



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BIANCA VASCONCELOS CORDOBA

ESTUDO DA INTERAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNP) EM
***Artemia* sp. POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA E ÓPTICA**

FORTALEZA
2018

BIANCA VASCONCELOS CORDOBA

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNP) EM
Artemia sp. POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA E ÓPTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade Federal
do Ceará, como um dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Emilio de Castro Miguel

Coorientador: Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro

**FORTALEZA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C816e Cordoba, Bianca Vasconcelos.
Estudo da interação de nanopartículas de prata (AGNP) em *Artemia* sp. por meio de microscopia eletrônica e óptica / Bianca Vasconcelos Cordoba. – 2018.
48 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Emilio de Castro Miguel.
Coorientação: Prof. Me. Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro.
1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas de prata. 3. *Artemia* sp.. 4. Microscopia eletrônica de varredura. 5. Microscopia confocal a laser. I. Título.

CDD 570

BIANCA VASCONCELOS CORDOBA

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNP) EM
Artemia SP. POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA E ÓPTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade Federal
do Ceará, como um dos requisitos para a
obtenção do título de bacharel em Ciências
Biológicas.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emilio de Castro Miguel (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

MSc. Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

MSc. Marlos de Medeiros Chaves
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Dr^a. Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico esse trabalho a minha mãe, pela mulher sonhadora e guerreira que é, incentivando sempre os sonhos de seus filhos, nunca nos deixando esquecer os nossos valores: honestidade, respeito e dignidade.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Regina, por todo o esforço e dedicação na minha criação, sempre colocando meus estudos acima de muitas coisas. Obrigada por entender meus dias ruins e por brigar comigo sempre que eu mereci. Graças a você eu sou o que sou hoje, futura bióloga e com um futuro todo pela frente na área acadêmica. Serei eternamente grata por tudo que fez por mim. Também aos meus irmãos: Jessica, Nathalia e Jefferson, por terem me apoiado quando decidi fazer biologia e terem orgulho de quem eu sou hoje. Obrigada ao meu pai, por sempre ver em mim uma pessoa brilhante e um orgulho para ele.

Ao Prof Dr. Emílio de Castro Miguel, pela orientação, não apenas durante esse trabalho, mas sempre que eu precisava de algo, me escutando em relação a planos futuros e me aconselhando sempre que preciso. Obrigada pela atenção, paciência, profissionalismo e respeito com que sempre me tratou. Sinto muito orgulho em dizer que fui orientada pelo senhor, uma das pessoas mais sensata e inteligente que tive a sorte de conhecer.

À Dra. Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel e ao MSc. Marlos de Medeiros Chaves por terem aceitado, gentilmente, participar da minha banca examinadora. Espero colher boas críticas e sugestões para aperfeiçoar esse trabalho.

Ao MSc. Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro, eu te devo uma cerveja e um pastel, pode ter certeza que pagarei. Indiretamente, você foi o responsável por grande parte desse trabalho, disponibilizando tempo, paciência e experiência sua só para poder me ajudar. Meu muito obrigado você foi um baita de um coorientador.

À toda equipe da Central Analítica da UFC: Emilio Castro Miguel, Rosemeyre Freire, João Victor, Marlos Chaves, Rafael Medeiros e Diego Couceiro.

Ao Ministério da Educação e a todo o grupo do Programa de Educação Tutorial (PET) Biologia/UFC, vocês são a minha família na universidade e fora dela. Grande parte de quem eu sou, aprendi vivendo ao lado desse grupo que sempre levarei na memória. Obrigada a velha e a nova fase do grupo, cada um de vocês foi especial e deixou um pouquinho de vocês em mim, muito obrigada Arthur, Eduardo, Cláudio, Daiane, Ester, Felipe, Jennifer, Kamila, Letícia, Lucas, Álife, Carlito, Marina, Naele, Renata, Tainnara, Tiago Guerra e Loreto, Vanessa Ariane e Alves, Elivânia, Victória, Ana Karolina, Breno (morro de saudades suas), bem como agradecer às professoras Maria Izabel e Erika Mota.

Aos meus amigos da geografia/agronomia/estatística que sempre se fizeram presentes em momentos de grande estresse meu, conversando e filosofando sobre a vida na praça da Milton, vou sentir saudades desses momentos.

Quero agradecer muito ao meu grupo Anbicagajere, meninas, vocês foram a minha força na universidade, nunca se esqueçam disso. À Gabriela Valentim por sempre me acalmar nos momentos mais improváveis e por ser minha amiga sabe tudo de ecologia, um orgulho; Caroliny Soares por ser a garota das bactérias e sempre me ajudar nas disciplinas mais chatas e estressantes; Andréia Campos por ser a pessoa mais relax e zen do mundo inteiro, admiro tua capacidade de não se estressar e tua risada mais gostosa do mundo; Renata Cândido, meu primeiro amor na faculdade, minha primeira amiga de verdade, compartilhamos muitas coisas juntas, muitas brigas também (é difícil lidar com arianos), mas nunca perdendo o respeito e sempre querendo o bem uma da outra; e Jennifer Bruna, a pessoa mais “maldita” (no bom sentido da palavra) que eu conheço, te quero bem sempre, mesmo tu me tirando do sério todos os dias. Aos meus amigos de turma, onde a conexão é tão grande que não lembro quando nem como começamos a nos falar, só aconteceu: Igor Moura, Thabata Cavalcante e Chrislaine Alves. Vocês tornaram o meu caminho acadêmico um lugar melhor. Amo tanto vocês que dói.

Aos meus amigos de outras vidas: Cecílio Neto (cada aventura contigo é incrível); Gustavo Dias, foi com você que eu pude crescer muito como pessoa, aprendi o que era o amor, entendi que cada um tem seu jeito e que as pessoas são únicas e especiais; Gabriela de Sena, minha amiga há mais de dez anos, dividindo a dor e o amor de ser quem eu sou; e a Luanna Rocha, o trevinho que eu vou carregar sempre comigo independente de qualquer coisa, você é luz. Obrigada por estarem presentes em momentos importantes na minha vida, nos piores e melhores.

Por fim, gostaria de agradecer à minha cachorra Valentina, por ser a minha alegria quando eu chego cansada da faculdade, quando fico cansada e triste. Ela, mesmo sem falar, compreende tudo aquilo que eu sinto. E ao cantor Silva, por ser meu refúgio musical quando parecia que nada do que eu fazia dava certo. Encerro meus agradecimentos com um trecho de uma música dele “Tá na chuva pra se molhar e na vida pra se perder. O amor não tem solução, é só viver. Não combina com solidão, tá no mundo pra se espalhar, entre as coisas que fazem bem além de bom, o amor é mais”.

“Nossas lealdades estão com as espécies e com o planeta. Nós falamos pela Terra. Nossa obrigação de sobreviver e florescer pertence, não só a nós mesmos, mas também ao Cosmos, antigo e vasto, do qual surgimos.” - (Carl Sagan, *Cosmos: A Personal Voyage*, 1980)

RESUMO

Levando em conta o avanço da nanotecnologia nas áreas do meio ambiente, biotecnologia e biomedicina, observa-se um crescimento dos estudos relacionados à aplicação desses nanomateriais e as consequências de sua liberação no meio ambiente. O presente estudo procurou mostrar o efeito tóxico de nanopartículas de prata (AgNPs), produzidas pelo Laboratório de Materiais Funcionais Avançados (LAMFA) da UFC, em náuplios de *Artemia* sp., avaliando a taxa de mortalidade, modificações morfológicas, danos celulares e emissão de prata, utilizando-se de ferramentas microscópicas: microscopia de campo claro, microscopia eletrônica de varredura, análise por espectrometria de raios-x por dispersão de energia e microscopia confocal de varredura à laser. As nanopartículas eram de natureza esférica e com tamanho médio de 15nm. Os cistos de artemia foram eclodidos em água marinha e postos para tratamento em meio de teste de diferentes concentrações (100ppm; 50ppm; 25ppm e 12,5ppm). O teste foi realizado com artêmias com 2 dias após eclosão e 6 dias após eclosão. Avaliando toxicidade aguda (24 e 48 horas). A agregação de AgNPs na região do intestino de *Artemia* sp. foi estudada usando microscopia de campo claro e o dano celular foi percebido pelas células apoptóticas coradas com laranja de acridina, utilizando-se microscopia confocal de varredura a laser. Alterações morfológicas foram observados por microscopia eletrônica de varredura. Este estudo mostrou que a concentração de 12,5ppm foi suficiente para sensibilizar o animal, sendo letal e causando alterações significativas no corpo e células do mesmo. Além disso, mostrou a agregação de AgNPs na região intestinal, as células apoptóticas e alterações morfológicas em todas as concentrações, indo de encontro com estudos já realizados. Assim, este estudo revelou que as concentrações, em partes por milhão, utilizadas de AgNPs têm efeito tóxico em *Artemia* sp. resultando em altas taxas de mortalidade e danos significativos no animal.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Nanopartículas de prata; *Artemia* sp.; Microscopia eletrônica de varredura; Microscopia confocal a laser; Nanotoxicologia

ABSTRACT

Taking into account the advancement of nanotechnology in the areas of environment, biotechnology and biomedicine, there is an increase in the studies related to the application of these nanomaterials and the consequences of their release into the environment. The present study aimed to show the toxic effect of silver nanoparticles (AgNPs), produced by the Laboratório de Materiais Funcionais Avançados (LAMFA) of the UFC, in nauplii of *Artemia* sp., Evaluating the mortality rate, morphological changes, cellular damage and emission of silver using microscopic tools: light field microscopy, scanning electron microscopy, energy dispersive x-ray spectrometry and confocal scanning laser microscopy. The nanoparticles were spherical in nature and had an average size of 15nm. Artemia cysts were hatched in seawater and placed in a test medium of different concentrations (100ppm, 50ppm, 25ppm and 12.5ppm) for treatment. The test was performed with artemia 2 days after hatching and 6 days after hatching. Assessing acute toxicity (24 and 48 hours). The aggregation of AgNPs in the intestine region of *Artemia* sp. was studied using light field microscopy and cell damage was detected by apoptotic cells stained with acridine orange using laser scanning confocal microscopy. Morphological changes were observed by scanning electron microscopy. This study showed that the concentration of 12.5 ppm was sufficient to sensitize the animal, being lethal and causing significant changes in the body and cells of the same. In addition, it showed aggregation of AgNPs in the intestinal region, apoptotic cells and morphological alterations at all concentrations, going against previous studies. That way, this study has shown that the concentrations, in parts per million, of AgNPs have a toxic effect on *Artemia* sp. resulting in high mortality rates and significant animal damage.

Key-words: Nanotechnology; Silver nanoparticles; *Artemia* sp.; Scanning electron microscopy; Laser Confocal Microscopy; Nanotoxicology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura (B) e gráfico semiquantitativo de elementos, elaborado por EDS da AgNP do trabalho 24
- Figura 2 - Microscopia de campo claro, microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos em *Artemia* sp 2 dias, submetida ao tratamento com água marinha - controle negativo 31
- Figura 3 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp 2 dias, submetida ao tratamento com ácido nítrico (HNO_3) - controle positivo 32
- Figura 4 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp. 2 dias, submetida ao tratamento de 100ppm..... 33
- Figura 5 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp. 2 dias, submetida ao tratamento de 50ppm..... 34
- Figura 6 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp. 2 dias, submetida ao tratamento de 25ppm..... 35
- Figura 7 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp. 2 dias, submetida ao tratamento de 12,5ppm..... 36
- Figura 8 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de

quantificação de elementos em *Artemia* sp 6 dias, submetida ao tratamento com água marinha - controle negativo..... 38

Figura 9 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp 6 dias, submetida ao tratamento com ácido nítrico (HNO₃) - controle positivo..... 39

Figura 10 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp. 6 dias, submetida ao tratamento de 100ppm..... 40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico de barras mostrando os resultados para a taxa de mortalidade (24 e 48 horas) de *Artemia* sp.de 2 dias, tratadas com várias concentrações (ppm) de AgNPs 26

Gráfico 2 - Gráfico de barras mostrando os resultados para a taxa de mortalidade (24 e 48 horas) de *Artemia* sp.de 6 dias tratada com várias concentrações (ppm) de AgNPs 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - O resultado da taxa de mortalidade (24 e 48 horas) de <i>Artemia</i> sp. de 2 dias, tratadas com concentrações (ppm) de nanopartículas de prata	26
Tabela 2 - O resultado da taxa de mortalidade (24 e 48 horas) de <i>Artemia</i> sp. de 6 dias, tratadas com concentrações (ppm) de nanopartículas de prata	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NPs	Nanopartículas
AgNPs	Nanopartículas de prata
PPM	Partes por milhão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
EDS	Espectroscopia por energia dispersiva de raios-X
HMDS	Hexametildisilizano
DP	Desvio padrão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Nanotecnologia	15
1.2 Nanopartículas de prata (AgNPs)	17
1.3 Toxicologia e sistemas biológicos	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Organismo teste: <i>Artemia sp</i>	21
3.2 Meio de teste	21
3.3 Teste de toxicidade: AgNPs com <i>Artemia sp.</i>	21
3.4 Cálculo da taxa de mortalidade	22
3.5 Processamento e análise para microscopia eletrônica de varredura	22
3.6 Microscopia confocal de varredura à laser	23
4. RESULTADOS	24
4.1 Análise da gota de AgNP.....	24
4.2 Taxa de mortalidade <i>Artemia sp.</i>	25
4.3 Variação morfológica de <i>Artemia sp.</i> 2 dias (após tratamento com nanopartículas de prata): microscopia de campo claro, eletrônica de varredura, confocal e análise semiquantitativa de prata	28
4.4 Variação morfológica de <i>Artemia sp.</i> 6 dias (após tratamento com nanopartículas de prata): microscopia de campo claro, eletrônica de varredura, confocal e análise semiquantitativa de prata	37
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	44
7. BIBLIOGRAFIA	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia

Ao par acelerado de descobertas e inovações, combinadas com a natureza interdisciplinar das mesmas, levando ao surgimento de áreas convergentes de conhecimento, capacidade e investimento, tem-se a nanotecnologia como um grande exemplo, já que ela surgiu da confluência de descobertas em física, química, biologia e engenharia por volta dos anos 2000 (ROCO; MIRKIN; HERSAM, 2010). Como nanotecnologia é uma ciência ampla que engloba muitas áreas do conhecimento, a sua definição sofreu alterações ao passar dos anos, a partir das aplicações inerentes a essa ciência. A primeira definição veio em 1999, com a publicação do livro *Nanotechnology Research Directions*, onde postulava que a nanotecnologia é a ciência com a capacidade de controlar e reestruturar a matéria nos níveis atômico e molecular entre 1 nm a 100 nm, além disso, explorar as propriedades e fenômenos eminentes com o objetivo de criar materiais, dispositivos e sistemas com essas propriedades e funções em uma pequena estrutura. Tal tecnologia poderia ser aplicada a diferentes áreas de relevância, como na biomedicina, engenharias e meio ambiente, e podem ser um elo para uma plataforma unificadora da ciência, engenharia e tecnologia em nanoescala (ROCO; WILLIAMS; ALIVISATOS, 1999). Em 2010, o Comitê Técnico 229 sobre nanotecnologias (ISO 2009) pertencente à Organização Internacional de Normalização (ISO) propôs uma definição que possuía os mesmo elementos de 1999, contudo, ainda não há uma aceitação clara e estabelecida sobre a linguagem comum, uso, aplicação e finalidade da nanotecnologia para a sociedade, visto que, algumas vezes esta ciência se apresenta como um paradigma científico e tecnológico fundamentalmente novo (LÖVESTAM *et al.*, 2010).

A nanotecnologia possibilita a construção da matéria em limites não naturais de tamanho, estabelecendo uma escala que permeia o comportamento de um átomo em relação ao material volumoso sólido, estando entre frações de nanômetros, sempre levando em consideração o ajuste em associação com o tamanho, forma e padrão do nanomaterial. Esta capacidade de rearranjar a matéria em nanoescala torna-se um método econômico para agregar funcionalidade a produtos de diferentes áreas, evidenciando assim, uma importância da nanotecnologia (FERREIRA; RANGEL, 2009). Além disso, esse rearranjo permite uma mudança nas propriedades e comportamento do material, tais como - condutibilidade, dureza, magnetismo- características também aproveitadas no desenvolvimento de produtos e dispositivos (MELO; PIMENTA, 2010).

Os nanomateriais, sendo produtos da nanociência, possuem sua própria definição e classificação de acordo a utilidade. Quando um material é colocado abaixo do seu tamanho crítico, onde suas propriedades se manifestam de forma anormal as suas características usuais, pode-se dizer que se tem um nanomaterial. Cada material possui seu tamanho crítico e este se relaciona diferentemente com cada uma das propriedades (ZARBIN, 2007). Dentro desses nanomateriais encontram-se os nanotubos, nanofibras e nanopartículas apresentando uma diversa gama de produção de nanomateriais nas diferentes áreas da ciência. Na indústria de cosméticos, os nanomateriais são utilizados em dermatologia cosmética, filtros solares, nanoemulsões preparadas a partir de nanopartículas, como por exemplo, nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de zinco (ZnO) (MORGANTI, 2010), sendo estas últimas usadas por possuírem sistemas de liberação de substâncias desejadas, como nanocápsulas, nanocristais, lipossomas e niossomas (MU; SPRANDO, 2010). Na área biomédica, há o aparecimento desses materiais na forma de *quantum dots* (QDs) ou pontos quânticos, caracterizados como nanocristais semicondutores coloidais que possuem comportamento de fotoluminescência (ZHANG *et al.*, 2006), sendo aplicados para a rotulagem em células sanguíneas vermelhas com o intuito de investigar a expressão gênica de antígenos (ALBUQUERQUE DE FARIA *et al.*, 2005), estudos de processos intracelulares de receptores relacionados a neurônios vivos e a identificação de linfonodos para o indicação de tumores e diagnósticos (MICHALET *et al.*, 2005). Na área ambiental, possivelmente seja, o ramo onde a nanociência tenha mais aplicações nanotecnológicas, contudo, apresentando o uso mais arbitrário em relação à essa tecnologia. A aplicação pode ser no tratamento ou remediação da poluição do ar, conforme Bhakta *et al.* (2016), que se utilizou de nanocatalisadores para acelerar as reações químicas de gases nocivos, gerados por carros e indústrias, em gases inofensivos, bem como membranas nanoestruturadas capazes de capturar as emissões de gases de efeito estufa causadas pela mineração de carvão e geração de energia em regiões de alto consumo. Bem como a produção de membranas seletivas capazes de filtrar contaminantes, como nanoestruturas que tem o poder de retirar poluentes industriais de efluentes, redução na utilização de matéria e energia pela aplicação de nanomateriais, além de estudos biotecnológicos sobre os efeitos das nanoestruturas no meio ambiente (ALVES, 2010).

Considerando a vasta aplicação desses materiais, deve-se ter cautela quanto a sua liberação no meio ambiente. Devido ao seu tamanho nanométrico, sua dispersão torna-se simples, podendo difundir-se facilmente nos solos, propagar-se pelo ar e até mesmo atingir

células, ocasionando o acúmulo desses elementos em organismos, acarretando em consequências danosas para o meio e indivíduos que nele estão. O resultado desse acúmulo pode se dar ao longo da cadeia alimentar, por adsorção de biomoléculas e como consequência uma interrupção, em organismos vivos, de processos biológicos (QUINA, 2004).

Em tese, não há uma grande quantidade de informações disponíveis sobre a toxicidade, biodegradação e acúmulo desses nanomateriais, evidenciando assim a importância de estudos nessa área em progresso.

1.2 Nanopartículas de Prata (AgNPs)

Segundo Poole Jr. e Owens (2003), por definição, as nanopartículas (NPs) podem ser caracterizadas como a composição de átomos ou moléculas que tenham um raio de tamanho entre 1 a 100 nanômetros, apresentando propriedades distintas daquelas do seu material de origem. Estas nanopartículas podem derivar de diferentes materiais, dando origem a NPs metálicas, NPs magnéticas, NPs coloidais, NPs semicondutoras, *quantum dots*, onde dependendo do material utilizado há métodos específicos de síntese.

As nanopartículas de prata (AgNPs), compostos formados pela redução de íons Ag^+ , tem chamado muito atenção pelas suas propriedades químicas, ópticas e elétricas aplicadas a nanotecnologia (BOLZAN *et al.*, 2015). As AgNPs são utilizadas em estudos antimicrobianos (DURÁN, 2010; LARA *et al.*, 2010; RADZIG *et al.*, 2013; ZHANG; SMITH; OYANEDEL-CRAVER, 2012), finalidades biomédicas (ALARCON *et al.*, 2016; MURPHY *et al.*, 2015; SAMBERG; OLDENBURG; MONTEIRO-RIVIERE, 2009) e em processos de melhoria em efeitos elétricos e ópticos (CHAPMAN; MULVANEY, 2001; GREER; STREET, 2007; ZOU; SCHATZ, 2005;). Nanopartículas de prata, por possuírem um alto efeito tóxico, atuando como produto antimicrobiano, são muito utilizadas em produtos comerciais (BEER *et al.*, 2012), por esse fato, estudos relacionados com a toxicidade de AgNPs são potencialmente importantes para a sociedade e devem ser conduzidos.

1.3 Toxicologia e sistemas biológicos

As AgNPs podem se mostrar nocivas ao meio ambiente, podendo ser letal para plantas e animais. Para a verificação da nocividade dessas nanopartículas são realizados testes ecotoxicológicos. Segundo Butler (1984) a ecotoxicologia é um estudo dos efeitos de poluentes, substancias liberadas no meio ambiente e na biota de vários animais, incluindo os

seres humanos. Em um teste de toxicidade busca-se avaliar os efeitos causados à um espécie teste escolhida, expondo-a em ensaios biológicos com uma ou mais substâncias durante um certo período de tempo. Tais testes são executados em organismos indicadores, pelo fato de possuírem algumas características desejáveis, como pequeno limite de tolerância ecológica a determinadas substâncias, apresentando assim alguma alteração fisiológica, morfológica ou comportamental, quando expostas a tóxicos (DE PAIVA MAGALHAES; FERRÃO-FILHO, 2008; RUBINGER, 2009). Os resultados são qualitativos e quantitativos, onde os efeitos tóxicos podem causar um efeito letal, que é a mortalidade, e efeitos sub letais como alterações no desenvolvimento e crescimento, reprodução, patologias, respostas celulares, efeitos que são quantificados com o número de organismos mortos, porcentagem de eclosão de ovos, alterações no tamanho e peso, ocorrência de tumores ou inibição enzimática (DOS SANTOS; DA SILVA, 2007).

Para que o teste apresente resultados significativos e relevantes, a escolha do organismo teste tem de ser apropriada, levando em conta alguns critérios. Segundo Rand (1995), os critérios para a escolha do organismo apropriado devem ser: sensibilidades entre espécies sempre constantes; disponibilidade e abundância; ciência da representatividade da espécie sobre o ecossistema que irá receber o impacto; baixa sazonalidade; importância comercial ou ecológica; apresentar facilidade de cultivo em laboratório, com técnicas disponíveis; conhecimentos sobre fisiologia, genética e comportamentos da espécie. O mesmo autor relata que a escolha de algas, peixes e invertebrados como organismos testes é recomendável pelo fato de já se possuir uma quantidade substancial de informações em estudos ecotoxicológicos disponíveis para muitos deles, além de serem organismos sensíveis e ecologicamente importantes.

A utilização de *Artemia* sp. tem sido amplamente usada em testes de toxicidade, por ser um animal com manutenção laboratorial fácil e ampla distribuição. *Artemia* sp. atua como elo de ligação entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores (PIMENTEL *et al.*, 2011). Possui corpo segmentado, característico do filo Arthropoda, dividido em cabeça, tórax e abdômen. Seu corpo é coberto com exoesqueleto fino e flexível de quitina, tendo os músculos presos internamente. Apresenta períodos de muda, que é o descarte e aparecimento de um novo exoesqueleto, onde nas fêmeas o processo ocorre precedendo a ovulação (ABATZOPOULOS, 2013).

Segundo Nunes (2006), o gênero *Artemia* é subdividido em seis espécies que geralmente possui populações partenogênicas e apresentam características próprias do gênero

que o tornam um organismo ideal para estudos ecotoxicológicos como adaptabilidade a amplas faixas de salinidade (5 a 250 g L⁻¹) e a grandes variações de temperatura (6 a 35 °C), apresentando ciclo de vida em estágios com alta taxa de fecundidade, estratégia de reprodução por ovoviviparidade ou oviparidade (com náuplios ou produção de cistos), pequeno tamanho corporal e adaptabilidade a recursos variados de nutrientes, pelo fato de ser um animal filtrador não seletivo, além de ser capaz de se desenvolver em laboratório.

A utilização de artêmias, como espécie teste, para verificar a nocividade de nanopartículas é comum, mas não há relatos quanto ao uso das AgNPs deste estudo, que foram elaboradas no Laboratório de Materiais Funcionais Avançados (LAMFA), Departamento de Física da UFC. Além disso, as técnicas de microscopias empregadas para a avaliação dos danos causados são pouco relatadas na literatura. Sendo assim, a proposta desse trabalho é elucidar ao máximo a letalidade e subletalidades dessas nanopartículas de prata quando expostas a um organismo modelo como *Artemia* sp.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar e caracterizar, a partir de técnicas de microscopia, o dano causado a *Artemia sp.* quando submetida a diferentes concentrações de nanopartículas de prata (AgNPs).

2.2 Específicos

- Viabilizar o cultivo de *Artemia sp.* como organismo modelo para teste de toxicidade;
- Caracterizar, na amostra, por meio de detector EDS, a presença ou ausência de AgNPs;
- Descrever alterações morfológicas por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de campo claro;
- Descrever dano celular causado a partir de microscopia confocal de varredura à laser;
- Avaliar, por meio de estatística, o índice de mortalidade, levando em conta estágio de desenvolvimento das artêmias e concentração de AgNPs.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Organismo teste: *Artemia* sp.

Os cistos de *Artemia* sp. foram adquiridos comercialmente em lojas especializadas. As artêmias foram mantidas distante da luz e acondicionados em recipientes de vidro longe da umidade. Para a obtenção dos náuplios, os cistos foram hidratados em 350 mL de água do mar artificial, preparada previamente com água destilada e sal marinho, e, em seguida mantidos sob constante aeração e com períodos de 12h de luz e 12h de escuro, a temperatura de 22 ± 2 ° C. Para os bioensaios foram usados os náuplio após 48h (2 dias) da eclosão e 144h (6 dias) da eclosão.

3.2 Meio de Teste

As AgNPs utilizadas foram sintetizadas e fornecidas pelo Prof. Dr. Odair Pastor Ferreira, do Laboratório de Materiais Funcionais Avançados (LAMFA), Departamento de Física da UFC. Preparadas pelo método de redução do citrato e estabilizadas com quitosana, as AgNPs apresentaram tamanho médio de 15nm e carga superficial com valor positivo de +40,8 mV. Valores negativos ou positivos garantem menor agregação das NPs, dessa forma, adquirem maior estabilidade. As AgNPs vieram na concentração de 600 ppm (partes por milhão) e foram diluídas em água do mar artificial para 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm e 12,5 ppm.

3.3 Teste de toxicidade: AgNPs com *Artemia* sp.

O bioensaio foi realizado em placas de 24 poços estéreis adicionando 10 náuplios a 2 mL de Meio de Teste, utilizando pipeta automática com mesmo volume para cada poço. Para cada concentração, foi conduzido um experimento em triplicata, onde foram testadas quatro concentrações de AgNP: 100ppm, 50 ppm, 25 ppm e 12,5 ppm. Além disso, houve triplicatas para controle positivo, (ácido nítrico a 1%), para assegurar que o organismo responde propriamente a uma substância nociva e o controle negativo (meio salino sem nanopartículas de prata), para indicar até que ponto a mortalidade pode ter sido causada por outro fator. As placas foram mantidas a temperatura de 22 ± 2 ° C. Após 24h e 48h, as placas eram analisadas para verificar o número de animais mortos, atribuindo como atributo de morte a imobilização do animal por 10s, adaptado de Blizzard et al. (1989).

3.4 Cálculo da taxa de mortalidade

O cálculo para a mortalidade percentual seguiu a fórmula de Arulvasu *et al* (2014):

$$\% \text{ de mortalidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de } Artemia \text{ sp. mortas}}{\text{n}^\circ \text{ inicial de } Artemia \text{ sp. vivas}} \times 100$$

Os resultados foram tabulados e expressos como gráficos e tabelas.

3.5 Processamento e análise para Microscopia eletrônica de varredura

Após as 48h do ensaio, as artêmias foram fixadas em solução fixadora de Karnovsky, que contém glutaraldeído a 2,5%, formaldeído a 4%, diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, em temperatura ambiente, por no mínimo 24 horas. Seguidamente, é feito o processo de pós fixação e desidratação, onde o material foi lavado, três vezes, em tampão cacodilato de sódio a 0,05M, por 45 minutos cada lavagem e de submetido a desidratação com etanol em série crescente de 50%, 70%, 90%, 100%, por 45 minutos cada, sendo a última série de 100% repetida duas vezes. Por fim, o material desidratado é colocado para secar em hexametildisilizano (HMDS), inicialmente com uma solução de 1:1 de HMDS e etanol por 60 minutos e por fim HMDS puro até evaporação completa da solução e secagem do material. Todo o procedimento foi feito em capela com exaustor. Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), o material já seco precisa ser montado em um porta amostra de alumínio, sendo aderidos ao mesmo por uma fita de carbono dupla face. Após isso, ocorre a metalização, utilizando o aparelho Quorum Q150T ES, cobrindo as amostras com uma camada de 20 nm de ouro, proporcionando assim, melhor aterramento do material ocasionando em melhores imagens. A elaboração das imagens ocorreu no microscópio eletrônico de varredura Quanta FEG 450 (FEI) e no Microscópio de varredura INSPECT 50. Para a Análise química semiquantitativa das amostras, utilizou-se a técnica analítica de espectrometria de raios-x por dispersão de energia (EDS), por meio de um detector acoplado a câmara do microscópio eletrônico de varredura.

3.6 Microscopia confocal de varredura à laser

As artêmias foram tiradas do meio de teste e imersas em laranja de acridina a 1% por 20 minutos, logo após as mesmas foram lavadas três vezes com água destilada para a observação de dano celular. As amostras foram colocadas em lâminas e observadas no microscópio confocal a laser (LM 710 Zeiss) utilizando um laser de excitação com comprimento de onda 488nm e de emissão 532nm. As imagens de campo claro foram obtidas no mesmo microscópio.

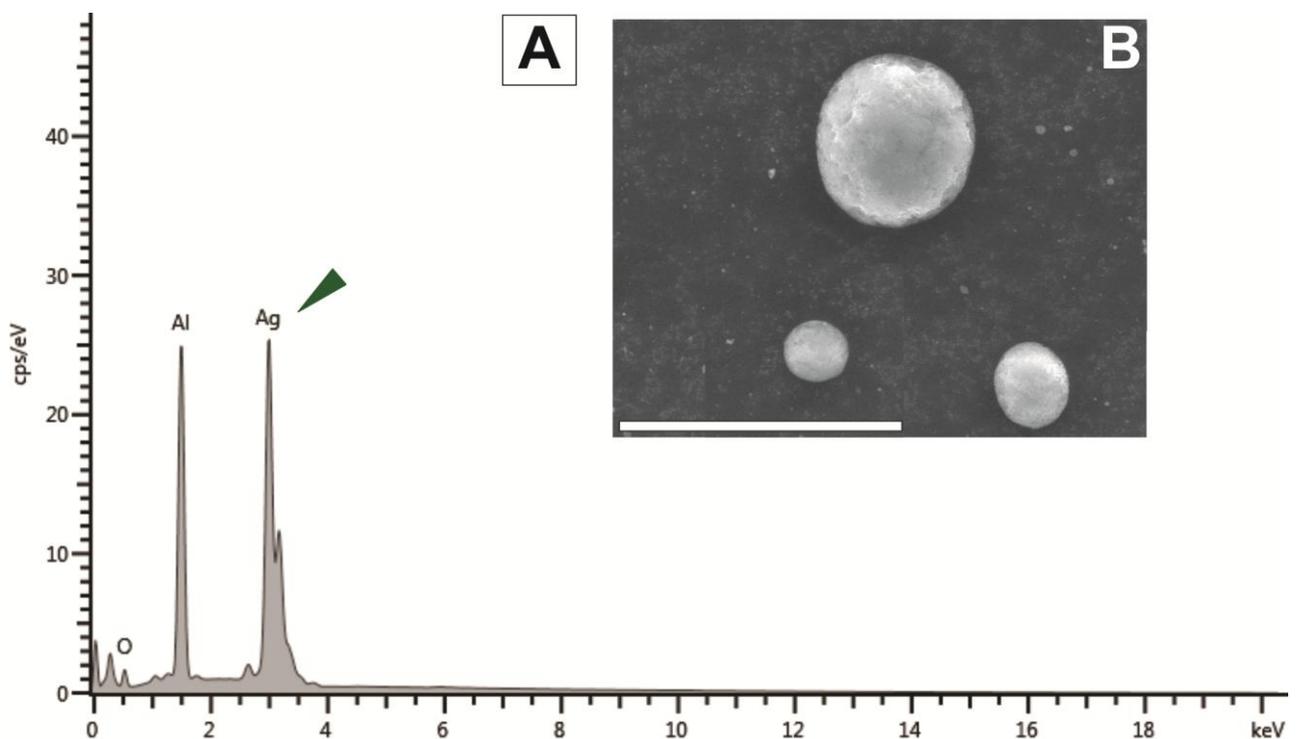
4 RESULTADOS

4.1 Análise da gota de AgNP

A análise feita em MEV e EDS teve o intuito de investigar a morfologia e tamanho das nanopartículas de prata. Apresentam, predominantemente, formato esférico com diâmetros que variam de alguns nanômetros para 30-40 nm (Figura 1B). O gráfico EDS aparece com três picos localizados entre 0 KeV e 4 KeV. O pico máximo localizado no espectro 0,5 KeV sinaliza para o oxigênio (O), onde a água onde foi diluída a mesma é responsável pela sinalização. O segundo pico máximo localizado no espectro 1,5 KeV indica o alumínio (Al), onde o porta amostra de alumínio é o responsável pela sinalização. que vem prata. O terceiro e ultimo pico localizado no espectro 3 KeV sinaliza para a prata. (Figura 1A).

Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura (B) e gráfico semiquantitativo de elementos, elaborado por EDS, das AgNPs do trabalho.

A - Gráfico semiquantitativo de elementos, elaborado por EDS. Note o pico de prata (Ag) (Ponta da seta verde);
 B - Imagem de MEV da morfologia da AgNP.
 Barras: B – 30 μm ;



Fonte: elaborada pela autora

4.2 Taxa de mortalidade *Artemia* sp.

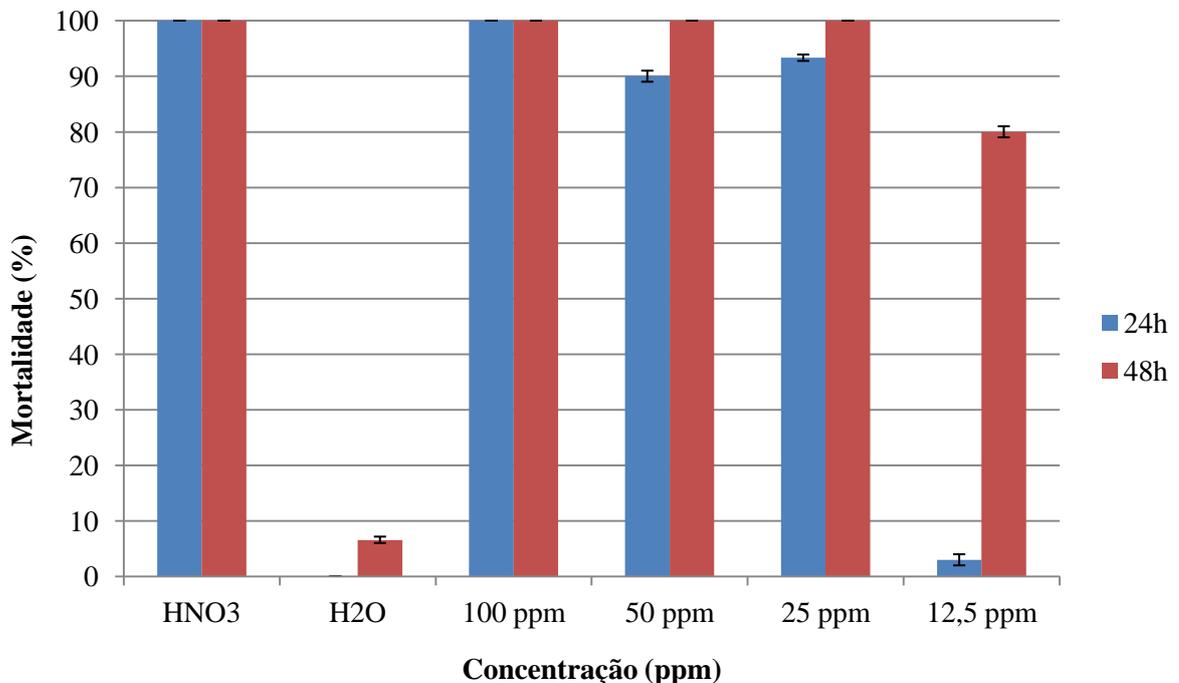
As análises estatísticas para mortalidade mostraram resultados significativos em artemia de 2 dias como em artemia de 6 dias. Para artêmia de 2 dias, todas as concentrações foram letais, e mostraram resultados significativos já dentro de 24 horas de exposição e em todas as concentrações. Nos controles, os resultados encontrados foram de tal forma que no controle negativo (água do mar artificial sem nanopartícula), a mortalidade foi de 0% e 6,6%, respectivamente 24h e 48h, podendo ser considerado um valor insignificante. Já no controle positivo (ácido nítrico a 1%) a mortalidade foi de 100%, para ambas as condições de tempo. Na concentração mínima de 12,5 ppm, a mortalidade foi de 30% e ao decorrer do aumento de concentração de 25 ppm, 50 ppm e 100 ppm a mortalidade foi de cerca de 93,33%, 90% e 90%, respectivamente, valores para as primeiras 24h. Para 48h, na concentração mínima de 12,5 ppm a mortalidade foi de 80% e ao decorrer do aumento de concentração de 25 ppm, 50 ppm e 100 ppm a mortalidade foi de cerca de 100%, 100% e 100%, respectivamente. Foi feito um teste t de Student, para comparação do grupo experimental (concentrações de AgNPs) com o grupo controle negativo, gerando um valor de p (Tabela 1).

Tabela 1 - O resultado da taxa de mortalidade (24 e 48 horas) de *Artemia* sp. de 2 dias, tratadas com concentrações (ppm) de nanopartículas de prata.

Concentração (ppm)	Número inicial de <i>Artemia</i> sp.	Nº de <i>Artemia</i> sp. mortas após 24 horas	Nº de <i>Artemia</i> sp. mortas após 48 horas	% de mortalidade após 24 horas (valor ± DP)	% de mortalidade após 48 horas (valor ± DP)	Valor de p em relação ao controle negativo
Controle negativo	30	0	2	0 ± 0	6.66 ± 0.57	-----
Controle positivo	30	30	30	100 ± 0	100 ± 0	-----
100 ppm	30	30	30	100 ± 0	100 ± 0	p= 0,01
50 ppm	30	27	30	90 ± 1	100 ± 0	p= 0,002
25 ppm	30	28	30	93.33 ± 0.57	100 ± 0	p= 0,001
12,5 ppm	30	9	24	30 ± 1	80 ± 1	p= 0,14

Fonte: elaborada pela autora

Gráfico 1 - Gráfico de barras mostrando os resultados para a taxa de mortalidade (24 e 48 horas) de *Artemia* sp. de 2 dias, tratadas com várias concentrações (ppm) de AgNPs.



Fonte: elaborada pela autora

Para artêmia de 6 dias, o resultado foi similar ao de 2 dias. Todas as concentrações foram letais, e mostrando resultados significantes já dentro de 24 horas de exposição e em todas as concentrações. O teste t apontou valor de $p < 0,05$ em todas as concentrações da nanopartícula de prata. (Tabela 2 e Gráfico 2).

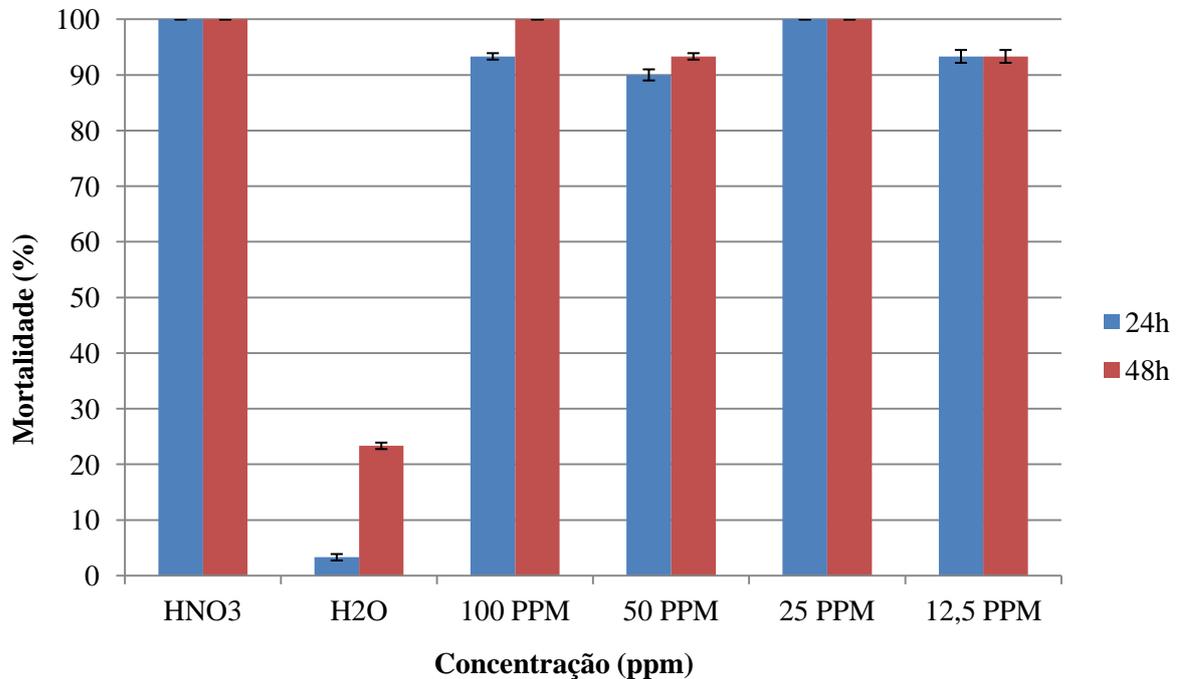
Tabela 2 - O resultado da taxa de mortalidade (24 e 48 horas) de *Artemia* sp. de 6 dias, tratadas com concentrações (ppm) de nanopartículas de prata.

DP - Desvio padrão

Concentração (ppm)	Número inicial de <i>Artemia</i> sp.	Nº de <i>Artemia</i> sp. mortas após 24 horas	Nº de <i>Artemia</i> sp. mortas após 48 horas	% de mortalidade após 24 horas (valor \pm DP)	% de mortalidade após 48 horas (valor \pm DP)	Valor de p em relação ao controle negativo
Controle negativo	30	1	7	3.33 ± 0.57	23.33 ± 0.57	-----
Controle positivo	30	30	30	100 ± 0.0	100 ± 0.0	-----
100 ppm	30	27	30	90 ± 0.57	100 ± 0.0	p= 0,04
50 ppm	30	27	28	100 ± 0.0	93.33 ± 0.57	p= 0,04
25 ppm	30	30	30	100 ± 0.0	100 ± 0.0	p= 0,04
12,5 ppm	30	28	28	93.33 ± 1.15	93.33 ± 1.15	p= 0,04

Fonte: elaborada pela autora

Gráfico 2 - Gráfico de barras mostrando os resultados para a taxa de mortalidade (24 e 48 horas) de *Artemia sp.* de 6 dias tratada com várias concentrações (ppm) de AgNPs.



Fonte: elaborada pela autora

4.3 Variação morfológica de *Artemia sp.* 2 dias (após tratamento com nanopartículas de prata): microscopia de campo claro, eletrônica de varredura, confocal e análise semiquantitativa de prata

Nas fotomicrografias de campo claro foram possíveis as observações de agregados de nanopartículas de prata dentro do intestino e preso no corpo do animal (Figura 2A; 3A; 4A; 5A; 6A; 7A). Como *Artemia sp.* é um animal filtrador não seletivos, geralmente consome partículas com tamanho menor que 50 μm , nesse estágio de náuplio (ARUVALSU *et al.*, 2014). Nas concentrações de 100ppm, 50ppm e 25ppm, a agregação de AgNPs é notória no intestino, preenchendo-o quase que completamente, e na cabeça, deixando os tecidos escurecidos pela nocividade. Em 12,5ppm, as AgNPs estão sutilmente presentes na região da cabeça e o dano ao corpo do animal se dá pela não distinção dos tecidos. No controle positivo, apesar do animal possuir uma coloração escura, devido ao dano do HNO₃, não há indicativos de agregados de nanopartículas. Já no controle negativo, os tecidos estão

esbranquiçados e se podem ver as delimitações de estruturas e tecidos, demonstrando não ter danos celulares significativos.

A laranja de acridina se liga aos ácidos nucleicos e destacam dano celular, de acordo com bula do fabricante. Assim, ela evidencia células apoptóticas e células necróticas. Como observado nas imagens, houve dano celular (DC), visível pelas pontuações brilhantes verdes, em todas as concentrações de nanopartículas de prata (Figura 4C; 5C; 6C; 7C). As três concentrações mais altas exibiram pontos verdes brilhantes por todo o corpo ou com mais intensidade em alguns pontos (Figura 4C; 5C; 6C). Na concentração mais baixa, apenas algumas manchas verdes eram visíveis no corpo do animal (Figura 7C). No controle positivo houve dano celular e brilho devida a nocividade conhecida do Ácido Nítrico às células vivas (Figura 3C). Já no controle negativo, houve brilho devido à própria fluorescência do material biológico e da emissão da acridina (2C). As figuras 2B; 3B; 4B; 5B; 6B; 7B são amostras de *Artemia* sp. com tratamentos em AgNP mas sem o laranja de acridina, servindo de imagem controle, mostrando que o dano celular só é realmente evidenciado com o laranja de acridina, pela ligação do mesmo com o ácido nucleico de celular apoptóticas.

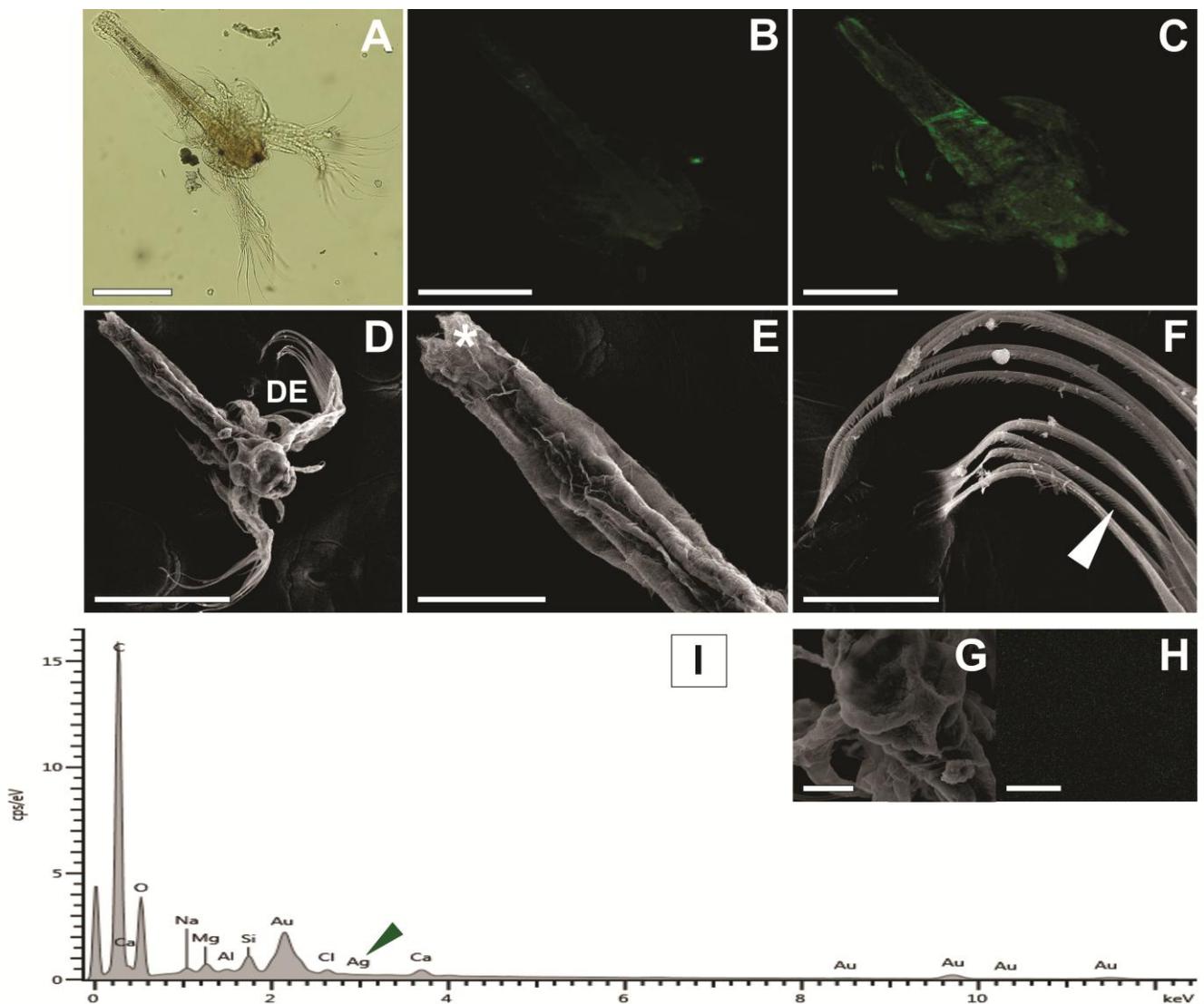
A interação das nanopartículas de prata com *Artemia* sp. pode ser observada externamente, onde as AgNPs estão sobre o exoesqueleto causando danos diretos a morfologia do bicho. Na figura 2 (D; E; F), controle negativo, onde o animal não foi exposto as AgNPs, há completo desenvolvimento das antenas, tamanho corporal, abertura anal completa e desenvolvimento completo dos enditos e cílios da superfície. Quando o animal foi exposto a uma substancia danosa, como o ácido nítrico, além da mortalidade, ele apresentou desenvolvimento insatisfatório das antenas, má formação ou nenhuma da abertura anal, pouco desenvolvimentos dos enditos e perca ciliar (Figura 3D; E; F). O mesmo padrão morfológico foi observado quando as artêmias foram submetidas às concentrações de 100ppm, 50ppm, 25ppm e 12,5 ppm. Não houve abertura anal (Figura 4E; 5E; 6E; 7E), desenvolvimento insastifatório das antenas (Figura 4D; 5D; 6D; 7D), onde o único tratamento que apresentou desenvolvimento de cílios nos enditos foi o 12,5ppm, a menor concentração (Figura 7F). Além disso, em todas as concentrações foi-se capaz de observar AgNPs fixadas no corpo e nas antenas.

Em análise com EDS para prata, controle positivo e negativo apresentou apenas ruído (Figuras 2H; 3H) e nenhum pico para Ag (Figuras 2I; 3I). Já quando submetida a AgNP, houve sinalização para prata, com formação de imagem (Figuras 4H; 5H; 6H; 7H) e pico para Ag (Figuras 4I; 5I; 6I; 7I). Houve também sinalização para outros elementos como carbono

(C), oxigênio (O), magnésio (Mg), silício (Si), cálcio (Ca) que são próprios da amostra biológica, alumínio (Al) do porta amostra, ouro (Au) da cobertura da metalização, cloro (Cl) e sódio (Na) do meio de teste.

Figura 2 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos em *Artemia* sp 2 dias, submetida ao tratamento com água marinha - controle negativo.

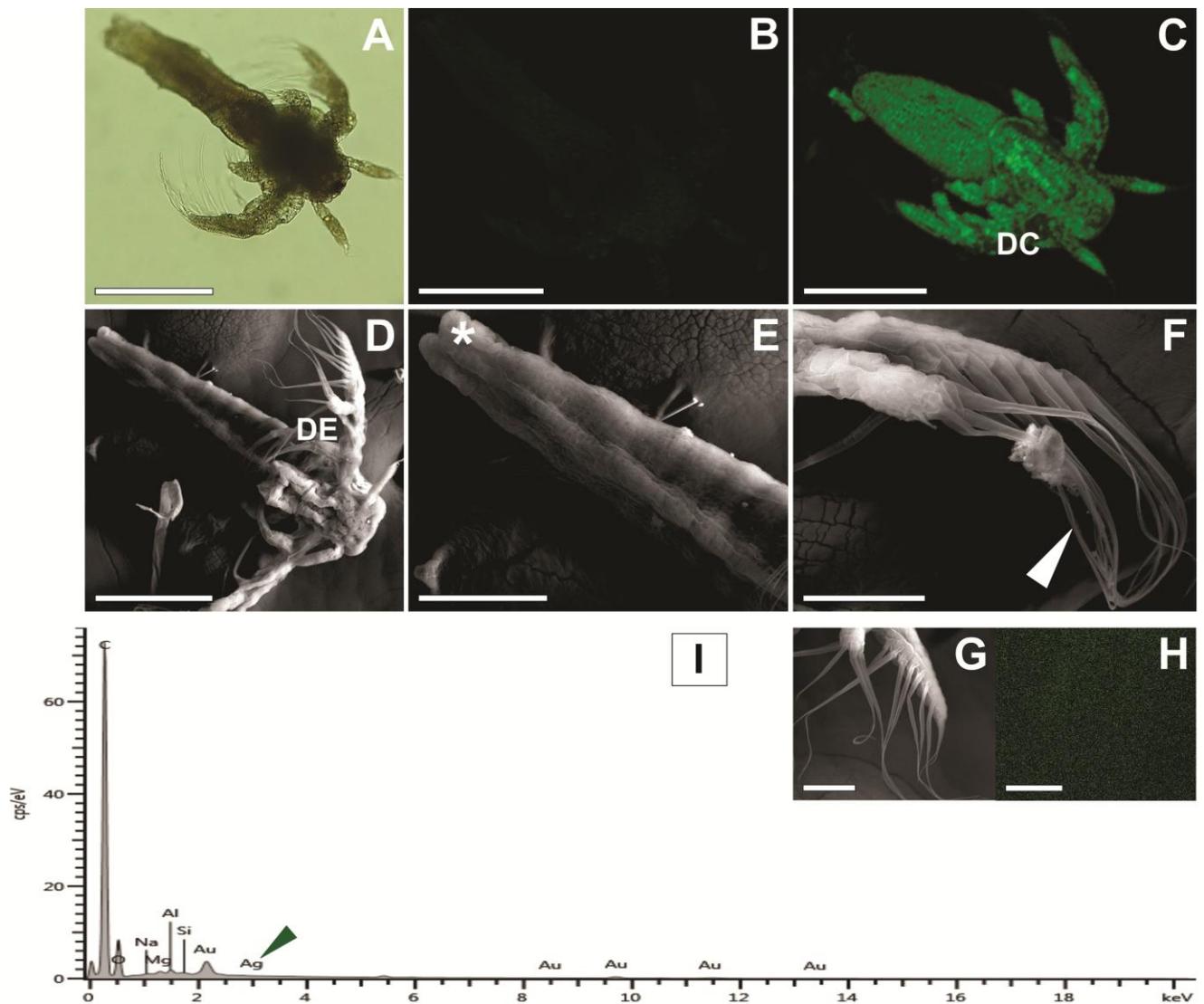
A – Imagem de campo claro da morfologia do animal;
 B – *Artemia* sp. sem laranja de acridina 1% ;
 C – *Artemia* sp. com laranja de acridina 1% ;
 D – Visão geral da morfologia do animal em MEV. Note o desenvolvimento completo da antena (DE);
 E – Detalhe do abdômen. Note a formação completa da abertura anal (*);
 F – Detalhe da antena. Note desenvolvimento dos enditos com presença de cílios (ponta da seta branca);
 G - Imagem de MEV para análise semiquantitativa de prata; H - Imagem EDS para prata;
 I - Gráfico semiquantitativo de elementos, elaborado por EDS. Note o pico de prata (Ag) (Ponta da seta verde).
 Barras: A, B, C – 200 μm ; D - 300 μm ; E – 100 μm ; F – 40 μm ; G, H - 50 μm .



Fonte: elaborada pela autora

Figura 3 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp 2 dias, submetida ao tratamento com ácido nítrico (HNO₃) - controle positivo.

A – Imagem de campo claro da morfologia do animal;
 B – *Artemia* sp. sem laranja de acridina 1% ;
 C – *Artemia* sp. com laranja de acridina 1%. Note o dano celular causado (DC);
 D – Visão geral da morfologia do animal em MEV. Note o moderado desenvolvimento da antena (DE);
 E – Detalhe do abdômen. Note a má formação da abertura anal (*);
 F – Detalhe da antena. Note pouco desenvolvimento dos enditos com ausência de cílios (ponta da seta branca);
 G - Imagem de MEV para análise semiquantitativa de prata;
 H - Imagem EDS para prata;
 I - Gráfico semiquantitativo de elementos, elaborado por EDS. Note o pico de prata (Ag) (Ponta da seta verde).
 Barras: A, B, C, D – 200 µm; E – 100 µm; F, G, H – 50 µm.



Fonte: elaborada pela autora

Figura 4 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp. 2 dias, submetida ao tratamento de 100ppm.

A – Imagem de campo claro da morfologia do animal. Note acúmulo de AgNPs no intestino (ponta da seta branca) e presença no corpo do animal (ponta da seta vermelha);

B – *Artemia* sp. sem laranja de acridina 1%;

C – *Artemia* sp. com laranja de acridina 1%. Note dano celular (DC);

D – Visão geral da morfologia do animal em MEV. Note o pouco desenvolvimento da antena (DE); E – Detalhe do abdômen. Note a ausência da abertura anal (*);

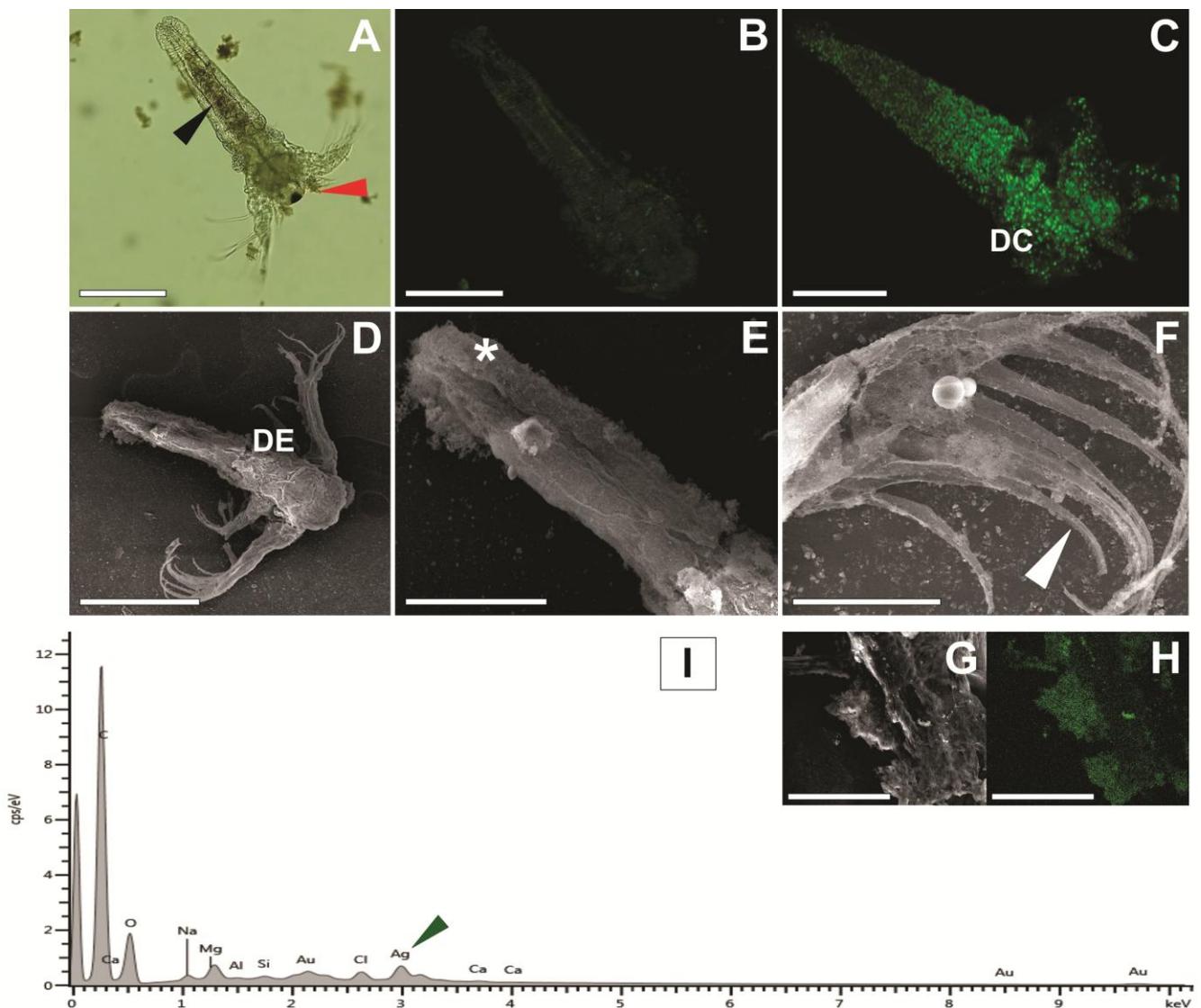
F – Detalhe antena. Note o pouco desenvolvimento dos enditos com ausência de cílios (ponta da seta branca);

G - Imagem de MEV para análise semiquantitativa de prata;

H - Imagem EDS para prata;

I - Gráfico semiquantitativo de elementos, elaborado por EDS. Note o pico de prata (Ag) (Ponta da seta verde).

Barras: A, B, C, D – 200 μ m; E – 100 μ m; F – 40 μ m; G, H – 50 μ m.



Fonte: elaborada pela autora

Figura 5 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp. 2 dias, submetida ao tratamento de 50ppm.

A – Imagem de campo claro da morfologia do animal. Note acúmulo de AgNPs no intestino (ponta da seta branca) e presença no corpo do animal (ponta da seta vermelha);

B – *Artemia* sp. sem laranja de acridina 1%;

C – *Artemia* sp. com laranja de acridina 1%. Note dano celular (DC);

D – Visão geral da morfologia do animal em MEV. Note o pouco desenvolvimento da antena (DE);

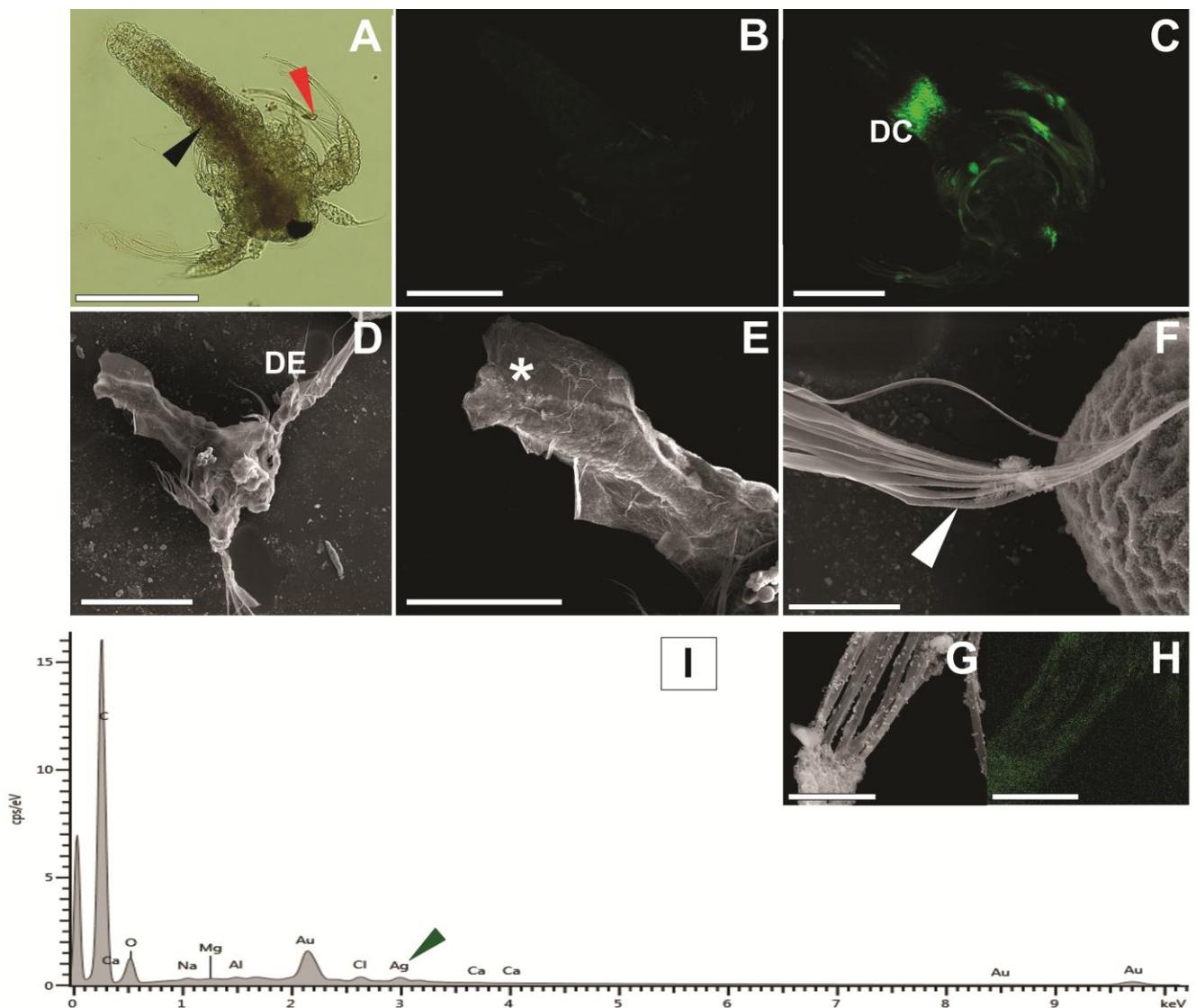
E – Detalhe do abdômen. Note a ausência da abertura anal (*);

F – Detalhe antena. Note o pouco desenvolvimento dos enditos com ausência de cílios (ponta da seta branca);

G - Imagem de MEV para análise semiquantitativa de prata;

H - Imagem EDS para prata; I - Gráfico semiquantitativo de elementos, elaborado por EDS. Note o pico de prata (Ag) (Ponta da seta verde).

Barras: A, B, C – 200 μ m; E – 100 μ m; F – 40 μ m; G - 50 μ m; H – 50 μ m.



Fonte: elaborada pela autora

Figura 6 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp. 2 dias, submetida ao tratamento de 25ppm.

A – Imagem de campo claro da morfologia do animal. Note acúmulo de AgNPs no intestino (ponta da seta branca) e presença no corpo do animal (ponta da seta vermelha);

B – *Artemia* sp. sem laranja de acridina 1%;

C – *Artemia* sp. com laranja de acridina 1%. Note dano celular (DC);

D – Visão geral da morfologia do animal em MEV. Note o pouco desenvolvimento da antena (DE);

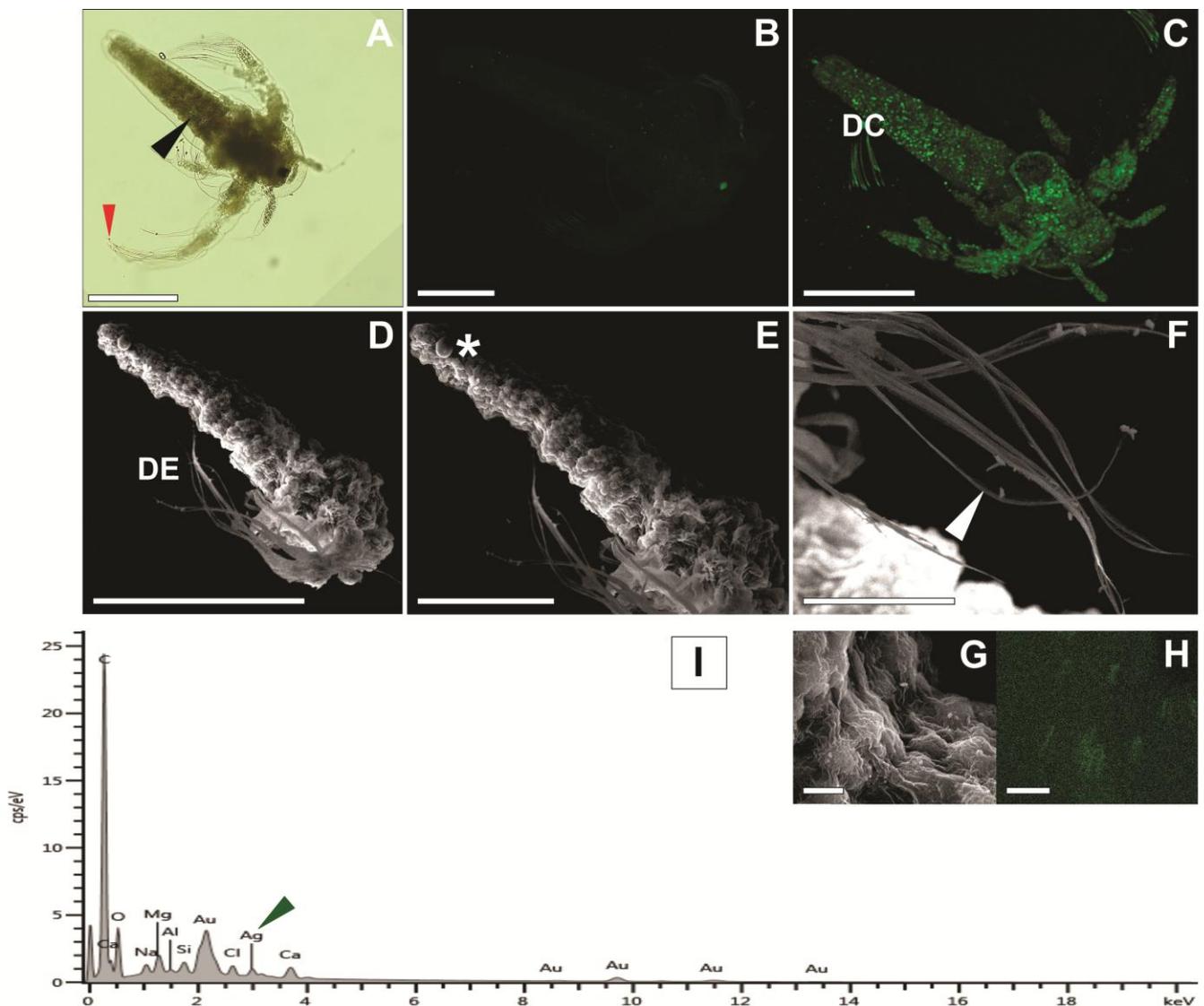
E – Detalhe do abdômen. Note a ausência da abertura anal (*);

F – Detalhe da antena. Note o pouco desenvolvimento dos enditos com presença moderada de cílios (ponta da seta branca);

G - Imagem de MEV para análise semiquantitativa de prata; H - Imagem EDS para prata;

I - Gráfico semiquantitativo de elementos, elaborado por EDS Note o pico de prata (Ag) (Ponta da seta verde).

Barras: A, B, C, D – 200 μm ; E – 100 μm ; F – 40 μm ; G, H - 5 μm .



Fonte: elaborada pela autora

Figura 7 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp. 2 dias, submetida ao tratamento de 12,5ppm.

A – Imagem de campo claro da morfologia do animal. Note acúmulo de AgNPs no intestino (ponta da seta branca);

B – *Artemia* sp. sem laranja de acridina 1%;

C – *Artemia* sp. com laranja de acridina 1%. Note dano celular (DC);

D – Visão geral da morfologia do animal em MEV. Note o pouco desenvolvimento da antena (DE);

E – Detalhe do abdômen. Note a ausência da abertura anal (*);

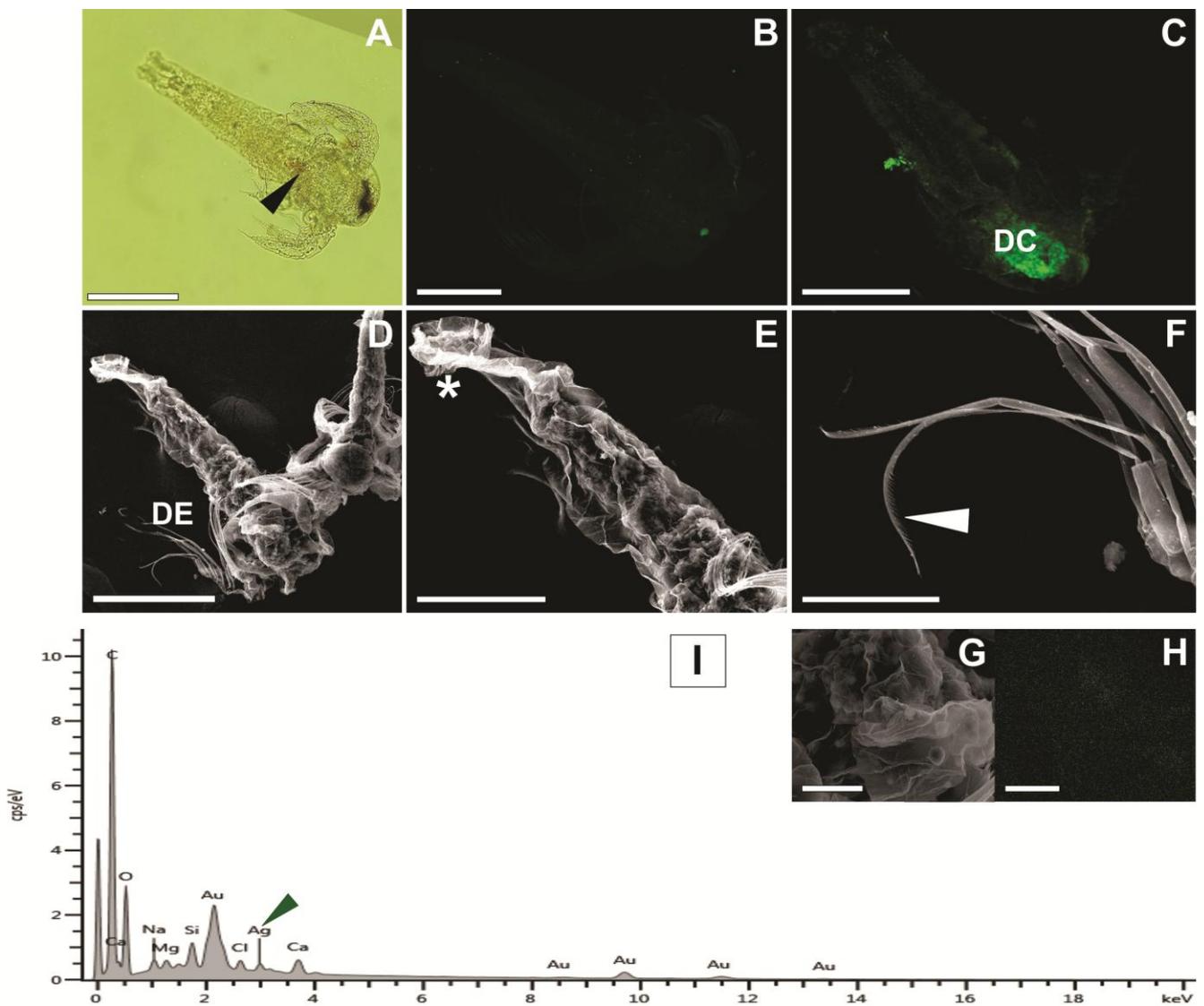
F – Detalhe da antena. Note o pouco desenvolvimento dos enditos com presença de cílios (ponta da seta branca);

G - Imagem de MEV para análise semiquantitativa de prata;

H - Imagem EDS para prata;

I - Gráfico semiquantitativo de elementos, elaborado por EDS. Note o pico de prata (Ag) (Ponta da seta verde).

Barras: A, B, C, D – 200 μ m; E – 100 μ m; F – 40 μ m; G - 30 μ m; H - 25 μ m.



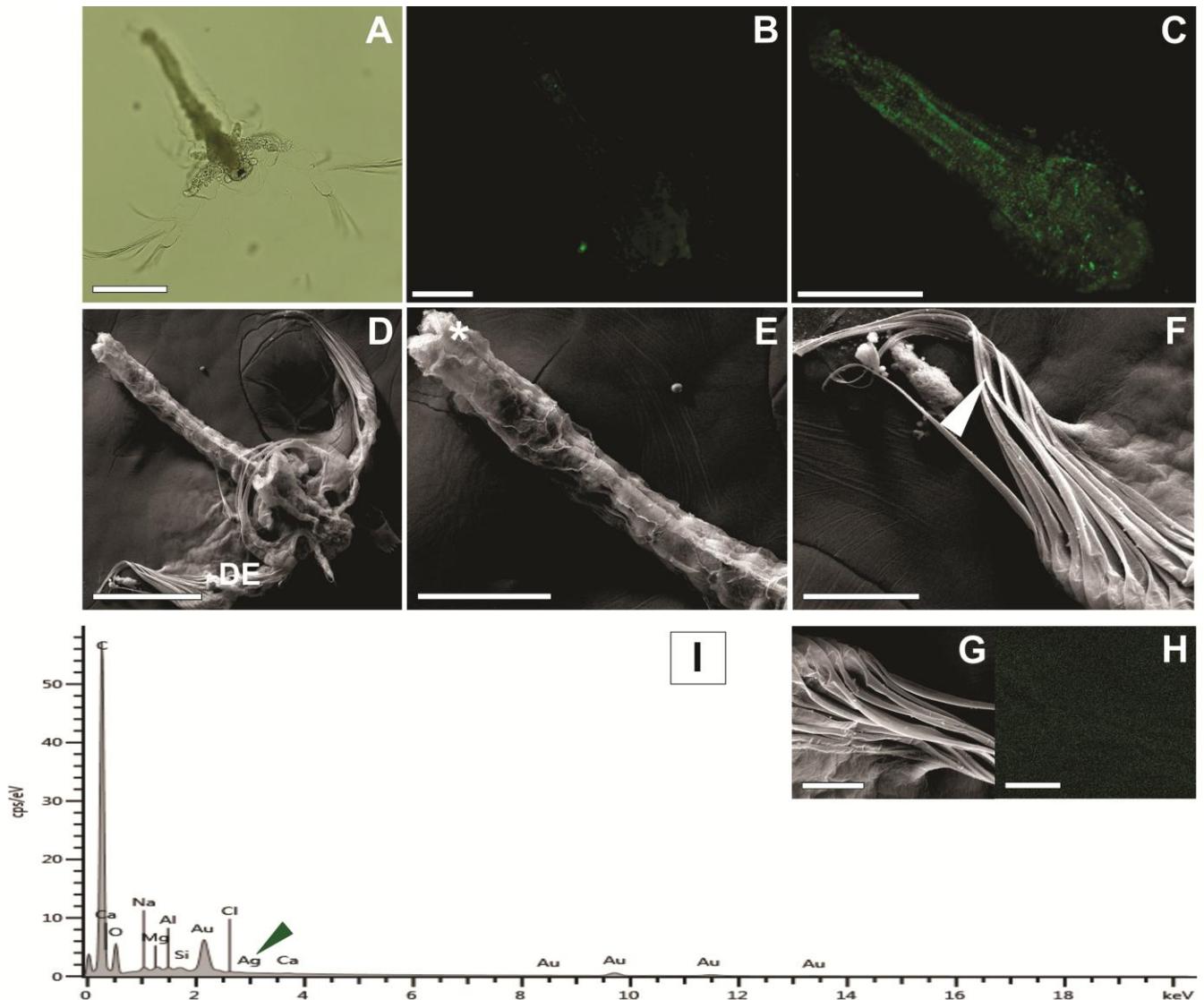
Fonte: elaborada pela autora

4.4 Variação morfológica de *Artemia* sp. 6 dias (após tratamento com nanopartículas de prata): microscopia de campo claro, eletrônica de varredura, confocal e análise semiquantitativa de prata

Os resultados foram semelhantes aos de *Artemia* sp. 2 dias. A imagem de EDS no tratamento de 100ppm mostrou nitidamente pontos de prata, além disso, foi o que apresentou maior pico de Ag no gráfico (Figura 10H; 10I). Os danos celulares (DC) apareceram em todas as concentrações, mostrando pico de Ag em todas (dados não mostrados). O desenvolvimento dos enditos nas artêmias submetidas as AgNPs seguiram o mesmo padrão das de 2 dias.

Figura 8 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos em *Artemia* sp 6 dias, submetida ao tratamento com água do mar artificial - controle negativo.

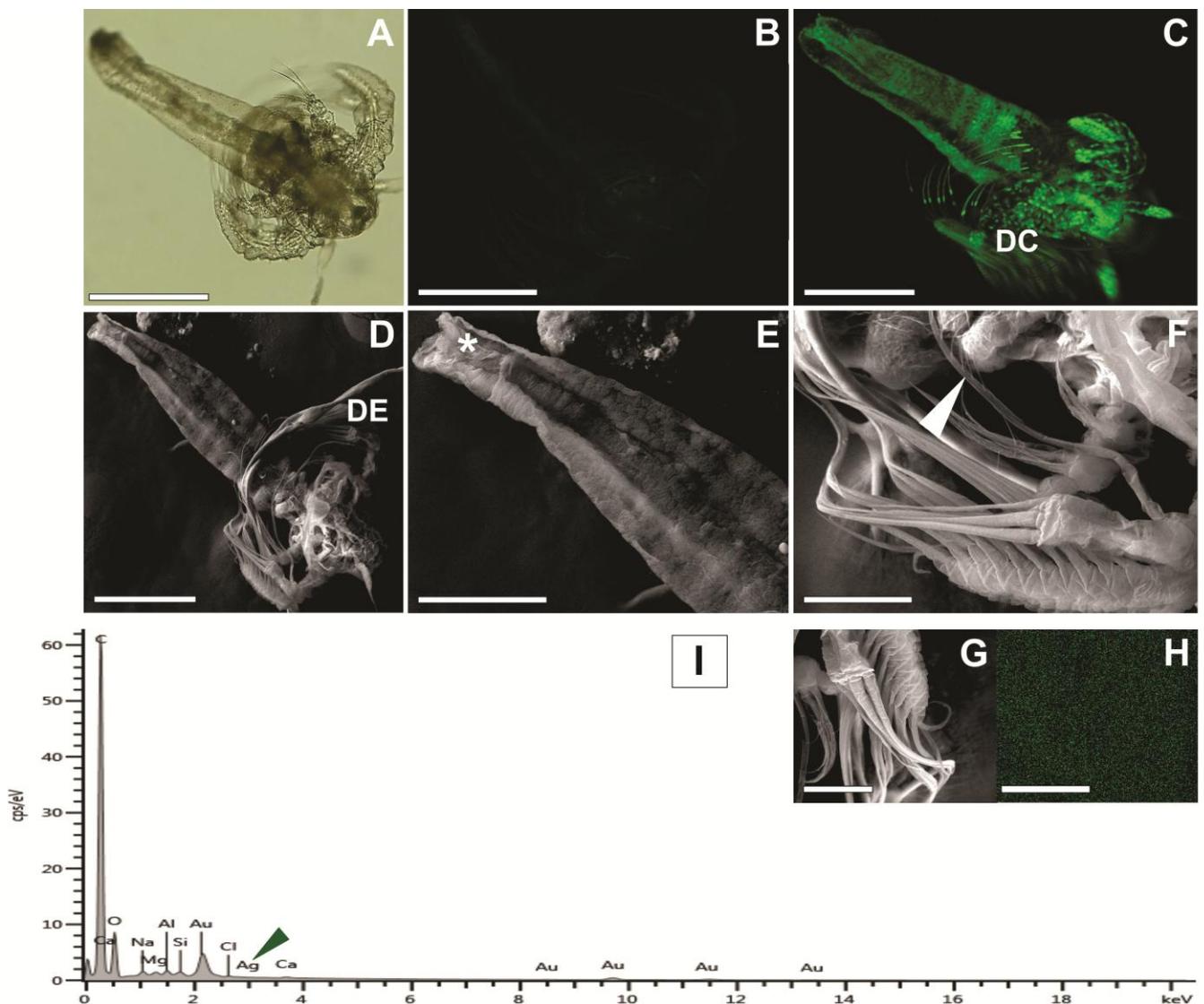
A – Imagem de campo claro da morfologia do animal;
 B – *Artemia* sp. sem laranja de acridina 1% ;
 C – *Artemia* sp. com laranja de acridina 1% ;
 D – Visão geral da morfologia do animal em MEV. Note o desenvolvimento completo da antena (DE);
 E – Detalhe do abdômen. Note a formação completa da abertura anal (*);
 F – Detalhe da antena. Note desenvolvimento dos enditos com presença de cílios (ponta da seta branca);
 G - Imagem de MEV para análise semiquantitativa de prata;
 H - Imagem EDS para prata;
 I - Gráfico semiquantitativo de elementos, elaborado por EDS Note o pico de prata (Ag) (Ponta da seta verde).
 Barras: A, B, C, D – 200 μ m; E – 100 μ m; F – 30 μ m; G - 50 μ m; H - 25 μ m.



Fonte: elaborada pela autora

Figura 9 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B,C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp 6 dias, submetida ao tratamento com ácido nítrico (HNO₃) - controle positivo.

A – Imagem de campo claro da morfologia do animal;
 B – *Artemia* sp. sem laranja de acridina 1% ;
 C – *Artemia* sp. com laranja de acridina 1%. Note o dano celular causado (DC);
 D – Visão geral da morfologia do animal em MEV. Note o moderado desenvolvimento da antena (DE);
 E – Detalhe do abdômen. Note a má formação da abertura anal (*);
 F – Detalhe da antena. Note moderado desenvolvimento dos enditos com ausência de cílios (ponta da seta branca);
 G - Imagem de MEV para análise semiquantitativa de prata; H - Imagem EDS para prata; I - Gráfico semiquantitativo de elementos, elaborado por EDS Note o pico de prata (Ag) (Ponta da seta verde).
 Barras: A, B, C, D – 200 µm; E – 100 µm; F – 50 µm; G - 40 µm; H - 25 µm.



Fonte: elaborada pela autora

Figura 10 - Microscopia de campo claro (A), microscopia confocal a laser (B, C), microscopia eletrônica de varredura (D, E, F, G), imagem obtida por EDS (H) e gráfico representativo de quantificação de elementos (I) em *Artemia* sp. 6 dias, submetida ao tratamento de 100ppm.

A – Imagem de campo claro da morfologia do animal. Note acúmulo de AgNPs no intestino (ponta da seta branca) e presença no corpo do animal (ponta da seta vermelha);

B – *Artemia* sp. sem laranja de acridina 1%;

C – *Artemia* sp. com laranja de acridina 1%. Note dano celular (DC);

D – Visão geral da morfologia do animal em MEV. Note o pouco desenvolvimento da antena (DE); E – Detalhe do abdômen. Note a ausência da abertura anal (*);

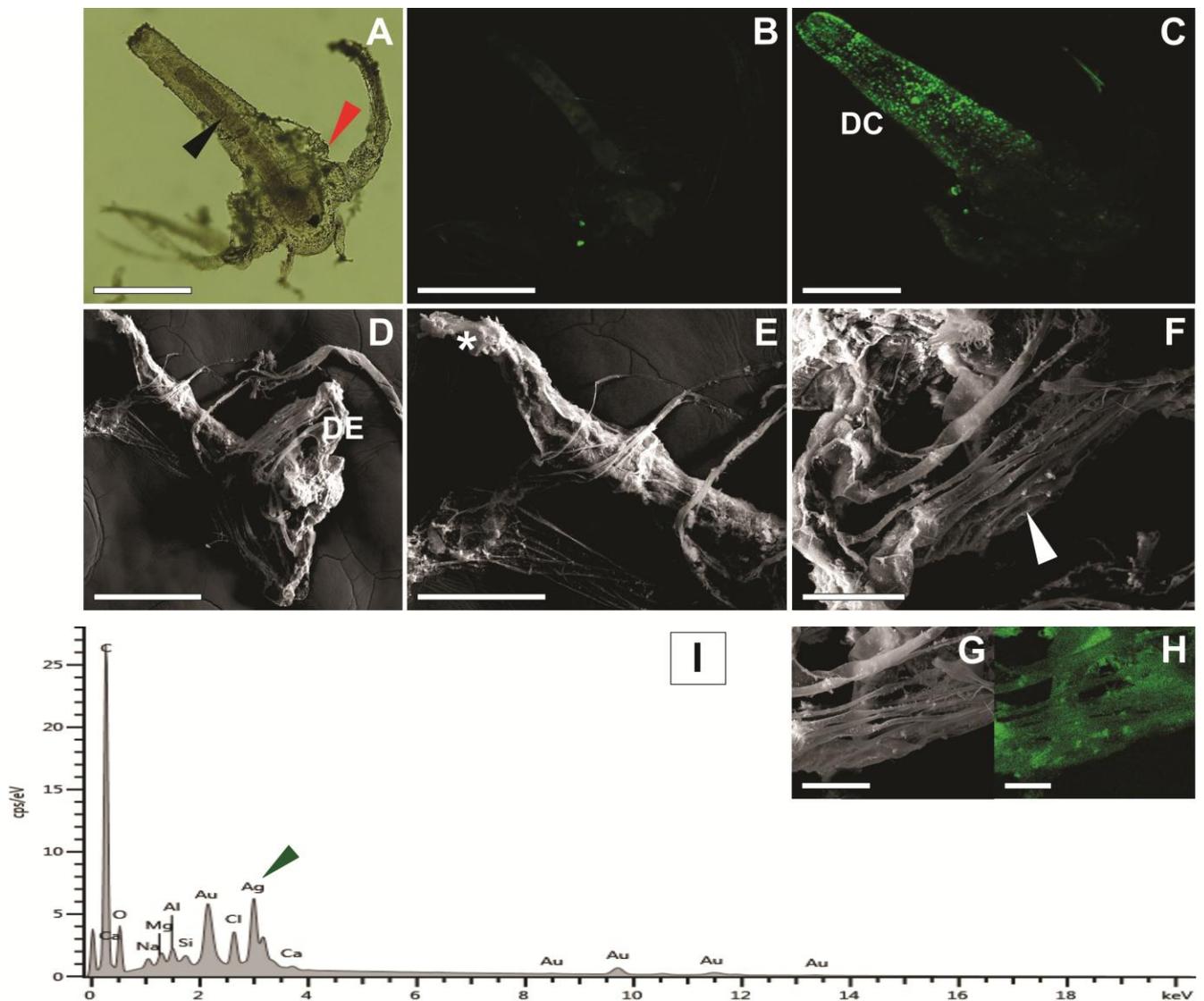
F – Detalhe antena. Note o pouco desenvolvimento dos enditos com ausência de cílios (ponta da seta branca);

G - Imagem de MEV para análise semiquantitativa de prata;

H - Imagem EDS para prata;

I - Gráfico semiquantitativo de elementos, elaborado por EDS Note o pico de prata (Ag) (Ponta da seta verde).

Barras: A, B, C, D – 200 μm ; E – 100 μm ; F – 50 μm ; G - 40 μm ; H – 25 μm .



Fonte: elaborada pela autora

5 DISCUSSÃO

Os danos a *Artemia* sp. foram observados por meio de técnicas de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, permitindo a observação do acúmulo de agregados nanopartículas, danos celulares e morfológicos. Pela microscopia de campo claro, pode-se observar agregados de nanopartículas no intestino, variando a quantidade entre as concentrações, geralmente possuindo maior quantidade aqueles que foram submetidos ao maior tratamento. Isto também foi observado por Ates *et al.* (2013), onde agregados ainda maiores de NPs se formam dentro do intestino do animal, mostrando que as NPs não eram mais partículas nanométricas, mas agregados no meio de exposição, sendo estes de difícil excreção pelo animal. O mesmo foi observado por Arulvasu *et al.* (2014), citando ainda que o acúmulo dessas AgNPs no animal impede a absorção de alimento e nutrientes, sendo letal não apenas pela toxicidade, mas pela capacidade de agregação das NPs. Além da facilidade desses animais, sendo filtradores não seletivos, de consumirem partículas de tamanho menor que 50 µm, nesse estágio de náuplio. Em outros organismos também foi descrito esse comportamento de agregação, como em *Daphnia similis* (BECARO *et al.*, 2015) e peixe-zebra (ASHARANI *et al.*, 2008). Isso pode vir a ser um problema no ambiente aquático devido à transferência trófica, principalmente por organismos planctônicos e bentônicos, sendo base da alimentação de muitos outros animais (WANG *et al.*, 2014).

O dano celular foi observado por microscopia confocal por meio de colocação com laranja de acridina. O resultado do estudo foi semelhante ao de Arulvasu *et al.* (2014) e Asharani *et al.* (2008), onde o controle negativo não apresentou coloração significativa já que não havia efeito tóxico das nanopartículas de prata, porém quando submetido ao tratamento com AgNPs os animais passaram a mostrar pontos fluorescentes verdes no corpo, explicado pela decomposição de partes do corpo e condição de apoptose devido à toxicidade das nanopartículas de prata. Sendo assim, quanto maior o sinal de fluorescência da laranja de acridina maior a quantidade de células apoptóticas. A técnica é muito utilizada para estudo citotóxico das nanopartícula em células de mamíferos (ARORA *et al.*, 2009; LEE, *et al.*, 2014; ASHARANI *et al.*, 2008).

As interações de NPs com o animal podem causar danos diretos ao exoesqueleto e o desenvolvimento de seus apêndices, bem como as membranas corporais (WANG, *et al.*, 2017). A agregação de AgNPs ao enditos, estrutura que pertence as antenas, podem ser observadas em MEV. Comprometendo o desenvolvimento completo em relação a tamanho, bem como causaram o emaranhamento até a fusão de alguns deles. Resultado próximo ao de

Mesarič *et al.*, (2015). Segundo o mesmo autor, os nanomateriais se ligaram aos enditos, ocasionando a fusão deles de tal forma que os cílios eram completamente cobertos impedindo a visualização dos mesmos. Wang *et al* (2014) observou que com o tratamento de nanopartículas de α -Fe₂O₃ ocorria o mesmo emaranhamento dos enditos mas além disso, haviam buracos em todas a superfícies do corpo da artêmia. As artêmias submetidas aos tratamentos apresentaram má formação da abertura anal, sendo uma má formação do abdômen. Característica também apresentada por Ozkan *et al.*(2016) onde as artêmias do grupo controle não apresentaram alterações visíveis no sistema digestivo, intestino e extremidades (antenas) ou malformações, contudo, quando exposta as nanopartículas apresentavam alterações na formação dos olhos, forma do globo e o desbotamento da íris, aumento do intestino, com alterações e acúmulo de NPs, malformações na casca exterior e por fim, perda de antenas também foram observadas.

Analisando-se as tabelas com as taxas de mortalidade, observou-se que os valores aumentaram quando se tratavam de artêmias com 6 dias, isto pode ser explicado pelo fato de náuplios de *Artemia* sp. recém-nascidos apresentarem alta resistência a substâncias tóxicas mas essa resistência diminui após 18h para um nível mais baixo e constante pelas 60h seguintes, além disso, os estágios III larvais se mostraram mais sensíveis a substancias nocivas (SORGELOOS; REMICHE-VAN DER WIELEN; PERSOONE, 1978). Ademais, Van Stappen (1996) observou que os náuplios iniciais de *Artemia* sp. possuem reservas de gema e passam a ingerir alimentos a partir do estágio II em diante. Isto as torna suscetíveis a ingerirem mais agregados de nanopartículas e sofrerem mais danos e mortalidade. Quando se olha apenas para os gráficos pode-se perceber que há mortalidade significativa dentro de 24 horas de exposição, em ambos os estágios de desenvolvimento, onde mais da metade dos náuplios foram encontrados mortos. Após 48 horas, a taxa de mortalidade foi quase 100% em todas as concentrações. Estes resultados também foram observados em Aruvalu *et al.* (2014), que também realizou teste em cistos de *Artemia* sp. revelando que as nanopartículas de prata têm efeito em ambos, tanto no animal vivo quanto nos seus cistos, apresentando uma diminuição da taxa de eclosão a partir do aumento de toxicidade da AgNP.

Observou-se que os valores de p se apresentaram abaixo de 5%, mostrando que os resultados indicaram um nível de significância, em relação ao controle negativo, bom, assim os resultados possuem confiança acima de 95%. Excetuando a concentração de 12,5 ppm em *Artemia* sp. de 2 dias, que apresentou valor de $p > 0,05$, onde nela aceitasse a hipótese nula de que não houve alteração significativa de mortalidade em relação ao grupo controle negativo.

Contudo, seus valores de desvio padrão, podem ser considerados dentro do valor de controle negativo. As demais concentrações apresentaram $p < 0,05$, aceitando assim a hipótese alternativa, onde houve alteração significativa entre as taxas do tratamento do controle negativo e as demais concentrações, mostrando que os valores de mortalidade sofreram variações altas quando comparadas com o grupo controle negativo, evidenciando altas taxas de mortalidade. Além disso, os dados estatísticos mostram que a concentração de 12,5 ppm já foi suficiente para sensibilizar o animal e ser letal para o mesmo. Mesarič *et al* (2015) também observou mortalidade em todas as concentrações usadas, inclusive nas mais baixas, 0.1 a 1 mg/mL, indicando dano morfológico, diminuição na velocidade de natação e alteração enzimática do náuplio.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, avaliou-se os efeitos tóxicos de nanopartículas de prata, sintetizadas pelo Laboratório de Materiais Funcionais Avançados (LAMFA) da UFC, em *Artemia* sp. para elucidar os efeitos tóxicos dela e seus impactos para os ecossistemas marinhos. Os resultados apontaram para o fato de que a exposição aguda em artemias de 2 dias de 6 dias de desenvolvimento sofreram mudanças significativas mortalidade, morfológicas e dano celular, comparados ao controle negativo. Houve o aparecimento de prata (Ag) e danos em todas as concentrações do tratamento. A *Artemia* sp. de 6 dias foi a mais sensível, de acordo com teste estatísticos, e a que apresentou o maior pico de prata e agregados de AgNP no seu corpo. Os resultados revelaram efeitos de curto prazo (24 h) e em todas as concentrações testadas, apresentando altas taxas de mortalidade. Além disso, o uso das técnicas microscopias utilizadas permitiram a visualização do dano e alterações ocorridas no ensaio, sendo potentes ferramentas para o estudo toxicológico de nanopartículas. A fim de se utilizar dessa AgNP para fins comerciais e seguros e em tratamentos a longo prazo outros estudos complementares devem ser realizados, principalmente na alteração bioquímica do animal e utilizando-se de mais técnicas microscopias, como realizar visualizações em microscopia de transmissão.

7 BIBLIOGRAFIA

ABATZOPOULOS, T. J.; BEARDMORE, J.; CLEGG, J. S.; SORGELOOS, P. **Artemia: basic and applied biology**. Springer Science & Business Media, 2013.

ALARCON, E. I.; VULESEVIC, B.; ARGAWAL, A.; ROSS, A.; BEJANI, P.; PODREBARAC, J.; GRIFFITH, M.. Coloured cornea replacements with anti-infective properties: Expanding the safe use of silver nanoparticles in regenerative medicine. **Nanoscale**, v. 8, n. 12, p. 6484-6489, 2016.

ALBUQUERQUE DE FARIAS, P. M.; SAEGESSER SANTOS, B.; DUARTE DE MENEZES, F.; DE CARVALHO FERREIRA, R.; DE LOURDES BARJAS-CASTRO, M.; CASTRO, V.; CESAR, L.C. Core-shell CdS/Cd (OH) 2 quantum dots: synthesis and bioconjugation to target red cells antigens. **Journal of microscopy**, v. 219, n. 3, p. 103-108, 2005.

ALVES, O. L. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. **Parcerias estratégicas**, v. 9, n. 18, p. 23-40, 2010.

ARORA, S.; JAIN, J.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 236, n. 3, p. 310-318, 2009.

ARULVASU, C.; JENNIFER, S. M.; PRABHU, D.; CHANDHIRASEKAR, D. Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp *Artemia*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

ASHARANI, P. V.; LOW KAH MUN, G.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETIL, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS nano**, v. 3, n. 2, p. 279-290, 2008.

ASHARANI, P. V.; WU, Y. L.; GONG, Z.; VALIYAVEETIL, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, v. 19, n. 25, p. 255102, 2008.

ATES, M.; DANIELS, J.; ARSLAN, Z.; FARAH, I. O. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. **Environmental monitoring and assessment**, v. 185, n. 4, p. 3339-3348, 2013.

BECARO, A. A.; JONSSON, C. M.; PUTI, F. C.; SIQUEIRA, M. C.; MATTOSO, L. H.; CORREA, D. S.; FERREIRA, M. D. Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 3, p. 22-29, 2015.

BEER, C.; FOLDBJERG, R.; HAYASHI, Y.; SUTHERLAND, D. S.; AUTRUP, H. Toxicity of silver nanoparticles—nanoparticle or silver ion?. **Toxicology letters**, v. 208, n. 3, p. 286-292, 2012.

- BHAKTA, J. N.; JANA, B. B.; LAHIRI, S.; MANDAL, S. K.; PRADHAN, M. K. Impact of nanomaterial in environmental remediation and toxicity. **Int J Env Tech Sci**, v. 2, p. 38-52, 2016.
- BLIZZARD, T. A.; RUBY, C. L.; MROZIK, H.; PREISER, F. A.; FISHER, M. H. Brine shrimp (*Artemia salina*) as a convenient bioassay for avermectin analogs. **The Journal of antibiotics**, v. 42, n. 8, p. 1304-1307, 1989.
- BOLZAN, A.; MACHADO, R. Estudo de nucleação e crescimento de nanopartículas de prata obtidas por redução química. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 14291-14298, 2015
- BUTLER, G. C. Developments in ecotoxicology. **Ecological Bulletins**, p. 9-12, 1984.
- CHAPMAN, R.; MULVANEY, P. Electro-optical shifts in silver nanoparticle films. **Chemical physics letters**, v. 349, n. 5-6, p. 358-362, 2001.
- DE PAIVA MAGALHAES, D.; FERRAO-FILHO, A. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 3, 2008.
- DOS SANTOS, J. R.; DA SILVA, J. M. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 4, p. 565-573, 2007.
- DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; CONTI, R. D.; ALVES, O. L.; COSTA, F.; BROCCCHI, M. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949-959, 2010.
- FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Quim. Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.
- GREER, J. R.; STREET, R. A. Thermal cure effects on electrical performance of nanoparticle silver inks. **Acta Materialia**, v. 55, n. 18, p. 6345-6349, 2007.
- LARA, H. H.; AYALA-NÚÑEZ, N. V.; TURRENT, L. D. C. I.; PADILLA, C. R. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 615-621, 2010.
- Lee, Y. H.; Cheng, F. Y.; Chiu, H. W.; Tsai, J. C.; Fang, C. Y.; Chen, C. W.; Wang, Y. J. Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. **Biomaterials**, v. 35, n. 16, p. 4706-4715, 2014.
- LÖVESTAM, G.; RAUSCHER, H.; ROEBBEN, G.; KLÜTTGEN, B. S.; GIBSON, N.; PUTAUD, J. P.; STAMM, H. Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. **Joint Research Centre (JRC) Reference Reports**, p. 80004-1, 2010.
- MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias estratégicas**, v. 9, n. 18, p. 09-22, 2010
- MESARIČ, T.; GAMBARDELLA, C.; MILIVOJEVIĆ, T.; FAIMALI, M.; DROBNE, D.; FALUGI, C.; MAKOVECF, D.; JEMECA, A.; SEPČIĆ, K. High surface adsorption

properties of carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition, and biochemical responses in *Artemia salina* larvae. **Aquatic toxicology**, v. 163, p. 121-129, 2015.

MICHALET, X.; PINAUD, F. F.; BENTOLILA, L. A.; TSAY, J. M.; DOOSE, S.; LI, J. J.; SUNDARESAN, G.; WU, A. M.; GAMBHIR, S. S.; WEISS, S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. **science**, v. 307, n. 5709, p. 538-544, 2005.

MORGANTI, P. Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology: CCID**, v. 3, p. 5, 2010.

MU, L.; SPRANDO, R. L. Application of nanotechnology in cosmetics. **Pharmaceutical research**, v. 27, n. 8, p. 1746-1749, 2010.

MURPHY, M.; TING, K.; ZHANG, X.; SOO, C.; ZHENG, Z. Current development of silver nanoparticle preparation, investigation, and application in the field of medicine. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, p. 5, 2015.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; VAN STAPPEN, G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental pollution**, v. 144, n. 2, p. 453-462, 2006.

OZKAN, Y.; ALTINOK, I.; ILHAN, H.; SOKMEN, M.. Determination of TiO₂ and AgTiO₂ nanoparticles in *Artemia salina*: toxicity, morphological changes, uptake and depuration. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 96, n. 1, p. 36-42, 2016.

POOLE JR, C.P.; OWENS, F. J. **Introduction to nanotechnology**. John Wiley & Sons, 2003.

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

RADZIG, M. A.; NADTOCHENKO, V. A.; KOKSHAROVA, O. A.; KIWI, J.; LIPASOVA, V. A.; KHMEL, I. A. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 300-306, 2013.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology**: effects, environmental fate and risk assessment. 2. ed. Flórida: CRC press, 1995. 1133p.

ROCO, M. C.; MIRKIN, C. A.; HERSAM, M. C. Nanotechnology research directions for societal needs in 2020. **Retrospective and Outlook. National Science Foundation (Sponsor)**, 2010.

ROCO, M. C.; WILLIAMS, R. S.; ALIVISATOS, P. **Nanotechnology Research Directions: IWGN Workshop Report. Vision for Nanotechnology R&D in the Next Decade**. national science and technology council arlington va, 1999.

RUBINGER, C. F. Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais. **Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil**, 2009.

SAMBERG, M. E. ; OLDENBURG, S. J.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 3, p. 407-413, 2009.

SORGELOOS, P.; REMICHE-VAN DER WIELEN, C.; PERSOONE, G.. The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests—a critical analysis. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 2, n. 3-4, p. 249-255, 1978.

PIMENTEL, M. F.; SILVA JUNIOR, F. C. G.; SANTAELLA, S. T.; LOTUFO, L. V. C. O. Uso de *Artemia* sp. como organismo-teste para avaliação da toxicidade das águas residuárias do beneficiamento da castanha de caju antes e após tratamento em reator biológico experimental. **Journal Brazilian Society Ecotoxicology**. Itajaí, v.6, n.1, p.15-22, 2011.

VAN STAPPEN, G. Introduction, biology and ecology of *Artemia*. In: **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. FAO, 1996. p. 79-106.

WANG, C.; JIA, H.; ZHU, L.; ZHANG, H.; WANG, Y. Toxicity of α -Fe₂O₃ nanoparticles to *Artemia salina* cysts and three stages of larvae. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 847-855, 2017.

WANG, H.; HO, K. T.; SCHECKEL, K. G.; WU, F.; CANTWELL, M. G.; KATZ, D. R.; HOROWITZ, D.B.; BOOTHMAN, W. S.; BURGESS, R. M. Toxicity, bioaccumulation, and biotransformation of silver nanoparticles in marine organisms. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 23, p. 13711-13717, 2014.

ZARBIN, A. J.G. Química de (nano) materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469, 2007.

ZHANG, H.; SMITH, J. A.; OYANEDEL-CRAVER, V.. The effect of natural water conditions on the anti-bacterial performance and stability of silver nanoparticles capped with different polymers. **Water research**, v. 46, n. 3, p. 691-699, 2012.

ZHANG, K.; CHANG, H.; FU, A.; ALIVISATOS, A. P.; YANG, H. Continuous distribution of emission states from single CdSe/ZnS quantum dots. **Nano letters**, v. 6, n. 4, p. 843-847, 2006.

ZOU, S.; SCHATZ, G. C. Silver nanoparticle array structures that produce giant enhancements in electromagnetic fields. **Chemical Physics Letters**, v. 403, n. 1-3, p. 62-67, 2005.