativamente em relação ao controle

Fonte: A Autora (2020)

A partir dos resultados apresentados na Tabela 5, pode-se perceber que somente na geração parental F0 houve efeitos significativos no parâmetro longevidade, sendo que nas concentrações 0,055 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e 0,065 $\mu\text{g. L}^{-1}$ ocorreram as maiores taxas de mortalidade. Ainda assim é possível verificar que os neonatos da geração F1 e F4 tornaram-se mais resistentes ao agente tóxico do que a geração F0, em decorrência a estarem um maior tempo expostos.

Em relação ao crescimento não foram apresentados efeitos significativos em nenhuma prole, entretanto verificou-se o aumento no comprimento da *D. magna* em todas as gerações (F0, F1 e F4) nas concentrações mais altas, quando comparado ao controle negativo. Ainda Hartmann et al. (2019) estudaram os efeitos nos organismos na faixa de concentração de (1,25; 2,5; 5,0 e 10) $\mu\text{g. L}^{-1}$ e obtiveram efeitos estatisticamente significativos no comprimento do corpo apenas na concentração mais alta, resultando no comprimento corporal maior em comparação ao CN, nas demais concentrações os resultados não diferiram entre o controle e as concentrações testadas.

Na Tabela 6, estão apresentados os resultados referentes a fecundidade, número total de posturas e início da primeira postura. Pode-se perceber que em relação a fecundidade todas as gerações com exceção da concentração 0,025 $\mu\text{g. L}^{-1}$ em F0, se reproduziram em maior quantidade do que o controle negativo. Na geração F1, foram verificados efeitos significativos na primeira concentração de teste, já em F4 os efeitos foram percebidos em todas as concentrações, sendo assim pode-se perceber que os organismos até mesmo nas menores concentrações sofreram efeitos estressores, ocasionando no aumento da reprodução, a fim de perpetuar a espécie.

Porém Hartmann et al. (2019) ao analisar o efeito multigeracional de várias gerações verificou que o número médio de filhotes nas maiores concentrações foi inferior em comparação com o controle negativo, contrariando os dados desta pesquisa. Ainda percebeu que na geração F1 na concentração mais baixa e nas duas mais altas ocorreram as menores taxas de reprodução, dados contrários ao estudo. Ainda Völker et al. (2013) estudaram os efeitos multigeracionais de cinco gerações de *D. magna* da na faixa 2,5, 5 e 10 $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ e perceberam que em todas as concentrações testadas houveram reduções do número de neonatos, quando comparado ao CN.

Em relação ao número total de posturas, foram observados efeitos significativos em F4 na concentração 0,065 $\mu\text{g. L}^{-1}$, esse resultado confere com a Tabela 7, onde

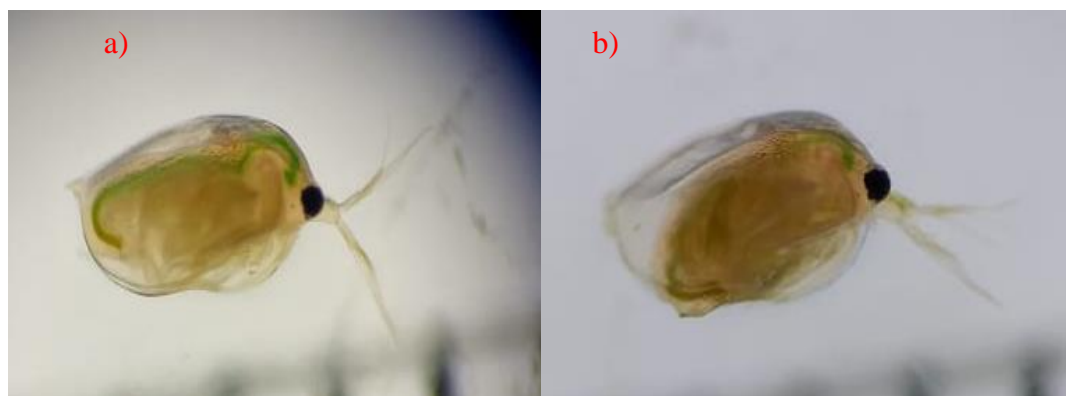
apresenta o número de organismos que não se reproduziram por concentração. E as Figuras 6a e 6b onde verificou-se a presença de machos oriundos da reprodução da geração parental, diminuindo o número total de posturas.

Tabela 6: Número de organismos que não se reproduziram nas gerações F1 e F4.

AgNP ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	F1	F4
0,025	-	4
0,035	-	1
0,045	-	-
0,055	-	4
0,065	-	9
Controle Negativo	-	-

Fonte: A Autora (2020)

Figura 6: Machos visualizados na finalização do teste de toxicidade crônica de multigeração com suspensão de AgNP. a) e b) organismos da concentração $0,065 \mu\text{g.L}^{-1}$ que não se reproduziram.



Fonte: A Autora (2020)

O início da primeira postura foi reduzido na geração F0 ao comparar com o controle negativo. Enquanto na geração F1 a prole aumentou a partir da concentração $0,035 \mu\text{g. L}^{-1}$ comparando com o CN. Já na geração F4 todas as concentrações apresentaram redução no início da primeira postura, quando analisado com o controle negativo, ainda foram percebidos efeitos significativos na concentração $0,045 \mu\text{g. L}^{-1}$ e $0,055 \mu\text{g. L}^{-1}$.

Hartmann et al. (2019) estudaram os principais parâmetros do ciclo de vida da *D. magna* (reprodução, mortalidade, tempo até a primeira prole e comprimento do corpo)

durante seis gerações, e perceberam que somente na segunda e terceira geração o tempo para a primeira prole foi significativamente afetado.

Os resultados apresentados refletem em efeitos multigeracionais, visto que os neonatos provenientes da geração parental, após caracterizados como geração F1 e F4, apresentaram consequências em seu ciclo de vida.

3.4.4 Teste pós exposição da multigeração, geração F1^{PE} e F4^{PE} - Descendentes da geração F0.

Os resultados do teste pós exposição da multigeração, geração F1^{PE} e F4^{PE} – Descendentes da geração F0 estão apresentados na Tabela 7 e Tabela 8.

Tabela 7: Resultado do parâmetro longevidade e crescimento após 21 dias de teste de pós exposição dos testes de toxicidade crônica de multigeração, disposta em meio M4, utilizando o organismo teste o microcrustáceo *Daphnia magna*.

$\mu\text{g. L}^{-1}$	Longevidade (%)								Crescimento (mm)							
	F1	n	F4	n	F1 ^{PE}	n	F4 ^{PE}	n	F1	n	F4	n	F1 ^{PE}	n	F4 ^{PE}	n
CN	96,67	30	93,33	30	93,33	30	83,33	30	2,71 ±0,18	29	2,77 ±0,23	28	2,88 ±0,08	28	2,91 ±0,08	27
0,025	86,67	30	80,00	30	60,00*	30	53,33*	30	2,74 ±0,09	25	2,74 ±0,14	24	2,89 ±0,09	18	2,87 ±0,20	14
0,035	73,33	30	90,00	30	70,00	30	83,33	30	2,75 ±0,13	22	2,73 ±0,10	27	2,90 ±0,09	21	2,96 ±0,08	25
0,045	80,00	30	90,00	30	70,00	30	80,00	30	2,72 ±0,16	22	2,76 ±0,09	26	2,89 ±0,09	32	2,91 ±0,08	24
0,055	73,33	30	86,67	30	53,33**	30	70,00	30	2,76 ±0,09	22	2,82 ±0,09	26	2,87 ±0,06	18	2,86 ±0,08	17
0,065	93,33	30	80,00	30	53,33**	30	76,67	30	2,77 ±0,15	28	2,81 ±0,10	24	2,89 ±0,07	22	2,95 ±0,07	14

* = diferente significativamente em relação ao controle

Fonte: A Autora (2020)

Tabela 8: Resultado do parâmetro fecundidade, número total de posturas e início da primeira postura após 21 dias de teste de pós exposição dos testes de toxicidade crônica da multigeração, disposta em meio M4, utilizando o organismo teste o microcrustáceo *Daphnia magna*.

$\mu\text{g. L}^{-1}$	Fecundidade								Número médio de posturas							
	F1	n	F4	n	F1 ^{PE}	n	F4 ^{PE}	n	F1	n	F4	N	F1 ^{PE}	n	F4 ^{PE}	n
CN	7,72 ± 2,14	29	5,57 ±2,59	28	10,48±5,32	29	12,96±7,36	25	2,28±0,59	29	2,37±0,56	27	3,41±1,09	29	3,54±1,62	28
0,025	10,58 ± 3,57**	26	7,58 ±4,44**	20	11,04±4,86	23	8,95±6,27	21	2,82±0,90	28	2,65±0,74	20	3,74±1,14	23	3,06±1,43	18
0,035	8,27 ± 3,10	22	8,14 ±3,65*	26	11,29±4,86	21	11,38±5,95	26	2,65±0,88	23	2,61±0,92	28	3,82±0,96	22	3,63±1,28	27
0,045	8,67 ± 4,10	24	10,19±3,48****	26	11,75±5,06	24	8,50±2,87	24	2,28±0,89	25	2,69±0,97	29	4,46±1,21*	24	3,31±1,05	26
0,055	9,09 ±3,78	22	7,89 ±5,34**	24	10,96±6,84	23	9,15±5,13	26	2,33±0,87	24	2,50±0,81	26	3,48±1,44	23	3,36±0,73	22
0,065	9,50 ± 3,45	28	8,87 ±8,50*****	15	11,82±6,17	28	9,35±8,50	23	2,69±1,04	29	3,33±0,82**	15	3,75±1,46	28	4,43±1,16	14

* = diferente significativamente em relação ao controle

Fonte: A Autora (2020)

Através da Tabela 7, pode-se verificar que no parâmetro longevidade foram identificados efeitos significativos em F1^{PE} e F4^{PE}. Na pós exposição da primeira geração (F1^{PE}) todas as concentrações reduziram o número de indivíduos de *D. magna* adultas, percebe-se ainda que os organismos sofreram efeitos tóxicos na menor concentração e também nas duas concentrações mais altas, entende-se que os organismos possuem maior sensibilidade ao agente tóxico desde pequenas doses. Ainda ao verificar as gerações F1 e F4 percebe-se que a taxa de sobrevivência é maior do que as gerações pós exposição, justifica-se pelo qual os organismos estavam em meio de teste a mais de 40 dias, observado a média do ciclo de vida da *D. magna* de 56 dias, com temperatura controlada de 20°C (RAND, 1995).

O crescimento em ambas análises não resultaram em efeitos significativos, porém, na maior concentração 0,065 µg. L⁻¹ os organismos possuíam o comprimento do corpo maior, comparado ao CN, desta forma compreende-se que após o término da exposição a AgNP as *D. magnas* conseguiram reagir e aumentar o seu tamanho.

No parâmetro crescimento não foram obtidos efeitos significativos para nenhuma concentração de pós exposição, entretanto, em quase todas as concentrações, inclusive no controle negativo os organismos aumentaram a reprodução quando comparado com F1 e F4, comprovando que a finalização da exposição da AgNP interfere na capacidade de multiplicação da espécie.

Em relação ao número médio de posturas, pode-se perceber que em F1 não foram observados efeitos significativos, enquanto na pós exposição (F1^{PE}) na concentração 0,045 µg. L⁻¹ os organismos se reproduziram mais vezes, ainda assim todas as concentrações tiveram efeito positivo comparando conjuntamente com o controle negativo. O mesmo ocorreu em F4, onde todas as concentrações tiveram o aumento de proles, comparando com o CN, entretanto efeitos significativos foram observados somente na maior concentração, porém em F4^{PE} ocorreu discrepâncias nos resultados, em algumas concentrações os organismos desenvolveram mais posturas, e outras o valor ficou abaixo do controle negativo. Ainda assim, ao comparar a geração F1 e F4 e a pós exposição com a geração parental (Tabela 3), pode-se perceber que F0 não apresentou resultados significativos para nenhuma concentração no número médio de posturas. Apesar disso, segundo Kim et al. (2013) e Arndt et al. (2014) em muitas pesquisas os efeitos tóxicos nos organismos são verificados em gerações pós exposição, apesar de não apresentar nenhuma toxicidade na geração parental.

4 CONCLUSÕES

O presente estudo confirma claramente que o cenário de exposição, pós exposição e múltiplas gerações é de grande importância para avaliar a toxicidade de nanopartículas de prata para organismos aquáticos, desta forma é possível concluir que:

- As AgNP sintetizadas nesta pesquisa, possuem forma esférica (característico da NP) e diâmetro de 4,6 nm não estando em estado de aglomeração e estando estável quando diluída no meio ISO ou M4.
- Nos testes de toxicidade aguda a média global da $CE_{50,48h}$ foi de $0,13 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Na geração parental (F0) no teste de toxicidade crônica nas maiores concentrações verificou-se a redução do número de organismos sobreviventes, já a fecundidade aumentou gradativamente conforme o aumento da concentração.
- Na pós exposição ($F0^{PE}$) da geração parental os efeitos foram significativos na longevidade nas menores concentrações, porém houve redução de 50% dos organismos nas concentrações mais altas, justifica-se pelo tempo de vida da *D. magna*, visto que já estavam a mais de 40 dias em teste.
- Ainda na fecundidade em $F0^{PE}$ os organismos conseguiram retomar o número de filhotes ao comparar com o controle negativo, entendendo assim como um efeito de recuperação dos organismos, já nas menores concentrações não foram identificados efeitos perceptíveis considerando que nestas condições os mesmos conseguiram se manter, resultado positivo em relação a recuperação dos organismos. Assim como o número médio de posturas foi superior em relação a prole, compreendendo assim que as menores concentrações não são tão prejudiciais ao longo do tempo.
- No teste de toxicidade crônica para múltiplas gerações, não foram identificados efeitos perceptíveis na longevidade em nenhuma geração (F1 e F4), diferentemente da geração parental, entretanto os organismos tornaram-se mais resistentes ao agente tóxico do que a geração F0, em decorrência do maior tempo em exposição. Ainda a fecundidade aumentou em praticamente todas as gerações, desta forma, pode-se dizer que os organismos até mesmo nas menores concentrações sofreram efeitos estressores, ocasionando no aumento da reprodução, a fim de perpetuar a espécie.
- Já em relação ao número total de posturas, foram observados efeitos significativos na geração F4 na maior concentração, devido a presença de machos oriundos da reprodução da geração parental. Pode-se afirmar que os resultados obtidos refletem em

efeitos multigeracionais, visto que os neonatos apresentaram consequências em seu ciclo de vida.

- Nos testes de pós exposição da multigeração os organismos apresentaram sensibilidade ao agente tóxico desde pequenas doses além da redução da taxa de sobrevivência pelo ciclo de vida natural da *D. magna*. Também foram percebidos efeitos no número médio de posturas na geração F1^{PE} onde os organismos se reproduziram mais vezes em todas as concentrações em comparação com o CN, porém em F4^{PE} ocorreu discrepâncias nos resultados, entretanto em muitas pesquisas os efeitos tóxicos nos organismos são verificados em gerações pós exposição, apesar de não apresentar nenhuma toxicidade na geração parental.
- Não foram identificados efeitos significativos em relação ao crescimento em nenhum dos testes realizados.
- Verificou-se também a importância do estudo da toxicidade das AgNPs, evidenciando efeitos multigeracionais e pós exposição em organismos aquáticos, além da contribuição na pesquisa, visto que a escassez de informações é significativa.

5 RECOMENDAÇÕES

Com a finalização desta pesquisa é possível indicar algumas recomendações para pesquisas futuras e desta forma pode-se citar as seguintes:

- Analisar separadamente a influência dos parâmetros temperatura, pH, oxigênio dissolvido e luminosidade na toxicidade da amostra de AgNP;
- Avaliar os efeitos de diferentes condições de alimentação para a *Daphnia magna*;
- Realizar testes com a suspensão de AgNP em amostras de água de ambiente natural/modificado buscando verificar alterações na toxicidade da AgNP devido a presença de matéria orgânica e outros compostos;
- Realizar estudos da cinética de absorção e bioacumulação das AgNPs na *D. magna*;
- Realizar testes para avaliar as interações intraespecíficas em diferentes fases da população de *D. magna*;
- Realizar testes de localização e ingestão das AgNPs para *D. magna* para observar a localização dos aglomerados de NP;
- Realizar testes para análise do comportamento de natação da *D. magna*.

REFERÊNCIAS

AHMED, B. Riaz et al. Silver nanoparticles: significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. **Toxicology In Vitro**, [S.L.], v. 38, p. 179-192, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.10.012>.

AKAIGHE, N. et al. The effects of monovalent and divalent cations on the stability of silver nanoparticles formed from direct reduction of silver ions by Suwannee River humic acid/natural organic matter. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 441, p. 277-289, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.055>.

ANTONY, Jacob Joe et al. Toxicological effects of silver nanoparticles. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 729-732, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.09.003>.

ARNDT, A. et al. Multigeneration impacts on *Daphnia magna* of carbon nanomaterials with differing core structures and functionalizations. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 541-547, 17 jan. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2439>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 12.713 de 31 de maio de 2016. **Ecotoxicidade aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea)**. Brasília, 2016.

ATKINS, P; JONES, L. **Princípios de química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012. 941 p.

BADINENI, V. et al. Effect of PVA/PVP protective agent on the formation of silver nanoparticles and its photocatalytic and antimicrobial activity. **Materials Today: Proceedings**, [S.L.], fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2020.02.002>.

BALÁŽ, L; et al. Bio-mechanochemical synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity. **Advanced Powder Technology**, v. 28, p. 3307–3312, 2017.

BARATA, C. et al. Validation of a two-generational reproduction test in *Daphnia magna*: An interlaboratory exercise. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 1073–1083, 2017.

BRASIL. FINEP: INOVAÇÃO E PESQUISA. **MCTIC e Finep fortalecem cooperação com a Argentina**. 2017. Disponível em: <http://www.finep.gov.br/noticias/todas-noticias/5579-mctic-e-finep-fortalecem-cooperacao-com-a-argentina>. Acesso em: 31 ago. 2020.

BRASIL. Ministério da ciência, tecnologia, inovações e comunicações. **Projeto NANoREG**. Disponível em: <http://www.mcti.gov.br/projeto-nanoreg>. Acesso em: 31 ago. 2020.

BECARO, A. et al. Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 3, p. 22–29, 2015.

BECHTOLD, M. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata e aplicação como agente biocida em tinta poliuretânica hidrossolúvel**. 2011. 116 f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

BHUTADA, E.; TANG, F. Argyria secondary to ingestion of colloidal silver. *Pathology*, v. 51, p. S73, 2019. BOWNIK, A. Science of the Total Environment Daphnia swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment : A review. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 194–205, 2017.

BOWNIK, A. Science of the Total Environment Daphnia swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment : A review. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 194–205, 2017.

CAMPOS, B. et al. Two-generational effects of contaminants in *Daphnia magna*: Effects of offspring quality. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 1470–1477, 2016.

CONAMA. **Resolução nº 430**, de 13 de maio de 2011. Padrões de Lançamento de Efluentes. Brasília, 13 mai. 2011.

COSTA, Pedro M. **The Handbook of Histopathological Practices in Aquatic Environments**: guide to histology for environmental toxicology. [S.I]: Academic Press, 2018. 292 p. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128120323/the-handbook-of-histopathological-practices-in-aquatic-environments#book-description>. Acesso em: 23 ago. 2020.

DIN – Deutsches Institut für Normung, 1989, Deutsches institut für normung-testverfahren mit wasserorganismen (gruppe I). Bestimmung der nicht akut giftigen wirkung von abwasser gegenüber daphnien über verdünnungstufen, **norma din 38 412** teil 30.(I 30). DIN 38412. Disponível em: < https://infostore.saiglobal.com/en-us/Standards/DIN-38412-30-1989-396476_SAIG_DIN_DIN_899305/>. Acesso em 12 agosto 2020.

DHAWAN, A.; SHARMA, V. Toxicity assessment of nanomaterials: Methods and challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 2, p. 589–605, 2010.

DURÁN, N. et al. NANOTOXICOLOGIA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 206-213, 2018. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170318>.

EPA - U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. EPA-821-R-02-012. Office of Water. Washington DC, 2002.

EPA- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Oral Reference Dose (RfD): Silver**. 1991. Disponível em: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0099_summary.pdf. Acesso em: 31 ago. 2020.

FERNANDES, P. **Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata**. 2014. 101 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

GONÇALVES, R. A. et al. Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic

multigenerational tests. **Aquatic Toxicology**, v. 197, n. September 2017, p. 32–40, 2018.

HARTMANN, S. et al. Comparative multi-generation study on long-term effects of pristine and wastewater-borne silver and titanium dioxide nanoparticles on key lifecycle parameters in *Daphnia magna*. **Nanoimpact**, [S.L.], v. 14, p. 100163, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.impact.2019.100163>.

HEGAZY, M. A. et al. Preparation and characterization of silver nanoparticles homogenous thin films. **Nriag Journal Of Astronomy And Geophysics**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 27-30, jun. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrjag.2018.04.002>.

HIEMENZ, P; RAJAGOPALAN, R. **Principles of colloid and surface chemistry**. 3. ed. Flórida: Marcel Dekker, 1997. 671 p.

HU, Y; et al. Distinct toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna* in M4 medium and surface water. **Science of the Total Environment**, v. 618, p. 838–846, 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10.706:2000** - Water quality - Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Disponível em <<https://www.iso.org/standard/18795.html>> Acesso em 12 agosto 2020.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6341:2012** – Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity tests.

JIANG, H. S. et al. The effect of chronic silver nanoparticles on aquatic system in microcosms. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 223, p. 395-402, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.036>.

KIM, S.W. et al. Multigenerational Study of Gold Nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*: transgenerational effect of maternal exposure. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 47, n. 10, p. 5393-5399, 13 maio 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es304511z>.

KHAIRUL, M.A. *et al.* Effects of surfactant on stability and thermo-physical properties of metal oxide nanofluids. **International Journal Of Heat And Mass Transfer**, [S.L.], v. 98, p. 778-787, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2016.03.079>.

KLEIVEN, M. et al. Growth inhibition in *Raphidocelis subcapita* – Evidence of nanospecific toxicity of silver nanoparticles. **ECSN**, 2019.

Kühr, S. et al. Silver nanoparticles in sewage treatment plant effluents: chronic effects and accumulation of silver in the freshwater amphipod *Hyalella Azteca*, **Environ Sci Eur.**, 30 (2018), p. 7

KUDRYASHOV, M. et al. Ag/PVP/PAN nanocomposites with triangular nanoprisms of silver synthesized by UV-induced polymerization: morphology manipulation and optical properties tuning. **Optical Materials**, [S.L.], v. 101, p. 109746, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.optmat.2020.109746>.

LIN, S.K. et al. Fabrication and characterization of colloidal silver nanoparticle via

photochemical synthesis. **Materials Letters**, [S.L.], v. 261, p. 127077, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2019.127077>.

LOPES, R. S. **Ecotoxicological assessment of engineered nanoparticles in Chironomus riparius.**, 2015. (Nota técnica).

MACKEVICA, A. et al. Chronic toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna* under different feeding conditions. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 161, p. 10-16, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.023>.

MACIEL, L. D. et al. A Nanotecnologia Aplicada ao Produto de Moda: Criatividade e Multifuncionalidade. In: CONGRESSO CIENTÍFICO TÊXTIL E DE MODA, 2., Natal. **Anais [...]**. São Paulo: Contexmod, 2014. p. 1-17.

MAJEED, S; et al. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from fungal species and its antibacterial and anticancer effect. **Karbala International Journal of Modern Science**, p. 1–7, 2017.

MATHIAS, F. T.; et al. Assessment of toxic and environmental effects of silver salt nanoparticles [Avaliação dos efeitos toxicológicos e ambientais de nanopartículas de sais de prata]. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 187–193, 2014.

MARCZYLO, E. L. et al. **Critical Reviews in Toxicology Environmentally induced epigenetic toxicity : potential public health concerns.** v. 8444, n. June, 2016.

MASELLI, V. et al. Multigenerational effects and DNA alterations of QDs-Indolicidin on. **Environmental Pollution**, 2017.

MOUSTAFA, M.T. et al. Removal of pathogenic bacteria from wastewater using silver nanoparticles synthesized by two fungal species. **Water Science**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 164-176, out. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wsj.2017.11.001>.

MUKHERJEE, T. et al. Bioremediation potential of arsenic by non-enzymatically biofabricated silver nanoparticles adhered to the mesoporous carbonized fungal cell surface of *Aspergillus foetidus* MTCC8876. **Journal Of Environmental Management**, [S.L.], v. 201, p. 435-446, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.06.030>.

NASROLLAHZADEH, M. et al. Applications of Nanotechnology in Daily Life. **Interface Science And Technology**, [S.L.], p. 113-143, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-813586-0.00004-3>.

NIKMATIN, S. et al. Physical, thermal, and mechanical properties of polypropylene composites filled with rattan nanoparticles. **Journal Of Applied Research And Technology**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 386-395, ago. 2017. Universidad Nacional Autonoma de Mexico. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jart.2017.03.008>.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **TEST 211: Daphnia magna Reproduction Test.** Paris, 2012. Disponível em: <<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264185203-en.pdf?expires=1597266143&id=id&accname=guest&checksum=0A1C57944A47FDBD41BBF937D1CA90FB>> Acesso em 12 agosto 2020.

OSCAR, B. **Avaliação toxicológica de nanoestruturas de óxido de zinco aplicadas em argamassas.** 2015. 88 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

PRYMAK, O. et al. Crystallographic characterization of laser-generated, polymer-stabilized 4 nm silver-gold alloyed nanoparticles. **Materials Chemistry And Physics**, [S.L.], v. 207, p. 442-450, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2017.12.080>.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.** 2nd edition. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. 1995. 1125p.

RIBEIRO, F; GALLEGU-URREA, J; JURKCHAT, K; CROSSLEY, A; HASSELLÖV, TAYLOR, C; AMADEU, SOARES, LOUREIRO, S. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. **Science of the Total Environment**, v. 466–467, p. 232–241, 2014.

ROSA, R. M. et al. Simultaneous photo-induced cross-linking and silver nanoparticle formation in a PVP electrospun wound dressing. **Materials Letters**, [S.L.], v. 207, p. 145-148, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2017.07.046>.

ROSSETTO, A. et al. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 807–814, 2014.

SÁ, E. **Síntese de nanopartículas de prata para obtenção de nanocompósito e avaliação da atividade bactericida em poliestireno expansível.** 2015. 190 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015

SAKKA, L. et al. Behavior and chronic toxicity of two differently stabilized silver nanoparticles to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 526–535, 2016.

SANTOS, P. C. Nanopartículas: Toxicidade Biológica. **Universidade Federal da Paraíba**, p. 0–54, 2014.

SCHULZ, J. et al. Distribution of sunscreens on skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. SUPPL., p. 157–163, 2002.

SORENSEN, S. N. et al. Acute and chronic effects from pulse exposure of *D. magna* to silver and copper oxide nanoparticles. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 180, p. 209-217, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.004>.

USKOKOVIC, V. et al. (2011). **Dynamic light scattering and zeta potential of colloidal.** **Archives of Oral biology** 56, 521-532.

VARENNE, F. et al. PT SC. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2018.

VÖLKER, C. et al. Comparative Toxicity Assessment of Nanosilver on Three *Daphnia* Species in Acute, Chronic and Multi-Generation Experiments. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 10, 7 out. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075026>.

WEINBERG, H. et al. Evaluating engineered nanoparticles in natural waters. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 72-83, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2010.09.006>.

XAVIER, F. C. **Caminho Iluminado**: recorda. Brasil: Ceu, 1998. 28 p. Disponível em: <http://www.oconsolador.com.br/linkfixo/bibliotecavirtual/chicoxavier/caminhoiluminado.pdf>. Acesso em: 07 set. 2020.

YADAY. K. K., J.K. Singh, N. Gupta, V.J. Kumar A review of nanobioremediation technologies for environmental cleanup: a novel biological approach Mater. **Environ. Sci.**, 8 (2017), pp. 740-757

YIN, T. et al. Influence of pH and ionic strength on the deposition of silver nanoparticles on microfiltration membranes. **Journal Of Membrane Science**, [S.L.], v. 449, p. 9-14, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2013.08.020>.

YUE. Y et al. Toxicity of silver nanoparticles to a fish gill cell line: Role of medium composition. **Nanotoxicology**. Switzerland, p. 54-63. fev. 2015.

ZAWRAH, M.F. et al. Stability and electrical conductivity of water-base Al₂O₃ nanofluids for different applications. **Hbrc Journal**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 227-234, dez. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hbrcj.2014.12.001>.