



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

DANIELI BINOTTO

**ESTUDO DOS EFEITOS DE TOXICIDADE CRÔNICA DE NANOPARTÍCULAS DE
PRATA FRENTE À MICROALGA *Desmodesmus subspicatus***

ERECHIM

2022

DANIELI BINOTTO

ESTUDO DOS EFEITOS DE TOXICIDADE CRÔNICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA FRENTE À MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*

Trabalho de conclusão de curso apresentado na Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária. Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Cristiane Funghetto Fuzinato.

ERECHIM

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Binotto, Danieli

Estudo dos efeitos de toxicidade crônica de nanopartículas de prata frente à microalga *Desmodesmus subspicatus* / Danieli Binotto. -- 2022.

38 f.

Orientadora: Dra. Cristiane Funghetto Fuzinatto

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária, Erechim, RS, 2022.

1. Microalgas. 2. *Desmodesmus subspicatus*. 3. Nanopartícula de prata. 4. Nanotoxicologia. I. Fuzinatto, Cristiane Funghetto, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

DANIELI BINOTTO


ESTUDO DOS EFEITOS DE TOXICIDADE CRÔNICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA FRENTE À MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

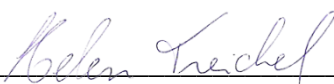
Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 28/03/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Funghetto Fuzinatto
Universidade Federal da Fronteira Sul – Erechim/RS



Prof^ª. Dr^ª. Marília Teresinha Hartmann
Universidade Federal da Fronteira Sul – Erechim/RS



Prof^ª. Dr^ª. Helen Treichel
Universidade Federal da Fronteira Sul – Erechim/RS

Dedico este trabalho aos meus pais, Orides e Isabel, e aos meus irmãos Natiela, Alessandra e Oilian.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado durante os anos de curso e me dado forças para continuar em momentos difíceis em que pensei em desistir.

À minha família pelo constante incentivo e apoio. Meus pais, Orides e Isabel, que são incríveis e estão sempre apoiando nossos sonhos. Meus irmãos, Natiela, Oilian e Alessandra, meus exemplos, por não mediram esforços para me orientar, guiar, aconselhar e consolar em momentos de angústia. Aos meus cunhados Felipe e Marcelo pelo apoio, incentivo e momentos de descontração. E ao meu sobrinho Heitor que chegou trazendo consigo uma alegria radiante e tornou nossos dias melhores. Vocês são a minha base e eu os amo muito!

As minhas amigas de longa data, Ana e Giliane, minhas pessoas, agradeço por compreenderem minha ausência e apesar da distância estarem sempre ao meu lado. As amigadas que fiz durante a graduação, Taís, Diana, Jordana, Júlia, Luana e Drika (minha companheira de laboratório), agradeço por terem me acolhido, me aconselhado, por compartilharmos nossas angústias sempre tentando nos animar e pelas diversas conversas e lanchinhos na grama que fizemos durante os anos, vocês tornaram todo esse processo muito mais leve e suportável.

Aos meus tios, Eneide e Gilmar, e meus primos, Arthur e Henrique, por me acolherem e guiarem em meus primeiros anos de graduação quando me senti perdida em meio a tantas mudanças.

A minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Funghetto Fuzinato, por aceitar este desafio e por todo tempo dedicado a me instruir neste trabalho. Mesmo passando por momentos pessoais delicados, não mediu esforços para me orientar, guiar, aconselhar e motivar. Agradeço de coração pela paciência e por todos os ensinamentos repassados.

Agradeço aos meus professores de todos os níveis de ensino por me instruírem e por todo conhecimento, lições e exemplos repassados.

Agradeço a Universidade Federal da Fronteira Sul pela infraestrutura e pela oportunidade de realizar este curso de graduação, e aos técnicos, colaboradores e colegas que estiveram presentes e foram importantes para esta conquista.

Todos acima citados são, de alguma forma, responsáveis por quem eu sou e por onde cheguei. Logo, meu sincero muito obrigada!

“[...] If at first, you don’t succeed, try, try,
try again.”

(Diana Wynne Jones – Howl’s Moving
Castle, 1986)

RESUMO

Atualmente a nanotecnologia é uma ciência promissora em grande parte pelas propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas apresentadas pelas nanopartículas e os nanomateriais. As nanopartículas de prata, foco deste estudo, tem sido produzidas comercialmente em larga escala devido as suas propriedades como boa condutividade, alta área superficial e excelente atividade antimicrobiana que as qualifica para uma série de aplicabilidades. Apesar das perspectivas animadoras sobre os benefícios da nanotecnologia, a nanotoxicologia vem ganhando espaço na comunidade científica através necessidade de se obter mais informações, especialmente com relação à segurança desses materiais em escala nanométrica frente a sistemas biológicos. Objetivando avaliar os possíveis efeitos causados pelas nanopartículas de prata a organismos aquáticos realizou-se testes toxicológicos caracterizados pela exposição da microalga *Desmodesmus subspicatus* a diversas concentrações de nanopartículas de prata, 25, 50, 100, 200, e 400 $\mu\text{g. L}^{-1}$, sob condições de iluminação, aeração e tempo de ensaio determinados. As nanopartículas de prata foram sintetizadas e caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão, Potencial Zeta e Espectroscopia de Absorção UV-Visível, apresentando um diâmetro de 4,6 nm e uma área superficial de $124,2 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, morfologia esférica, boa dispersão e um certo grau de instabilidade. Os testes de toxicidade crônica foram realizados em triplicata, após análise estatística dos dados obtidos chegou-se a uma curva dose-resposta que permitiu verificar a concentração efetiva do agente tóxico capaz de inibir 50% do crescimento da biomassa algácea, $CE_{50,72h}$ de $0,3148 \pm 0,096 \text{ mg.L}^{-1}$. Evidencia-se a alta toxicidade das nanopartículas de prata frente a organismo aquáticos, bem como a importância de estudos destinados a analisar os efeitos causados por substâncias químicas aos sistemas biológicos e recomenda-se a realização de mais testes para identificar os demais efeitos causados pelas nanopartículas de prata e aumentar a confiabilidade do resultado obtido neste estudo, uma vez que, este valor não pode ser comparado com segurança com os demais trabalhos devidos as particularidades que cada um apresenta.

Palavras-chave: Microalgas, *Desmodesmus subspicatus*, nanopartículas de prata, nanotoxicologia.

ABSTRACT

Currently, nanotechnology is a promising science mostly due to the mechanical, optical, magnetic and chemical properties presented by nanoparticles and nanomaterials. Silver nanoparticles, the focus of this study, have been commercially produced on a large scale due to their properties such as good conductivity, large surface area, and excellent antimicrobial activity that qualifies them for a range of applicability. Despite the encouraging perspectives on the benefits of nanotechnology, nanotoxicology has gained space in the scientific community due to the need to obtain more information, especially regarding the safety of these nanometer scale materials against biological systems. In order to evaluate the possible effects caused by silver nanoparticles to aquatic organisms, toxicological tests were performed, characterized by the exposure of the microalgae *Desmodesmus subspicatus*, to different concentrations of silver nanoparticles, 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$, under specified lighting, aeration and test time conditions. The silver nanoparticles were synthesized and characterized by Transmission Electron Microscopy, Zeta Potential and UV-Visible Absorption Spectroscopy, presenting a diameter of 4,6 nm and a surface area of 124,2 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$, spherical morphology, good dispersion and a certain degree of instability. The chronic toxicity tests were performed in triplicate, after statistical analysis of the data obtained, a dose-response curve was reached and allowed to verify the effective concentration of the toxic agent capable of inhibiting 50% of algal biomass growth $EC_{50,72h}$ de $0,3148 \pm 0,096 \text{ mg.L}^{-1}$. The high toxicity of silver nanoparticles towards aquatic organisms is evidenced, as well as the importance of studies aimed to analyzing the effects caused by chemical substances on biological systems and it is recommended to perform more tests to identify the other effects caused by silver nanoparticles and increase the reliability of the result obtained in this study, since this value cannot be safely compared with other studies due to the particularities that each one presents.

Keywords: Microalgae, *Desmodesmus subspicatus*, silver nanoparticle, nanotoxicology.

1 INTRODUÇÃO

A entrada na nanotecnologia no mundo da ciência revolucionou todas as suas áreas. A nanotecnologia é conhecida como uma ciência em constante evolução desde seu surgimento, em meados do século XX, e está atrelada a uma ampla variedade de disciplinas e aplicações (SINGH *et al.*, 2020) devido as notáveis propriedades diferenciadas que os materiais nanotecnológicos e as nanopartículas apresentam (SEGALA, 2009).

O aproveitamento das propriedades apresentadas pelas nanopartículas (NPs) com grande área superficial como propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas, em aplicações tecnológicas forma a base da nanotecnologia de materiais (QUINA, 2004). Singh *et al.* (2020) salientam que os materiais de escala nanométrica são pautados como base para grandes avanços tecnológicos, possibilitando desenvolvimentos no campo da eletrônica, manufatura, tecnologia de comunicação, biologia e medicina.

Dentre as nanopartículas metálicas existentes, destacam-se as nanopartículas de cobalto, ouro e prata. O interesse em nanopartículas de prata (AgNPs), foco de estudo, se dá devido a sua boa condutividade, elevado efeito catalítico, alta área superficial e excelente atividade antimicrobiana, propriedades que as qualificam para ser utilizadas em diversos aspectos, como redução de infecções, prevenção a colonização bacteriana em superfícies de prótese, em cateteres e materiais odontológicos, bem como na indústria de alimentos, eletrônicos, no tratamento de água e na fabricação de tintas antibacterianas (GUZMÁN; DILLE; GODET, 2008).

Apesar das perspectivas animadoras sobre os benefícios da nanotecnologia, a nanotoxicologia, um ramo da toxicologia dedicado ao estudo dos efeitos toxicológicos de nanomateriais em diferentes sistemas biológicos, incluindo células, tecidos e organismos vivos vem ganhado espaço na comunidade científica. Esta urgência surgiu através necessidade de se obter mais informações, especialmente com relação à segurança de materiais em escala nanométrica, uma vez que, o conhecimento atual sobre os potenciais efeitos adversos das nanopartículas ainda é limitado (STERN; MCNEIL, 2007; DURÁN *et al.*, 2018).

¹ Este trabalho de conclusão de curso está organizado em formato de artigo científico

As AgNPs são produzidas comercialmente em larga escala e devido a sua aplicabilidade, especialmente em eletrônicos, é esperado que a produção aumente ainda mais. Portanto, os ambientes aquáticos estão sujeitos ao contato com as nanopartículas fator que leva a preocupações quanto ao seu impacto (NIKMATIN *et al.*, 2017; JIANG, *et al.*, 2017).

Atualmente, pesquisadores ainda estão tentando entender, em detalhes, como as propriedades físico-químicas e morfológicas dos nanomateriais podem influenciar as interações destes com células, animais, seres humanos e meio ambiente, e assim determinar seu impacto final para a saúde e o meio ambiente (DURÁN *et al.*, 2018).

A preocupação em relação as propriedades físico-químicas das nanopartículas fundamenta-se no fato de que a entrada e o acúmulo em organismos vivos são facilitados, uma vez que, o tamanho destas estruturas viabiliza sua entrada em barreiras biológicas teciduais e membranas celulares levando a efeitos tóxicos (SINGH *et al.*, 2020).

Outro fator preocupante é a fácil difusão de nanopartículas na água, ar e solo combinada com a difícil remoção por técnicas de filtração comumente utilizadas. De modo geral, a biodisponibilidade, biodegradabilidade e toxicidade de novos nanomateriais devem ser analisadas e esclarecidas, visto que estes são encontrados em ambientes aquáticos e terrestres e eventualmente atingem a cadeia trófica, podendo ser de alguma forma tóxico para várias espécies, incluindo, invertebrados, algas, bactérias crustáceos, nematóides, mamíferos, peixes e ratos (PASCHOALINO *et al.*, 2010; LANDA *et al.*, 2012; EXBRAYAT *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2020).

O Brasil não é um exemplo de preocupação com responsabilidade na política da nanotecnologia, o quadro regulatório ainda é incerto, pois dentre os projetos de lei relacionados alguns foram arquivados e outros encontram-se em tramitação. Exemplificasse o PL 5076/2005 que dispunha de regulamentações quanto a pesquisa em nanotecnologia no país, cria a Comissão Técnica Nacional de Nanosseguurança (CTNano) e institui o Fundo de Desenvolvimento de Nanotecnologia (FDNano) e o PL 6741/2013, que dispõe da Política Nacional da Nanotecnologia, abordando tópicos como pesquisa, produção, destino de rejeitos e o uso da nanotecnologia em si (PIZZI; FUMAGALI; OLIVEIRA, 2016; HUPFFER; LAZZARETTI, 2019; BRASIL, 2022).

Em vista disso, estudos toxicológicos vêm apresentando técnicas de análise e avaliação de impactos ambientais causados pelos mais diversos contaminantes e materiais, dentre eles as nanopartículas, e o emprego de organismos-teste aquáticos é uma

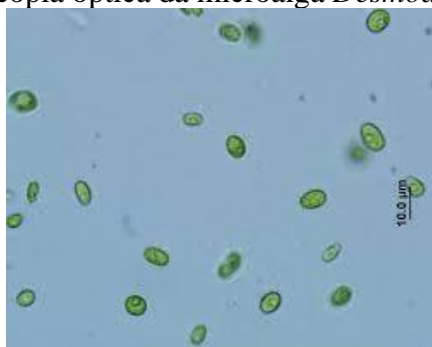
característica comum e que tem avançado de maneira acentuada nos últimos anos em estudos que visam observar a qualidade da água e a toxicidade de distintos contaminantes. (WOOD *et al.*, 2016).

Knie e Lopes (2004) destacam que dentre os diversos organismos-teste existentes, um comumente utilizado para testes ecotoxicológicos são as algas. Algas compõem a base da cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos, sendo caracterizadas como organismos produtores, logo, são consideradas adequadas para avaliação e observações dos efeitos causados pela exposição a substâncias tóxicas.

Ensaio de toxicidade que usam algas como organismo teste consistem basicamente na exposição destas a diferentes diluições de efluentes ou substância a ser avaliada. A duração do ensaio varia de acordo com a espécie do organismo (REGINATTO, 1998).

A microalga escolhida para este estudo foi a *Desmodesmus subspicatus*, exemplificada na Figura 1, caracterizada como uma microalga verde planctônica e representante dos produtores primários nos ecossistemas de água doce, é um elemento fundamental que constitui o nível trófico destes ecossistemas, sendo assim, são consideradas adequadas para avaliação de qualidade hídrica, periculosidade de substâncias químicas através de observações nos efeitos que a exposição a meios contaminados com substâncias tóxicas afeta o desenvolvimento das mesmas (KNIE E LOPES, 2004).

Figura 1 – Microscopia óptica da microalga *Desmodesmus subspicatus*.



Fonte: NETO (2017).

Se por um lado à nanotecnologia vem ganhando cada vez mais espaço, ampliando o leque de aplicações na esfera humana e ambiental, por outro, pesquisas levando em consideração o risco para a saúde humana e ambiental também vêm sendo publicadas, pois como qualquer área da tecnologia que faz uso intensivo de novos materiais e substâncias químicas, a nanotecnologia também pode desencadear alguns riscos (QUINA, 2004; JAIN, 2005).

Diante do exposto, fica evidente e justifica-se a necessidade de compreender o comportamento das nanopartículas, investigar os efeitos nocivos que podem resultar da crescente produção, transporte e utilização de nanomateriais, não só para prever as respostas toxicológicas, mas também contribuir para o desenvolvimento desta tecnologia (PASCHOALINO *et al.*, 2010; ENGELMANN, 2015).

Isto posto, esta pesquisa objetivou agregar e complementar as informações científicas relacionadas à identificação de efeitos de toxicidade crônica para a microalga *Desmodesmus subspicatus* após a exposição a suspensão de nanopartículas metálicas, especificamente, as nanopartículas de prata.

2. METODOLOGIA

Os procedimentos metodológicos foram realizados no Laboratório de Qualidade da Água da Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim (UFFS), e eventualmente em demais laboratórios da mesma instituição.

As análises referentes a caracterização das nanopartículas foram realizadas no Laboratório de Microscopia Central (LCME) e no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.1 CULTIVO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*

A metodologia de cultivo da microalga *D. subspicatus* foi fundamentada na ABNT 12648/2018, intitulada Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Métodos de ensaio com algas (*Chlorophyceae*) que aborda definições e metodologias referentes a estudos de toxicidade crônica para algas (ABNT, 2018).

O meio de cultivo utilizado foi o CHU (Anexo I), com volume complementado para 1L com água Mili-Q, o pH foi ajustado para $7,1 \pm 0,5$ com Ácido clorídrico (HCl) ou Hidróxido de sódio (NaOH) e em seguida inserido na autoclave por 15 minutos a 121 °C. Após resfriado a temperatura ambiente, cerca de 15 a 20 mL de inóculo foram adicionados para 1L de CHU, todo o processo foi realizado em uma câmara de fluxo laminar para evitar possíveis contaminações. Posteriormente o meio já inoculado foi mantido em incubadora por um período de aproximadamente 7 dias, a uma temperatura de 20 ± 2 °C com iluminação e aeração constante. A Figura 2 ilustra o cultivo em seu estágio inicial e final.

As informações obtidas permitiram determinar um padrão de equivalência entre as medidas de absorvância e a contagem de número de células, obtendo uma equação de regressão $y = ax + b$, em que y representa a absorvância e x a incógnita para determinação da concentração celular.

2.2 TESTE DE SENSIBILIDADE

O teste de sensibilidade foi realizado de acordo com a ABNT NBR 12648/2018, em triplicata, caracterizando-se pela exposição da microalga, *D. subspicatus* ao dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7 - 100 \text{ mg.L}^{-1}$), uma substância referência, visando verificar a viabilidade das algas para posterior utilização nos testes de toxicidade crônica (ABNT, 2018). As concentrações escolhidas para elaboração do teste foram definidas a partir de valores de concentração efetiva para inibir 50% do crescimento da biomassa algácea (CE_{50}) encontrados na literatura.

Para a elaboração dos ensaios, foram preparadas três soluções nutriente de acordo com o Anexo II, que posteriormente foram utilizadas no preparo da solução de pré cultura e solução nutriente, aferidas em barão volumétrico com água Mili-Q para o volume de 1L, de acordo com o Anexo III. Ambas foram submetidas a autoclave por 15 minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e a solução nutriente teve seu pH corrigido para $8 \pm 0,5$ com HCl ou NaOH.

A quantidade de diluição de inóculo a ser adicionado para uma pré cultura de 250 mL foi determinada pela Equação 1:

$$V_i(\text{mL}) = \frac{C_{ipc} \cdot V_{pc}}{C_{estoque}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde V_i é o volume de inóculo a ser retirado da cultura estoque; C_{ipc} é a concentração inicial da pré cultura (volume necessário para atingir a biomassa algal de $10.000 \text{ cel.mL}^{-1}$); V_{pc} é o volume da pré cultura (250 mL); $C_{estoque}$ é a concentração de algas da cultura estoque.

Ao fim do período de incubação a solução foi submetida a leituras de espectrofotometria em triplicata visando determinar, através da Equação 1, o volume necessário da pré cultura inoculada para atingir a biomassa algal de $100.000 \text{ cel.mL}^{-1}$ e com este dado preparar um nova pré cultura de 250 mL. Desta nova solução foram retiradas alíquotas de 10 mL para cada ensaio, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Relações de volume para preparo dos ensaios do teste de sensibilidade da microalga *D. subspicatus* frente à solução referência dicromato de potássio.

Concentração de (mg.L^{-1})	Volume de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (mL)	Volume de solução nutriente (mL)	Volume de água de diluição (Ultrapura - mL)	Volume de inóculo ($10^5 \text{ cel. mL}^{-1}$)	Volume total (mL)
Controle	-	10	80	10	100
0,1	0,8	10	79,2	10	100
0,3	2,4	10	77,6	10	100
0,5	4,0	10	76,0	10	100
0,7	5,6	10	74,4	10	100
0,9	7,2	10	79,8	10	100

Fonte: Autora, 2022.

Posteriormente os ensaios, preparados em erlenmeyers de 125 mL, foram acondicionados em uma Incubadora Shaker Refrigerada, marca Solab SL – 223, mantidos em agitação de 130 rpm, temperatura controlada de 23 ± 2 °C e iluminação constante por um período de 72h. Os erlenmeyers foram movimentados a cada 18-24h durante o período de testes pra evitar discrepância na incidência de luz.

Ao fim o período de teste, os ensaios foram submetidos a leituras de pH e absorvância em triplicada. Os valores de absorvância obtidos ao final de cada teste foram convertidos para número de células. mL^{-1} através da equação da reta obtida pela correlação nº células x absorvância e posteriormente inseridos no software GraphPad Prism® 6.0, este fornece a curva de dose-resposta, em que x representa a concentração do agente estressante, e o eixo y traça a resposta dos organismos, viabilizando assim a identificação dos valores de $CE_{50,72h}$ para cada teste, bem com seus intervalos de confiança (IC 95%).

2.3 SÍNTESE DA NANOPARTÍCULA DE PRATA

A síntese das nanopartículas de prata foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Fernandes (2014), porém, com algumas adaptações, o processo se deu pela redução de Nitrato de Prata (AgNO_3) pelo agente redutor Borohidreto de Sódio (NaBH_4) na presença de um agente estabilizante, o Álcool Polivinílico (PVA).

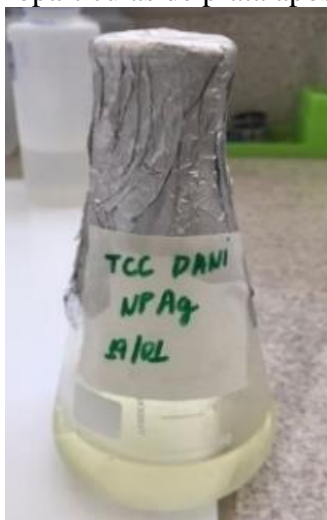
Inicialmente, 1g de Álcool Polivinílico (PVA – 1% m.v^{-1}) foi solubilizado em 50 mL de água de osmose reversa a aproximadamente 85 °C e agitação constante por 1h. Na

sequência $3,15 \times 10^{-3}$ g de AgNO_3 (1mM) e $1,4 \times 10^{-3}$ g de NaBH_4 (2mM) foram diluídos separadamente, cada um em 25 mL de água resfriada de osmose reversa a 3 ± 2 °C.

Em seguida, o PVA foi submetido a um banho de gelo em agitação constante ao qual foi adicionado o NaBH_4 diluído. Uma bureta foi ambientada e preenchida com AgNO_3 que posteriormente foi gotejado a solução de PVA + NaBH_4 , todo o processo se deu sob agitação constante, obtendo uma solução de cor levemente amarelada, característica da síntese.

Posteriormente o Erlenmeyer foi vedado com papel alumínio, Figura 4, e acondicionado na geladeira a 4 ± 2 °C até o momento do uso, que só deve ocorrer após 24 h da síntese, visando garantir efetivamente o fim da reação, mas não deve exceder 30 dias pois as suspensões de nanopartículas têm tendência a aglomerar.

Figura 4 – Suspensão de nanopartículas de prata após sintetizadas ($2,35 \text{ mg.L}^{-1}$).



Fonte: Autora (2022).

2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As AgNP foram caracterizadas em relação a sua área superficial, ao seu diâmetro médio e sua estabilidade em suspensão através dos seguintes meios: Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Potencial Zeta e Espectroscopia de Absorção UV-Visível.

2.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi realizada em equipamento MET (JEM-1011 MET-100KV), que permite observar a morfologia da nanoestrutura e,

quando houver, a ocorrência de aglomerados de NPs. A técnica aplicada para o preparo da amostra foi de acordo com a metodologia descrita por Oscar (2015), que consiste na aplicação das nanopartículas de prata em uma película de carbono/cobre que foram posteriormente reservadas em um dessecador à vácuo para secagem a aproximadamente 25° C por um período de 24h. Através da MET pode-se conhecer o diâmetro médio das suspensões de AgNP e assim, através da Equação 2 proposta por Hiemenz e Rajagopalan (1997), calcular o valor da área superficial das mesmas.

$$A_{sup} = \frac{6}{\rho \cdot D} \quad \text{Equação 2}$$

2.4.2 Potencial Zeta

Schaffazick *et al.* (2003) salientam que o potencial zeta indica o potencial de superfícies das nanopartículas. Portanto, o potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática, parâmetro fundamental para se estudar a estabilidade das nanopartículas. (GARCIA *et al.*, 2021). As suspensões de NPs Ag foram caracterizadas através do equipamento Zetasizer Nano ZS com ângulo de retroespalhamento de 173° e temperatura de 25 °C.

2.4.3 Espectroscopia de Absorção UV-Visível

A espectroscopia de absorção UV-visível, realizada em equipamento Spectro 3000W – Marte Científica, foi outra técnica de caracterização empregada, esta fornece o comprimento de onda no qual as nanopartículas de prata apresentam absorção máxima (A), podendo este valor ser correlacionado com o tamanho da NP. A faixa espectral de comprimento de onda foi ajustada entre 300 e 700 nm (SILVA, 2020).

2.5 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA PARA À MICROALGA *D. subspicatus*

Os testes de toxicidade crônica foram realizados de acordo com a ABNT 12648/2018, porém com algumas adaptações, visando avaliar o crescimento algáceo. O teste procedeu em triplicata com a exposição da microalga *D. subspicatus* a diferentes concentrações de nanopartículas de prata, elencadas utilizando um fator de diluição 2.

Para a elaboração dos ensaios, empregou-se a mesma metodologia descrita no teste de sensibilidade (item 2.2), alterando somente a solução de referência pela solução

de nanopartículas de prata ($2,35 \text{ mg.L}^{-1}$). A relação de volume de cada item adicionado aos erlenmeyers do ensaio está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Relações de volume para preparo dos ensaios do teste de toxicidade crônica da microalga *D. subspicatus* frente as AgNP.

Concentração de AgNP ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Volume de AgNP (mL)	Volume de solução nutriente (mL)	Volume de água de diluição (Ultrapura - mL)	Volume de inóculo ($10^5 \text{ cel. mL}^{-1}$)	Volume total (mL)
Controle	-	10	80	10	100
25	0,85	10	79,15	10	100
50	1,70	10	78,30	10	100
100	3,40	10	76,60	10	100
200	6,80	10	73,20	10	100
400	13,60	10	66,4	10	100

Fonte: Autora (2022).

Após prover condições favoráveis de nutrientes e luz, por um período de tempo definido de 72 horas, foram realizadas leituras de pH e o crescimento algáceo foi quantificado através de leituras de absorvância em triplicada. A Figura 5 demonstra a disposição dos erlenmeyers na incubadora shaker para início do teste.

Figura 5 – Disposição dos erlenmeyers em shaker incubadora para teste crônico com nanopartículas de prata para a microalga *D. subspicatus*.



Fonte: Autora (2022).

Os resultados obtidos para as diferentes concentrações de nanopartículas de prata foram comparados ao crescimento médio de culturas de controle negativo (não expostas as AgNPs).

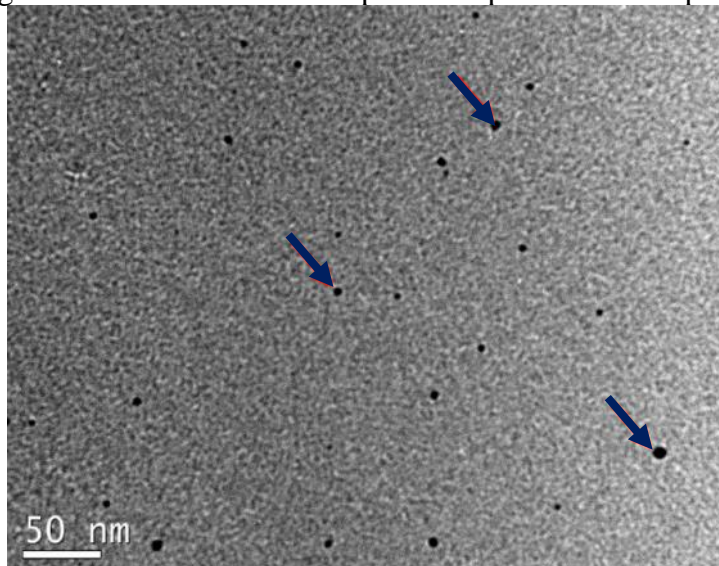
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

3.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) viabilizou a obtenção de imagens das suspensões de nanopartículas, como apresenta a Figura 6. Nesta figura os pontos de coloração preta, indicados pelas setas azuis, representam as nanopartículas de prata. Através da Figura 6 é possível distinguir sua estrutura esférica, bem como sua evidente dispersão, em consonância com o apresentado por Majeed *et al.* (2018), não apresentando aglomerações. As imagens ainda possibilitaram concluir sobre o tamanho das suspensões, obtendo-se um diâmetro médio com valor aproximado de 4,6 nm, similar aos valores observados por Becaro *et al.* (2015), Baláz *et al.* (2017) e Prymak *et al.* (2018), deste modo, pode-se considerar os resultados confiáveis.

Figura 6 – Imagem obtida através da MET para a suspensão de nanopartículas de prata.



Fonte: Laboratório de Microscopia Central da UFSC.

Em posse do valor do diâmetro médio das suspensões de nanopartículas de prata (D) 4,6 nm, conhecendo o valor de densidade da prata (ρ) $10,5 \text{ g.cm}^{-3}$, calcula-se o valor

da área superficial das AgNP através da Equação 2, obtendo um valor de $124,2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, deste modo, observa-se que as AgNPs apresentam um pequeno diâmetro e uma grande área superficial, Zhang, Xiao e Fang (2018) salientam que a toxicidade de NPs estão relacionadas ao seu tamanho, pois quanto menor a NP maior a sua área superficial e assim maior a liberação de íons Ag^+ .

3.1.2 Potencial Zeta

A análise do potencial zeta foi realizada para as AgNP diluída em diferentes meios, sendo estes, água de osmose reversa ($\text{H}_2\text{O OR}$), meio CHU e solução nutriente, a fim determinar os valores de carga superficial, segundo Uskokovic *et al.* (2011) com este dado é possível obter informações sobre a estabilidade das suspensões. Os dados obtidos para a carga superficial, bem como o erro de leitura e o pH estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Potencial zeta das nanopartículas de prata diluídas em diferentes meios

AgNP (meio)	Carga superficial (mV)	pH
$\text{H}_2\text{O OR}$	$-0,95 \pm 0,08$	7,7
CHU	$-5,79 \pm 0,32$	7,9
Solução nutriente	$-5,27 \pm 0,18$	7,9

Fonte: Laboratório de Toxicologia Ambiental, ENS/UFSC.

Bechtold (2011) e Angel *et al.* (2013) apontam que valores de carga superficial compreendidos entre o intervalo de -30mV e 30mV caracterizam suspensões instáveis, consequentemente com maior tendência a formar aglomerados de nanopartículas, Bechtold (2011) ainda complementa que valores muito próximos de 0mV , considerado como ponto isoelétrico, o menos estável, apresentam esse fenômeno de forma mais acentuada. Os valores de carga superficial apresentados na Tabela 3 são análogos aos resultados de Becaro *et al.* (2015) no entanto, não estão dentro da faixa de estabilidade exposta por Bechtold (2011) e Angel *et al.* (2013) além de apresentar valores próximos do ponto isoelétrico, caracterizando suspensões que podem apresentar certo grau de instabilidade.

O pH é outro parâmetro que afeta diretamente a carga superficial das suspensões de nanopartículas, Bechtold (2011) destaca que valores de pH ácido e pH básico, caracterizam, respectivamente, uma carga superficial positiva e negativa. O pH 7,7 obtido para a amostra de AgNP diluída em $\text{H}_2\text{O OR}$ está muito próximo da neutralidade,

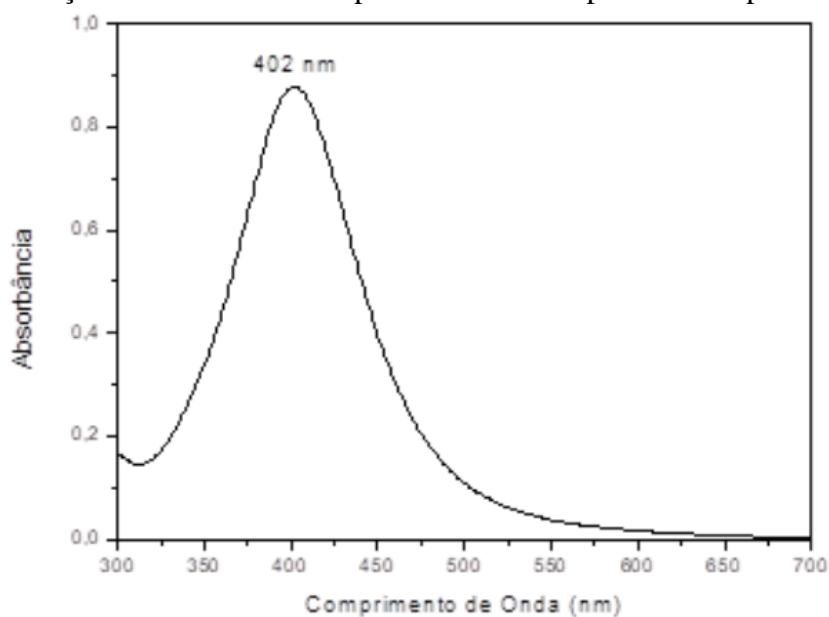
consequentemente os valores de carga superficial são negativos e muito próximos do ponto isoelétrico, as AgNP diluídas em meios CHU e solução nutriente apresentam valores de carga superficial mais distantes do ponto isoelétrico, mas ainda assim instáveis.

Todavia, a metodologia de síntese das AgNPs conta com a presença de PVA, um agente estabilizante que se baseia na estabilidade estérica das suspensões de nanopartículas, portanto, independe da concentração eletrolítica e do pH, o processo remete a constituição de uma barreira física entre as NPs (LOESCHNER *et al.*, 2011).

3.1.3 Espectroscopia de absorção UV-Visível

A técnica de espectroscopia de absorção UV-visível viabilizou a construção da curva característica de correlação entre absorbância e comprimento de onda apresentada na Figura 7.

Figura 7 – Relação absorbância x comprimento de onda para as nanopartículas de prata



Fonte: Laboratório de Microscopia Central da UFSC.

Pode-se perceber que o comprimento de onda de máxima absorção foi 402 nm. Picos de absorbância máxima compreendidos nesta faixa indicam NPs de formato esférico e com diâmetros próximos a 5 nm, conferindo com a morfologia e o valor de diâmetro 4,6 nm encontrados para as NPs desta síntese (BERNI *et al.* 2008; GARCIA, 2011).

O valor de máxima absorção obtido neste estudo para nanopartículas de prata é similar a valores observados por Machado (2012) que apresenta máxima absorbância a 404,04 nm, Silva (2020) e Becaro *et al.* (2015) que apresentam, ambos, máxima

absorbância a 400 nm, e Pham (2019) que apresenta máxima absorbância a 410 nm para nanopartículas de prata sintetizadas na presença de PVA como agente estabilizante. Valores de máxima absorção compreendidos próximos aos apresentados correspondem à ressonância plasmônica de superfície característica de AgNP (BECARO *et al.*, 2015).

3.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CORRELAÇÃO ABSORBÂNCIA X NÚMERO DE CÉLULAS

Os dados obtidos através da contagem de células em microscópio óptico e as leituras de absorbância de cada uma das diluições descritas na Tabela 4, permitiu gerar um padrão de equivalência entre os dados.

Tabela 4 – Diluições realizadas para determinação da densidade celular e construção da curva de correlação entre n° de células e absorbância.

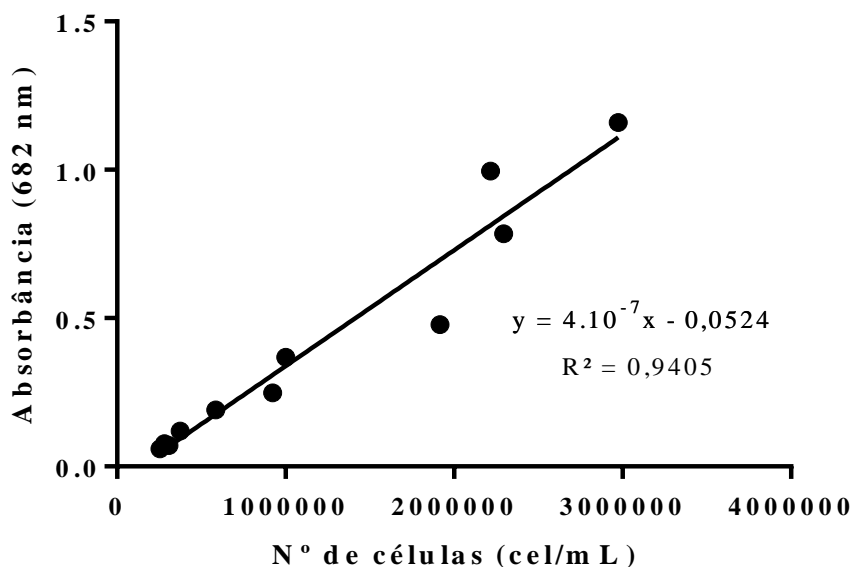
Fator de diluição	Volume de microalga (μL)	Volume total (mL)	N° de células	Absorbância (682 nm)
10	500	5	2975000	1,160
12	417	5	2217500	0,995
16	313	5	2295000	0,784
24	209	5	1917500	0,478
32	156	5	1000000	0,368
48	104	5	922500	0,248
64	78	5	585000	0,191
96	52	5	375000	0,120
128	39	5	280000	0,077
192	26	5	307500	0,071
256	19	5	255000	0,059

Fonte: Autora (2022).

As informações referentes a absorbância e ao número de células por mililitro foram submetidas a uma regressão linear gerando uma curva de calibração, representada na Figura 8. O valor obtido para o coeficiente de determinação, $R^2 = 0,9405$, foi satisfatório, uma vez que, de acordo com Martins (2018) um valor de R^2 próximo a 1 significa que os pontos analisados estão próximos à reta de regressão linear e, portanto, o modelo ajustou bem os dados.

A equação da reta encontrada através da regressão linear, posteriormente foi empregada para cálculos visando determinar a concentração celular de amostras que foram utilizadas nos testes.

Figura 8 – Curva de calibração entre absorbância e número de células por mililitro de diluições contendo à microalga *Desmodesmus subspicatus*.



Fonte: Autora (2022).

3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE

Após a finalização da triplicata que compõe o teste de sensibilidade, realizado para avaliar a viabilidade do lote de algas para posterior aplicação em testes crônicos, obteve-se um valor de $CE_{50,72h}$ para cada teste realizado, e assim, uma média de $CE_{50,72h}$ e o desvio padrão dos resultados, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 – Concentração efetiva para inibir 50% do crescimento de organismos da microalga *D. subspicatus* após exposição a substância de referência Dicromato de Potássio (100 mg.L^{-1}).

Teste	$CE_{50,72h}$ (mg.L^{-1})
1	0,5367
2	0,3907
3	0,4095
Média	0,4456
Desvio Padrão	0,0794

Fonte: Autora (2022).

O valor médio de $CE_{50,72h}$ encontrado para o teste de sensibilidade foi $0,4456 \pm 0,089 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo esta a concentração de efeito tóxico de dicromato de potássio para inibir 50 % do crescimento da biomassa algácea.

Os valores apresentaram coeficiente de variação menor que 20%, como exige a ABNT 12.648/2018 para que o teste seja validado, portanto, podem ser considerados homogêneos. Knie e Lopes (2004) apresentam um valor de $CE_{50,72h}$ de $0,53 \pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ para a microalga *D. subspicatus*, o valor obtido no teste e o valor apresentado na literatura podem ser considerados próximos, uma vez que estão dentro da faixa de valores do intervalo de confiança, assim, enfatizando a viabilidade do lote de algas e a reprodutibilidade do teste.

3.4 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA PARA À MICROALGA *D. subspicatus*

Análogo ao teste de sensibilidade, obtiveram-se os valores de $CE_{50,72h}$ para cada teste crônico realizado, bem com seus respectivos intervalos de confiança, logo, obteve-se o valor médio de $CE_{50,72h}$ para o teste de toxicidade crônica e o desvio padrão dos resultados, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6 – Valores obtidos de $CE_{50,72h}$ para à microalga *D. subspicatus* exposta a diferentes concentrações de AgNP ($2,35 \text{ mg.L}^{-1}$).

Teste	$CE_{50,72h}$ (mg. L ⁻¹)
1	0,2193
2	0,3811
3	0,3439
Média	0,3148
Desvio Padrão	0,0847

Fonte: Autora (2022).

O valor médio de $CE_{50,72h}$ encontrado, $0,3148 \pm 0,096 \text{ mg.L}^{-1}$, apresentou coeficiente de variação menor que 20%, como exige a ABNT 12.648/2018, os valores de pH apresentaram uma variação menor que 1,5 entre si, deste modo, os resultados podem ser considerados homogêneos e o teste validado.

A Tabela 7 apresenta valores de CE_{50} para AgNP observados por distintos autores, os quais empregaram como organismo teste diferentes espécies de microalgas, marinhas

e dulcícolas, e diferentes metodologias para realização do teste de toxicidade e para a realização da síntese das nanopartículas de prata.

Tabela 7 – Informações referentes a estudos que utilizam nanopartícula de prata, como concentração efetiva e microalga exposta.

Organismo teste	CE₅₀	Autoria
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,110 mg. L ⁻¹ /96 h	Romero <i>et al.</i> (2020)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	28,880 mg. L ⁻¹ /72 h	Fazelian <i>et al.</i> (2020)
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	0,038 mg. L ⁻¹ /96 h	Pham (2018)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,024 mg. L ⁻¹ /96 h	Pham (2018)
<i>Scenedesmus sp.</i>	0,089 mg. L ⁻¹ /72 h	Pham (2019)
<i>Thalassiosira sp.</i>	0,107 mg. L ⁻¹ /72 h	Pham (2019)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	0,005 mg. L ⁻¹ /72 h	Mertens <i>et al.</i> (2019)
<i>Chlorella autotrophica</i>	0,570 mg. L ⁻¹ /72 h	Sendra <i>et al.</i> (2018)
<i>Dunaliella salina</i>	0,640 mg. L ⁻¹ /72 h	Sendra <i>et al.</i> (2018)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1,080x10 ⁻⁶ mg. L ⁻¹ /96 h	Xiang <i>et al.</i> (2018)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	0,008 mg. L ⁻¹ /72 h	Jemec <i>et al.</i> (2016)
<i>Skeletonema costatum</i>	25,770 mg. L ⁻¹ /24 h	Huang <i>et al.</i> (2016)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	1,090 mg. L ⁻¹ /7 dias	Becaro <i>et al.</i> (2015)

Fonte: Autora (2022).

Em relação aos estudos destacados na Tabela 7, pode-se observar que todos possuem sua particularidade, como a espécie de microalga utilizada e as características apresentadas pelas suspensões de AgNPs. Fernandes *et al.* (2016) salienta que as NPs podem diferir em características como tamanho e formato dependendo do modo como foram sintetizadas, podendo-se obter morfologias esféricas, triangulares, cúbicas, em formato de flor e nanofios, que resultam em NPs com propriedades distintas que podem afetar a toxicidade das mesmas (KHODASHENAS E GHORBANI, 2019), portanto, cada estudo apresenta importância uma vez fornece informações referentes a segurança de distintas formas de AgNPs a microalgas.

Salienta-se que todos os estudos apresentam algum grau de toxicidade frente aos organismos aquáticos, estes observados através da avaliação de efeitos adversos ocasionados pela presença de AgNPs, porém, percebe-se um enfoque na avaliação de inibição do crescimento através da obtenção de valores de CE₅₀, os quais apresentam expressiva variação entre si. Uma comparação segura entre resultados de CE₅₀ obtidos na

literatura pode-se se considerar um processo delicado devido as particularidades e distinções apresentadas por cada estudo.

Esta variação de resultados de CE_{50} já é perceptível em estudos que empregam o mesmo organismo teste, exemplifica-se com os estudos de Becaro *et al.* (2015) e Jemec *et al.* (2016), ambos utilizaram a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, e obtiveram, respectivamente, valores de CE_{50} de $1,090 \text{ mg. L}^{-1}$ e $0,008 \text{ mg. L}^{-1}$, porém se intensifica quando envolvem organismos teste distintos, que vão do valor de CE_{50} mais baixo, $1,080 \times 10^{-6} \text{ mg. L}^{-1}$ no estudo de Xiang *et al.* (2018) ao mais alto, $28,880 \text{ mg. L}^{-1}$ no estudo de Fazelian *et al.* (2020).

Bettio (2020) destaca que esta diferença expressiva entre valores de toxicidade respalda a tese de que os resultados obtidos para uma determinada espécie não necessariamente podem ser considerados para todas, pois há muitos fatores envolvidos no processo, como as condições e variações, as metodologias utilizadas e as características da espécie de microalga escolhida para o teste, pois cada espécie reage de forma diferente as perturbações a que é submetida.

Logo, cada estudo é relevante pois complementa lacunas acerca da exposição de nanopartículas de prata frente a organismos aquáticos e viabiliza o estabelecimento de legislações e regulamentações que disponham de limites de exposição à agentes tóxicos que garantam a segurança da espécie estudada, e quando possível, englobe diversas espécies de um ecossistema estabelecendo o menor limite encontrado para um organismo-teste que o compõe.

Bondarenko *et al.* (2013) realizou a classificação de nanopartículas e sais metálicos em diferentes categorias de perigo de acordo com a Diretiva UE (União Europeia) 93/67/EED (CEC, 1996), que relaciona a menor média de CE_{50} de três principais organismos-teste aquáticos, crustáceos, peixes e algas. Resultados $< 1 \text{ mg.L}^{-1}$ são classificados como muito tóxicos, entre $1 - 10 \text{ mg.L}^{-1}$ são classificados como tóxicos, entre $10 - 100 \text{ mg.L}^{-1}$ são classificados como nocivos para organismos aquáticos e $< 100 \text{ mg.L}^{-1}$ não são classificados.

O valor obtido como $CE_{50,72h}$: $0,3148 \pm 0,096 \text{ mg.L}^{-1}$ pode ser considerado relativamente próximo a uma média de CE_{50} : $0,36 \text{ mg. L}^{-1}$ obtida por Bondarenko *et al.* (2013), resultante de uma revisão de 149 estudos de um período de 1989 a 2013, com o qual o autor classifica as AgNPs como muito tóxicas para organismo aquáticos,

considerando a proximidade dos valores de concentração efetiva apresentados acima, as AgNPs são novamente classificadas como muito tóxicas para organismos aquáticos.

Além disso, observar-se que o valor de concentração efetiva ($CE_{50,72h}$: $0,3148 \pm 0,096 \text{ mg.L}^{-1}$) de AgNPs frente a microalga *D. subspicatus* extrapolou os limites máximos permitidos para a prata em legislações ambientais, como a Resolução CONAMA nº 357/2005, que apresenta limites que vão de $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ a $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ para águas dulcícolas e salinas e a Resolução do CONAMA 430/2011 que apresenta limite de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para lançamento de efluentes, evidenciando novamente a toxicidade das nanopartículas de prata (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011).

4 CONCLUSÃO

O desenvolver dos procedimentos experimentais e levantamento de dados bibliográficos realizados neste estudo possibilitaram a compreensão de um dos efeitos de toxicidade das nanopartículas de prata frente a organismos aquáticos, bem como a obtenção da concentração efetiva de AgNP capaz de inibir 50% do crescimento da biomassa algácea em relação ao controle durante o período de exposição de 72 horas, $CE_{50,72h}$: $0,3148 \pm 0,096 \text{ mg.L}^{-1}$, dado que não foi encontrado na literatura para a microalga foco deste estudo, destacando o ineditismo do resultado. Conclui-se que a microalga *Desmodesmus subspicatus* apresenta sensibilidade à exposição crônica à AgNP, classificando este agente como muito tóxico a organismos aquáticos.

As AgNPs sintetizadas neste estudo apresentaram dispersão entre as suspensões e maior estabilidade quando diluídas em meio CHU e solução nutriente e foram caracterizadas com morfologia esférica e diâmetro de 4,6 nm, sendo seu tamanho um dos fatores responsáveis por sua toxicidade.

Verifica-se a importância do estudo da toxicidade das AgNPs, uma vez que, devido as propriedades que possui, apresenta uma significativa demanda de utilização nas mais diversas áreas e produtos, fato que sinaliza a necessidade de obter informações sobre como as AgNPs se comportam frente a sistemas biológicos.

Visto que é perceptível a variação de concentrações de inibição apresentadas em estudos devido as particularidades que cada um apresenta, toda contribuição que corrobore e acrescente as informações já existentes de toxicidade de nanopartículas frente a sistemas biológicos é válida para que possa se estabelecer limites que se adequem a cada espécie do ecossistema estudado.

Como não há estudos similares a este, empregando a mesma metodologia e mesmo organismo-teste, que viabilize uma correlação e comparação segura, recomenda-se a realização de mais ensaios a fim de aumentar a confiabilidade do resultado e obtenção dos demais possíveis efeitos tóxicos de AgNPs frente à microalga *Desmodesmus subspicatus*.

REFERÊNCIAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12648:2018 - **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica: Método de ensaio com algas**. Rio de Janeiro, 2018.

ANGEL, B. M.; BATLEY, G. E.; JAROLIMEK, C. V.; ROGERS, N. J. The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 359–365, set. 2013.

BALÁŽ, M; DANEU, N; BALÁŽOVÁ, L; DUTKOVÁ, E; TRÁČIKOVÁ, L; BRIANČIN, J; VARGOVÁ, M; BALÁŽOVÁ, M; ZORKOVSKÁ, A; BALÁŽ, P. Bio-mechanochemical synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity. **Advanced Powder Technology**, [S.L.], v. 28, N. 12, p. 3307–3312, dez. 2017.

BECARO, A. A; JONSSON, C; PUTI, F; SIQUEIRA, M; MATTOSO, L; CORREA, D; FERREIRA, M. Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 3, p. 22–29, mai. 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.

BERNI NETO, E; RIBEIRO, C; ZUCOLOTTI, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, São Carlos, v. 99, p.1-4, 2008.

BETTIO, C. D. **Efeitos de toxicidade de nanopartículas metálicas para espécies de microalgas marinhas e dulcícolas: uma revisão**. 2020. 48 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2020.

BONDARENKO, O.; JUGANSON, K.; IVASK, A.; KASEMETS, K.; MORTIMER, M.; KAHRU, A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. **Archives Of Toxicology**, [S.L.], v. 87, n. 7, p. 1181-1200, 1 jun. 2013.

BRASIL. Câmara dos Deputados. **Projeto de Lei 5076/2005**: Dispõe sobre a pesquisa e o uso da nanotecnologia no País. Brasília: Câmara dos Deputados, 2005. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=282392>. Acesso em: 27 out. 2021.

_____. Câmara dos Deputados. **Projeto de Lei 5133/2013**: Regulamenta a rotulagem de produtos da nanotecnologia e de produtos que fazem uso da nanotecnologia. Brasília: Câmara dos Deputados, 2013. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=567257>. Acesso em: 21 out. 2021.

_____. Câmara dos Deputados. **Projeto de Lei 6741/2013**: Dispõe sobre a Política Nacional de Nanotecnologia, a pesquisa, a produção, o destino de rejeitos e o uso da nanotecnologia no país, e dá outras providências. Brasília: Câmara dos Deputados, 2013. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=600333>. Acesso em: 21 out. 2021.

_____. **Resolução nº 357, de 18 de março de 2005**. Classificação de Corpos D'água e Padrões de Lançamento de Efluentes. Brasília, 18 mar. 2005.

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

CEC. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, Environmental Risk Assessment**. Office for official publications of the European Communities, Luxembourg, 1996.

DURÁN, N.; ROLIM, W.; DURÁN, M.; FÁVARO, W.; SEABRA, A. Nanotoxicologia de Nanopartículas de Prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 206-213, dez. 2018.

ENGELMANN, Wilson; HOHENDORFF, Raquel Von; FROHLICH, Afonso. Das nanotecnologias aos nanocosméticos: conhecendo as novidades na escala nanométrica. In: ENGELMANN, Wilson. **Nanocosméticos e o Direito à Informação**. Erechim: Devian, 2015. P. 15-76.

EXBRAYAT, Jean-Marie; MOUDILOU, Elara N.; LAPIED, Emmanuel. Harmful Effects of Nanoparticles on Animals. **Journal Of Nanotechnology**, [S.L.], v. 2015, p. 1-10, nov. 2015.

FADEEL, B.; GARCIA-BENNETT, A. E. Better safe than sorry: understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 362-374, mar. 2010.

FAZELIAN, N.; MOVAFEGHI, A.; YOUSEFZADI, M.; RAHIMZADEH, M.; ZAREI, M. Impact of silver nanoparticles on the growth, fatty acid profile, and antioxidative response of *Nannochloropsis oculata*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, p. 1-14, jun. 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. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/510/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2021.

FERNANDES, I; AROCHE. A; MORAES, C; PETER, C; HASENKAMP, W. Síntese de nanopartículas de prata para produção de tintas condutoras: uma revisão. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 22., 2016, Natal. **Anais [...]**, 2016. p. 7400 - 7410.

GARCIA, D. G.; SANTOS, K. O.; FREITAS, K. F. D.; CARDOSO, M. J. B.; FOOK, M. V. L. Synthesis of silver nanoparticles by electrodeposition technique for biosensor development. **Brazilian Journal of Development**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 31130-31145, mar. 2021.

GARCIA, M. V. D. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual e Campinas, Campinas, 2011. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266890>. Acesso em: 23 de fev. 2022.

GUZMÁN, M. G.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **Internacional Journal of Materials and Metallurgical Engineering**, [S.L.], v. 2, n. 7, 2008.

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

HUANG, J.; CHENG, J.; YI, J. Impact of silver nanoparticles on marine diatom *Skeletonema costatum*. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 10, p. 1343-1354, apr. 2016.

HUPFFER, H. M.; LAZZARETTI, L. L. Nanotecnologia E Sua Regulamentação No Brasil. **Revista Gestão E Desenvolvimento**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 153, 9 set. 2019.

JAIN, K. K. The role of nanobiotechnology in drug discovery. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 10, n. 21, p. 1435-1442, nov. 2005.

JEMEC, A.; KAHRU, A.; POTTHOFF, A.; DROBNE, D.; HEINLAAN, M.; BÖHME, S.; GEPPERT, M.; NOVAK, S.; SCHIRMER, K.; REKULAPALLY, R. An interlaboratory comparison of nanosilver characterisation and hazard identification: harmonising techniques for high quality data. **Environment International**, v. 87, p. 20-32, fev. 2016.

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.

KHODASHENAS, B.; GHORBANI, H. R. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. **Arabian Journal of Chemistry**, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 1823–1838, dez 2019.

KNIE, J; LOPES, E. **Testes ecotoxicológicos: Métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA, 2004. 288 p.

LANDA, P.; VANKOVA, R.; ANDRLOVA, J.; HODEK, J.; MARSIK, P.; STORCHOVA, H.; WHITE, J. C.; VANEK, T.. Nanoparticle-specific changes in

- Arabidopsis thaliana gene expression after exposure to ZnO, TiO₂, and fullerene soot. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 241-242, p. 55-62, nov. 2012.
- LOESCHNER, K.; HADRUP, N.; QVORTRUP, K.; LARSEN, A.; GAO, X.; VOGEL, U.; MORTENSEN, A.; LAM, H.; LARSEN, E. H. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. **Particle And Fibre Toxicology**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-14, jun. 2011.
- MACHADO, F. M. **Avaliação do uso de nanopartículas de prata e atividade antimicrobiana para tratamento de águas**. 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/106736/318272.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 25 fev. 2022.
- MAJEED, S; DANISH, M; ZHRUDIN, A; DASH, G. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from fungal species and its antibacterial and anticancer effect. **Karbala International Journal of Modern Science**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 86–92, mar. 2018.
- MARTINS, M. E. G. Coeficiente de determinação. **Revista de Ciência Elementar**, [S.L.], v. 6, n. 1, mar. 2018.
- MERTENS, J.; OORTS, K.; LEVERETT, D.; ARIJS, K. Effects of silver nitrate are a conservative estimate for the effects of silver nanoparticles on algae growth and *Daphnia magna* reproduction. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 8, p. 1701-1713, jul. 2019.
- NETO, D. P. **Produção de biomassa microalgal de *Desmosdesmus subspicatus* em condição autotrófica de mixotrófica**. 2017. 44 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.
- 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.
- OSCAR, B. V. **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.
- PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 421-430, jan. 2010.
- PHAM, T. L. Toxicity of Silver Nanoparticles to Tropical Microalgae *Scenedesmus acuminatus*, *Chaetoceros gracilis* and Crustacean *Daphnia lumholtzi*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 19, p. 1009-1016, nov. 2018.
- PHAM, T.-L. Effect of Silver Nanoparticles on Tropical Freshwater and Marine Microalgae. **Journal of Chemistry**, v. 2019, p. 1–7, may. 2019.

PIZZI, C. C.; FUMAGALI, E. O.; OLIVEIRA, L.P.S. Nanotoxicologia e Direito: um estudo sobre a aplicação do princípio da precaução. In: SEMANA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE TIRADENTES (SEMPESq), 18., 2016. **Anais [...]** Aracajú:SEMPESq, 2015. p. 1-4. Disponível em: <https://eventos.set.edu.br/sempesq/article/view/4528/3130>. Acesso em: 15 ago. 2021.

PRYMAK, O. et al. Crystallographic characterization of laser-generated, polymerstabilized 4 nm silver-gold alloyed nanoparticles. **Materials Chemistry And Physics**, [S.L.], v. 207, p. 442-450, mar. 2018.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, [S.L.], v. 27, n. 6, p.1028-1029, dez. 2004.

REGINATTO, V. **Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais**. 1998. 105 f. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química, Campinas, 1998. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/248913>. Acesso em: 22 ago. 2021.

ROMERO, N.; VISENTINI, F. F.; MÁRQUEZ, V. E.; SANTIAGO, L. G.; CASTRO, G. R.; GAGNETEN, A. M. Physiological and morphological responses of green microalgae *Chlorella vulgaris* to silver nanoparticles. **Environmental Research**, v. 189, p. 1-10, oct. 2020.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 726-737, out. 2003.

SEGALA, K. **Síntese e caracterização de nanocompósitos funcionais**. 2009. 229 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química Orgânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SENDRA, M.; BLASCO, J.; ARAÚJO, C. V. M. Is the cell wall of marine phytoplankton a 46 protective barrier or a nanoparticle interaction site? Toxicological responses of *Chlorella autotrophica* and *Dunaliella salina* to Ag and CeO₂ nanoparticles. **Ecological Indicators**, v. 95, p. 1053-1067, dec. 2018.

SILVA, M. L. N. **Identificação dos efeitos toxicológicos da coexposição de nanopartículas de prata e glifosato par microcrustáceo *Daphnia magna***. 2020. 120 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/220417/PGEA0675-T.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>. Acesso em: 25 fev. 2022.

SINGH, S.; KUMAR, V.; DATTA, S.; SINGH, S.; DHANJAL, D. S.; GARG, R.; KAUR, P.; SHARMA, K.; SINGH, J. Challenges and Future Perspectives of Nanotoxicology. **Model Organisms To Study Biological Activities And Toxicity Of Nanoparticles**, [S.L.], p. 451-466, mar. 2020.

SPLABOR. **Câmara de Neubauer:** Saiba como realizar a limpeza correta. 2016. Disponível em: <http://www.splabor.com.br/blog/camara-de-contagem-neubauer/aprendendo-mais-saiba-como-realizar-a-limpeza-correta-de-sua-camara-de-contagem-camara-de-neubauer/>. Acesso em: 15 jan. 2022.

STERN, S. T.; MCNEIL, S. E. Nanotechnology Safety Concerns Revisited. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 101, n. 1, p. 4-21, 30 jun. 2007.

UFRGS. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Laboratório de Virologia. BMM 5777 – Culturas celulares e suas aplicações em Microbiologia.** Disponível em: https://www.ufrgs.br/labvir/material/contagem_celulas.pdf. Acesso em: 18 jan. 2022.

USKOKOVIĆ, V.; ODSINADA, R.; DJORDJEVIC, S.; HABELITZ, S. Dynamic light scattering and zeta potential of colloidal mixtures of amelogenin and hydroxyapatite in calcium and phosphate rich ionic milieus. **Archives Of Oral Biology**, [S.L.], v. 56, n. 6, p. 521-532, jun. 2011.

WOOD, C. S; WEIS, C; CARO, C; ROE, A. A practice analysis of toxicology. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [S.L.], v. 82, p. 140–146, dez. 2016.

XIANG, L.; FANG, J.; CHENG, H. Toxicity of silver nanoparticles to green algae *M. aeruginosa* and alleviation by organic matter. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 11, p. 1-9, oct. 2018.

ZHANG, W.; XIAO, B.; FANG, T. Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity. **Chemosphere**, [S.L.], v. 191, n. 7, p. 324– 334, jan. 2018.

ANEXO I
MEIO DE CULTIVO CHU

Quadro 1 – Soluções-estoque para o meio de cultivo CHU

Solução	Reagente	Fórmula	Conc./L
1	Nitrato de sódio	NaNO ₃	25 g
2	Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl ₂ . 2H ₂ O	2,5 g
3	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g
4	Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	7,5 g
5	Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	17,5 g
6	Cloreto de sódio	NaCl	2,5 g
7	Titriplex III	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ . 2H ₂ O	50 g
	Hidróxido de potássio	KOH	31 g
8	Sulfato ferroso hepta-hidratado	FeSO ₄ . 7H ₂ O	4,98 g
9	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	11,42 mg
10	Sulfato de zinco hepta-hidratado	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,82 mg
	Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,44 mg
	Óxido de molibdênio	MoO ₃	0,71 mg
	Sulfato de cobre penta-hidratado	CuSO ₄ . 5H ₂ O	1,57 mg
	Nitrato de cobalto hexa- hidratado	CO(NO ₃) ₄ . 6H ₂ O	0,49 mg

Fonte: ABNT NBR 12648/2018.

Cada solução foi dissolvida separadamente e posteriormente aferidos para 1000 mL em balão volumétrico. Pode ser preservada na geladeira por até 6 meses.

Quadro 2 – Composição de 1 litro de meio CHU

Solução	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume (mL)	10	10	10	10	10	10	1	1	1	1

Fonte: ABNT NBR 12648/2018.

ANEXO II

SOLUÇÕES NUTRINTE

Quadro 3 – Soluções-estoque do meio nutriente

Reagente	Fórmula	Quantidade/L
Solução I (Sais Nutrientes)		
Cloreto de amônia	NH_4Cl	1,5 g
Cloreto de magnésio hexa-hidratado	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g
Cloreto de cálcio di-hidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g
Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4	0,16 g
Solução II (Complexo de Ferro)		
Cloreto férrico hexa-hidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80 mg
Titriplex III	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg
Solução III (Microelementos)		
Ácido bórico	H_3BO_3	185 mg
Cloreto de manganês tetra-hidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg
Cloreto de zinco	ZnCl_2	3 mg
Cloreto de cobalto hexa-hidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg
Cloreto de cobre di-hidratado	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg
Molibdato de sódio di-hidratado	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg

Fonte: KNIE E LOPES (2004).

ANEXO III

MEIO NUTRIENTE DE PRÉ CULTURA E DE TESTE

Quadro 3 – Composição do meio nutriente de pré-cultura preparado com a soluções descritas no Anexo II.

Solução-estoque	Volume/Litro
I	10 mL
II	1 mL
III	1 mL
Bicarbonato de sódio	300 mg

Fonte: KNIE E LOPES (2004).

Quadro 4 – Composição do meio nutriente de teste preparado com as soluções descritas no Anexo II.

Solução-estoque	Volume/Litro
I	100 mL
II	10 mL
III	10 mL
Bicarbonato de sódio	3 g

Fonte: KNIE E LOPES (2004).