



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DE RECURSOS NATURAIS

ALEXIA RIQUET MARTINS

TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM MODELOS AQUÁTICOS E A
INTERFERÊNCIA DO MEIO NA AGREGAÇÃO DA NANOPARTÍCULA

FORTALEZA

2026

ALEXIA RIQUET MARTINS

TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM MODELOS AQUÁTICOS E A
INTERFERÊNCIA DO MEIO NA AGREGAÇÃO DA NANOPARTÍCULA

Dissertação apresentada ao Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Emílio de Castro Miguel.

FORTALEZA

2026

ALEXIA RIQUET MARTINS

TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM MODELOS AQUÁTICOS E A
INTERFERÊNCIA DO MEIO NA AGREGAÇÃO DA NANOPARTÍCULA

Dissertação apresentada ao Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovado em: 27/02/2026

BANCA EXAMINADORA

Dr. Emílio de Castro Miguel (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Davino Machado Andrade Neto

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Fernanda Gomes Trindade

Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)

Dra. Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro

Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha família por todo o suporte, direto e indireto, financeiro e emocional. Eles foram cruciais em toda a minha jornada de vida e conhecimento.

Ao meu grupo de pesquisa, que esteve comigo nos momentos mais importantes durante a realização desse projeto.

Aos colaboradores do Laboratório de Química Avançada de Materiais da UFC (LQMat), coordenado pelo Dr. Pierre Fachine, do Departamento de Análise Química e Físico-Química, da Universidade Federal do Ceará (UFC); ao Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabMol), coordenado pelo professor André Luís Coelho da Silva, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC; e à INVE do Brasil, que cedeu os custos de *Artemia salina*.

Aos órgãos de fomento que tornaram essa pesquisa possível: CNPq, Funcap e à própria Universidade Federal do Ceará (UFC). Agradeço também à Central Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC) pela disponibilização dos equipamentos.

RESUMO

As nanopartículas de prata (AgNP) são de alto interesse industrial, destacando-se por suas propriedades antissépticas, antifúngicas e versatilidade no transporte de fármacos (*drug delivery*). Contudo, a expansão na sua empregabilidade está diretamente vinculada ao aumento do descarte dessa nanopartícula no meio ambiente. Mundialmente, podem ser encontradas regulamentações, que mesmo não direcionadas, abrangem o uso, produção e descarte de nanopartículas, como REACH e a EPA. No Brasil, destaca-se o Projeto de Lei 880/2019 (Marco Legal da Nanotecnologia), independente da regulamentação, o delineamento de risco de um nanomaterial a ser empregado em larga escala é uma necessidade básica para se garantir a segurança de uso. Visando padronizar parâmetros de toxicidade e experimentação, a OECD estabelece normativas com orientações e modelos de estudo para a testagem de materiais. Dentre os organismos-modelo para estudos em meio aquático e cadeia trófica, tem-se a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, o microcrustáceo *Artemia salina* e embriões de *Danio rerio*; organismos escolhidos para testagens da exposição a concentrações de AgNP (12.5, 25 e 50 ppm) e teste de passagem de nível trófico da nanopartícula, através da sua síntese, caracterização de AgNP e análise de danos causados aos modelos com uso de microscopia. A AgNP utilizada foi sintetizada em colaboração e analisada em Uv-Vis, com duas sínteses e um padrão e outras dez (10) vezes mais concentradas; os experimentos de exposição nos três modelos se deram pela diluição do sintetizado de AgNP nos respectivos meios dos modelos com análises a cada 24 horas. O experimento de nível trófico consistiu em exposição de *C. reinhardtii* previamente contaminada com as concentrações de AgNP, exposta a *A. salina* (náuplio I e II), e ao final dos experimentos as amostras foram coletadas e fixadas para microscopia ótica, eletrônica de varredura e de feixe confocal. Os resultados obtidos demonstraram que em meio das *A. salinas* tende a formar colóides, visíveis no trato digestivo do espécime sem causar alterações morfológicas ou mortalidade, em meio TAP homemeide a AgNP não demonstra a mesma tendência de agregação, além de diminuir a velocidade de replicação de *C. reinhardtii*, que formam colônias envoltas em uma secreção transparente, os embriões de *D. rerio* apresentaram 100% de mortalidade e o experimento de nível trófico não apresentou toxicidade causada pela ingestão de *C. reinhardtii* contaminada, pela *A. Salina*. Conclui-se que o meio de exposição influencia diretamente na toxicidade de AgNP, que se mostrou tóxica quando mantida em seu estado não agregado.

Palavras-chave: AgNP; toxicidade; *Artemia salin*;; *Danio rerio*; *Chlamydomonas Reinhard*.

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNP) are of high industrial interest, standing out for their antiseptic and antifungal properties and versatility in drug delivery. However, the expansion of their employability is directly linked to the increase in the disposal of these nanoparticles in the environment. Worldwide, regulations such as REACH and the EPA exist, although not specifically targeted, which cover the use, production, and disposal of nanoparticles. In Brazil, Bill 880/2019 (Legal Framework for Nanotechnology) stands out. Regardless of regulation, risk assessment of a nanomaterial to be used on a large scale is a basic requirement to ensure the safety of use. Aiming to standardize toxicity and experimental parameters, the OECD establishes standards, guidelines, and study models for testing materials. Among the model organisms for studies in aquatic environments and food chains are the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*, the microcrustacean *Artemia salina*, and *Danio rerio* embryos. These organisms were chosen for testing exposure to AgNP concentrations (12.5, 25, and 50 ppm) and testing the trophic level passage of nanoparticles through their synthesis, characterization of AgNP, and analysis of damage caused to the models using microscopy. The AgNP used was synthesized in collaboration and analyzed in UV-Vis, with two syntheses and one standard, and ten (10) times more concentrated; the exposure experiments in the three models were carried out by diluting the synthesized AgNP in the respective model media with analyses every 24 hours. The trophic level experiment consisted of exposing *C. reinhardtii* previously contaminated with AgNP concentrations to *A. salina* (nauplii I and II), and at the end of the experiments, the samples were collected and fixed for optical, scanning electron, and confocal microscopy. The results obtained showed that in the *A. salinas* medium, colloids tend to form, visible in the digestive tract of the specimen without causing morphological changes or mortality. In the homemade TAP medium, AgNP does not show the same tendency to aggregate, in addition to decreasing the replication speed of *C. reinhardtii*, which form colonies surrounded by a transparent secretion. *D. rerio* embryos showed 100% mortality, and the trophic level experiment showed no toxicity caused by the ingestion of *C. reinhardtii* contaminated by *A. Salina*. It is concluded that the exposure medium directly influences the toxicity of AgNP, which proved to be toxic when kept in its non-aggregated state.

Keywords: AgNP; toxicity; *Artemia salina*; *Danio rerio*; *Chlamydomonas reinhardtii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . Barra: 50 µm	16
Figura 2	– <i>Artemia salina</i> náuplio II. Barra: 50 µm.....	17
Figura 3	– Ciclo de vida de <i>Artemia salina</i> : eclosão, náuplio I, náuplio II, juvenil e estágio adulto.....	18
Figura 4	– Embrião de <i>Danio rerio</i> com 5 horas e 20 minutos de fecundação.Barra: 150 µm.....	25
Figura 5	– Agregação de AgNP com meio água do mar artificial 35g/L.....	28
Figura 6	– Náuplio em estágio I exposto por 24 horas a AgNP padrão e 10 vezes mais concentrada. Barra: 50 µm.....	36
Figura 7	– Náuplio em estágio I exposto por 48 horas a AgNP padrão e 10 vezes mais concentrada. Barra: 50 µm.....	37
Figura 8	– Náuplio em estágio II exposto por 24 horas a AgNP padrão e 10 vezes mais concentrada. Barra: 50 µm.....	38
Figura 9	– Náuplio em estágio II exposto por 48 horas a AgNP e 10 vezes mais concentrado. Barra: 50 µm.....	39
Figura 10	– Agrupamento das imagens de <i>Artemia salina</i> referentes ao teste de toxicidade com AgNP. Barra: 50 µm.....	41
Figura 11	– <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> expostas a concentrações de AgNP (12,5, 25 e 50 ppm). Barra: 50 µm.....	42
Figura 12	– <i>Artemia salina</i> (NII) alimentada com <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> exposta a AgNP (72 horas). Barra: 50µm.....	43
Figura 13	– Imagens de MEV de <i>Artemia</i> náuplio II exposta a AgNP (padrão) por 48 horas. Barra: 300 µm.....	45
Figura 14	– Imagens de MEV de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> exposta a AgNP por 72 horas, magnificação de 10.000 e 30.000 kV. Barra: 300 µm.....	46
Figura 15	– Imagens de microscopia confocal de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> expostas por 72 horas a AgNP, com e sem tratamento (laranja de acridina). Barra: 50 µm.....	48
Figura 16	– Embriões de <i>Danio rerio</i> expostos a concentrações de AgNP (12,5, 25 e 50 ppm) por 24 horas.Barra: 300 µm.....	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Tabela de absorvância de AgNP com e sem AMA.....	28
Gráfico 2 – Gráfico de absorvância de AgNP com E3.....	30
Gráfico 3 – Gráfico de absorvância de AgNP com TAP.....	30
Gráfico 4 – Toxicidade aguda de AgNPs (síntese padrão) em náuplios I de <i>Artemia salina</i>	31
Gráfico 5 – Toxicidade aguda de AgNPs (síntese padrão) em náuplios II de <i>Artemia salina</i>	32
Gráfico 6 – Toxicidade aguda de AgNP (síntese 10 vezes mais concentrada) em náuplio I de <i>Artemia salina</i>	32
Gráfico 7 – Toxicidade aguda de AgNP (síntese 10 vezes mais concentrada) em náuplio II de <i>Artemia salina</i>	33
Gráfico 8 – Exposição de microalgas <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> a AgNP (a) e Exposição de microalgas <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> a AgNP, corte do gráfico a abaixo de 10^6 (b).....	34
Gráfico 9 – Toxicidade aguda de <i>Artemia salina</i> alimentada com <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> previamente exposta a AgNP.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNP	Nanopartícula de prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
AMA	Água do Mar Artificial
TAP	Tris Acetato Fosfato
E3	Meio para FET reconstituído
ppm	Partes por milhão
µm	Micrômetros
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
FET	<i>Fish Embryo Toxicity</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Características de nanopartículas	11
1.2	Nanopartícula de prata (AgNP)	11
1.3	Descarte e toxicidade de nanopartículas	13
1.4	Perspectiva da regulamentação global de nanoresíduos	14
1.5	Modelos utilizados para os testes de toxicidade	15
1.5.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	15
1.5.2	<i>Artemia salina</i> (náuplio I e II).....	16
1.5.3	<i>Danio rerio</i> (embriões).....	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Síntese da nanopartícula de prata (AgNP)	20
3.2	Teste de inibição de crescimento de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> expostas à AgNP	21
3.3	Exposição de <i>Artemia salina</i> à AgNP	23
3.4	Exposição de embriões de <i>Danio rerio</i> a AgNP	24
3.5	Passagem de nível trófico	25
3.6	Técnicas em Microscopia	26
3.6.1	<i>Microscopia ótica</i>	26
3.6.2	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	26
3.6.3	<i>Microscopia de feixe confocal</i>	27
4	RESULTADOS	28
4.1	Estabilidade de AgNP em meio de <i>Artemia salina</i>	28
4.2	Estabilidade da AgNP no meio de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> e <i>Danio rerio</i>	30
4.3	Toxicidade de AgNPs sobre náuplios I e II de <i>Artemia salina</i>	31
4.4	Análise quantitativa das colônias de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> expostas a AgNP	33
4.5	Toxicidade de microalgas <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> expostas por 72 horas a AgNP inseridas como alimentação de <i>Artemia salina</i>	35
4.6	Microscopia Ótica	36
4.6.1	<i>MO Artemia salina</i>	36

4.6.2	<i>MO Chlamydomonas reinhardtii</i>	42
4.7	Microscopia eletrônica de varredura.....	45
4.8	Microscopia de confocal.....	48
4.9	Microscopia ótica de FET.....	50
5	DISCUSSÃO.....	52
5.1	Reatividade de AgNP.....	52
5.2	Ingestão e digestão em <i>Artemia salina</i>	53
5.3	AgNP em meio TAP homemade.....	53
5.4	Resposta da <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> a toxicidade de AgNP.....	54
5.5	Estabilidade de AgNP no meio E3 e ação nos embriões de <i>Danio rerio</i>	55
5.6	Inserção de AgNP na cadeia trófica.....	56
6	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características de nanopartículas

Nanopartículas consistem em partículas de tamanho reduzido, as quais pelo menos uma de suas dimensões é menor que 100 nm (Mourdikoudis; Pallares; Thanh, 2018). As dimensões das partículas podem influenciar diretamente em suas propriedades (Altammar, 2023; Bélteky et al., 2021).

Podendo ser separadas entre nanopartículas a base de carbono (grafeno, nanotubos de carbono, óxido de grafeno) (Holmannova et al., 2022), com base em lipídios (utilizados como carreadores de DNA, RNA e siRNA) (Xu et al., 2022), de cerâmica (TiO_2 , SiOs, AlO_2) (Hass Wakamatsu; Salomão, 2010) semicondutoras (CdSe, ZeSe, TiO_2 , ZnO)(Mishra et al., 2023), poliméricas (nanohidrogéis) (Mishra et al., 2023) e nanopartículas metálicas (AgNPs, CuNPs, AuNPs) (Altammar, 2023).

Dentre os inúmeros tipos de nanopartículas, as mais estudadas são as poliméricas e as metálicas (Altammar, 2023; Sajid, 2022), principalmente as nanopartículas de prata (AgNP), devido a sua fácil síntese e sua ampla utilização no meio farmacológico e médico, entre suas aplicações, podem ser citadas revestimentos de dispositivos médicos curativos para ferimentos e queimaduras, antissépticos e moléculas modificadas para uso em sistemas de Drug delivery (Essghaier, 2024; Kaushal et al., 2023).

1.2 Nanopartícula de prata (AgNP)

As nanopartículas de prata (AgNPs) têm despertado um interesse sem precedentes na comunidade científica devido às suas propriedades físico-químicas singulares, as quais derivam de sua elevada relação superfície-volume e de efeitos de confinamento quântico. Um dos fenômenos mais notáveis é a Ressonância de Plásmon de Superfície Localizada (LSPR), que confere às AgNPs propriedades ópticas ajustáveis, fundamentais para o desenvolvimento de sensores de alta sensibilidade e dispositivos fotônicos (Sati et al., 2025)

A eficácia dessas nanopartículas é intrinsecamente dependente de sua morfologia (esferas, prismas ou fios) e do método de síntese, que dita a estabilidade e a reatividade química

do material em diferentes meios (Sati et al., 2025).

No campo biomédico, as AgNPs são amplamente reconhecidas por seu potente e amplo espectro de ação antimicrobiana, agindo contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e vírus, incluindo variantes resistentes a antibióticos. O mecanismo de ação envolve a liberação controlada de íons de prata, que rompem a integridade da membrana citoplasmática, induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e interferem na replicação do DNA. Essas partículas se destacam ainda pelo uso em terapias anticancerígenas, nas quais sua citotoxicidade seletiva pode ser explorada para inibir o crescimento tumoral e melhorar a entrega direcionada de fármacos (Jangid et al., 2024).

As AgNP formam ligações fortes com moléculas biológicas especialmente as de membrana através de íons (Ag^+) liberados causando a oxidação da membrana bacteriana, entrando na célula e podendo causar danos ao DNA da bactéria, impedindo sua replicação e síntese de enzimas cruciais para o funcionamento da célula, levando a morte celular (Noga et al., 2023).

Além das aplicações biológicas, avanços demonstram a versatilidade das AgNPs na engenharia de materiais e energia. No setor fotovoltaico, a incorporação de camadas de nanopartículas de prata em células solares orgânicas tem mostrado um aumento significativo na eficiência de conversão energética, facilitando o transporte de cargas e reduzindo perdas ópticas. Paralelamente, na área ambiental, elas são aplicadas como catalisadores eficientes na degradação de poluentes orgânicos em efluentes industriais e no desenvolvimento de embalagens inteligentes para alimentos, visando prolongar a vida útil de produtos perecíveis através de suas propriedades conservantes (Gavim et al., 2025).

Apesar do vasto potencial, a síntese sustentável e a toxicidade ambiental das AgNPs permanecem como desafios críticos para sua comercialização em larga escala. A transição para a "síntese verde", que utiliza extratos vegetais ou microrganismos em vez de agentes redutores químicos tóxicos, tem sido o foco de pesquisas de ponta para mitigar impactos ecológicos. A compreensão detalhada da interação entre as AgNPs e os sistemas biológicos (a "*nano-bio interface*") é essencial para garantir a segurança regulatória, permitindo que os benefícios tecnológicos dessas nanoestruturas sejam plenamente aproveitados sem comprometer a saúde humana ou a biodiversidade (Karataş et al., 2026).

Além disso, o uso em larga escala dessas partículas pode acarretar dano ambiental, principalmente no que desrespeita a fauna e flora aquática, tendo impactos diretos como morte de espécies, além da sua inserção na cadeia alimentar, se alojando em produtores primários de

grande consumo, e sendo bioacumulado ao passar da complexidade predatória da cadeia alimentar, podendo chegar direta ou indiretamente ao consumo humano, principalmente por via de pescados e outros alimentos derivados de água doce ou salgada (Mat Lazim et al., 2023; Ramzan et al., 2022).

1.3 Descarte e toxicidade de nanopartículas

O desenvolvimento de novas partículas também representa o surgimento de novos resíduos químicos a serem descartados. As nanopartículas, são algumas dessas partículas que representam um grande avanço tecnológico, e vem sendo exploradas e produzidas em grandes quantidades para diversas finalidades, no mundo moderno tem-se cada vez mais aproveitados das novas características de materiais em escala nanométrica para gerar fármacos, alimentos e materiais, e produtos entre eles tintas, protetor solar, além de derivados alimentícios de consumo diário, como sucos e processados de frutas e leite (Adeyemi; Fawole, 2023; Chen et al., 2023; Joseph et al., 2023).

O uso gera descarte, e o descarte de forma inadequada expõe os ecossistemas e as cadeias tróficas a novos perigos de possíveis contaminações nocivas (Colman et al., 2014; Nam et al., 2014). A eliminação de nanopartículas não neutralizadas, é um risco não apenas pela sua acumulação como sua interação com o meio e os indivíduos expostos (Elsaesser; Howard, 2012; Nemmar et al., 2013).

O processo de reação dessas moléculas com o meio pode mudar por completo suas propriedades e características, podendo tanto neutralizar uma molécula antes perigosa, quanto tornar uma partícula antes inofensiva um problema ambiental (Colman et al., 2014). A interação é apenas um dos problemas desse descarte inadequado, por ano toneladas de resíduos são descartados e com eles quantidades cada vez mais significativas de nanopartículas, o acúmulo se torna uma questão quando se considera que diferentes doses de uma mesma substância podem ter efeitos divergentes (Bélteky et al., 2019; Nam et al., 2014).

Ademais, é crucial frisar que os dejetos de nanopartículas provem tanto de descarte doméstico, quanto de industrial e agrícola (Agredo-Gomez et al., 2024; Kolarova; Napiórkowski, 2021; Pontes et al., 2020) Sendo mais que um problema de gerenciamento de resíduos, representa a carência de propostas e legislações governamentais com relação aos produtos que se utilizam e derivam-se de nanopartículas como um todo.

1.4 Perspectiva da regulamentação global de nanoresíduos

A base para resguardar o uso e eliminação seguro de nanopartículas é a regularização. Esse processo regulatório ainda está em fases iniciais, sendo encontrado principalmente em países de primeiro mundo, com os da união europeia, que regulamenta através do REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) regulado pela Agência Europeia dos Produtos Químicos, através de processos como a exigência para as empresas fabricante o enfoque em nanopartículas e nanomateriais, de fabricação segura através do processo de “safe by design” que garante a segurança do material, dès do uso ao descarte, além da mensuração de possíveis riscos que podem ser causados por essas estruturas (“REACH regulation”), 2026)

Os Estados Unidos da América, também apresentam medidas voltada para regulação de nanoestruturados, através do TSCA (Toxic Substances Control Act) regulado pelo EPA (agência de regulação ambiental) (“EPA”, 2026), que esta mais ligada a manutenção de registros pela fabricante das informações de periculosidade do que é produzido e a exigência de notificação do órgão competentes além de testes de para a segurança humana. Mundialmente se tem registros e protocolos gerados pelas instituições como a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), que propõe diretrizes e praticas para experimentação e utilização segura de produtos como as nanopartículas (“OECD”, 2026).

No que diz respeito à atuação da legislação brasileira não se tem nenhuma lei ou diretriz em vigor no período atual, que se volte diretamente para a regularização do produção e descarte de nanomateriais em geral. O que é observado, é a regulamentação do uso por órgão como a Anvisa pelo RDC n° 751/2022, voltada, contudo para produtos da área da saúde e o possível risco humano, e a criação de projetos de lei como a PL 880/2019 (Marco Legal da Nanotecnologia), marcando a relevância dessas estruturas e da necessidade de se progredir na sua regularização, como forma de garantir o uso, produção e eliminação de forma benéfica e com menor impacto para a fauna e a flora local.

A observação de parâmetros ambientais é a principal ferramenta para mensurar a saúde de um ecossistema, existem diversas formas e indicadores amplamente estudados que são utilizados como medidores da boa interação entre o ambiente e alguma substância, tanto organismos vivos como anfíbios, algas e peixes (Kumar; Gupta; Dhiman, 2024; Zaghoul et al., 2020) ou químicos como peróxidos e proteínas (López-Pedrouso et al., 2022; Nagarani et al., 2023).

Muitos desses biomarcadores de poluição, principalmente a aquática, vem sendo estudados e padronizados para serem utilizados em laboratório, permitindo assim a criação de modelos e protocolos, que predizem os impactos de determinados componentes em situação controlada, minimizando danos e perdas, tanto para o ecossistema quanto para os insumos de pesquisa (Kumar; Gupta; Dhiman, 2024). A testagem de toxicidade em espécimes laboratoriais é uma etapa crucial e indispensável para garantir a segurança de um composto, especialmente para determinar a sua dosagem segura de utilização, o que determina a diferença entre um medicamento e um veneno (López-Pedrouso et al., 2022; Nagarani et al., 2023).

Quando se trata do bioacumulo de uma substância no meio ambiente, a questão pode ser tratada de forma similar, sendo necessário averiguar a toxicidade do reagente nas condições externas, diferentes do que ele inicialmente fora designado para interagir. As normativas da OECD designarão que o limite não deve ultrapassar 100 ppm no meio (OECD 423, 2001), entre esse intervalo é crucial a determinação do início da letalidade, mensurando-se assim se há a necessidade de medidas mais efetivas para a neutralização do componente no meio.

1.5 Modelos utilizados para os testes de toxicidade

Os modelos selecionados para a análise da AgNP seguem uma via ascendente na cadeia alimentar, por meio do crescimento de nível trófico, seguindo de organismos base como microalgas (*Chlamydomonas reinhardtii*) (Dupuis; Merchant, 2023) e microcrustáceos (*Artemia salina*) (Tiong et al., 2025) até embriões de peixe (*Danio rerio*) (Polaka et al., 2022). Analisando a resposta dos modelos a AgNP, juntamente com a reatividade da partícula aos diferentes meios que cada modelo exige e como esses meios interferem diretamente na interação e toxicidade entre as partículas e os organismos.

1.5.1 Chlamydomonas reinhardtii

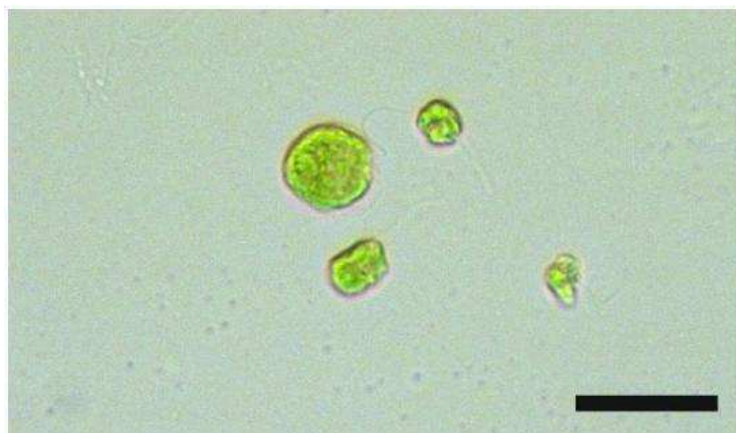
A *Chlamydomonas reinhardtii* (fig.1) é um eucarioto fotossintetizante unicelular que mede entre 10 e 20 µm (Cross; Umen, 2015; Harris, 2026), apresenta dois flagelos utilizados para locomoção, e pode ser encontrada tanto em ambiente aquático (água doce e salgada) quanto em solo, sendo uma das microalgas mais estudadas. Além disso, essa alga é

muito utilizada para estudos genéticos e a fotossíntese, pela presença de DNA no cloroplasto, mitocondrial e núcleo, por sua resistência e rápida divisão (Tran; Kaldenhoff, 2020; Weeks, 2023).

O cloroplasto que preenche a maior parte do interior da alga, é também a organela que confere a coloração verde intensa quando a célula esta em um estado saudável, contudo pode se desenvolver em ambiente bem ou mal iluminados devido a possibilidade de utilizar a molécula de acetato como molécula energética (Dupuis; Merchant, 2023; Hanikenne, 2003).

O modelo em si apresenta vantagem por poder ser utilizado como sinalizador de contaminação de água doce de fácil propagação e rápida adaptabilidade, além do baixo custo de manutenção e poder ser propagado em ambientes de armazenamento reduzido (Dupuis; Merchant, 2023; Tran; Kaldenhoff, 2020).

Figura 1 – *Chlamydomonas reinhardtii*, Barra 50 μm .



Fonte: elaborado pela autora.

1.5.2 *Artemia salina* (náuplio I e II)

Artemia salina (fig.2), é um microcrustáceo filtrador de água salgada com tamanho que varia entre 10 a 20 mm, que se desenvolve a partir de cistos, passando por estágio de desenvolvimento de náuplio até chegar a fase adulta. Sendo um dos modelos de ecotoxicidade mais utilizados, por seu fácil manuseio e baixo custo tendo sua experimentação normatizada pelo ISO/TS 20787:2017. A artemia representa a base da cadeia alimentar, rica em proteína é um dos principais alimentos vivos de peixes em cativeiro, sendo também utilizado para estudo

de nível trófico (Rajabi et al., 2015; Tiong et al., 2025).

Figura 2 – *Artemia salina* náuplio II, Barra 50 µm.



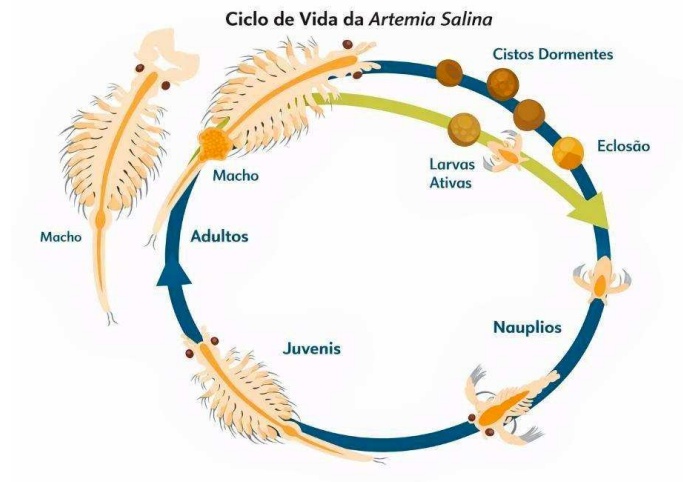
Fonte: elaborado pela autora.

O primeiro estágio do ciclo de vida da artemia (fig.3) após a eclosão, é designado como náuplio I, um indivíduo pré-desenvolvido com estrutura simples que nasce após 24 horas de incubação dos cistos, suas estruturas internas ainda não estão totalmente desenvolvidas e ainda dependendo da própria reserva nutricional para sobreviver, desenvolvimento segue com o estágio de náuplio II, 48 horas de desenvolvimento, já há ingestão de resíduos externos, sendo sua dieta normalmente composta de microalgas ou plâncton, se alimentando nesse estágio por estruturas até 0,45 micrómetros, sua estrutura morfologia engloba apêndices, olhos naupliares, seguimentos do abdome. Esses são os estágios mais estudados e utilizados do ciclo de vida da artemia (Contino et al., 2023; Rajabi et al., 2015).

O meio ideal de desenvolvimento das artemias utiliza-se o Red Sea Salt, ph 8 (básico), contem também cálcio, magnésio entre outros aditivos.

As artemias são utilizados como modelos de pesquisa voltadas para contaminantes em água salgada. São organismos filtradores, o que aumenta sua interação com partículas no meio, além de serem pequenos quando comparados com outros modelos animais, não demandando muito espaço para a eclosão desenvolvimento ou grande quantidades de material a ser testado, além de baixo valor de mercado, por serem utilizados na aquicultura como alimento para peixes, o que facilita o seu acesso, apresentam também a vantagem de seus cistos poderem ser armazenados por grandes períodos.

Figura 3 – Ciclo de vida de *Artémia salina*. Eclosão, náuplio I, náuplio II, juvenil e estágio adulto.



Fonte: inve aquaculture web page, (<https://artemia.inveaquaculture.com/artemia/>)

1.5.3 *Danio rerio* (embriões)

Danio rerio é um peixe de água doce que, vem se mostrando ser uma alternativa ao uso de ratos para testes laboratoriais, devido a características como, similaridade com o DNA humano de 70%, alta taxa de reprodução, baixo custo de manejo quando comparado com roedores e rápido desenvolvimento chegando a fase adulta entre 60 a 90 dias, além de apresentar dimorfismos sexual, (Haraoka et al., 2022; Polaka et al., 2022; Yoo et al., 2016).

O seu uso para pesquisa é regulamentado pelo Comitê de Ética Animal (CEUA), contudo embriões com até 96 horas de vida não necessitam de aprovação para uso, e seus parâmetros de experimentação são normalizados pelas diretrizes de teste 236 da OCDE (OECD, 2025).

Além das vantagens de utilização do modelo *Danio rerio*, seus ovos também permitem o acompanhamento do desenvolvimento morfológico dos embriões por serem transparentes, permitindo a análise de parâmetros além da mortalidade, como deformações e atrasos no desenvolvimento (Haraoka et al., 2022; Polaka et al., 2022; Yoo et al., 2016).

A experimentação com esses modelos aquáticos, visa a utilização de espécimes já consolidadas pela literatura, que a partir da disponibilidade, foi possível traçar um delineamento experimental visando a posteriori criação da cadeia trófica com esses espécimes, ou seja, de acordo com a cadeia alimentar um indivíduo serviria de alimento para o seguinte para se observar a passagem de nível trófico na cadeia de bioacumulação da nanopartícula de interesse.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Esse trabalho teve por objetivo sintetizar, caracterizar e observar os efeitos tóxicos da exposição de organismos modelo (*Artemia salina*, *Chlamydomonas reinhardtii* e *Danio rerio*) a AgNP e os efeitos da interação da nanopartícula aos seus diferentes meios, além de investigar a passagem de nível trófico dessa nanopartícula.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar AgNP pelo método de síntese verde.
- Observar a agregação de AgNP nos diferentes meios.
- Determinar a toxicidade de AgNP nos modelos *Artemia salina*, *Chlamydomonas reinhardtii* e *Danio rerio*.
- Averiguar possíveis danos celulares causados aos modelos com auxílio de microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de feixe confocal.
- Averiguar a passagem de nível trófico de AgNP de *Chlamydomonas reinhardtii* a *Artemia salina*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese da nanopartícula de prata (AgNP)

A nanopartícula de prata (AgNP), utilizada foi sintetizada em parceria com o Laboratório de Química Avançada de Matérias da UFC (GQMat), coordenado pelo Dr. Pierre Fachine - Departamento de Análise Química e Físico-química, Universidade Federal do Ceará - UFC, de acordo com (Mallmann, 2016).

A caracterização levou em vista os dados já descritos por (Mallmann, 2016) em síntese posteriores, do mesmo grupo de pesquisa, apresentaram que a partícula em questão detém as seguintes características, ação antifúngica, quando exposta a *Aspergillus species*, tamanho do raio hidrodinâmico da partícula de 67 nm, de acordo com dispersão de raio-X, as medidas no DLS (Dynamic Light Scattering) apresentaram dispersão próximos a 27 e 2 nm.

A síntese consistiu em adicionar nitrato de prata (AgNO_3) 21 miligramas em 250 ml de água ultrapura e aquecê-la a 80°C, nessa temperatura foi adicionado a arabinose ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$) 0,5 gramas e citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0,25 gramas, em agitação e temperatura constante por 10 minutos.

O cálculo da concentração de prata em solução, se utilizou do volume final da síntese e da proporção de íons prata (Mallmann, 2016)

Devido a concentração final em ppm (partes por milhão) obtida ser próxima a 50 ppm, que foi a concentração máxima testada, e com a finalidade de evitar a redução das proporções do meio necessário para os testes, foi realizada uma nova síntese na qual as concentrações dos reagentes foram aumentadas em 10 vezes, com a finalidade de se manteve a promoção de no máximo 20% de contaminante no meio exigida pela norma (OECD, 2004) . Ambas as soluções, síntese padrão e a 10 vezes mais concentrada foram testadas para garantir sua similaridade de reação com o meio e com as amostras de teste.

Para a caracterização das partículas, foram realizadas medições em UV – vis com excitação em 300 e 600 nm. A partir dessa excitação foram observadas bandas entre 350 e 450 nm, confirmando a presença de AgNPs em ambas as soluções sintetizadas.

A coloração da síntese padrão final foi amarelo forte, já para a concentração

observou-se uma coloração bem escura quase preta, que se assemelhava a padrão quando diluída.

Os resultados da concentração foram gerados por cálculo de Ag advindo do AgNO_3 , tendo como base a quantidade de nitrato de prata (AgNO_3) utilizado na síntese.

Para detecção da AgNP em solução foram feitas medições no espectrofotômetro specord 250 da Analytik Jena, no departamento de Física da UFC e no departamento de química analítica e físico química da UFC, laboratório GQmat, para visualização do comprimento de onda da nanopartícula.

3.2 Teste de inibição de crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii* expostas à AgNP

Os testes seguiram as diretrizes do teste de inibição de crescimento de algas e cianobactérias de água doce da OCDE para testes de produtos químicos, OECD 201 (Oecd, 2006). Para tanto, foram testados os efeitos biológicos a partir de concentrações de 50, 25 e 12,5 ppm.

As microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* foram crescidas em meio TAP Homemade (pH 7,0) em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabMol), coordenado pelo professor André Luís Coelho da Silva - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, quando alcançaram o crescimento exponencial, foram expostos às nanopartículas de prata em culturas de 20 ml na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/ml em triplicata, utilizando tubos Falcon de 50 ml, por 72 horas. Juntamente com substância de referências (controles) utilizados, sendo elas Dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) como controle positivo, na concentração final em meio de 0,05 molar, diluído em meio TAP homemade e apenas meio TAP de acordo com (Gorman; Levine, 1965; Gormant; Levine, 2026).

Foi utilizado a fase exponencial (logarítmica), do desenvolvimento das microalgas, alcançada de um a dois dias após o início do cultivo, o pH do meio aferido antes do início do experimento e ao final, iniciando em torno do pH 8, as culturas mantiveram-se, a temperatura entre 21 a 24 °C. A superfície onde as culturas foram incubadas receberam iluminação fluorescente contínua e uniforme.

A biomassa de algas em cada frasco foi determinada, antes do início dos testes

(Tempo 0) e diariamente durante o período de exposição (ao completar 24, 48 e 72 horas de exposição a partícula). As medições foram feitas em pequenos volumes removidos da solução de teste, e contabilizados o desenvolvimento da colônia com o auxílio de câmara de Neubauer.

Ao fim das 72 horas de exposição, cada unidade da triplicada (20ml) foi separada em duas amostras de 10 ml, sendo a primeira amostra de 10 ml, destinados a ressupinação em AMA (água do mar artificial), para evitar diluição do meio das artemias, e coleta para um poço da placa de poços das artemias, os outros 10 ml seguiram para fixação com fixador de Karnovsky modificado (composto de tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, Paraformaldeído a 4% e Glutaraldeído a 2,5 %) (Karnovsky, 1964) Todas as alíquotas foram centrifugadas (5000 rpm em temperatura ambiente) e lavadas com meio TAP homemade, para remover excesso de AgNP existente no meio.

Metade dos alíquotas foram separadas utilizados para alimentação das artêmias em estágio de náuplio II (De Paiva Pinheiro et al., 2020).

Tabela 1 - Composição do meio TAP Homemade (pH 7,0)

Solução	Componente	Volume	Concentração na solução estoque	Concentração final no meio
Base Tris	Tris 1 M	20 mL	1 M	20 mM
Sal TAP	NH ₄ Cl	10 mL	20 g/L	0,2 g/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O		5 g/L	0,05 g/L
	CaCl ₂ .2H ₂ O		2,5 g/L	0,025 g/L
Tampão fosfato	K ₂ HPO ₄	1 mL	10,8 g/100 mL	0,108 g/L
	KH ₂ PO ₄		5,6g/100 mL	0,2 g/L
	Sal dissódico de EDTA		50 g/250 mL	0,2 g/L
Elementos-traço de hunter	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 mL	22 g/100 mL	0,22 g/L
	H ₃ BO ₃		11,4 g/200 mL	0,057 g/L
	MnCl ₂ .4H ₂ O		5,06g/50 mL	0,1012 g/L
	FeSO ₄ .7H ₂ O		4,99 g/50 mL	0,0998 g/L
	CoCl ₂ .6H ₂ O		1,61 g/50 mL	0,0322 g/L
	CuSO ₄ .5H ₂ O		1,57 g/50 mL	0,0314 g/L
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4 H ₂ O		1,10 g/50 mL	0,022 g/L
Ácido acético	Ácido acético glacial	1 mL	-	-

Fonte: (Gorman; Levine, 1965; Gormant; Levine, 2026).

3.3 Exposição de *Artemia salina* à AgNP

A exposição de *Artemia salina* às AgNPs seguiu as diretrizes estabelecidas pela OCDE 202 para experimento de toxicidade aguda em materiais (OECD, 2004).

As concentrações testadas foram 12.5, 25 e 50 ppm de AgNP, derivadas tanto da solução padrão quanto a 10 vezes mais concentrada de AgNP, para observar se ambas as sínteses tinham a mesma toxicidade. O experimento se deu em placas de 24 poços, o qual cada poço representava uma unidade da triplicata. Água do mar artificial e dicromato de potássio 0,05M foram empregues como controles negativo e positivo do experimento respectivamente.

As artemias foram eclodidas em câmara de cultivo com aeração e luz constante a 24 °C, a partir de cistos cedidos pela INVE do Brasil.

Para o controle negativo, adicionou-se 2 ml de AMA (água do mar artificial) em cada poço, já o controle positivo foi utilizado 2 ml de dicromato de potássio 0,05M.

As diluições a partir da solução com a síntese dos componentes 10 vezes mais concentrada, foram feitas em estoque de 10 ml para cada concentração em seguida despejada nos poços. A diluição da solução da síntese padrão consistiu na correção da concentração para 50 ppm, as demais diluições foram feitas diretamente nos poços utilizando AMA.

Para se obter os náuplios é necessário adicionar seus cistos em água do mar artificial (AMA) 35 g/L pH 8, aclimatada, iniciando o processo de eclosão. Durante todo o processo, mantido-se iluminação, temperatura e aeração contantes, e realizar a eclosão em uma câmara de incubação. O ciclo de eclosão de completa com 24 horas do início da incubação, obtendo artemias em estado de náuplio I, sendo obtendo náuplio II com 48 horas do início da eclosão (De Paiva Pinheiro et al., 2020; Miguel et al., 2023).

Com as artemias no estágio de náuplio desejado, são selecionados 10 indivíduos vivo para cada poço utilizado. As placas montadas foram mantidas em câmara de cultivo, com iluminação direta e contínua, além de temperatura em torno de 24 ~25°C, por 24 horas, após esse período a placa deve ser analisada em microscópio estereoscópio a fim de se contabilizar a quantidade de indivíduos vivos restantes de cada poço, o procedimento se repete ao completar 48 horas de exposição a AgNP. Ao fim desse período, os indivíduos que se mantiverem vivos

foram coletados e colocados em Eppendorfs contendo 0,5 ml de fixador de Karnovisk modificado (composto de tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, Paraformaldeído a 4% e Glutaraldeído a 2,5 %), e conservados em geladeira para processamento (Karnovsky, 1964).

Devido aos resultados obtidos, não foi possível o cálculo da DL50 para essas amostras.

3.4 Exposição de embriões de *Danio rerio* a AgNP

As exposições da nanopartícula aos embriões foram de acordo com os parâmetros estabelecidos pela OCDE (OECD, 2025) Os embriões foram obtidos através de desova induzida em acasalamentos realizados no Laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da UFC, com colônia estabelecida, seguindo a proporção de 3 machos para 6 fêmeas. Os aquários foram preparados pela tarde (17h) com enriquecimento ambiental (esferas de vidro) e divisória entre os machos e fêmeas, a divisória foi retirado no dia seguinte as 8h, e o processo de reprodução foi mantido até as 12 horas.

Para interromper o processo de reprodução os peixes foram novamente separados e realocados para seus viveiros, o enriquecimento ambiental removido e os ovos obtidos removidos e aclimatado em câmara de incubação com água reconstituída.

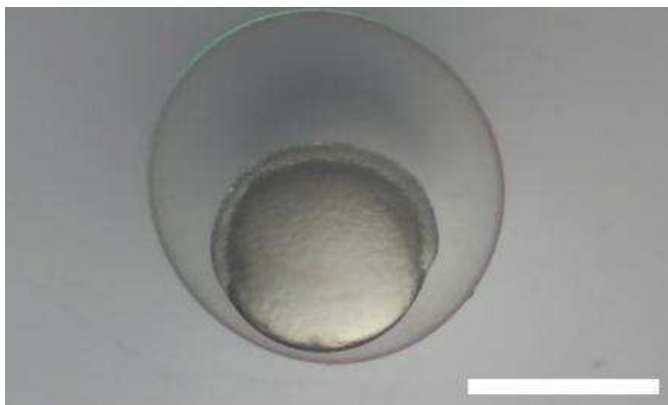
O experimento utilizou E3 (água reconstituída), como meio de manuseio dos embriões e diluição de soluções. O ph utilizado para esse meio foi 7,3 (levemente alcalino), contendo em solução bicarbonato de sódio 0,096g (NaHCO₃), Sulfato de magnésio 0,06g (MgSO₄), sulfato de cálcio di-hidratado 0,06g (CaSO₄.2H₂O) e Cloreto de potássio 0,004g (KCl), quantidade referente a um litro (Miguel et al., 2025).

Os embriões passam por duas etapas de seleção antes de serem dispostos nos poços da placa de 24 poços, previamente montadas com 2 ml de solução por poço, sendo 20 poços destinados para o contaminante e 4 para os controles de placa, evitando assim a utilização de embriões não viáveis e com tempos de fecundação diferente dos necessários. Todos os embriões utilizados na montagem de placas possuem 5 horas e 20 minutos de fecundação, como visto na (fig. 4).

São necessários para o experimento uma placa correspondente a controle negativo, contendo apenas meio E3 e uma placa correspondente ao controle positivo, 3,4- dicloroanilina

a 0,02%.

Figura 4 – Embrião de *Danio rerio* com 5 horas e 20 minutos de fecunda. Barra 150 μm .



Fonte: elaborado pela autora.

3.5 Passagem de nível trófico

O experimento de passagem de nível trófico da AgNP, se deu pela separação de alíquotas de 10 ml, de cada respectiva concentração e dos controles ao fim das 72 horas de exposição das *Chlamydomonas reinhardtii*, essas alíquotas foram centrifugadas (5000 rpm em temperatura ambiente) e lavadas com meio TAP homemade, para remover excesso de AgNP existente no meio.

As amostras ressuspendidas com AMA após centrifugação, foram colocadas um poço contendo 10 artemias com 48 horas de eclosão, estágio de náuplio II, e ressuspendidas após 24 horas juntamente com a contagem de artemias vivas, assim como o experimento de toxicidade com as artemias (De Paiva Pinheiro et al., 2023; Miguel et al., 2023).

3.6 Técnicas em Microscopia

As amostras das algas, das artêmias e dos embriões de *Danio rerio* foram processadas para microscopia de ótica de campo claro, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser.

Diferenciando-se do processamento se deu apenas a concentração do tampão cacodilato de sódio utilizada, sendo 0,05 M para as microalgas e 0,1M para as artemias.

3.7.1 Microscopia ótica

Para microscopia ótica de campo claro *in vivo*, as amostras de *A. salina* e *C. reinhardtii*, foram posicionadas em lâmina previamente limpa. As imagens foram feitas utilizando o Zeiss Primo Star equipado com câmera digital, e as imagens foram capturadas com o auxílio do software Zen Lite, na Central Analítica - UFC.

Imagens de microscopia, se deram após processamento, de desidratação das amostras e inclusão de resina epox, para corte dos blocos de resina epox, utilizando-se de um ultramicrotomo (Leica RM2255 Rotating Microtome), e os cortes cordos com azul de toluidina (TBO) 0.025% pH 4.0 e lavados com água destilada. As imagens também foram feitas com o Zeiss Primo Star, da Central Analítica - UFC.

3.7.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O processo pós fixação consistiu em lavagens, 3 vezes com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M, seguido da serie alcoólica (50%, 70%, 90% e 100%), em que as artemias ficaram 30 minutos em cada Etapa. Subsequentemente as amostras foram secas por via química, com a isenção progressiva das proporções de HMDS em álcool puro permanecendo 15 minutos em cada troca. O recipiente da amostra foi mantido fechado durante esse período. Ao final, o líquido contendo as artemias foi transferido para uma laminula, deixado *overnight* para secagem. Por fim, as amostras secas foram montadas em stubs com fita de carbono e, em seguida, metalizadas (Metalizadora QT150 ES – Quorum).

As imagens de MEV foram feitas utilizando-se do Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450-FEG – ThermoFisher na Central Analítica da UFC.

3.7.3 Microscopia confocal

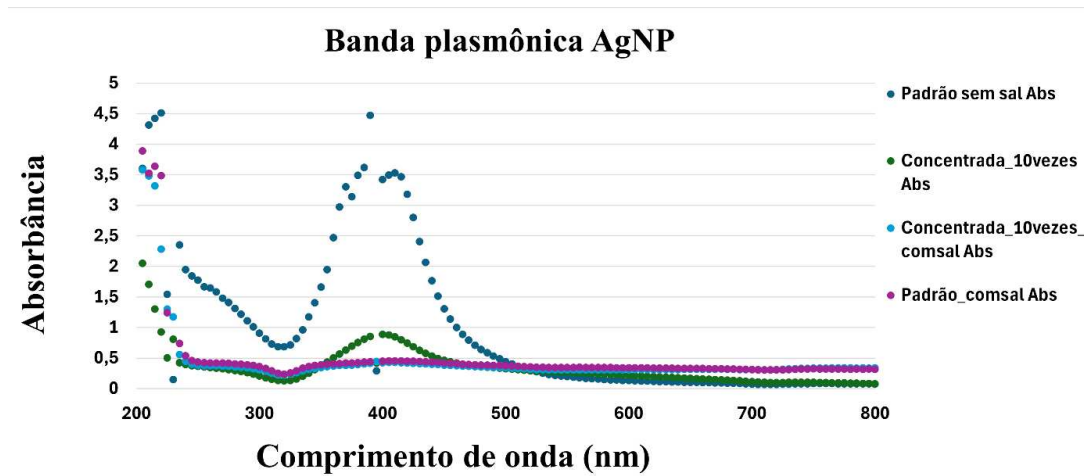
As amostras previamente processadas com laranja de acridina foram preparadas em lamínas de vidro e excitadas com leiser de 405 nm, para a captação do sinal e formação das imagens.

As imagens de confocal foram feitas utilizando-se do Microscópio Confocal LM-710 – Zeiss na Central Analítica da UFC.

4 RESULTADOS

4.1 Estabilidade de AgNP em meio de *Artemia salina*

Gráfico 1 – Tabela de absorbância de AgNP com e sem AMA.



Fonte: Elaborada pela autora.

As linhas correspondem às amostras testadas, padrão sem sal (síntese de concentração padrão de AgNP sem a adição de Red Sea Salt, componente do meio das artemias), concentrada 10 vezes (a síntese refeita com os reagentes 10 vezes mais concentrados), concentrada 10 vezes com sal (análise da síntese 10 vezes mais concentrada com a adição de Red Sea Salta meio das artemias, padrão com sal (síntese com a concentração padrão dos reagentes adicionada de Red Sea Salt). É possível ver a agregação nas diferentes concentrações utilizadas durante o experimento na (fig.5).

Figura 5 – Agregação de AgNP com meio Água do mar artificial 35g/L.



Fonte: elaborada pela autora.

As AgNPs, sintetizadas das duas formas mencionadas anteriormente, agregaram rapidamente quando adicionadas ao meio AMA da *Artemia salina*, (fig. 5). Dessa forma, foram realizadas análises UV- vis (300 a 600nm), para observar a presença de AgNP ainda no meio.

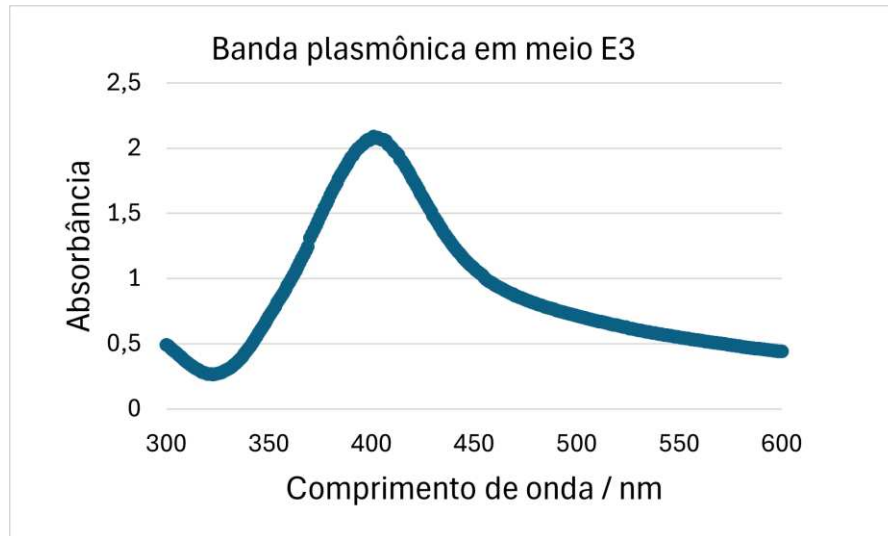
A banda plasmônica (pico entre 350 e 450 nm) indica a presença da partícula em solução, a falta desse pico indica a agregação da AgNP.

Em vista da rápida reação de agregação, observada em ambas as soluções de AgNP sintetizadas, ao se adicionar a AgNP ao meio salino das artemias, foram necessários testes para averiguar a presença da AgNP não agregado, durante o tempo do experimento. As análises das bandas plasmônicas, das soluções de prata com e sem sal, com sal sendo AgNP a 50 ppm diluída em água ultrapura e com sal seria AgNP 50 ppm diluída em água do mar artificial) foram averiguadas, que nas soluções antes de interagirem com o meio salino (azul-escuro e verde) é perceptível o pico entre 350 e 450 nm, como visto no gráfico 1, representando a presença de nanopartículas no meio. Nas amostras com sal (azul-claro e roxo do Gráfico 1) não foi observado picos entre 350 e 450 nm, representando a ausência de AgNP em suspensão. A mistura entre o sal e a solução de nanopartícula de prata foi feita minutos antes de ser levada para medição, podendo ser observado a rápida mudança de cor de um tom amarelado características da AgNP para um preto acinzentado, além de ser possível perceber a presença de pequenos coloides pretos.

Com isso é observado que em meio de água do mar artificial destinado para a *Artemia salina*, há a tendência de agregação de AgNP, que perdem assim sua conformação e propriedades originais esperadas. Contudo a toxicidade desses agregados ainda é cabível de investigação.

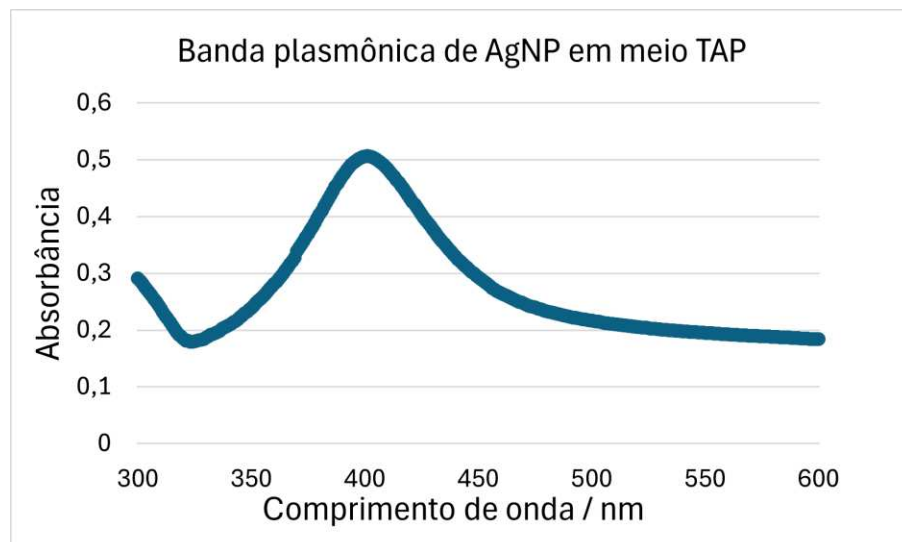
4.2 Estabilidade da AgNP no meio de *Chlamydomonas reinhardtii* e *Danio rerio*

Gráfico 2 – Gráfico de absorvância de AgNP (50 ppm) com E3.



Fonte: Elaborada pela autora.

Gráfico 3 – Gráfico de absorvância de AgNP (50 ppm) com TAP



Fonte: elaborada pela autora.

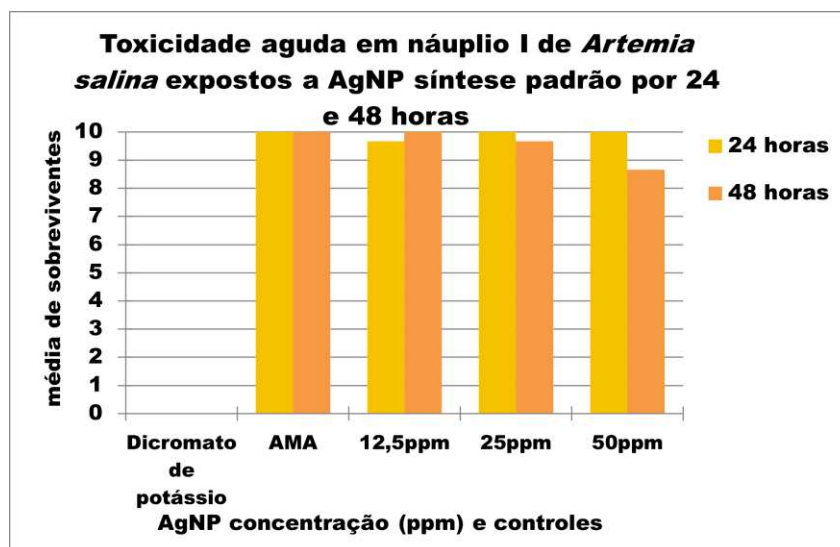
Ambas as diluições em meio próprio para *Danio rerio* (E3) e *Chlamydomonas reinhardtii* (TAP), (Gráficos 2 e 3), apresentaram picos similares entre 350 e 450 nm, tendo o ápice da leitura sendo capitada próximo a 400 nm, assim como é visível no gráfico relativo a diluição de AgNP em água reconstituída, esses picos representam a presença da AgNP em

suspensão. Mesmo misturada ao meio, o processo de agregação que estingue o pico não foi observado nesses meios.

Devidos a presença desses picos em ambos os meios, tanto o cultivo de *Danio rerio* (E3) e *Chlamydomonas reinhardtii* (TAP), mantiveram as características e propriedades observadas da AgNP, não sendo possível notar a formação imediata de agregados, ou seja, AgNP manteve sua estrutura nanométrica em solução por mais tempo do que é notado em meio salino com Red Sea Salt destinado ao cultivo de artemia.

4.3 Toxicidade de AgNPs sobre náuplios I e II de *Artemia salina*

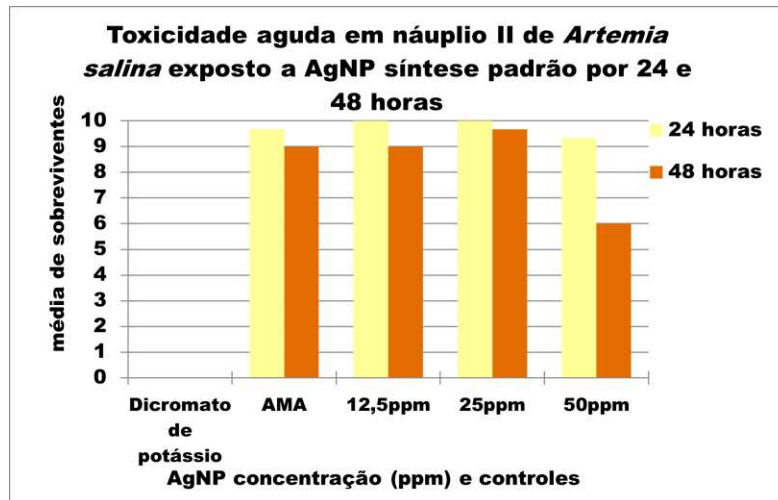
Gráfico 4 – Toxicidade aguda de AgNPs (síntese padrão) em náuplios I de *Artemia salina*.



Fonte: elaborado pela autora.

Os espécimes expostos a solução padrão de AgNP a artemias iniciando o experimento em estágio de náuplio I, não apresentaram média de mortalidade numericamente relevante quando observamos o gráfico gerado pela média das contagens de vivos obtidas nas triplicatas, (Gráfico 4). Tanto em 24 horas de exposição quanto em 48 horas, as artemias se mantiveram estáveis e com movimentos perceptíveis, desenvolvendo-se para o próximo estágio de crescimento esperado. O controle positivo, contendo dicromato de potássio a 0,05M, apresenta mortalidade de 100% já esperada.

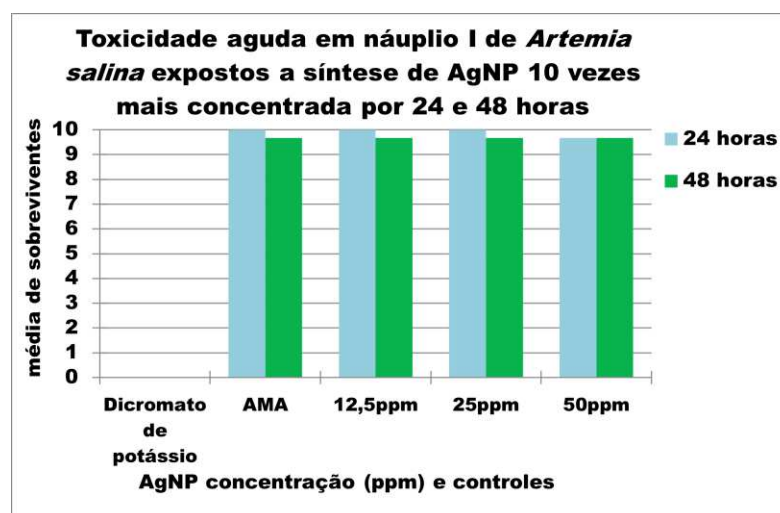
Gráfico 5 – Toxicidade aguda de AgNPs (síntese padrão) em náuplios II de *Artemia salina*.



Fonte: elaborado pela autora.

Da mesma forma que náuplio I (gráfico 4), é observado no (Gráfico 5), que os náuplios em estágio II expostos a AgNP, tiveram um baixo índice de mortalidade, contudo é possível observar que 50 ppm tem uma média de vivos em 48 horas de exposição menor que quando comparado com as demais concentrações, não chegando a 2 mortos por poço quando considerado o desvio padrão (gráfico 5).

Gráfico 6 - Toxicidade aguda de AgNPs (síntese 10 vezes mais concentrada) em náuplios I de *Artemia salina*.

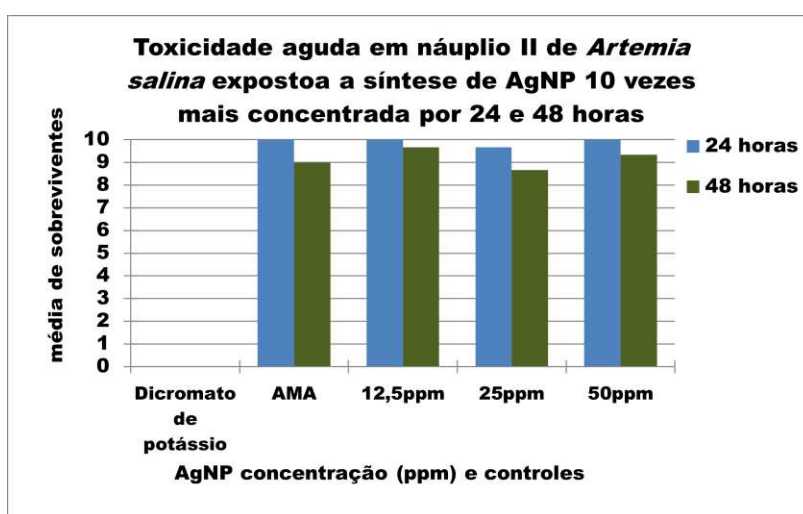


Fonte: elaborado pela autora.

Os resultados expostos no gráfico de exposição de náuplios I a AgNP 10 vezes mais concentrada, gráfico 6, se diferencia do observado com náuplio I e AgNP padrão, gráfico 4, por ter uma maior média de indivíduos vivos em 50 ppm em 48 horas de exposição.

De modo geral, não se observa divergências relevantes quando comparado a média de indivíduos vivos exposto as duas formas de síntese de AgNP, as mortes observadas foram mínimas, podendo não estar diretamente relacionadas a partícula, demonstrando que não há divergências nas duas sínteses no que desrespeita a toxicidade comparada com náuplios de *Artemia salina*.

Gráfico 7 - Toxicidade aguda de AgNPs (síntese 10 vezes mais concentrada) em náuplios II de *Artemia salina*.



Fonte: elaborado pela autora.

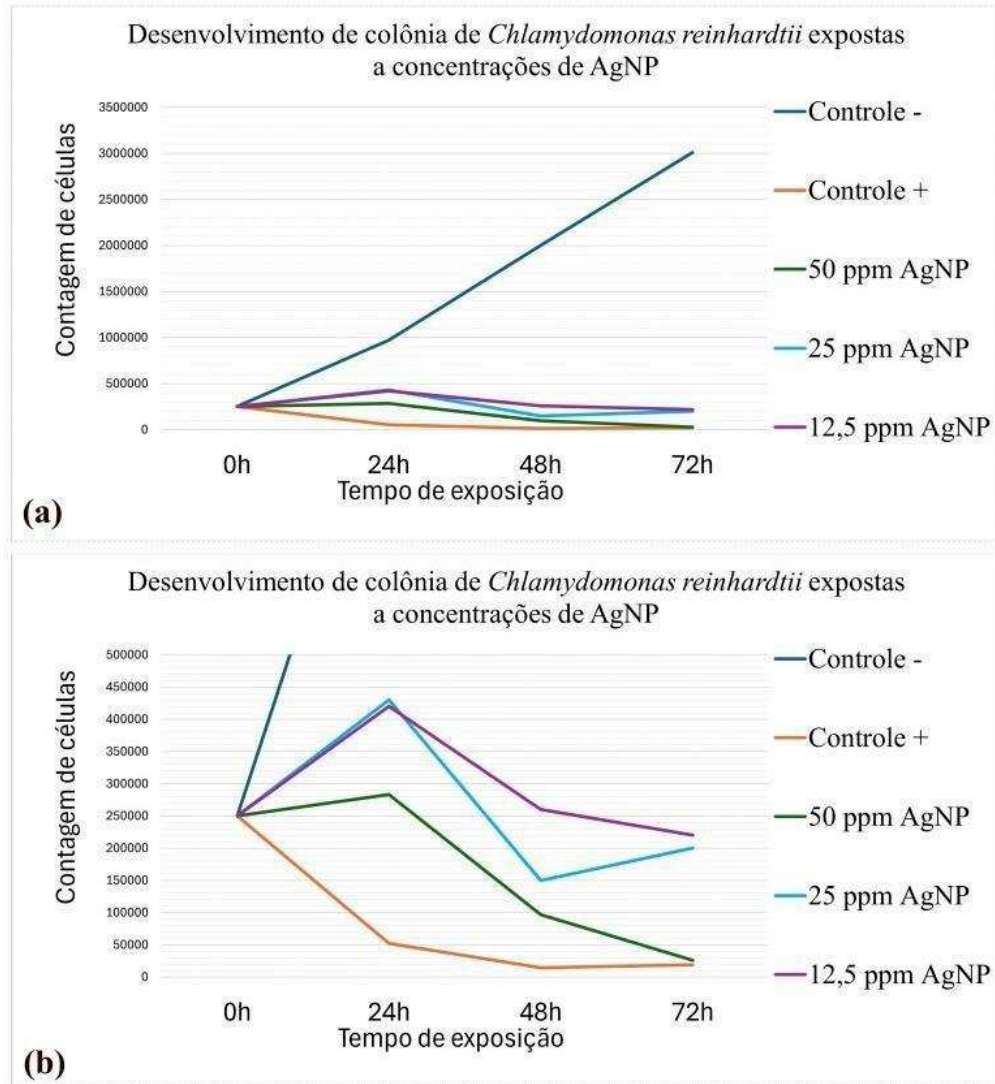
A média de sobreviventes observada no gráfico da AgNP síntese 10 vezes mais concentrada em náuplio II, gráfico 7, são similares aos dados coletados para o controle negativo apenas com água do mar artificial, sendo a média nas primeiras 24 horas de 10 vivos com uma ou duas mortes sendo notadas com 48 horas, independente da concentração de AgNP.

4.4 Análise quantitativa das colônias de *Chlamydomonas reinhardtii* expostas a AgNP

A partir desse ponto os experimentos se seguiram com a utilização apenas da AgNP advinda

da síntese 10 vezes mais concentrada por questão de conveniência de diluição das alíquotas.

Gráfico 8 - Exposição de microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* a AgNP (a) e Exposição de microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* a AgNP, corte do gráfico abaixo de 10^6 (b).



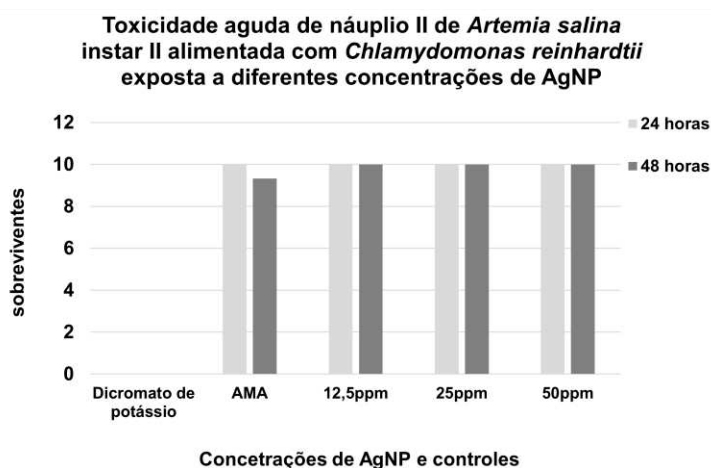
Fonte: elaborado pela autora.

As colônias *Chlamydomonas reinhardtii* partiram de uma concentração inicial de células por ml de $2,5 \times 10^5$, gráfico 8 (a). O controle negativo do experimento apresentou crescimento contínuo tendo uma taxa de crescimento em média de 220% a cada 24 horas, finalizando o experimento com $3,01 \times 10^6$ células/ml, gráfico 8 (a). O controle positivo teve a tendência oposta, com um decréscimo de quase 100% em comparação com o volume inicial de células, a queda no número de indivíduos mais proeminentes se deu nas primeiras 24 horas. A propensão de comportamento das células durante as primeiras 24 horas de exposição foi

similar; as colônias a serem expostas começaram a crescer, a 50 ppm em um volume bem menor que 12,5 e 25, (Gráfico 8 (b)). De 24 para 48 horas a tendência no volume de células foi decrescente, tendo uma morte celular mais acentuada em 25 ppm, bem menor do que a notada em 12,5 ppm. A tendência progressiva de 48 horas para 72 horas, mostrou que 50 ppm continuou em redução no volume de células se aproximando do volume final do controle positivo, 25 ppm iniciou um processo de crescimento no número de células, terminando com um volume de células/ml final similar a 12,5 ppm, (gráfico 8 (b)).

4.5 Toxicidade de microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* expostas por 72 horas a AgNP inseridas como alimentação de *Artemia salina*

Gráfico 9 – Toxicidade aguda de *Artemia salina* alimentada com *Chlamydomonas reinhardtii* previamente exposta a AgNP.



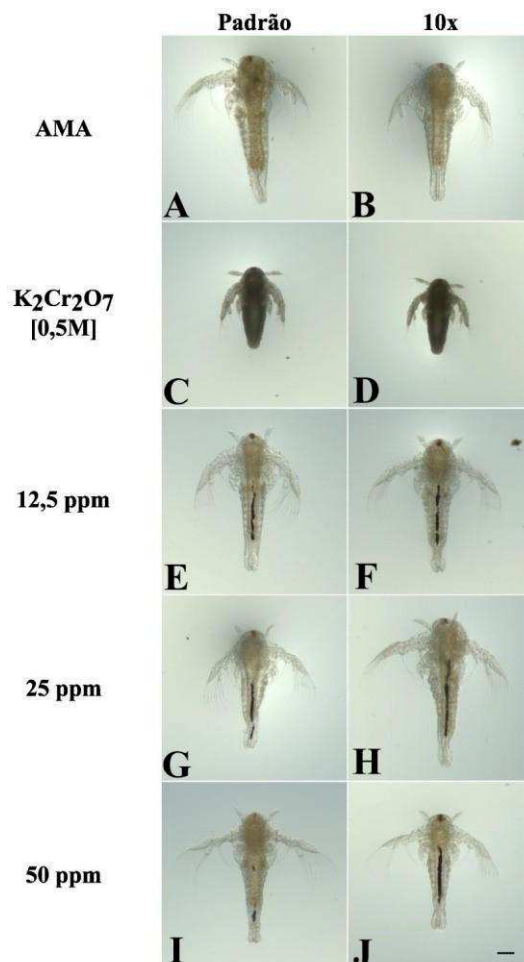
Fonte: elaborada pela autora.

A alimentação das artemias com microalgas expostas a AgNP teve a média de mortalidade próxima a zero, quase todos os indivíduos chegaram as 48 horas vivos, exceto os expostos a dicromato de potássio, que apresentou 100% de mortalidade nas primeiras 24 horas de exposição as artemias.

4.6 Microscopia Ótica

4.6.1 MO *Artemia salina*

Figura 6 – Náuplio em estágio I expostos por 24 horas a AgNP padrão e 10 vezes mais concentrada, Barra: 50 μm .



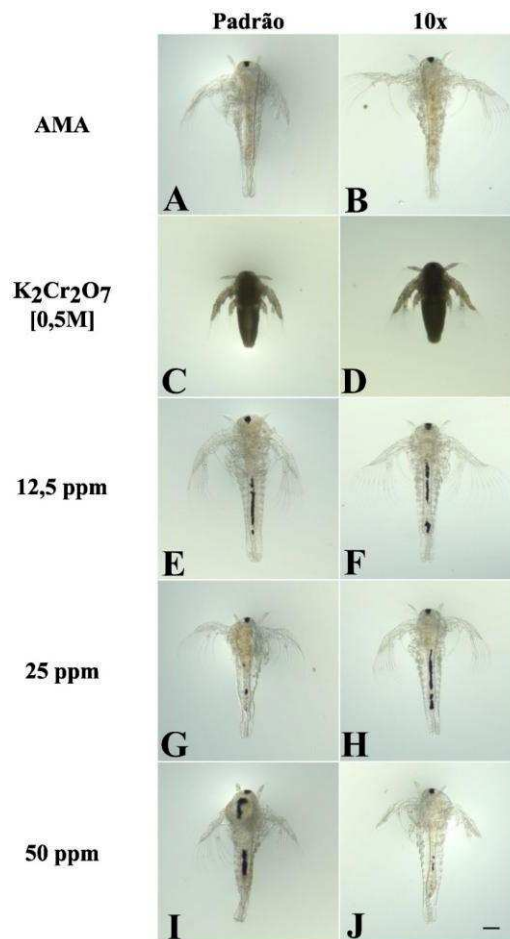
Fonte: elaborada pela autora.

Como observado na (fig.6), o controle negativo expostos somente a AMA completou o desenvolvimento para o estágio de náuplio II, (fig.6 A e B), apresenta tamanho regular, trato digestivo bem desenvolvido e a presença de olho náupliano, apêndices e antenas sem deformidade aparente, já os espécimes expostos ao controle negativo (dicromato de potássio 0,05M), (fig.6 C e D), tem toda sua estrutura mais escurecida e mantém o desenvolvimento referente a náuplio I, sem danos aparentes a nenhuma estrutura corporal.

As artemias advindas da exposição a nanopartícula se mostram semelhantes ao controle negativo no que desrespeita ao desenvolvimento do animal para o estágio de náuplio II, contudo as amostras apresentam coloide de cor escura no trato digestivo quase por completo, (fig.6 E, F, G, H e J), exceto na concentração de 50 ppm da concentração padrão, (fig.6 I), que também apresenta a massa escura, contudo, em menor quantidade do que as demais artemias expostas a nanopartícula.

Devido a inexistência de partículas consumíveis de tamanho significativo, para a formação de aglomerados no trato digestivo que se não advindas da AgNP diluída no meio, se pressupõe que esses coloides sejam nanopartículas de prata agregadas, possivelmente prata metálica.

Figura 7 – Náuplio em estágio I expostos por 48 horas a AgNP padrão e 10x mais concentrada, Barra: 50 μm .

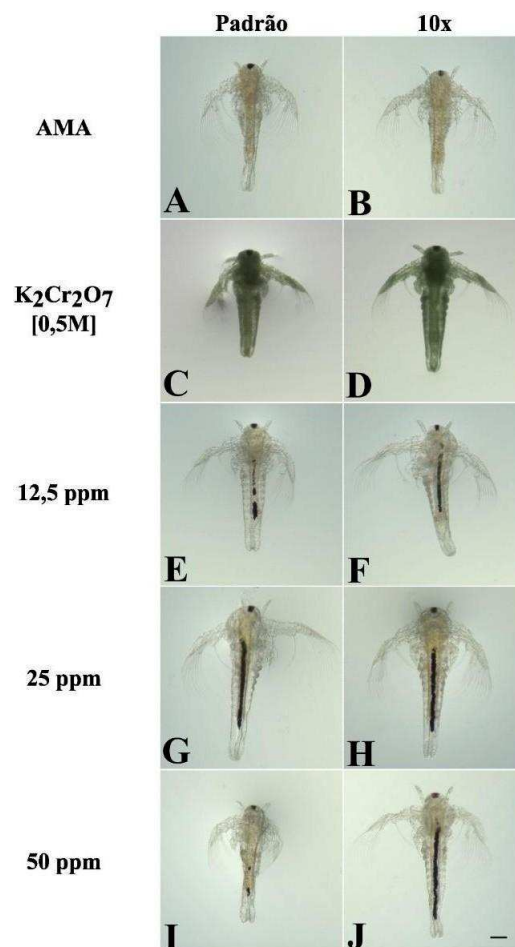


Fonte: elaborada pela autora.

Já na figura 7, os náuplios expostos a AgNPs por 24h, os controles negativos (fig.7

A e B), não apresentam problemas no desenvolvimento já estando em estágio de náuplio III (mais desenvolvido que o estágio anterior de náuplio II) e o controle positivo morto em estágio de náuplio I, (fig.7 C e D). A presença da prata no trato digestivo é menos proeminente nessas amostras, ainda bem presente na concentração de 12,5 ppm, (fig.7 E e F), mas já apresenta uma redução significativa na sua presença em 25 ppm na concentração padrão, fig.7 G, já em 50 ppm também se percebe a redução na quantidade especialmente na concentração 10 vezes mais concentrada, quase não havendo partícula, (fig.7 J). A concentração de 50 ppm padrão, aparenta não somente ter partículas no trato digestivo. A presença em menor quantidade do aglomerado no trato digestivo das artemias pode estar relacionado ao tempo de exposição dela aos coloides, podendo representar que o agregado passou pelo processo digestivo de ingestão, digestão e excreção.

Figura 8 – Náuplio em estágio II expostos por 24 horas a AgNP padrão e 10 vezes mais concentrada, Barra: 50 μm .

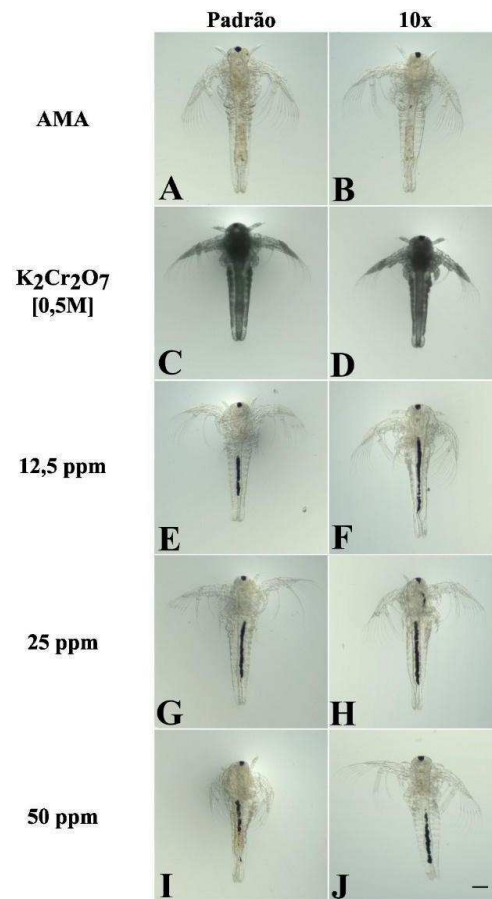


Fonte: elaborada pela autora.

Pode-se notar que, as amostras da (fig.8) já iniciam a exposição em estágio de náuplio II, os controles expostos apenas a água do mar artificial apresenta a continuação do crescimento para o estágio de náuplio III, (fig.8 A e B), sem a perda ou deformidade de nenhuma das características morfológicas adquiridas no estágio de náuplio II.

Os olhos, antenas, apêndices e aparelho digestivo apresentam-se íntegros e sem alterações visíveis que demonstrem algum dano. Já as artérias expostas a dicromato de potássio apresentam manutenção da morfologia de náuplio II e escurecimento do corpo do animal. Os espécimes expostos as concentrações de AgNP por 24 horas, apresentam características referentes ao observado no controle apenas com água do mar artificial, contudo a presença de uma massa preta é observável no trato digestivo de todos os exemplares em grande quantidade, exceto, no de 50 ppm exposto a AgNP de síntese padrão, (fig.8 I).

Figura 9 – Náuplio em estágio II expostos por 48 horas a AgNP padrão e 10 vezes mais concentrada, Barra: 50 μ m.



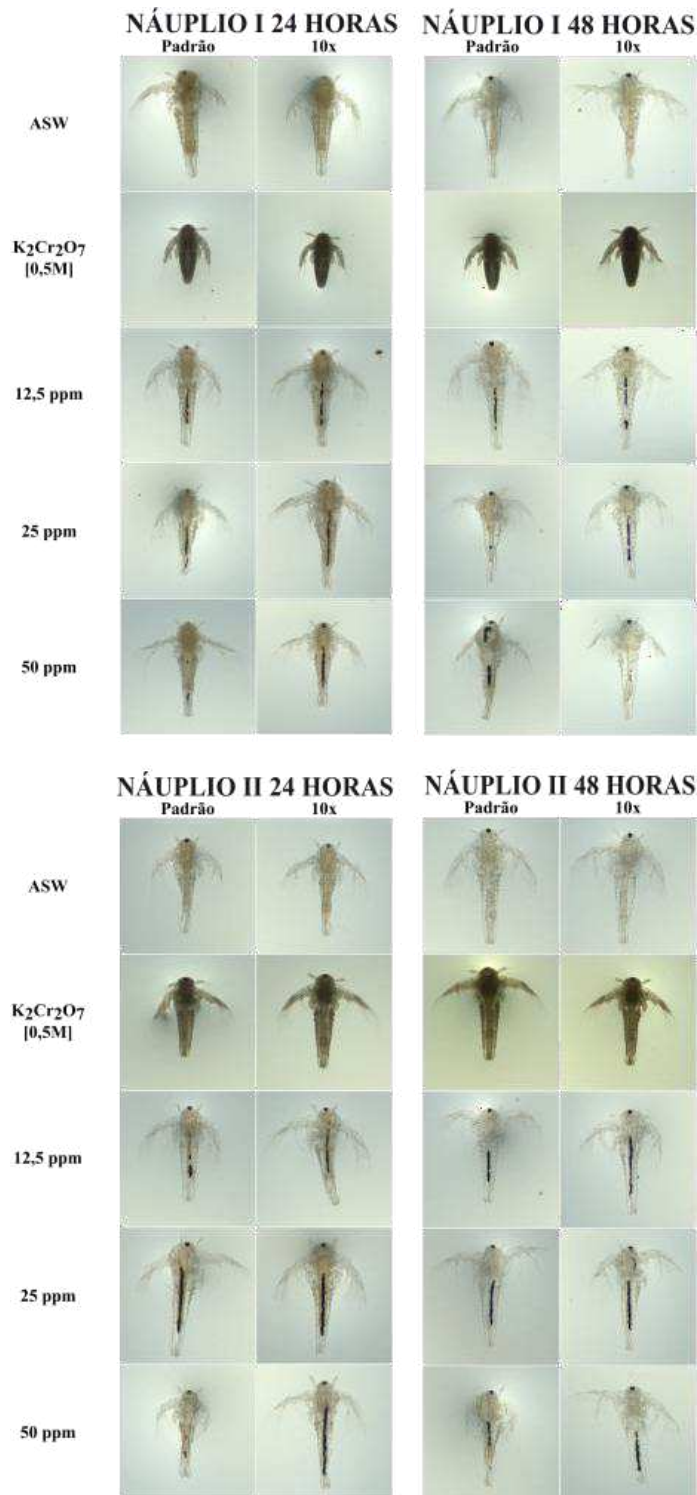
Fonte: elaborada pela autora.

De forma similar os controles expostos apenas a AMA, coletados em 24 horas para

náuplio II, os modelos captados não apresentaram deformidade ou interferência de desenvolvimento quando expostos apenas a água do mar artificial, (fig.9 A e B), e se mantém em estágio de náuplio II com escurecimento do corpo quando expostos a dicromato de potássio, (fig.9 C e D). Novamente é perceptível a ampla presença de coloides pretos no decorrer do trato digestivo, sendo observado menor quantidade da substância nos espécimes expostos a AgNP na concentração de 12,5 e 50 ppm na síntese padrão, (fig.9 E e G). No exemplar exposto a concentração de 25 ppm na síntese 10 vezes mais concentrado, (fig.9 H), é possível se notar uma massa escura na parte superior no início do sistema digestivo, onde se espera que ocorra a captação do alimento pelo animal.

A (fig.10) é uma imagem comparativa das imagens de todas as artemias expostas ao teste de toxicidade com AgNP diretamente, é possível ver nessa figura, que independente da concentração da nanopartícula exposta é possível perceber o coloide de coloração escura no trato digestivo, além do desenvolvimento completo dos indivíduos, sendo notável os apêndices, antenas, abdome e olho naupliano.

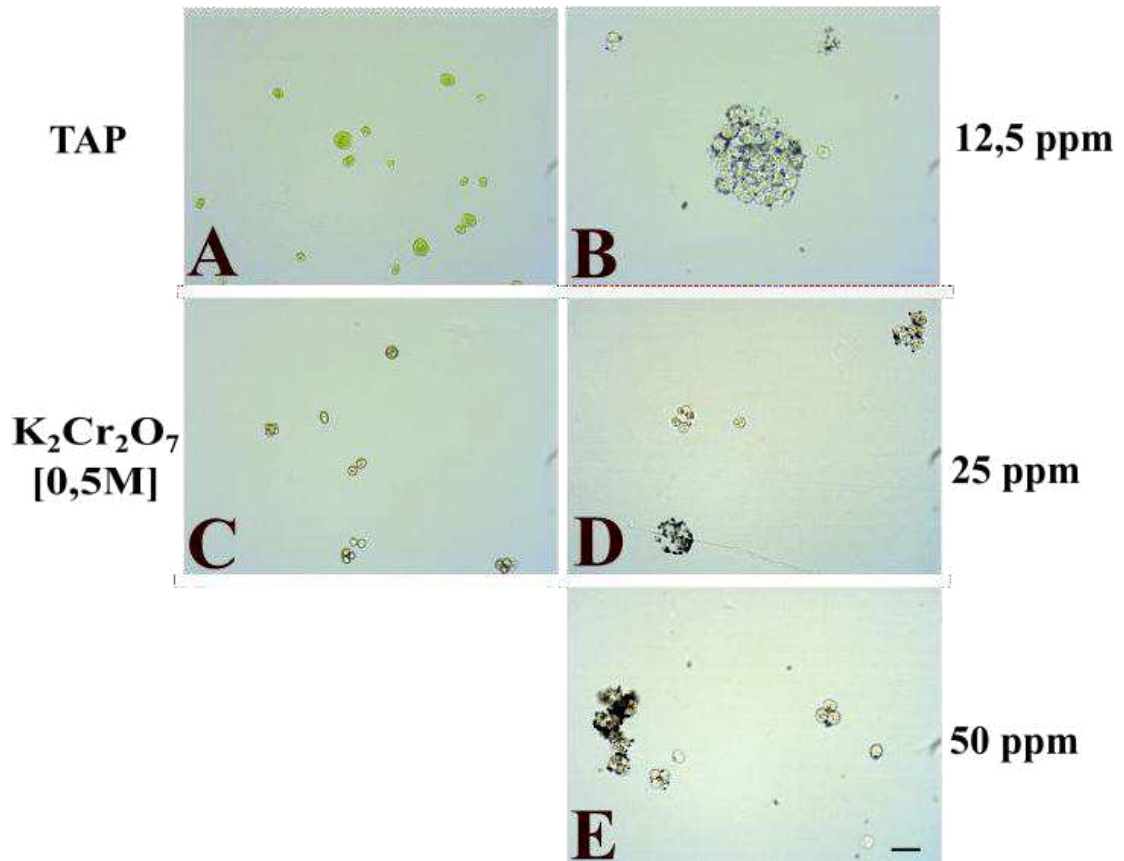
Figure 10 – Agrupamento das imagens de Artemia salina referentes ao teste de toxicidade com AgNP.



Fonte: elaborada pela autora.

4.6.2 MO *Chlamydomonas reinhardtii*

Figura 11 – *Chlamydomonas reinhardtii* expostas concentrações de AgNP (12.5, 25, 50 ppm), Barra: 50 µm.

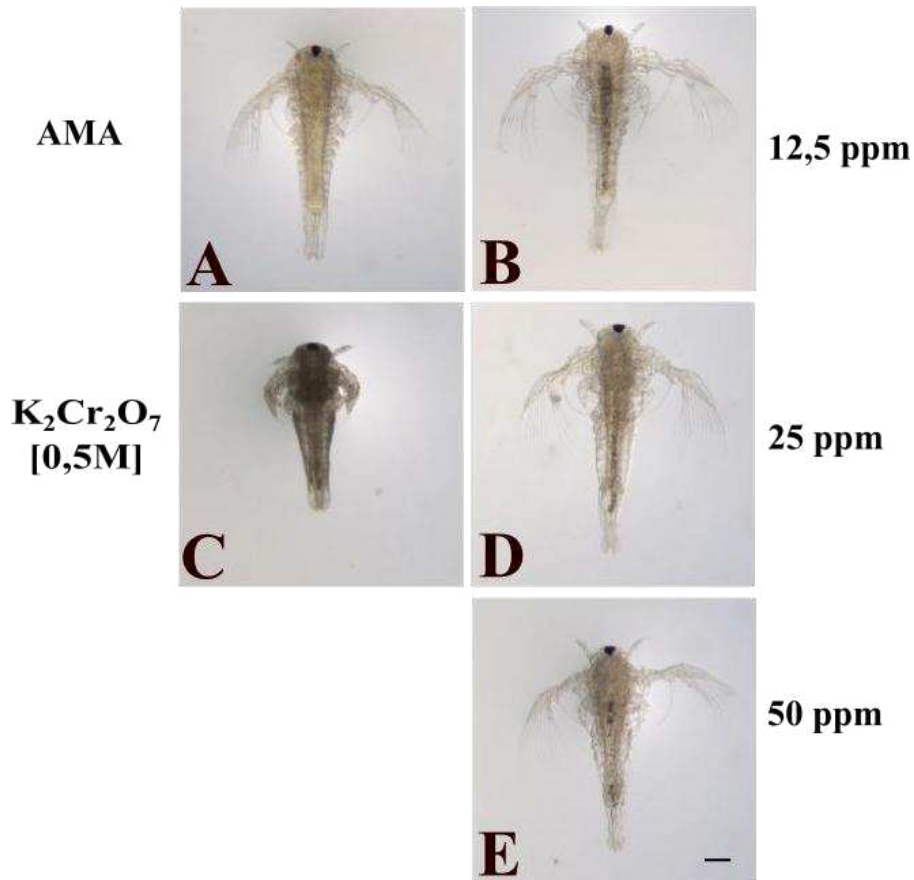


Fonte: elaborada pela autora.

Controle negativo, mantido apenas em meio TAP homemade para o desenvolvimento das microalgas, apresenta espécimes de coloração verde forte e de formato esférico (fig.11 A). Por outro lado, as algas expostas ao dicromato apresentam verde menos intenso e células de tamanho aparentemente menor, além de pequenos agregados celulares (fig.10 C).

As amostras expostas a AgNP apresentam similaridades na pigmentação, sendo ela mais fraca e células menores do que a observada no dicromato, (fig.11 C), além da tendência de agregação entre as células e a presença de colóides de coloração escura ao entorno da camada externa das microalgas, mesmo entre as células agregadas, sendo possível observar o contaminante dentro do aglomerado de células, além de uma camada transparente superficial entre as células, que aparenta mantê-las agregadas, (fig.11 B, D e E).

Figura 12 – *Artemia salina* (NII) alimentada com *Chlamydomonas reinhardtii* exposta a AgNP (72 horas), Barra: 50 μm .



Fonte: Elaborada pela autora.

As artemias observadas nas imagens foram alimentadas com *Chlamydomonas reinhardtii*, que receberam previamente o tratamento de exposição a AgNP em diferentes concentrações.

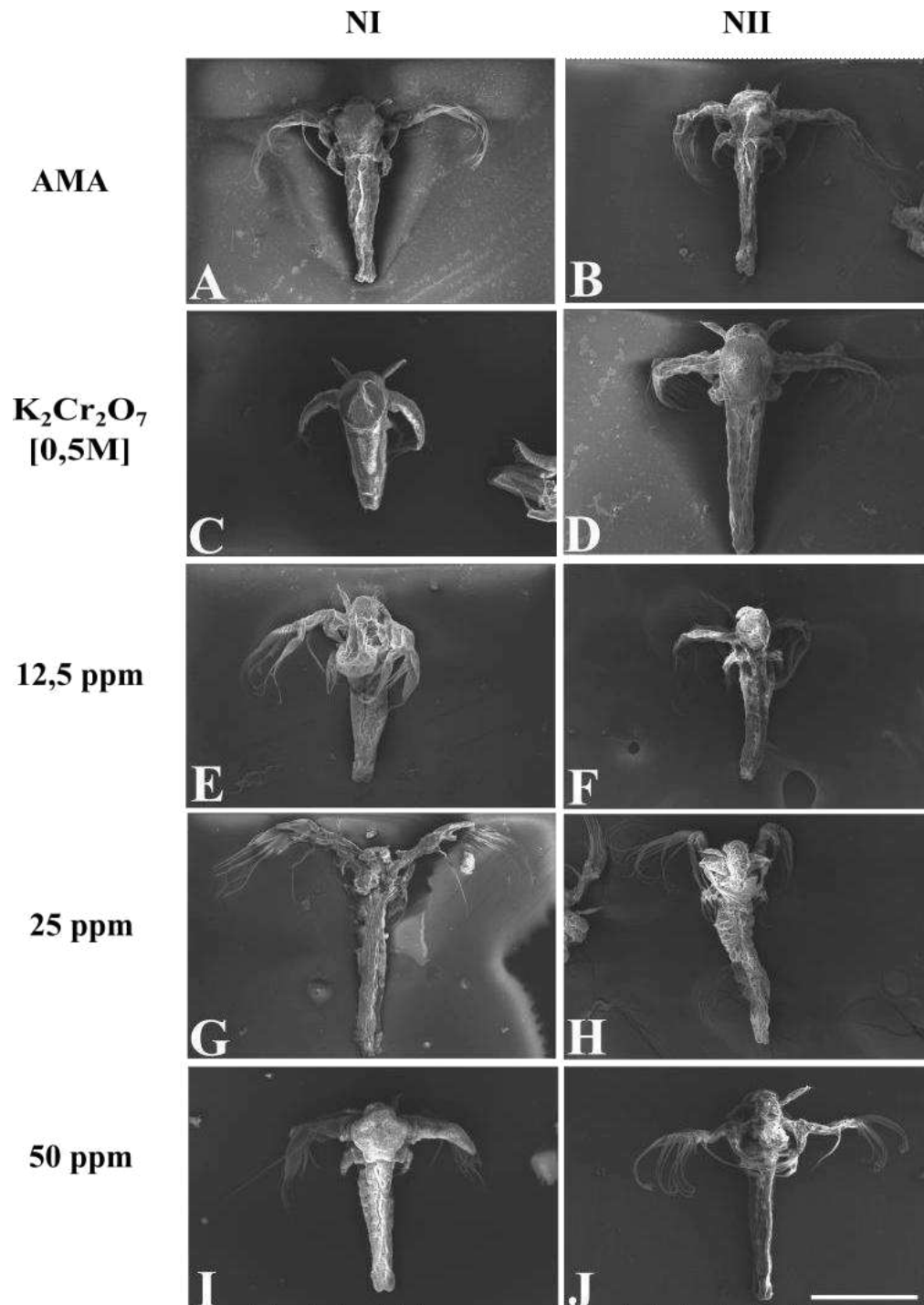
Os controles, os quais foram alimentados com clamidomonas sem contaminante no meio de crescimento, controle negativo (AMA), (fig.12 A, e C). *Chlamydomonas reinhardtii* previamente exposta por 72 horas a dicromato de potássio, (fig.12 C), controle positivo. Todas as artemias foram expostas já em estágio de náuplio II, nesse estágio é esperado a ingestão de contaminantes presentes no meio, o que é observado em todos os

espécimes. O controle positivo apresenta o trato digestivo cheio e com uma leve coloração esverdeada, olhos, antenas e apêndices sem danos aparentes, e crescimento esperado com bom desenvolvimento dos segmentos do corpo. O controle positivo apresenta estagnação do desenvolvimento, ainda é possível se perceber algum contaminante em pouca quantidade no trato digestivo.

Os espécimes expostos a clamidomona contaminada com AgNP apresentam seu trato digestivo completo por agregados escuro e claros em quantidade variável, sendo que na concentração de 12,5ppm é mais proeminente a presença de coloides escuros, (fig.12 B), em comparação com o controle negativo alimentado com clamidomonas regulares, as artemias que receberam clamidomonas com AgNP aparentam ter um desenvolvimento abdominal menor, com um abdômen mais esguio e com os segmentos do corpo menos proeminente.

4.7 Microscopia eletrônica de varredura

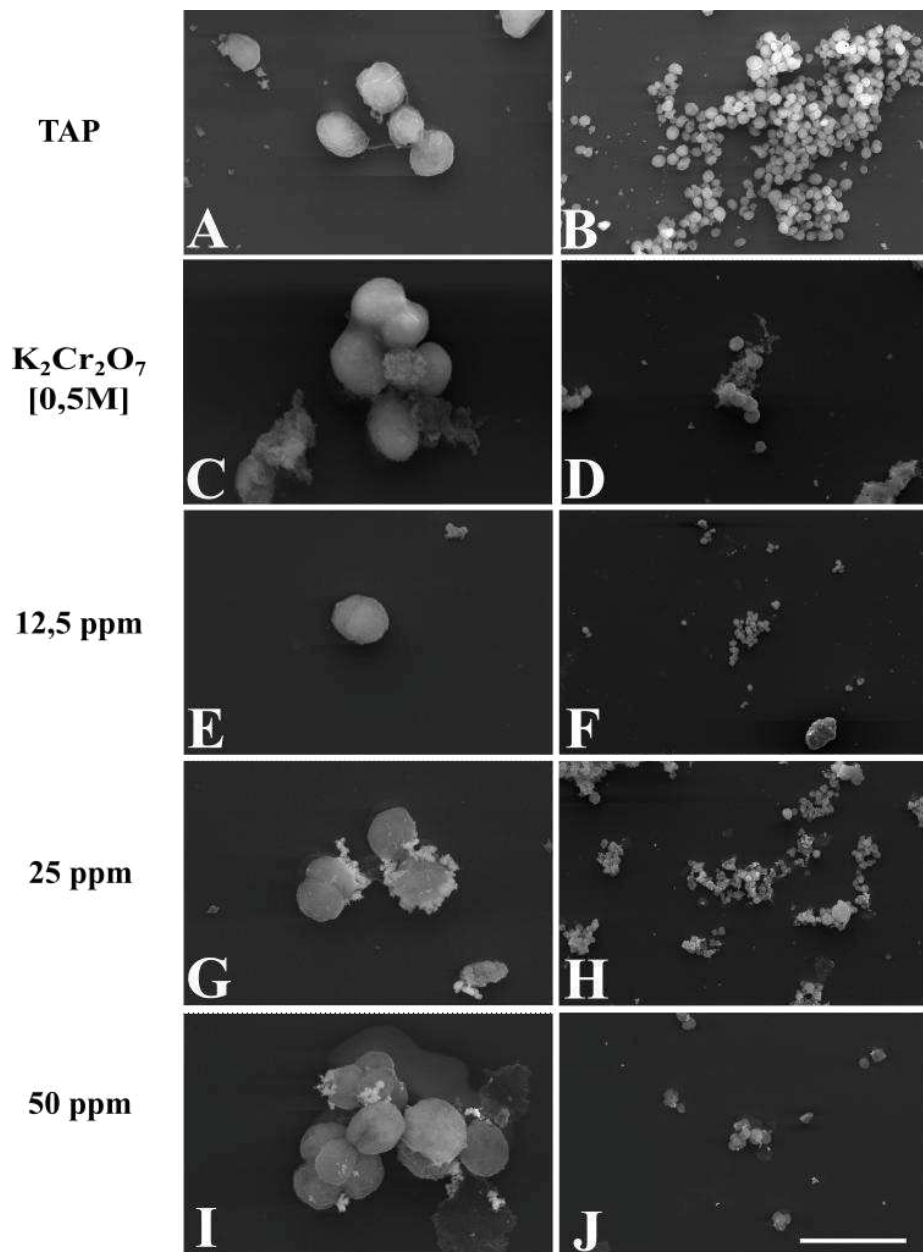
Figura 13 - Imagens de MEV de artemia náuplio II exposta a AgNP (padrão) por 48 horas, Barra: 300 μm .



Fonte: elaborada pela autora.

As imagens de varredura, não evidenciaram diferenças estruturais aparentes, os indivíduos correspondem ao desenvolvimento esperado para 48 horas de desenvolvimento, exceto o controle positivo que se manteve com as características do início do experimento. Os modelos se assemelham ao controle negativo, (fig.13 A e B), apresentando apêndices, antenas e abdome bem visível e desenvolvido, contudo é possível se comparar que os indivíduos expostos a 12,5 ppm apresentam um tamanho menor do abdome quando comparados com o controle negativo e as demais concentrações de exposição da AgNP, (fig.13 E).

Figura 14 - Imagens de MEV *Chlamydomonas reinhardtii* exposta a AgNP por 72 horas, magnificação de 10 000 e 30000 kV, Barra: 300 μ m.



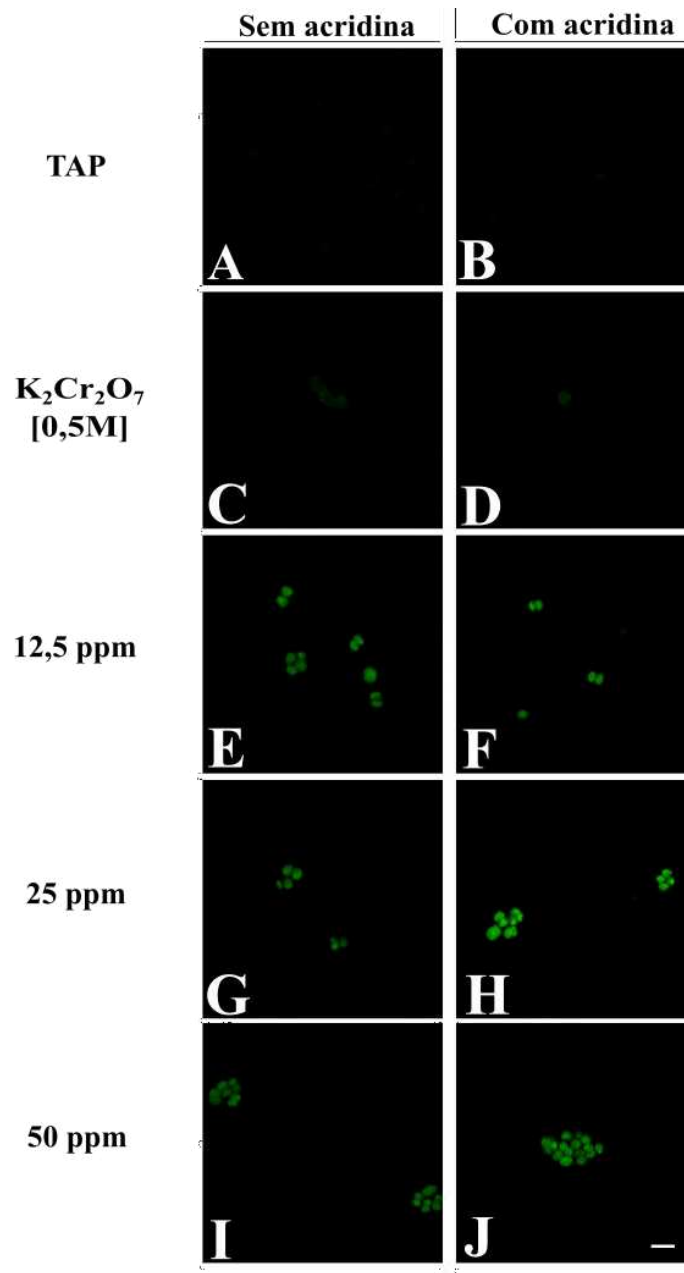
Fonte: elaborada pela autora.

As *Chlamydomonas reinhardtii*, expostas apenas ao meio TAP homemade, (fig.14 A e B), demonstraram alteração superficial, é perceptível o enrugamento do envoltório da microalga, as mesmas quando expostas a dicromato de potássio desenvolvem uma camada de revestimento externo, além de apresentar, ter uma superfície menos enrugada que o controle com AMA, (fig.14 C e D). É possível se notar no controle com dicromato de potássio a presença de células com o revestimento externo rompido e com seu conteúdo interno extravasado.

Nas três concentrações, (fig.14 E, F, G, H, I e J), a microalga aparenta estar entre os controles no que desrespeita ao dano superficial, com a notável presença de agregados externos ao entorno das clamidomonas.

4.8 Microscopia de feixe confocal

Figura 15 – Imagens de microscopia confocal de *Chlamydomonas reinhardtii* previamente expostas por 72 horas a AgNP, com e sem tratamento para microscopia (laranja de acridina), Barra 50: μm .



Fonte: elaborada pela autora.

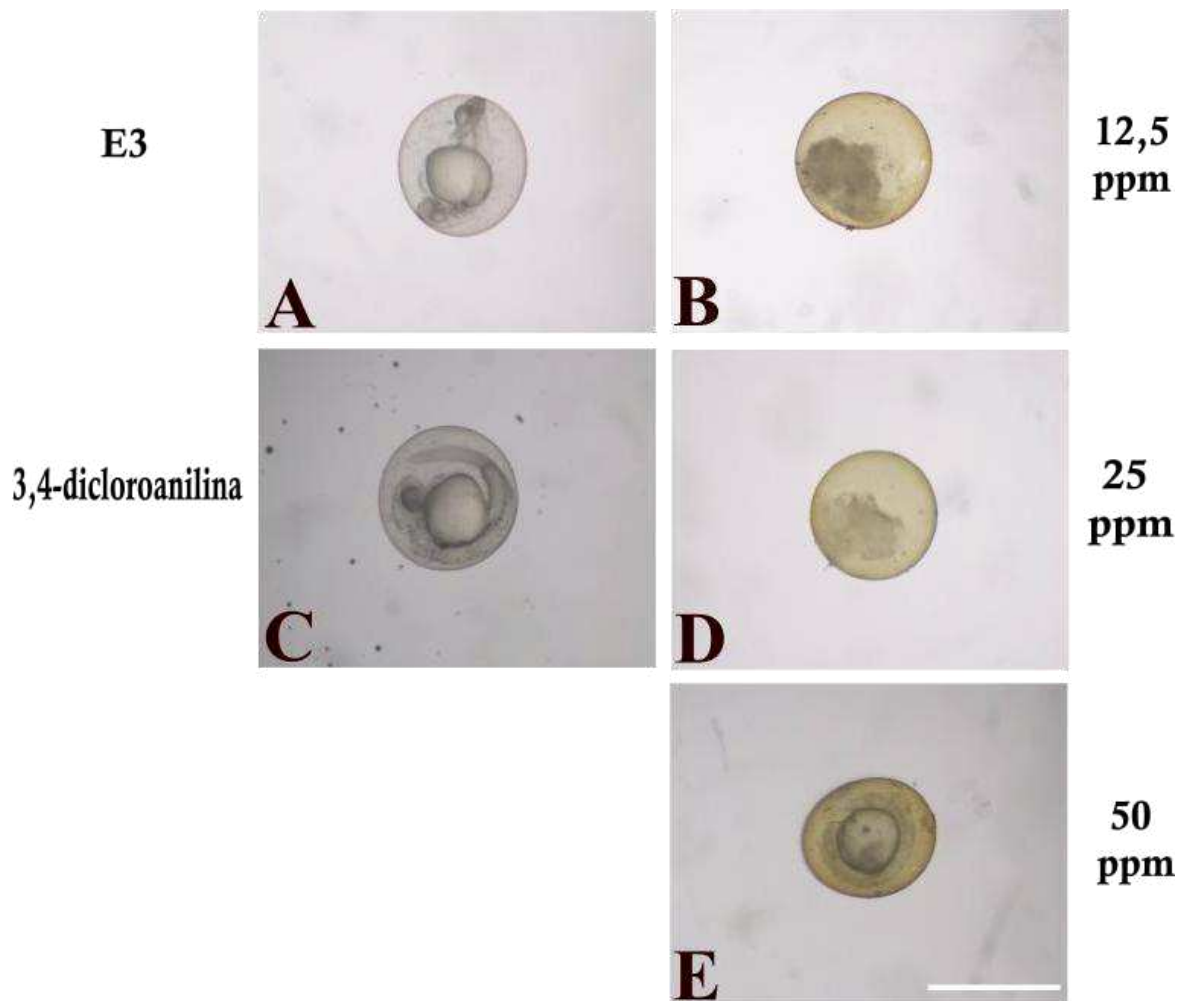
As respostas da *Chlamydomonas reinhardtii*, com e sem laranja de acridina foram muito similares independente da amostra analisada, apresentando apenas um brilho levemente mais acentuado quando utilizado a laranja de acridina, (fig.15 B, D, F, H e J).

O controle positivo apresenta menor sinal de fluorescência, (fig. 15 A e B), concentrada em pequenos pontos, já o controle negativo, (fig.15 C e D), quase não apresenta amostra e a perfeição da fluorescência também é fraca.

Nas amostras expostas a AgNP é possível se notar uma fluorescência mais intensa e um processo de agregação, sendo que em 12,5 ppm tem-se um número de agregados em cada unidade menor, (fig.15 E e F), essa quantidade parece aumentar de acordo com o aumento da concentração de AgNP, com 50 ppm apresentando os maiores agregados com maior número de unidades por agregado, (fig.15 J).

4.9 Microscopia ótica de FET

Figura 16 – Embriões de *Danio rerio*, exposto a concentrações de AgNP (12,5, 25,50) por 24 horas, Barra: 300 μm .



Fonte: elaborada pela autora.

Ambos os controles se assemelham no desenvolvimento do embrião, dentro do saco embrionário é possível identificar o embrião já com características correspondentes a 24 horas de desenvolvimento como olhos, (fig.16 A e C), desprendimento de cauda, batimento cardíaco e movimentação dentro do saco embrionário. Diferente dos embriões expostos a AgNP, 12,5 e 25 ppm, (fig.16 B e D), apresentam coloração amarelada e estão completamente coagulados, tendo apenas uma massa celular dentro do saco embrionário, em 50 ppm é

possível se notar o início do desenvolvimento do embrião. O embrião, contudo, não está com vida, detém uma cor amarelada e o saco vitelínico apresenta escurecimento compatível com a decomposição do embrião morto, (fig16. E).

Os índices de mortalidade em todas as triplicatas do experimento foram próximos ou iguais a 100% nas placas expostas as concentrações de prata, na segunda triplicata também foi possível notar alguns embriões iniciando o desenvolvimento como o observado em 50 ppm na placa de 25 ppm, (fig.16 D e E), contudo, já mortos em 24 horas novamente. Os índices de mortalidade e deformação analisados nos controles foram dentro do esperado, 100% dos indivíduos expostos apenas a água reconstituída sobreviveu em todas as triplicatas; a média de mortos do pesticida 3,4 – dicloranilina também é de 100% nas primeiras 24 horas.

Devido ao índice de 100% de mortes dos embriões nas primeiras 24 horas de experimento, as análises só se seguiram por 24 horas e apenas as imagens de 24 horas individuais foram captadas.

5 DISCUSSÃO

5.1 Reatividade de AgNP

A síntese da AgNP utilizada consistiu em uma abordagem bottom-up, o aquecimento catalisa a reação endotérmica de síntese das AgNPs partir do nitrato de prata, liberando Ag^+ , o citrato adicionado age como agente redutor, doando elétrons para o Ag^+ gerando Ag^0 , o que também estabiliza a nanopartícula, que tem a tendência de se agrupar, a arabinose funciona de forma similar agindo tanto como agente redutor quanto como estabilizante da partícula. A estabilização da nanopartícula consiste em uma camada externa carregada que repele as partículas entre si e impede seu crescimento (Bruna et al., 2021; Kahrilas et al., 2014; Lok et al., 2007).

A toxicidade da AgNP sintetizada se dá, pela quebra dessa estabilidade, entre o Ag^0 e o citrato e a arabinose adsorvidos na camada externa das nanopartículas, substâncias externas que interajam de forma mais forte com Ag^0 ou que removam a camada externa de estabilizantes, retornando Ag^0 a Ag^+ , que disperso no meio pode interagir com estruturas externas ou formar prata metálica e se agregar (Bélteky et al., 2019; El Badawy et al., 2012; Palácio et al., 2021; Shrestha; Wang; Dutta, 2020).

O que pode ser observado quando a AgNP entra em contato com a água do mar artificial é que as partículas sofrem um processo de diminuição da repulsão eletrostática pelo aumento da força iônica no meio, ou seja os íons do sal interagindo com a camada externa da AgNP, debilitando sua camada externa diminuindo o efeito da repulsão entre as partículas, ou seja a camada externa se fragiliza, mas se mantém, o processo não destrói por completo a ligação entre o revestimento estabilizante e a Ag^0 interna, ele apenas permite a aproximação entre os núcleos de prata e a fusão entre as partículas, gerando apenas uma molécula maior com o mesmo núcleo e revestimento.

O agregado observado é de coloração escura e não branca, o que demonstrara ser um indicador de prata metálica e não cloreto de prata (AgCl), composto que tem coloração branca (Lodeiro et al., 2018; Shrestha; Wang; Dutta, 2020). Contudo o processo reativo gerado na nanopartícula indica um processo de capitalização, possivelmente gerado pelo cloreto de sódio no meio (Sendra et al., 2017).

A nanopartícula de prata agregada se torna menos tóxica que a AgNP dispersa no meio, devido ao tamanho e a possibilidade de interação do Ag⁰ interno, quanto maior a superfície de interação entre a AgNP maior a dispersão de Ag⁺ no meio, nesse caso a nanopartícula mesmo tendo menor tamanho quando comparado com o agregado gerado no meio salobro ainda é mais tóxica por permite melhor interação entre a partícula e o alvo da (Beer et al., 2012; Römer et al., 2011).

5.2 Ingestão e digestão em *Artemia salina*

As *Artemias salinas* são microcrustáceos móveis, que em geral se alimentam do que conseguem filtrar na coluna de água, sendo considerados filtradores não seletivos, não sendo de hábito desse tipo de animal procurar por alimento no assoalho, seja do seu ambiente nativo ou de recipientes de teste (Gorham et al., 2014; Rajabi et al., 2015). No estágio de náuplio II quando há o início da ingestão de partículas para a alimentação, o consumo da artemia é limitado a partículas até 30 micrômetros (Contino et al., 2023) agregados maiores que isso não seriam internalizados pela artemia, sendo o tamanho medio esperado da nanopartícula não agregada no meio de 67 nm de acordo com (Mallmann, 2016).

Nas pranchas de microscopia ótica, é possível observar que há a ingestão desses agregados, demonstrando que os mesmos deveriam ter menos de 30 micrômetros e estarem disponíveis no meio. Demais os agregados não aparentam estar presos no trato digestivo, podendo fazer parte do processo de digestão das artemias.

5.3 AgNP em meio TAP homemade

O meio TAP (Tris-Acetato-Phosfato), empregado no experimento de exposição das *Chlamydomonas reinhardtii* a AgNP, diferente do encontrado na solução de Red Sea Salt, apresenta a presença em solução de Tris 1 M, um tampão que neutraliza os íons ácidos que podem vir a se formar no meio e ir a interagir com a camada externa da AgNP, proporcionando estabilidade da partícula por mais tempo no meio evitando o processo de agregação. Contudo o tempo de interação da AgNP e a exposição a luz, favorecem que haja a produção de íons que interajam com a camada externa da nanopartícula (Dupuis; Merchant,

2023; Hanikenne, 2003).

5.4 Resposta da *Chlamydomonas reinhardtii* a toxicidade de AgNP

As *Chlamydomonas reinhardtii* são microalgas fotossintetizantes altamente resistentes a contaminantes no ambiente, podendo se adaptar a poluentes (Dupuis; Merchant, 2023). Sua parede celular quando comparada com outras espécies como a Clorela, permitindo mais facilmente a entrada e acúmulo de partículas internamente.

Estudos indicam que em meios considerados “água doce”, há uma maior biodisponibilidade dos íons de Ag^+ , representando que o complexo da AgNP se mantém estável até interagir com um organismo externo, tendo uma menor taxa de interação diretamente com os componentes presente no meio, tornando a formação de colóides mais lenta e permitindo que as formas mais reativas interagem diretamente com organismos (Kent; Vikesland, 2012; Oukarroum et al., 2012; Sendra et al., 2017).

O processo observado nas amostras expostas a AgNP foi uma adaptação e defesa ao microcontaminante externo, havendo uma queda no número de indivíduos e diminuição no tamanho das células. Sendo perceptível a formação de microcolônias palmeloides (Cheloni; Slaveykova, 2021) fase caracterizada pela visível agregação das unidades celulares, descrita pelo processo de divisão celular, em que a célula gerada se mantém presas em uma mucilagem, secretada como forma de defesa, não sendo capaz de haver a separação da parede celular individual, também é notável que essas algas agregadas não desenvolvem flagelo (Rosowski, 2003).

Ademais a toxicidade esperada a AgNP causada pelos íons Ag^+ , os agregados de prata que se acumulam pelo ambiente representam um estresse físico as microalgas. Os agregados escuros visivelmente se acomodam no exterior das células, representando uma barreira física para a captação de luz, o que reduz a capacidade de fotossíntese e produção de energia.

Essas agregações no exterior da célula podem estar sendo catalisada, devido ao mecanismo de resposta ao estresse dos íons Ag^+ , a liberação da camada polimérica promove uma barreira física entre os agregados e as AgNP no meio e as microalgas, visando evitar o contato e diminuir os danos causados pela sua interação com a membrana citoplasmática, além

de tentar evitar a entrada da prata no lúmen das algas, essa camada apresenta características “pegajosas”, o que propicia o alojamento dos agregados (Cheloni; Slaveykova, 2021; Dupuis; Merchant, 2023; Hanikenne, 2003).

5.5 Estabilidade de AgNP no meio E3 e ação nos embriões de *Danio rerio*

Nesse modelo dois componentes foram essenciais para que não se observasse um relevante processo de agregação no meio.

Primeiramente a composição do meio, durante sua síntese os compostos seguem uma ordem de adição e reação, primeiramente é adicionado NaHCO_3 a água destilada, seguindo da adição de MgSO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e KCL , a mistura desses componentes em água destilada corrigido para pH 7,3, não libera no meio uma grande quantidade de íons capazes de perturbar a estabilidade da camada externa da nanopartícula de forma a promover uma rápida agregação (OECD, 2025; Polaka et al., 2022; Yoo et al., 2016).

Em vista disso é esperado uma agregação moderada, pela oxidação natural da partícula e por sua reação a luz, já que as placas com os embriões são expostas a períodos de luz referentes ao ciclo (Bélteky et al., 2019; El Badawy et al., 2012; Shrestha; Wang; Dutta, 2020).

Outro especto, é que devido a maior vulnerabilidade do embrião de *Danio rerio*, o experimento alcançou média de mortalidade igual a 100% dos indivíduos nas primeiras 24 horas de exposição, sendo feito as demais triplicatas mais parando novamente nesse período (Padilla; Glaberman, 2020; Polaka et al., 2022).

Diferente do que da *Chlamydomonas reinhardtii*, os embriões de *Danio rerio*, não apresentam uma segunda camada de defesa física (parede e membrana celular) nem resposta ativa a contaminantes externos como o caso da produção de secreções que ocorre na microalga (Dupuis; Merchant, 2023; Harris, 2026). A barreira física presente é apenas o corium, que ao interagir diretamente com a nanopartículas de prata promove a liberação de Ag^+ , devido a afinidade aos grupamentos ricos em enxofre presente nas proteínas de membrana e enzimas, esse processo favorece a lise celular, permitindo não apenas a morte celular, mas a entrada de Ag^+ , que reage com os componentes internos (Yoo et al., 2016).

A destruição de células do corium permite que a as nanopartículas a cessem com

mais facilidade o espaço pré-vitelínico até chegar na membrana vitelínica do embrião, realizando ação semelhante a ocorrida no corium (Padilla; Glaberman, 2020; Polaka et al., 2022).

Pode-se notar nas imagens B e D (fig.16) que as células correspondentes ao embrião no interior do corium estão desformes sinalizando problemas na divisão celular e até extravasamento das células, além do escurecimento das células imagem D e E (fig.13), evidenciando o início do processo de decomposição.

A coloração amarelada evidencia a entrada da nanopartícula no meio vitelínico, e a presença do desenvolvimento de algumas estruturas em alguns embriões, como pode ser notado na imagem E, demonstra que o processo de entrada leva um certo tempo para chegar a afetar o embrião.

O estágio visualizado corresponde a um embrião com desenvolvimento entre 14 à 16 horas, o que demonstra que a AgNP pode levar esse tempo para vir a matar efetivamente o embrião independente da concentração, em vista que nas demais triplicatas, esse mesmo tipo de embrião no mesmo estágio de desenvolvimento também foi encontrado nas demais concentrações.

5.6 Inserção de AgNP na cadeia trófica

A tendência já observada das nanopartículas de prata (AgNP), é causar a morte em organismos mais vulneráveis como visto nos embriões de *Danio rerio*, a lenta acumulação em organismos resistentes como o caso da *Chlamydomonas reinhardtii*, que desenvolveu um envoltório para se proteger e se adaptar a AgNP, contudo ainda é observável a presença de agregados escuros dentro ou próximo as células, ou o consumo dos agregados notado no trato digestivo das *Artemia salina*.

Independente do organismo se mostrar resistente ou não, esses organismos se encontram como mecanismo de transporte da nanopartícula, dentro da cadeia trófica aquática, em vista que todos eles são considerados organismos bases na cadeia alimentar (Banaee et al., 2024; Saidon et al., 2024).

A presença da acumulação dessa partícula metálica em organismos basais representa um potencial de biomagnificação perigoso, em vista que a tendência de acumulação em

consumidores mais complexos na cadeia alimentar tende a chegar diretamente no ser humano (Saidon et al., 2024).

O acúmulo de metais pesados em organismos marinhos já é uma questão ambiental conhecida, contudo a exploração do uso e comercialização de nanopartículas metálicas pode vir a trazer um novo perigo ambiental, com tendências reais de escalonamento por via de biomagnificação e vir a se tornar um futuro problema que afete a saúde pública e a segurança sanitária dos alimentos advindos do meio aquático.

6 CONCLUSÃO

As nanopartículas de prata (AgNP) é uma nanopartícula que apresenta toxicidade diretamente relacionada a sua estabilidade, meios salinos propiciam a formação de agregados, diminuindo área de contato do íon Ag^+ , o que torna os agregados menos tóxicos, como visto no modelo de *Artemia salina*, que mesmo com a ingestão dos coloides não apresentaram mortes significativas, já meios considerados “água doce”, sem a presença de íons que perturbe a camada de estabilização da nanopartícula, propiciam a interações nocivas de AgNP para com os modelos, como visto nas *Chlamydomonas reinhardtii*, que responderam ao estresse ambiental gerado pela partícula com a formação de colônias palmeloides, e em embriões de *Danio rerio* que se mostraram totalmente vulneráveis, com 100% de mortes em todas as concentrações testadas, mesmo não apresentando toxicidade o teste de passagem de nível trófico demonstrou que AgNP, é capaz de entrar na cadeia trófica como foi visto da *Chlamydomonas reinhardtii* para *Artemia salina*.

REFERÊNCIAS

- ADEYEMI, Jerry O.; FAWOLE, Olaniyi A. Metal-Based Nanoparticles in Food Packaging and Coating Technologies: A Review. **Biomolecules**, [s. l.], v. 13, n. 7, 1 jul. 2023.
- AGREDO-GOMEZ, A. D. *et al.* Use of ZnO nanoparticles as a pesticide: In vitro evaluation of their effect on the phytophagous *Puto barberi* (mealybug). **Nano-Structures and Nano-Objects**, [s. l.], v. 37, 2024.
- ALTAMMAR, Khadijah A. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], 2023.
- BANAEE, Mahdi *et al.* Assessing Metal Toxicity on Crustaceans in Aquatic Ecosystems: A Comprehensive Review. **Biological Trace Element Research**, [s. l.], 1 dez. 2024.
- BEER, Christiane *et al.* Toxicity of silver nanoparticles-Nanoparticle or silver ion? **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 208, n. 3, p. 286–292, 5 fev. 2012.
- BÉLTEKY, Péter *et al.* Silver nanoparticles: Aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 14, p. 667–687, 2019.
- BÉLTEKY, Péter *et al.* Are smaller nanoparticles always better? Understanding the biological effect of size-dependent silver nanoparticle aggregation under biorelevant conditions. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 16, p. 3021–3040, 2021.
- BRUNA, Tamara *et al.* Silver nanoparticles and their antibacterial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], 1 jul. 2021.
- CHELONI, Giulia; SLAVEYKOVA, Vera I. Morphological plasticity in *Chlamydomonas reinhardtii* and acclimation to micropollutant stress. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 231, 1 fev. 2021.
- CHEN, Jian *et al.* Emerging Nanoparticles in Food: Sources, Application, and Safety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], 1 mar. 2023.
- COLMAN, Benjamin P. *et al.* Emerging contaminant or an old toxin in disguise? Silver nanoparticle impacts on ecosystems. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 48, n. 9, p. 5229–5236, 2014.
- CONTINO, Martina *et al.* Sublethal Effects of Polystyrene Nanoplastics on the Embryonic Development of *Artemia salina* (Linnaeus, 1758). **Animals**, [s. l.], v. 13, n. 19, 1 out. 2023.
- CROSS, Frederick R.; UMEN, James G. The *Chlamydomonas* cell cycle. **Plant Journal**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 370–392, 1 maio 2015.
- PINHEIRO, Sergimar K. *et al.* Toxic effects of silver nanoparticles on the germination and root development of lettuce (*Lactuca sativa*). **Australian Journal of Botany**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 127–136, 1 jun. 2020.
- PINHEIRO, Sergimar K. *et al.* Acute toxicity of titanium dioxide microparticles in *Artemia* sp. nauplii instar I and II. **Microscopy Research and Technique**, [s. l.], 1 jun. 2023.

DUPUIS, Sunnyjoy; MERCHANT, Sabeeha S. *Chlamydomonas reinhardtii*: a model for photosynthesis and so much more. **Nature Methods**, [s. l.], 1 out. 2023.

EL BADAUWY, Amro M. *et al.* The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 429, p. 325–331, 1 jul. 2012.

ELSAESSER, Andreas; HOWARD, C. Vyvyan. Toxicology of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 129–137, 2012.

ESSGHAIER, Badiia. Silver nanoparticles for pharmaceutical and biomedical applications drug delivery. *In: Silver Nanoparticles for Drug Delivery*. [S. l.: s. n.], 2024. p. 89–107.

GAVIM, Anderson E. X. *et al.* Ag Nanoparticle Layer on PEDOT:PSS with Optimized Energy Levels for Improving PM6:Y6-Based Organic Photovoltaics. **ACS Omega**, [s. l.], v. 10, n. 33, p. 37664–37673, 26 ago. 2025.

GORHAM, Justin M. *et al.* Storage wars: How citrate-capped silver nanoparticle suspensions are affected by not-so-trivial decisions. **Journal of Nanoparticle Research**, [s. l.], v. 16, n. 4, 2014.

GORMAN, D. S.; LEVINE, R. P. TAP and Tris-minimal medium. [S. l.: s. n.], [19--].
GORMAN, Donald S.; LEVINE, R. P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, [s. l.], 1965. Disponível em: <https://www.pnas.org>. Acesso em: [inserir data].

HANIKENNE, M. *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. **New Phytologist**, [s. l.], 1 ago. 2003.

HARAOKA, Yukinari *et al.* Zebrafish imaging reveals TP53 mutation switching oncogene-induced senescence from suppressor to driver in primary tumorigenesis. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2022.

HARRIS, Elizabeth H. **The Chlamydomonas Sourcebook**. [S. l.]: Academic Press, 2009. (ou conforme a edição citada).

HASS WAKAMATSU, Mitzi; SALOMÃO, Rafael. **Nanopartículas cerâmicas: propriedades, aplicações e implicações**. [S. l.: s. n.], [20--].

HOLMANNOVA, Drahomira *et al.* Carbon Nanoparticles and Their Biomedical Applications. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 12, 1 ago. 2022.

JANGID, Himanshu *et al.* Advancing biomedical applications: an in-depth analysis of silver nanoparticles in antimicrobial, anticancer, and wound healing roles. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], 2024.

JOSEPH, Tomy M. *et al.* Nanoparticles: Taking a Unique Position in Medicine. **Nanomaterials**, [s. l.], 1 fev. 2023.

KAHRILAS, Genevieve A. *et al.* Investigation of antibacterial activity by silver nanoparticles prepared by microwave-assisted green syntheses with soluble starch, dextrose, and arabinose.

- KARATAŞ, Hasan *et al.* Silver Nanoparticles in Antibacterial Research: Mechanisms, Applications, and Emerging Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 927, 16 jan. 2026.
- KARNOVSKY, Morris John. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], 1965.
- KAUSHAL, Ashutosh *et al.* Advances in therapeutic applications of silver nanoparticles. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], 1 set. 2023.
- KENT, Ronald D.; VIKESLAND, Peter J. Controlled evaluation of silver nanoparticle dissolution using atomic force microscopy. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 46, n. 13, p. 6977–6984, 3 jul. 2012.
- KOLAROVA, Nikola; NAPIÓRKOWSKI, Paweł. Trace elements in aquatic environment: Origin, distribution, assessment and toxicity effect for the aquatic biota. **Ecohydrology & Hydrobiology**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 655–668, 1 out. 2021.
- KUMAR, Pawan; GUPTA, Himanshu; DHIMAN, Soniya. Biomarkers for the detection of water pollution in rivers. *In: Biomarkers in Environmental and Human Health*. [S. l.]: Springer, 2024. p. 1–21.
- LODEIRO, Pablo *et al.* Effect of polymer coating composition on the aggregation rates of Ag nanoparticles in NaCl solutions and seawaters. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 631–632, p. 1153–1162, 1 ago. 2018.
- LOK, Chun Nam *et al.* Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 527–534, maio 2007.
- LÓPEZ-PEDROUSO, María *et al.* Finding Biomarkers in Antioxidant Molecular Mechanisms for Ensuring Food Safety of Bivalves Threatened by Marine Pollution. **Antioxidants**, [s. l.], 1 fev. 2022.
- MALLMANN, J. J. Eduardo. **Green sintetise of silver nanoparticle trough reducing sugar**. Fortaleza: [s. n.], [20--].
- MAT LAZIM, Zainab *et al.* Distribution of Silver (Ag) and Silver Nanoparticles (AgNPs) in Aquatic Environment. **Water**, [s. l.], v. 15, n. 7, 1 abr. 2023.
- MIGUEL, Thaiz Batista A. R. *et al.* Toxic effect of plasma and ultrasound activated cashew apple juice in *Artemia salina* nauplii. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 53, 2023.
- MIGUEL, Thaiz Batista A. R. *et al.* Evaluating the Toxicity of Cold Plasma-Treated Cashew Apple Juice. **ACS Food Science and Technology**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 3716–3725, 17 out. 2025.
- MISHRA, Kirti *et al.* Hybrid Semiconductor Photocatalyst Nanomaterials for Energy and Environmental Applications: Fundamentals, Designing, and Prospects. **Advanced Sustainable Systems**, [s. l.], 1 ago. 2023.
- MOURDIKOU DIS, Stefanos; PALLARES, Roger M.; THANH, Nguyen T. K.

Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**, [s. l.], v. 10, n. 27, p. 12871–12934, 2018.

NAGARANI, N. *et al.* Biomarkers as ecological indices in monitoring the status of market fish. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, [s. l.], v. 84, n. 1, 10 jan. 2023.

NAM, Dong Ha *et al.* Uptake and bioaccumulation of titanium- and silver-nanoparticles in aquatic ecosystems. **Molecular and Cellular Toxicology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 9–17, 2014.

NEMMAR, Abderrahim *et al.* Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: A review of the in vivo and in vitro studies. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2013, 2013.

NOGA, Maciej *et al.* Toxicological Aspects, Safety Assessment, and Green Toxicology of Silver Nanoparticles (AgNPs)—Critical Review: State of the Art. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], 1 mar. 2023.

OECD. **Test No. 202**: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. Paris: OECD Publishing, 2004. Disponível em: <https://www.oecd.org>. Acesso em: 22 fev. 2026.

OUKARROUM, Abdallah *et al.* Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 78, p. 80–85, 1 abr. 2012.

PADILLA, Stephanie; GLABERMAN, Scott. The zebrafish (*Danio rerio*) model in toxicity testing. *In: An Introduction to Interdisciplinary Toxicology*. [S. l.]: Academic Press, 2020. p. 525–532.

PALÁCIO, Soraya Moreno *et al.* Silver nanoparticles effect on *Artemia salina* and *Allium cepa* organisms: influence of test dilution solutions on toxicity and particles aggregation. **Ecotoxicology**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 836–850, 2021.

POLAKA, Suryanarayana *et al.* Zebrafish models for toxicological screening. *In: Pharmacokinetics and Toxicokinetic Considerations*. [S. l.]: Academic Press, 2022. v. 2, p. 221–240.

PONTES, Montcharles S. *et al.* In vitro and in vivo impact assessment of eco-designed CuO nanoparticles on non-target aquatic photoautotrophic organisms. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 396, 5 set. 2020.

RAJABI, Somayeh *et al.* *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1–6, 2015.

RAMZAN, Uzma *et al.* New Insights for Exploring the Risks of Bioaccumulation, Molecular Mechanisms, and Cellular Toxicities of AgNPs in Aquatic Ecosystem. **Water**, [s. l.], 1 jul. 2022.

RÖMER, Isabella *et al.* Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1218, n. 27, p. 4226–4233, 8 jul. 2011.

ROSOWSKI, James R. Photosynthetic Euglenoids. *In: Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. [S. l.]: Academic Press, 2003. p. 383–422.

SAIDON, Nadhirah B. *et al.* Trophic transfer and biomagnification potential of environmental contaminants (heavy metals) in aquatic ecosystems. **Environmental Pollution**, [s. l.], 1 jan. 2024.

SAJID, Muhammad. Nanomaterials: types, properties, recent advances, and toxicity concerns. **Current Opinion in Environmental Science and Health**, [s. l.], 1 fev. 2022.

SATI, Abhinav *et al.* Silver Nanoparticles (AgNPs): Comprehensive Insights into Bio/Synthesis, Key Influencing Factors, Multifaceted Applications, and Toxicity—A 2024 Update. **ACS Omega**, [s. l.], 4 mar. 2025.

SENDRA, M. *et al.* Direct and indirect effects of silver nanoparticles on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricornutum*). **Chemosphere**, [s. l.], v. 179, p. 279–289, 2017.

SHRESTHA, Sweta; WANG, Bo; DUTTA, Prabir. Nanoparticle processing: Understanding and controlling aggregation. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], 1 maio 2020.

TIONG, Irene K. R. *et al.* Artemia as a model organism in stress response studies: current progress and future prospects. **Marine Biology**, [s. l.], 1 jan. 2025.

TRAN, Nam Trung; KALDENHOFF, Ralf. Achievements and challenges of genetic engineering of the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Algal Research**, [s. l.], 1 set. 2020.

WEEKS, Donald P. Genetic transformation of *Chlamydomonas* nuclear, chloroplast, and mitochondrial genomes. **The Chlamydomonas Sourcebook**, [s. l.], v. 1, p. 325–343, 1 jan. 2023.

XU, Letao *et al.* Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. **Advanced NanoBiomed Research**, [s. l.], 1 fev. 2022.

YOO, Myung Hoon *et al.* Embryotoxicity and hair cell toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, [s. l.], v. 83, p. 168–174, 1 abr. 2016.

ZAGHLOUL, Alaa *et al.* Biological indicators for pollution detection in terrestrial and aquatic ecosystems. **Bulletin of the National Research Centre**, [s. l.], v. 44, n. 1, dez. 2020.