



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ALEXIA RIQUET MARTINS

**TOXICIDADE AGUDA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (NpAg) EM
NÁUPLIOS DE *Artemia salina***

FORTALEZA

2023

ALEXIA RIQUET MARTINS

TOXICIDADE AGUDA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (NpAg) EM
NÁUPLIOS
DE *Artemia salina*

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado à Coordenação do
curso de graduação em
Biotecnologia, do Departamento
de Bioquímica e Biologia
Molecular, da Universidade
Federal do Ceará, como parte dos
requisitos para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Emilio de Castro

Miguel Coorientadora: Ana Kamila

Medeiros Lima

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na
PublicaçãoUniversidade
Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M341t Martins, Alexia Riquet.

Toxicidade aguda de nanopartículas de prata (NpAg) em náuplios de Artemia
salina /Alexia Riquet Martins. – 2023.

47 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do
Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Emílio de Castro Miguel.

Coorientação: Profa. Ma. Ana Kamila Medeiros Lima .

1. Nanopartícula de prata. 2. Toxicidade. 3. Naúplio. 4. Artemia salina. 5.
Microscopia. I.Título.

CDD 661

ALEXIA RIQUET MARTINS

TOXICIDADE AGUDA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (NpAg) EM
NÁUPLIOS
DE *Artemia salina*

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado à Coordenação do
curso de graduação em
Biotecnologia, do Departamento
de Bioquímica e Biologia
Molecular, da Universidade
Federal do Ceará, como parte dos
para obtenção do grau de
Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em 07/07/2023

BANCA EXAMINADORA

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

Ma. Ana Kamila Medeiros Lima (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Sergimar Kennedy De Piava Pinheiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A todos que me acompanharam nessa jornada acadêmica e acreditaram no meu potencial e que mesmo com todas as dificuldades não desistiram de mim.

RESUMO

Nanopartículas possuem uma dimensão entre 1 à 100 nm, promovendo novas propriedades em relação ao material original. As nanopartículas de prata (NpAg) são amplamente usadas em produtos do cotidiano como medicamentos, tintas, cosméticos e filtros solares. Em vista disso, esse estudo se propõe a analisar a aglomeração, toxicidade e efeitos morfológicos de tal partícula no modelo animal de *Artemia salina*, através de análises de aglomeração das partículas feitas por DLS (*Dynamic light scattering*), além de experimento de exposição, e imagens feitas tanto por microscopia ótica quanto eletrônica de varredura. Com a conclusão dos experimentos, pode-se notar que a partícula tem uma agregação uniforme independente do meio, e se observar um número maior de indivíduos mortos no estágio de naúplio 2, além de não se ter alterações morfológicas apenas uma fragilização do revestimento externo do animal. O que possibilitou a averiguação de que os indivíduos com o sistema digestivo completo são mais afetados pela nanopartícula de prata, possivelmente devido à sua ingestão e que a concentração empregada não influencia na aglomeração da partícula.

Palavras-chave: nanopartícula de prata; toxicidade; naúplio; *Artemia salina*; microscopia;

ABSTRACT

Nanoparticles are between 1 and 100 nm in size, providing new properties compared to the original material. Silver nanoparticles (NpAg) are widely used in everyday products such as drugs, paints, cosmetics, and sunscreens. In view of this, this study proposes to analyze the agglomeration, toxicity, and morphological effects of such a particle in the animal model of *Artemia salina*, through particle agglomeration analysis by DLS (Dynamic light scattering), as well as exposure experiment, and imaging by both optical and scanning electron microscopy. With the conclusion of the experiments, it can be seen that the particle has a uniform aggregation independent of the medium, and a greater number of dead individuals were observed in nauplii stage 2, and there were no morphological changes, only a weakening of the external coating of the animal. This allowed the verification that individuals with a complete digestive system are more affected by the silver nanoparticle, possibly due to its ingestion, and that the concentration used does not influence the agglomeration of the particle.

Keywords: silver nanoparticle; toxicity; nauplii; *Artemia salina*; microscopy;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Imagens <i>A.salina</i> exposta a água do mar artificial.....	34
Figura 2 – Imagens <i>A.salina</i> exposta a dicromato de potássio.....	35
Figura 3 – Imagens <i>A.salina</i> exposta a 6ppm de NpAg.....	
Figura 4 – Imagens <i>A.salina</i> exposta a 12,5ppm de NpAg.....	36
Figura 5 – Imagens <i>A.salina</i> exposta a 25ppm de NpAg.....	37
Figura 6 – Imagens <i>A.salina</i> exposta a 50ppm de NpAg.....	38
Figura 7 – Imagens <i>A.salina</i> exposta a 100ppm de NpAg.....	39
	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico – Análise de DLS da primeira hora de agregação da NpAg de 6ppm	
1 em AMA.....	21
Gráfico – Análise de DLS até 48 horas de agregação de NpAg de 6ppm de	
2 AMA.....	21
Gráfico – Análise de DLS da primeira hora de agregação da NpAg de	
3 12,5ppm em AMA.....	22
Gráfico – Análise de DLS até 48 horas de agregação de NpAg de 12,5ppm de	
4 AMA.....	22
Gráfico – Análise de DLS da primeira hora de agregação da NpAg de 25ppm	
5 em AMA.....	23
Gráfico – Análise de DLS até 48 horas de agregação de NpAg de 25ppm de	
6 AMA.....	23
Gráfico – Análise de DLS da primeira hora de agregação da NpAg de 50ppm	
7 em AMA.....	24
Gráfico – Análise de DLS até 48 horas de agregação de NpAg de 50ppm de	
8 AMA.....	24
Gráfico – Análise de DLS da primeira hora de agregação da NpAg de 100ppm	
9 em AMA.....	25
Gráfico – Análise de DLS até 48 horas de agregação de NpAg de 100ppm de	
10 AMA.....	25
Gráfico – Análise de DLS da primeira hora de agregação da NpAg de 6ppm	
11 em água ultrapura.....	26
Gráfico – Análise de DLS até 48 horas de agregação de NpAg de 6ppm de	
12 água ultrapura.....	26

Gráfico – Análise de DLS da primeira hora de agregação da NpAg de 13 12,5ppm em água ultrapura.....	27
Gráfico – Análise de DLS até 48 horas de agregação de NpAg de 12,5ppm de 14 água ultrapura.....	27
Gráfico – Análise de DLS da primeira hora de agregação da NpAg de 25ppm 15 em água ultrapura.....	28
Gráfico – Análise de DLS até 48 horas de agregação de NpAg de 25ppm de 16 água ultrapura.....	28
Gráfico – Análise de DLS da primeira hora de agregação da NpAg de 50ppm 17 em água ultrapura.....	29
Gráfico – Análise de DLS até 48 horas de agregação de NpAg de 50ppm de 18 água ultrapura.....	29
Gráfico – Análise de DLS da primeira hora de agregação da NpAg de 100ppm 19 em ultrapura.....	30
Gráfico – Análise de DLS até 48 horas de agregação de NpAg de 100ppm de 20 água ultrapura.....	30
Gráfico 21 - Análise da toxicidade aguda em N1 expostos a NpAg através da comparação entre o número de mortos e as concentrações respectivas observadas durante os períodos de experimentação de 24 e 48 horas.....	31
Gráfico 22 - Análise da toxicidade aguda em N2 expostos à NpAg através da comparação entre o número de mortos e as concentrações respectivas observadas durante os períodos de experimentação de 24 e 48 horas.....	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Nanopartículas de Prata (NpAg)	13
1.2 Agregação de NpAg	13
1.3 Toxicidade das nanopartículas	14
1.4 Organismo modelo.....	15
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral	16
2.2 Específicos	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Agregação de NpAg em água do mar artificial e água ultrapura	17
3.2 Toxicidade aguda de nanopartículas de prata em náuplios de <i>Artemia salina</i> estagios I e II.....	18
3.2.2 Análise morfológica dos indivíduos de <i>Artemia salina</i> expostos aos testes de toxicidade	19
4. RESULTADOS	21
4.1 Análises de aglomeração de NpAg com Água do mar artificial filtrada e NpAg com água ultrapura.....	21
4.2 Tendência de mortalidade	31
4.2.1 DL50	33
4.3 Análises morfológicas com imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia ótica	34
4.3.1 Controles	34
4.1.2 Exposição às concentrações de nanopartícula de prata.....	36
5 DISCUSSÃO	41

5.1 Aglomeração de nanopartículas (NpAg)	41
5.2 Toxicidade e mortalidade	42
5.3 Toxicidade e morfologia.....	43
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanopartícula de prata (NpAg)

Nanopartículas são estruturas em escala nanométrica que possuem, pelo menos, uma das dimensões menores que 100 nm. Seu tamanho pode variar de acordo com o método de produção e os elementos empregados na composição da partícula (ZIELINSKA et al., 2020). Essa redimensionalização da escala de tamanho promove propriedades diferentes das que seriam esperadas de serem observadas no material em dimensões originais, permitindo que os elementos já conhecidos anteriormente se comportem de maneira única, adquirindo propriedades e interações que podem ser aproveitadas de diversas novas formas (MOURDIKOUDIS; PALLARES; THANH, 2018). Podendo ser observada, essas novas características nas nanopartículas de prata, ouro, cobre, zinco, titânio e outros compostos orgânicos e inorgânicos, sendo que as de prata vem se popularizando no mercado por sua ação bactericida (COLMAN et al., 2014a, 2014b).

A prata é um dos elementos estudados principalmente pelas suas características antimicrobianas, um biomaterial que por anos foi empregando na desinfecção de feridas e no combate a microrganismos (DESHMUKH et al., 2019). Seu mecanismo de ação se baseia na liberação de íons de prata (Ag^+) que formam ligações fortes com moléculas biológicas sendo mais aceitas, as teorias em que esses íons promovem a oxidação da membrana bacteriana, afetando subsequentemente mente outros pontos do citoplasma promovendo a morte da célula ou por via de ligação ao DNA da bactéria impedindo sua replicação e com algumas enzimas impossibilitando a de produzir energia (GOKCEKAYA et al., 2021). Esses mecanismos de ação podem perder a eficácia quando a partícula sofre mudanças da sua escala nanométrica perdendo assim suas propriedades de nanopartículas, com o aumento de tamanho devido sua aglomeração no meio.

A nanopartícula de prata utilizada, em solução estoque de 600 ppm, é estabilizada com quitosana , e de acordo com analise de dispersão da partícula feita nessa solução estoque, os tamanhos que poderiam ser encontrados variavam de quantidades significativas de partículas entre 50 nanometros a 450 nanometros.

1.2 Agregação de NpAg

Como toda partícula, as nanopartículas de prata têm suas próprias tendências de agregação, dependendo do ambiente e dos elementos aos quais elas

são expostas. Contudo, deve-se considerar principalmente as tendências de aglomeração dos ambientes nos quais a partícula terá mais possibilidade de ser encontrada, seja durante o uso ou o descarte final. Essa tendência de aglomeração é outra característica crucial na determinação da toxicidade de algum componente ou substância, tendo em vista que sua biodisponibilidade afeta a forma que as partículas interagem com os organismos vivos ou não vivos aos seu redor (ARULVASU et al., 2014; COLMAN et al., 2014b).

O DLS (Espalhamento dinâmico de luz), caracteriza partículas de intervalos de tamanho nano a micro, com as medições feita através da passagem de dispersões de luz dinâmica em ângulos de medição diferentes, sendo o equipamento utilizado para fazer as análises das tendencias de aglomeração da NpAg, acompanhando as mudanças de tamanho durante os períodos pré-selecionados (ELZEY; GRASSIAN, 2010; MOTTA et al., 2023). Pois sua alteração física reflete diretamente nas suas interações com o meio, consequentemente com seus níveis de toxicidade.

1.3 Toxicidade de NpAg

As propriedades e ação das nanopartículas podem variar dependendo das suas características físico-químicas, tais como nano forma (tamanho nanométrico), forma iônica (forma carregada eletricamente) ou ligação com outros compostos químicos (ligada ou incorporada a outros elementos e moléculas) (DESHMUKH et al., 2019; GOKCEKAYA et al., 2021). Desse modo, tais fatores impactam significativamente no mecanismo de ação da partícula, e seus potenciais efeitos nos organismos (sejam eles macro ou microscópicos) (NEMMAR et al., 2013), gerando efeitos variados na sua eficiência e nos efeitos toxicológicos que essa partícula promove (ELSAESSER; HOWARD, 2012). Desse modo, é indispensável a testagem desses novos compostos tanto em viés de se comprovar sua eficiência quanto para garantir sua segurança para o descarte.

A presença de novos materiais em quantidades cada vez maiores, torna necessário a analise das variações que a presença, a curto e longo prazo dessas partículas ira proporcionar no ecossistema o qual ira receber quantidades cada vez maiores. O escalonamento no uso das nanopartículas de prata, atualmente a prata pode ser encontrada em tintas, eletrodomésticos, cosméticos, fármacos, na indústria têxtil (DESHMUKH et al., 2019), todo esse aumento no uso da prata demonstra que sua presença também tende a aumentar em sistemas de descarte principalmente de

esgoto (COLMAN et al., 2014a), seja ele doméstico ou industrial, o qual em muitas vezes não tem o tratamento apropriado para neutralizar ou coletar essa nova perticula.

Ademais, com as evoluções das pesquisas notou-se o impacto negativo que o acúmulo dessa partícula no ambiente pode acarretar, como interferir em importantes processos de sistemas biológicos presentes em corpos d'água (COLMAN et al., 2014b; NAM et al., 2014). Sendo o meio aquático o mais afetado pelo descarte, foi proposto um modelo que permitisse que se avaliasse essa toxicidade nesse meio e seu possível impacto na fauna (DE PAIVA PINHEIRO et al., 2023; MIGUEL et al., 2021). Além da estipulação de parâmetros, como a DL50, serem indispensável, para delimitar concentrações e descarte adequado desses resíduos. A DL50 é um parâmetro que é comumente utilizado em estudos biológicos, para a determinação da toxicidade de um composto qualquer, no qual se determina qual a concentração no qual 50% de uma dada população vem a óbito (MORRIS-SCHAFFER; MCCOY, 2021).

1.4 Organismo modelo

O organismo modelo selecionado para a experimentação foi a *Artemia salina*, por já ser um modelo altamente empregado em análises de toxicologia (MADHAV et al., 2017), seu tamanho e valor mercadológico pequenos, o que favorece o seu amplo uso na pesquisa e principalmente por ser um organismo aquático de água salgada sensível a mudanças no ambiente (RAJABI et al., 2015).

A *Artemia salina* é um crustáceo da família Artemiidae de água salgada, que se alimenta através da filtração, onde recolhe partículas do meio. Morfologicamente, é dividido por cabeça, tórax e abdômen e tem seu tamanho adulto variando de 10 a 20 mm de comprimento.

Seu desenvolvimento se baseia em dois estágios, sendo eles, naúplio I (N1) após 24 horas após a eclosão, com o corpo e órgão parcialmente desenvolvido, e estágio de naúplio II (N2), atingido após 48 horas de desenvolvimento com estrutura interna e externa já bem mais desenvolvidos. Importante salientar que o sistema digestivo do animal só está completamente formado após atingir o estágio de N2, assim podendo se alimentar de partículas encontradas no meio, não sendo mais dependente da própria reserva nutricional (GONÇALO DAS NEVES SILVA et al., [s.d.]; SORGELOOS; REMICHE-VAN DER WIELEN; PERSOONE, 1978).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Investigar a toxicidade aguda de nanopartículas de prata em náuplios de *Artemia salina*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar a agregação das NpAg em água do mar artificial e água ultrapura usando o equipamento de DLS;
- Diferenciar os efeitos da toxicidade aguda das NpAg em náuplios em estágios de desenvolvimento I e II e em diferentes concentrações (6, 12,5, 25, 50 e 100 ppm);
- Caracterizar as mudanças morfológicas sofridas por conta da exposição à NpAg nos dois estágios (N1 e N2) de desenvolvimento, por meio da microscopia ótica e eletrônica de varredura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Agregação de NpAg em água do mar artificial e água ultrapura

Para a análise da aglomeração das nanopartículas de prata, em água do mar artificial (AMA) 35 g/L (35 gramas de Red Salt para 1 litro de água destilada), no equipamento DLS (Dispersão Dinâmica de Luz), fora utilizado uma mistura feita minutos antes do início da testagem contendo água do mar artificial filtrada e a alíquota referente a concentração que se desejava testar. A coleta da alíquota foi feita com micropipetas automáticas a partir da solução padrão de 600ppm e homogeneizada em um tubo Falcon de 15 ml com a quantidade necessária de AMA para se obter 2ml de solução na concentração desejada. Note que as concentrações testadas foram 6, 12.5, 25, 50 e 100 ppm (partes por milhão) de nanopartícula de prata.

Com a amostra homogeneizada, 1 ml foi retirado, com o auxílio de uma pipeta automática, e colocado em cubeta de quartzo que por sua vez foi colocada no equipamento de DLS (Zetasizer Nano S – Malvern). As leituras programadas no sistema da máquina, se basearam nos intervalos de 1 horas, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 24 horas, 28 horas, 32 horas e 48 horas, sendo a primeira hora de leituras contínuas (120 leituras totais) e as seguintes de leituras únicas.

Para testagem da aglomeração, sem a interferência de íons no meio, o mesmo experimento foi reproduzido com a nanopartícula em dois meios. Inicialmente água do mar filtrada e depois reproduzido com água ultrapura, coletadas minutos antes do início do experimento para garantir o máximo possível de neutralidade do meio que entraria em contato com a partícula, utilizando-se as mesmas concentrações de antes 6, 12.5, 25, 50 e 100ppm. As leituras programadas no sistema da máquina também tiveram os mesmos intervalos, se basearam nos intervalos de 1 horas, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 24 horas, 28 horas, 32 horas e 48 horas, sendo a primeira hora de leituras contínuas (120 leituras totais) e as seguintes de leituras únicas. Com as tendencias de aglomeração da partícula, foi possível seguir para os testes de toxicidade, possibilitando uma melhor correlação entre a mortalidade e a tendencia de comportamento da partícula no meio.

3.2 Toxicidade aguda de nanopartículas de prata em náuplios de *Artemia salina* estagios I e II

A solução base de nanopartículas de prata utilizada foi a de concentração 600 ppm (partes por milhão) armazenada em ambiente resfriado. Note que essa solução padrão fora testada para garantir o tamanho das partículas presentes. Com a partícula base, o próximo passo é o cálculo e separação das medidas necessárias para as concentrações. As soluções escolhidas para serem testadas foram 6, 12.5, 25, 50 e 100 ppm (ARULVASU et al., 2014; ASADI DOKHT LISH et al., 2019; DE PAIVA PINHEIRO et al., 2020, 2023; UNAL; EGRI; ATES, 2022).

Cada concentração é calculada e medida tendo como base a solução de 600ppm inicial e para obter uma solução final de 10 ml para cada uma das concentrações desejadas, ou seja, 10 ml de 6, 12.5, 25, 50 e 100 ppm da nanopartícula diluída. Sendo misturada e homogeneizada com AMA, (a água do mar só foi misturada a nanopartícula de prata minutos antes de entrar em contato com as artêmias), produzida em laboratório a partir de Red Salt e água destilada, solução homogeneizada e filtrada com papel de filtro para evitar possíveis partículas maiores (MIGUEL et al., 2021).

O cultivo dos indivíduos da *Artemia salina*, foi feito em meio aquoso de água do mar artificial filtrada. Em um Erlenmeyer com 200 ml de água do mar filtrada em temperatura ambiente e adicionou-se 0,4g de cisto, com os cistos na água, fora colocado dentro do Erlenmeyer, um aerador de aquário (em contato com a água), para manter a oxigenação do meio, com a aeração ligada o Erlenmeyer foi posto em uma câmara de cultivo contendo luz de LED, para manter a luminosidade além da temperatura (entre 24~25 °C), para acompanhada por um termômetro.

Cada estágio de vida da artêmia tem seu tempo específico de desenvolvimento, sendo 24 horas para náuplio 1 (N1), onde os indivíduos estão parcialmente desenvolvidos e 48 horas para náuplio 2 (N2), já se obtém indivíduos completamente desenvolvidos.

Preparado as soluções e os náuplios no estágio desejado, foi separado placas de 24 poços (previamente identificada), e colocados 10 indivíduos vivos em cada poço da placa, com o auxílio de um estereoscópio, em 100 microlitros utilizando uma micropipeta automática. Para cada concentração (6, 12.5, 25, 50 e

100 ppm), montou-se três poços contendo 10 indivíduos em cada (triplicata), para se obter dados mais confiáveis possível. Em cada poço, os quais já tinham os 10 indivíduos, foi adicionado 2 ml da solução (correspondendo com a concentração demarcada na placa) (MIGUEL et al., 2021), iniciando-se assim o processo de exposição.

Durante o processo de exposição dos indivíduos, repetido igualmente em ambos os estágios de desenvolvimento N1 e N2, o número de mortos em cada poço foi contabilizado. Essas contagens se deram às 24 horas e ao fim das 48 horas do início da exposição. Ao fim do experimento, as artêmias foram coletadas com o auxílio da lupa e pipeta automática e armazenadas em eppendorfs identificados conforme a concentração.

3.2.2 Análise morfológica dos indivíduos de *Artemia salina* expostos aos testes de toxicidade

Ao fim do ensaio de toxicidade, imagens a fresco foram feitas no microscópio ótico. O procedimento se baseia em coletar um indivíduo vivo e colocá-lo em uma lâmina de vidro e por cima uma lamínula para que a imagem possa ser feita nos aumentos desejados, no caso desse experimento 40x. Os indivíduos restantes foram fixados com fixador de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio 0,1M), o bastante para cobrir toda a amostra.

Com a amostra já fixada, pode se seguir para a etapa de a desidratação, parte do processo para preparar as amostras para a microscopia no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450-FEG – FEI (MEV). A desidratação se baseia em uma série de lavagens, com intervalos de 45 minutos entre as lavagens, em sequência da amostra, iniciando com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (3 lavagens) e concentrações graduais de álcool (50%, 70%, 90% e 100%) sendo que a última concentração de 100% de álcool deve ser repetida três vezes, todo o processo feito em capela de exaustão e com luvas.

Terminado o processo de desidratação, segue-se para a retirada do álcool da amostra no equipamento de ponto crítico, as amostras foram colocadas em envelopes de papel de filtro, dentro de separações do suporte do equipamento (Secadora de Ponto Crítico Quorum K850 WM), identificadas com papel e

numeração a lápis, tudo imerso em álcool 100% dentro do tanque da máquina onde se dá início ao processo de resfriamento com nitrogênio líquido, seguido pelas trocas do álcool pelo nitrogênio até não se ter mais álcool na amostra e se iniciar o aquecimento até a preção ideal onde alcançado esse ponto pode-se aliviar a pressão do gás lentamente até zerar.

Ao fim do processo de ponto crítico, tem-se as amostras secas e prontas para montagem em *stubs*, preparados com fita de carbono e enumerados, para metalização em uma metalizadora QT150 ES – Quorum, com o objetivo de tornar as amostras condutíveis no microscópio. Ao fim do processo os *stubs* prontos são levados para o MEV e as imagens (magnitude 500,5.00 Kv, tamanho 200 nanômetros) dos indivíduos mais completo são feitas.

4 RESULTADOS

4.1 Análises de aglomeração de NpAg com Água do mar artificial filtrada e NpAg com Água ultrapura

Nas leituras da nanopartícula (concentração 6 ppm) com a água do mar artificial, foi possível notar (gráfico 1), que ao decorrer da primeira hora houve uma pequena queda inicial nos tamanhos, seguido por uma tendência de aumento, que não chegou a passar o tamanho de 230 nanômetros. Contudo, as medições já se iniciaram acima de 100 nanômetros, em contrapartida no gráfico 2 é possível ver que ao decorrer das 48 horas, a tendência foi de aumento sem queda até a última leitura marcando 2000 nanômetros.

Gráfico 1 e 2 - Análise de DLS da tendência de aglomeração das partículas de NpAg com concentração de 6ppm em AMA.

Gráfico 1:

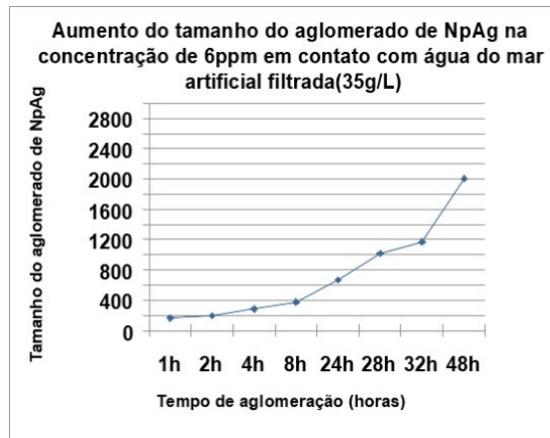
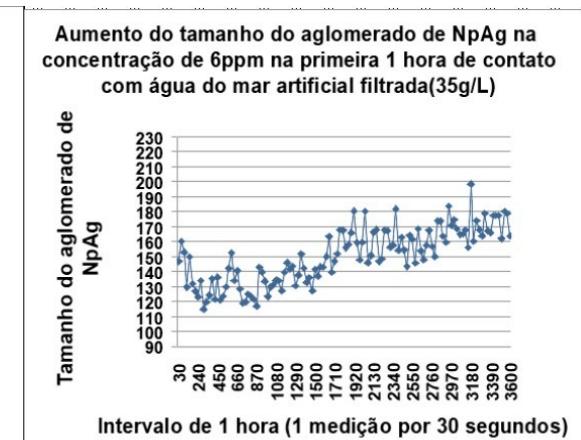


Gráfico 2:



Fonte: Elaborado pela autora

As análises obtidas com a concentração de 12,5 ppm também em água do mar artificial, seguiu a tendência de se manter na primeira hora de medição o tamanho abaixo de 230 nanômetros, Gráfico 3, com leituras iniciais maiores de 100 nanômetros, a tendência de agregação se mantém até a última leitura no Gráfico 4 onde é alcançado o tamanho inferior a 2000 nanômetros observado no Gráfico 2.

Gráfico 3 e 4 - Análise de DLS da tendência de aglomeração das partículas de NpAg com concentração de 6ppm em AMA.

Gráfico 3:

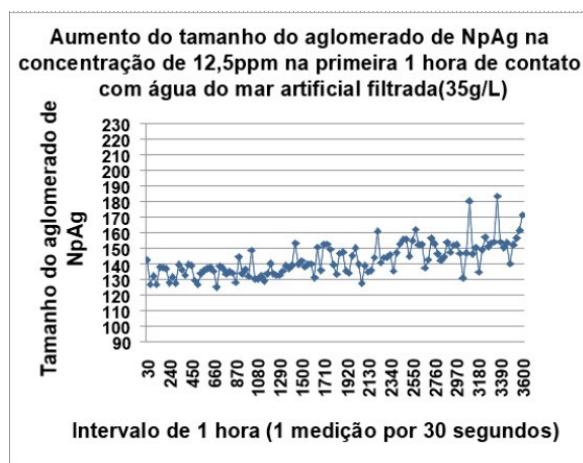
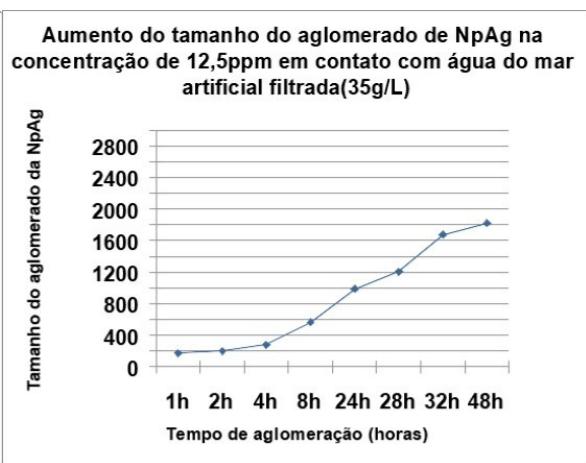


Gráfico 4:



Fonte: Elaborado pela autora

Com a concentração de a tendencia inicial, observada no Gráfico 5, foi quase uma curva perfeita, iniciando em um tamanho bem menor, se comparado as anteriores, por volta de 90 nanômetros, mas seguindo a mesma tendencia de se manter em um tamanho inferior a 230 nanômetros. Ademais, no decorrer das 48 horas seu comportamento teve uma tendencia de aumento até alcançar 32 horas, onde o tamanho caiu de 2400 para 1400 nanômetro. Sendo que na marca de 48 horas o tamanho foi superior ao observado nas outras concentrações (Gráficos 4 e 2), chegando por volta de 2800 nanômetros.

Gráfico 5 e 6 - Análise de DLS da tendencia de aglomeração das partículas de NpAg com concentração de 6ppm em AMA.

Gráfico 5:

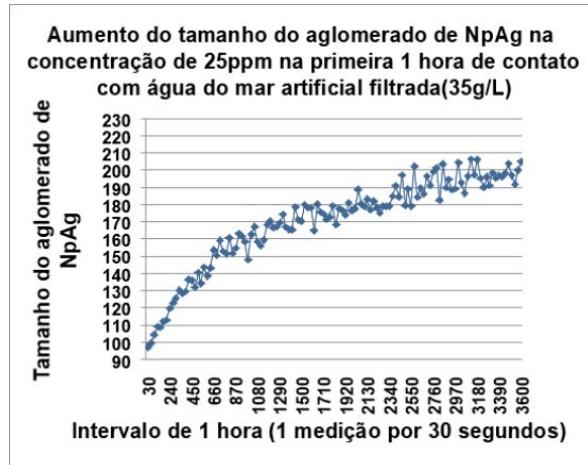
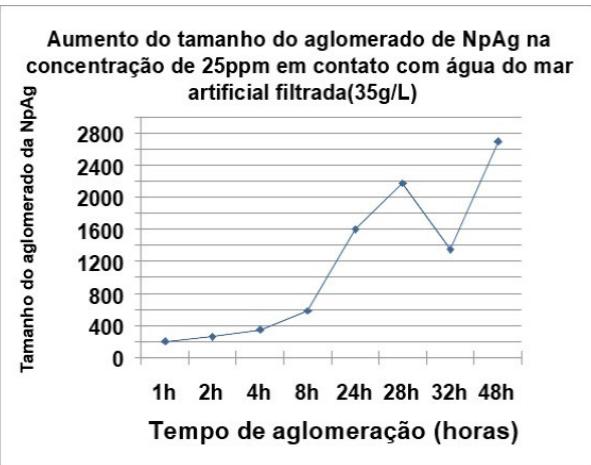


Gráfico 6:



Fonte: Elaborado pela autora

Novamente, como observado nas concentrações de 6 e 12.5, 50 ppm, as leituras iniciam com superiores a 90 nanômetros. Contudo, nas primeiras horas, diferente das outras tem um escalonamento mais rápido do tamanho das partículas, alcançando na última leitura o tamanho de 230 nanômetros, gráfico 7. Contrário ao que é visto nos gráficos 6, 4 e 2 o gráfico 8 tem uma leve crescente, mas se mantem bem abaixo do que fora observado antes, além da última leitura ficar em torno dos 600 nanômetros, bem abaixo dos 2000 nanômetros de antes.

Gráfico 7 e 8 - Análise de DLS da tendencia de aglomeração das partículas de NpAg com concentração de 6ppm em AMA.

Gráfico 7:

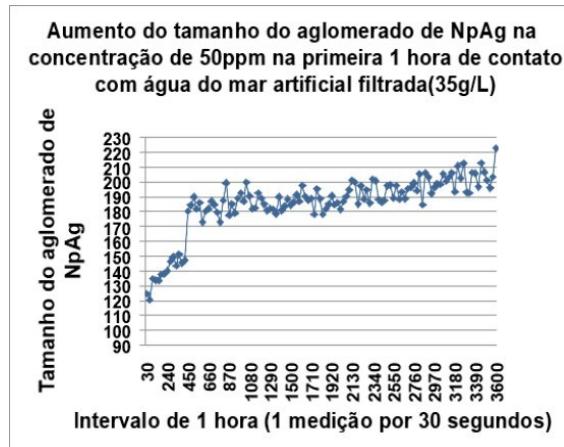
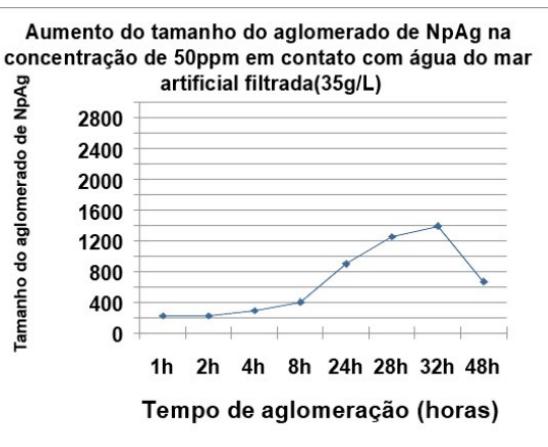


Gráfico 8:



Fonte: Elaborado pela autora

No gráfico 9, assim como os demais gráficos (1, 3, 5, e 7), mesmo que tenha uma tendência linear, ainda se mantém na leitura inicial maior que 90 nanômetros. Em contrapartida, o gráfico 10 é o mais discrepante dos demais, durante todo período de leitura, os pontos se mantiveram em leituras baixas, não passando os 600 nanômetros.

Gráfico 9 e 10 - Análise de DLS da tendência de aglomeração das partículas de NpAg com concentração de 6ppm em AMA.

Gráfico 9:

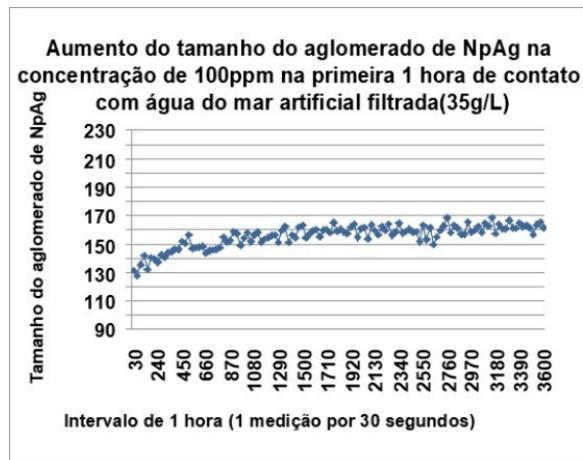
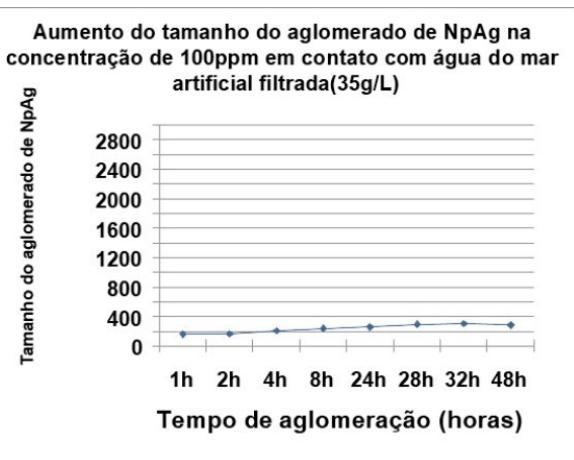


Gráfico 10:



Fonte: Elaborado pela autora

Todas as concentrações mantiveram a tendência de aumentar o tamanho da partícula na primeira hora, chegando próximo a 230 na última leitura da hora e iniciando com média de 100 nanômetros. Ao decorrer das leituras de 48 horas, as tendências foram aumentando o tamanho e chegando próximo a 2000 nanômetros. Contudo, o gráfico 10 mostra uma grande discrepância durante todas as medições em comparação aos outros referentes as demais concentrações.

Com viés comparativo, as medições das concentrações de nanopartícula de prata foram novamente feitas, agora com meio sendo trocado de água do mar artificial para água ultrapura, coletada mantes da mistura nanopartícula água ser feita. O gráfico 11, demostra as leituras de tamanho da concentração de 6 ppm com água ultrapura, é visível a discrepância em relação as outras análises da primeira hora feitas com água do mar filtrada, a primeira leitura inicia com 700 nanômetros e declina até se manter numa faixa de tamanho entre 300 e 100 nanômetros. Ademais, as leituras feitas posteriores a primeira hora, gráfico 12, captaram partículas que se mantiveram abaixo de 200 nanômetros.

Gráfico 11 e 12 - Análise de DLS da tendencia de aglomeração das partículas de NpAg com concentração de 6ppm em água ultrapura.

Gráfico 11:

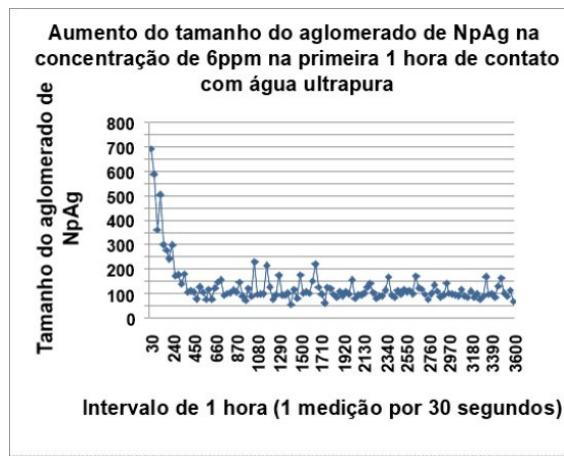
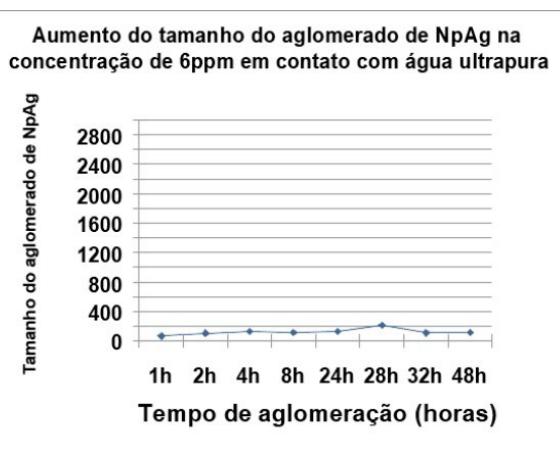


Gráfico 12:



Fonte: Elaborado pela autora

Voltando a tendência de tamanho observada nas amostras submetidas a água do mar filtrada, 12.5 ppm com água ultrapura na primeira hora teve suas primeiras leituras abaixo de 230, entre 110 e 140 nanômetros, sendo as seguintes formando uma tendência de tamanho linear entre essas medidas, como observado no gráfico 13. O gráfico 14, por sua vez, segue a tendência do gráfico 12 da concentração de 6 ppm, leituras abaixo de 200 nanômetros.

Gráfico 13 e 14 - Análise de DLS da tendência de aglomeração das partículas de NpAg com concentração de 6ppm em água ultrapura.

Gráfico 13:

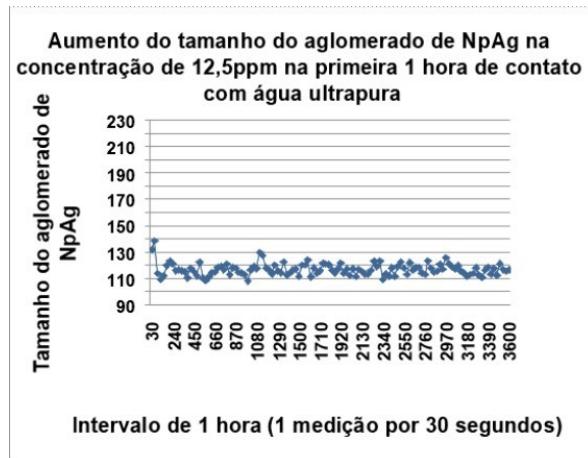
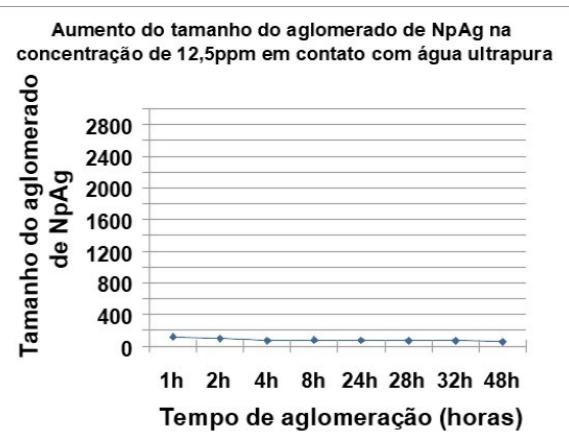


Gráfico 14:

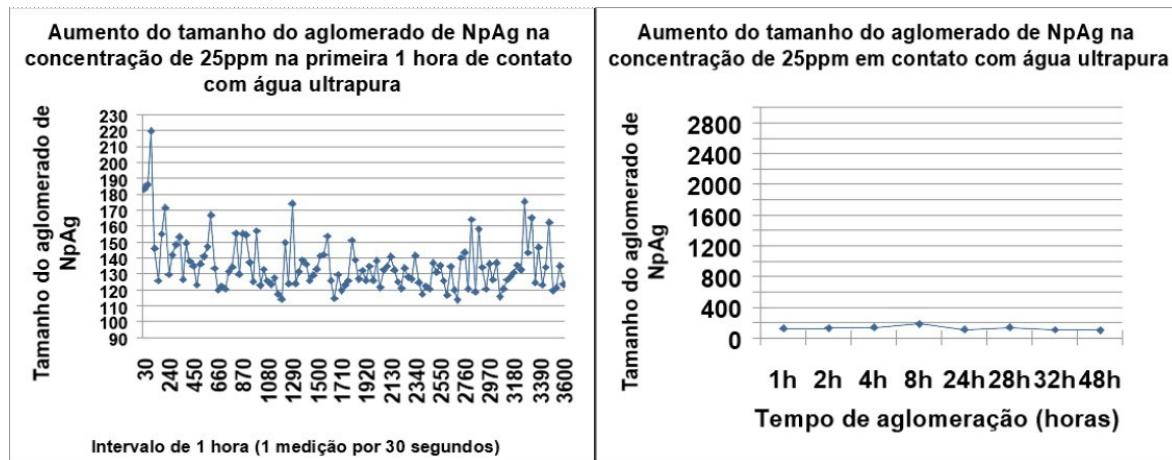


Fonte: Elaborado pelos autores

O gráfico 15, já mostra uma tendência mais dispersa das partículas em 25ppm, se mantendo abaixo de 230 nanômetros, mas tendo uma variação maior entre as leituras e iniciando com leituras mais altas acima de 180 nanômetros, as leituras seguidas da primeira hora se mantiveram abaixo dos 200 nanômetros como os gráficos (14 e 12).

Gráfico 15 e 16 - Análise de DLS da tendência de aglomeração das partículas de NpAg com concentração de 6ppm em água ultrapura.

Gráfico 15:



Fonte: Elaborada pelos autores

Os gráficos de 50 ppm (gráfico 17 e 18), com água ultrapura se assemelham muito com os observados em 12.5 ppm, primeira hora com valores similares entre 130 e 160, sem tendência de aumento ou diminuição do tamanho e nas horas seguintes se manteve com leituras de tamanho menores que 200 nanômetros.

Gráfico 17 e 18 - Análise de DLS da tendência de aglomeração das partículas de NpAg com concentração de 6ppm em água ultrapura.

Gráfico 17:

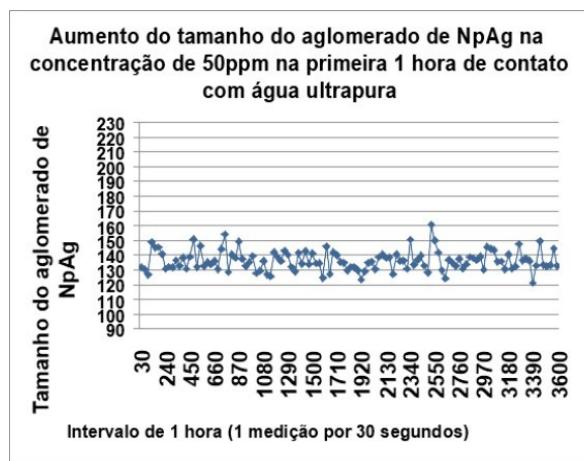
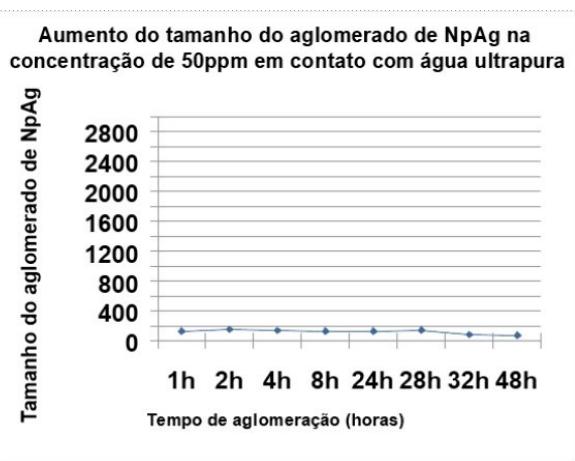


Gráfico 18:



Fonte: Elaborada pelos autores

Com a mesma tendência de 12.5, 25 e 50 ppm, os gráficos com os resultados da concentração de 100 ppm e água ultrapura ficam abaixo de 230, com menor leitura sendo 120 e maior 170 nanômetros no gráfico 19. No gráfico 20 das leituras até 48 horas de aglomeração se mantêm abaixo de 200 nanômetros.

Gráfico 19 e 20 - Análise de DLS da tendência de aglomeração das partículas de NpAg com concentração de 6ppm em água ultrapura.

Gráfico 19:

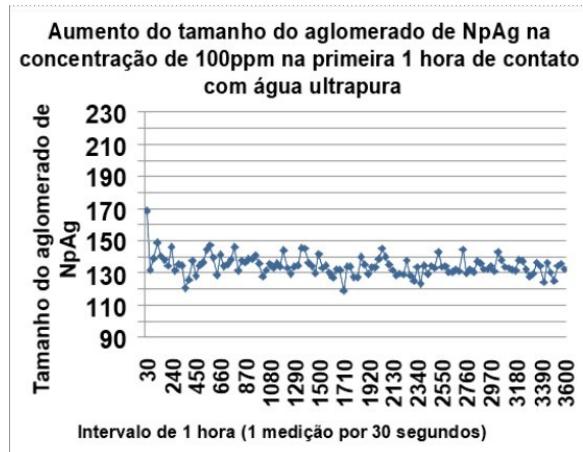
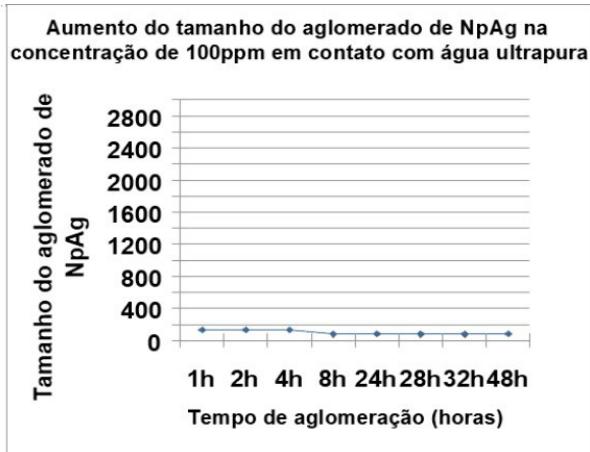


Gráfico 20:

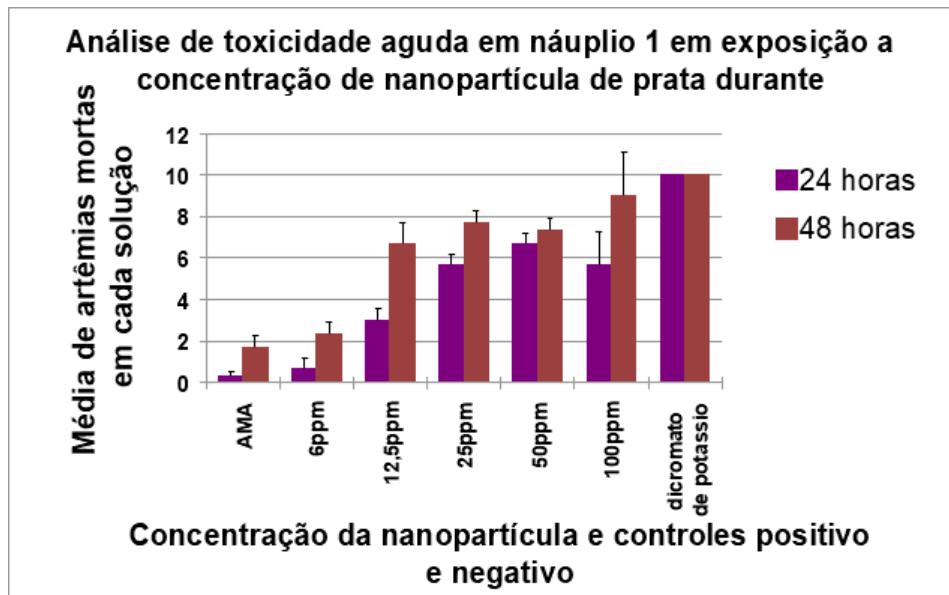


Fonte: Elaborada pelos autores.

Repetindo o teste com água ultrapura, é possível detectar que na concentração de 6ppm há um declínio anormal de um tamanho consideravelmente maior nas primeiras leituras, que não fora observado em nenhuma outra concentração. Em contrapartida, todas as outras leituras da primeira hora mantiveram o padrão de ficar abaixo de 230 nanômetros assim como o obtido nas com água do mar filtrada. No entanto, as leituras seguintes de até 48 horas, se mantiverem bem abaixo de 200 nanômetros, sendo a única discrepância desse conjunto de gráficos o de 100 ppm com água do mar artificial, o qual teve leituras que chegaram próximas aos 400 nanômetros.

4.2 Tendencia de mortalidade

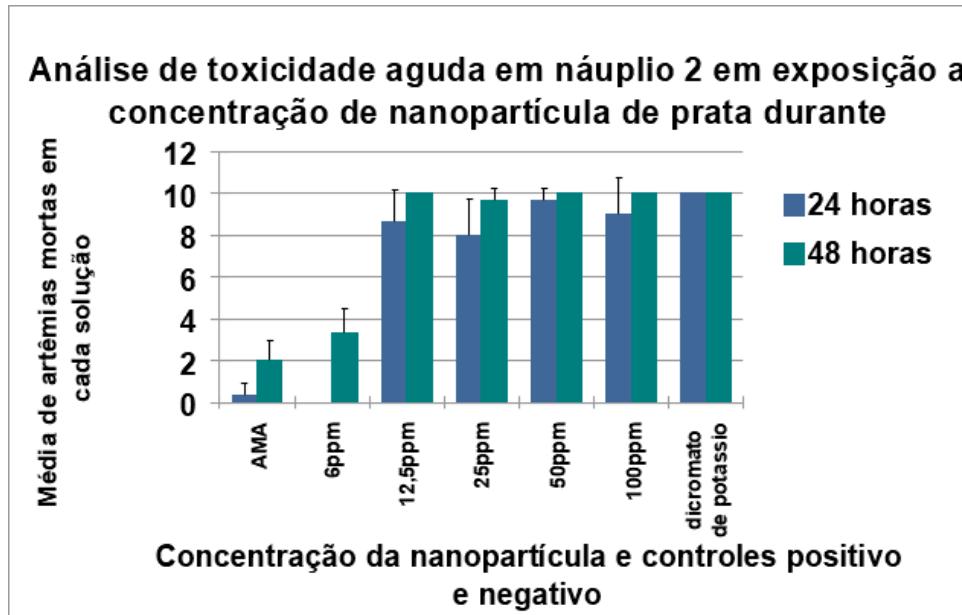
Gráfico 21 - Análise da toxicidade aguda em N1 expostos a NpAg através da comparação entre o número de mortos e as concentrações respectivas observadas durante os períodos de experimentação de 24 e 48 horas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os espécimes em estágio de náuplio 1 apresentaram uma tendência crescente no número de indivíduo mortos, sendo que com 24 horas de exposição nas concentrações de 24,50 e 100 ppm já se tinha passado dos 50% de mortos em uma tendência de curva a qual as mortes voltaram a diminuir em 100 ppm. Chegando em 48 horas apenas 6 ppm e o controle negativo (água do mar artificial filtrada ou AMA) não haviam alcançado a margem de 50%. Os valores foram escalonando em reta com 100 ppm sendo o que continha o maior número de mortos, excluindo o controle positivo.

Gráfico 22 - Análise da toxicidade aguda em N2 expostos à NpAg através da comparação entre o número de mortos e as concentrações respectivas observadas durante os períodos de experimentação de 24 e 48 horas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com náuplio 2, a tendência foi de quase 100% de mortos nas primeiras 24 horas, novamente 6 ppm e controle negativo se mantiveram abaixo desse parâmetro comparados às demais concentrações, mesmo com as 48 horas, não sendo possível a comparação de letalidade entre as concentrações.

4.2.1 DL50

Note que apenas nos dados de N1, na primeira contagem de 24 horas fora possível estabelecer uma DL50. Em vista, de que os dados iniciais coletados de N2 já demonstravam valor de quase 100% de mortos em todas as concentrações exceto 6 ppm e AMA, nas primeiras 24 horas, não sendo possível assim calcular um valor para DL50 das artêmias em estágio de N2 nem na contagem de 24 nem de 48 horas.

O único valor de DL50 calculável, a partir os dados coletados fora para N1 nas primeiras 24 horas de exposição, obtendo-se a concentração de 21,86 ppm para essa DL50. Em 48 horas, a equação gerada não possibilitou o cálculo do valor.

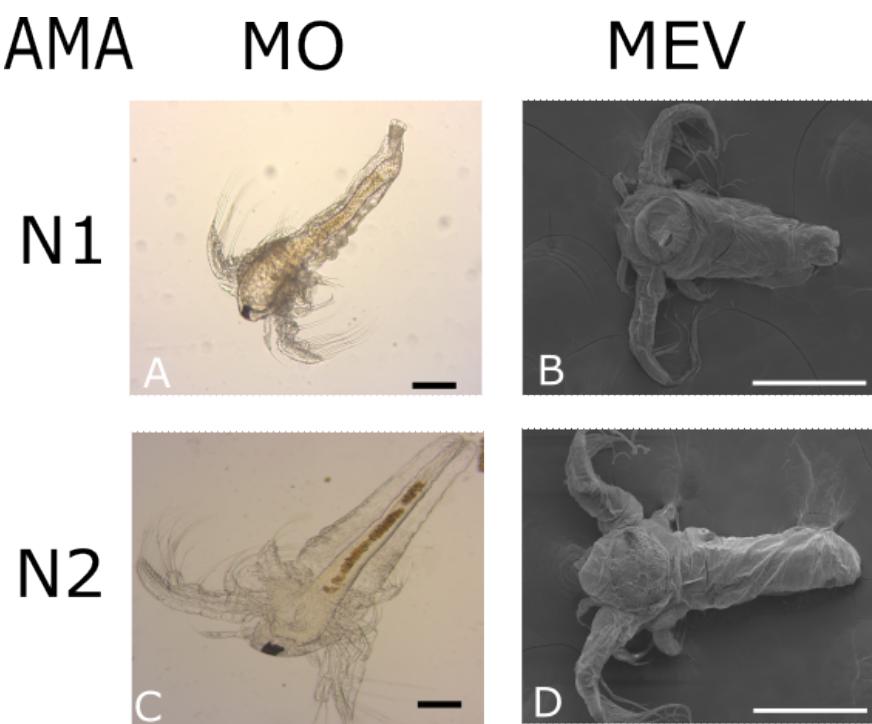
Devido os dados para N2, os quais foram valores próximos, o que não permite o estabelecimento da equação da reta, portanto não é possível calcular a DL50, devido há não haver uma dispersão no número de mortos mais sim uma uniformidade.

4.3 Análises morfológicas com imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica

4.3.1 Controles

Artêmias expostas apenas a água do mar artificial filtrada em concentração de 35g/L de sal marinho, foi considerado o controle negativo (C-) utilizados para o experimento. Não foram observados danos estruturais, morfológicos ou a presença de partículas externas nas artêmias (figura 1- A e C), além de nenhum dano ao exoesqueleto do animal (figura 1-B e D), pode se perceber que as artêmias que iniciam o experimento em estágio de desenvolvimento N1 ao final do mesmo alcançaram o estágio N2 sem intercorrências no desenvolvimento padrão do animal (figuras 1- A e B).

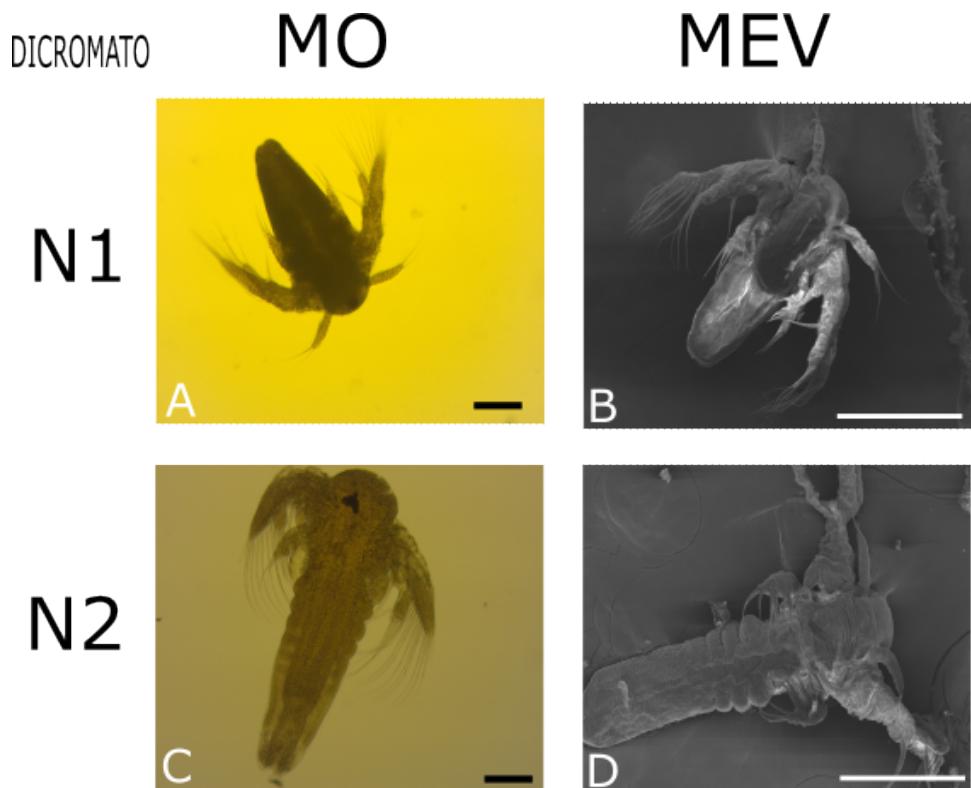
Figura 1 - Amostras de água do mar filtrada (AMA): A) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 1 em AMA (controle negativo), B) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 1 em AMA (controle negativo), C) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 2 em AMA (controle negativo), D) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 2 em AMA (controle negativo).



Fonte: Elaborado pelos autores.

O dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), em concentração 0,05 mol/L foi o controle positivo (C+) do experimento. Nessa situação, é perceptível e esperada a morte de todos os indivíduos, sem causar danos morfológicos significativos ao animal (figura 2-A e C). A morte rápida do animal interfere no ciclo de desenvolvimento, as artêmias que iniciaram o experimento em fase de N1 (figura 2 - A e B) não se desenvolveram para alcançar o estágio de N2 (figura 2 – C e D).

Figura 2 - Amostras de *A. salina* em dicromato de potássio: A) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 1 em dicromato (controle positivo), B) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 1 em dicromato (controle positivo), C) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 2 em dicromato (controle positivo), D) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 2 em dicromato (controle positivo).

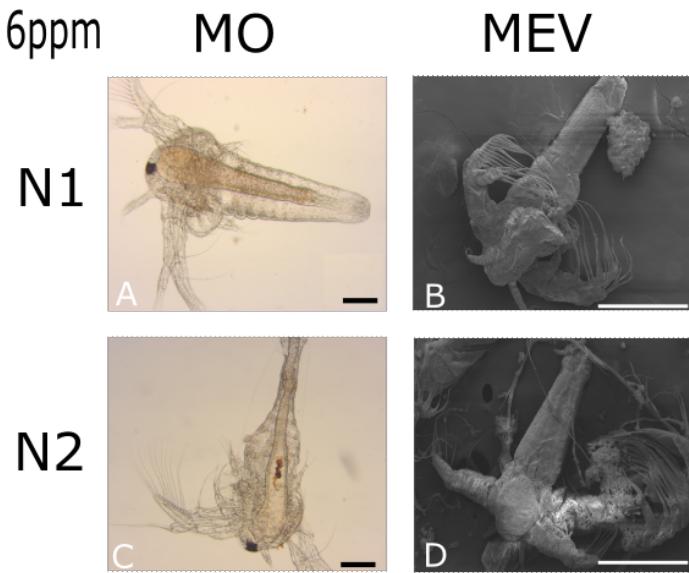


Fonte: Elaborado pelos autores.

4.1.2 Exposição a concentrações de nanopartícula de prata

Nas artêmias expostas a concentração de 6ppm da nanopartícula de prata, foram encontradas poucas alterações morfológicas, sendo o estágio de desenvolvimento das artêmias iniciadas em N1 completado para N2 (Figura 3-A e B). Além de nenhuma entrada aparente de partícula no trato digestivo do animal (Figura 3-A e C), não é observável danos morfológicos em ambas as microscopias, olhos, antenas e apêndices demostram constituição similar ao controle nas artêmias expostas apenas a água do mar artificial (figura 3 – B e D).

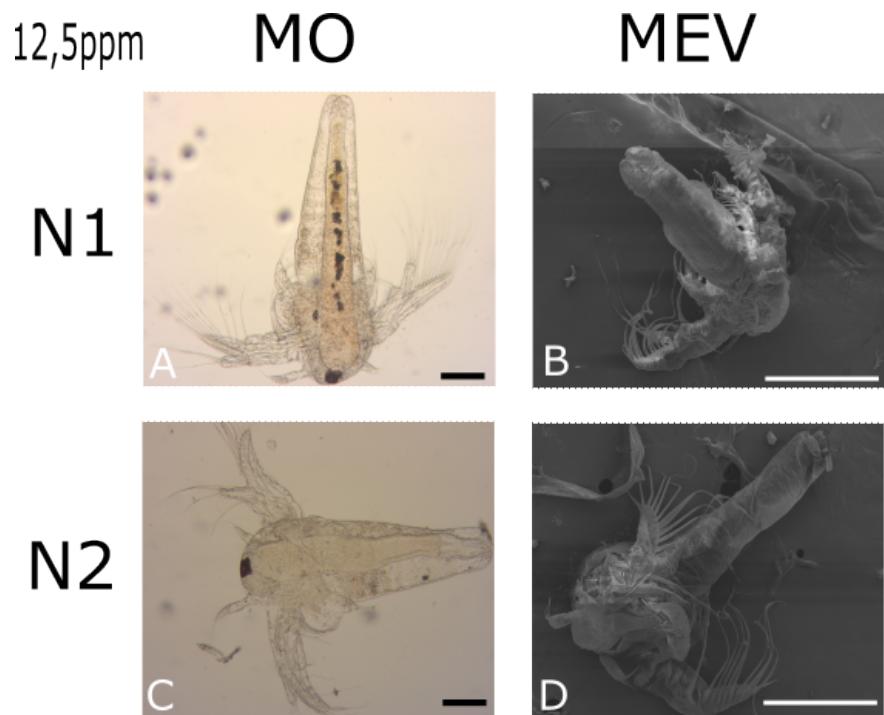
Figura 3 - Amostra de *A. salina* em nanopartícula na concentração de 6ppm: A) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 1 em concentração de 6ppm, B) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 1 em concentração de 6ppm, C) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 2 em concentração de 6ppm, D) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 2 em concentração de 6ppm.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Na concentração de 12,5ppm já é possível notar a presença de partículas no trato digestivo do animal, mas apenas no estágio de N1 (figura 4-A). Não é percebido comprometimento no desenvolvimento do animal para as artêmias, iniciado em N1 (figura 4-A e B), ou alterações morfológicas significativas, apêndices, olho e antenas bem desenvolvidos, com poucos ou nenhum dano observável (figura 4 – B e D).

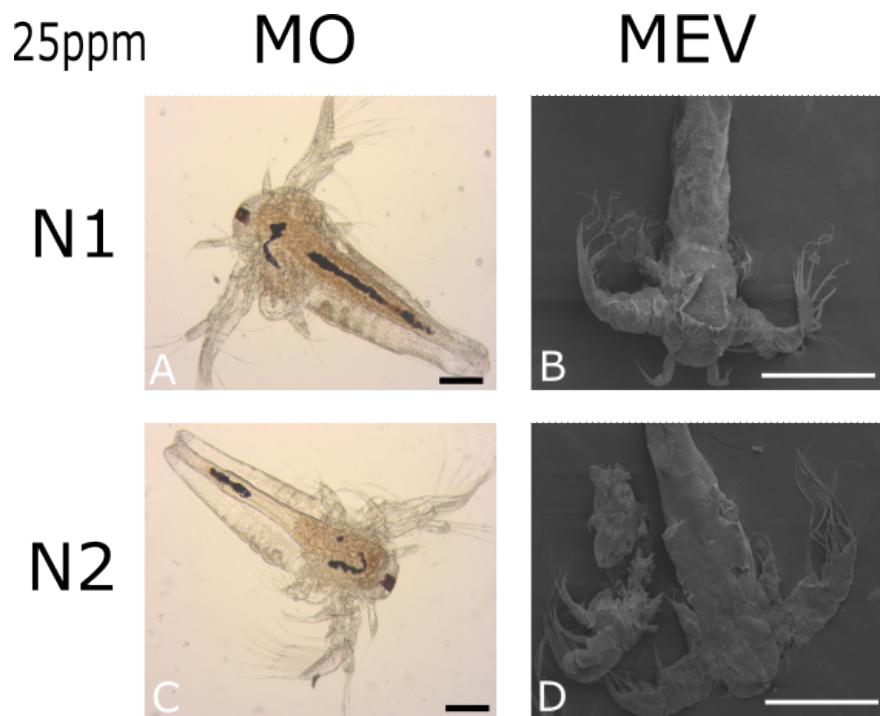
Figura 4 - Amostra de *A. salina* em nanopartícula na concentração de 12,5ppm: A) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 1 em concentração de 12,5ppm, B) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 1 em concentração de 12,5ppm, C) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 2 em concentração de 12,5ppm, D) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 2 em concentração de 12,5ppm.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Com a concentração de 25ppm, já é possível encontrar uma quantidade bem maior de partícula no trato digestivo sendo que N1 (figura 5-A) apresenta uma quantidade maior que N2 (figura 5-C), danos externos ou alterações morfológicas não são perceptíveis nas imagens de óptico, contudo, nas de microscopia eletrônica de varredura, (figura 5 – B e D), é possível identificar que o animal ficou mais frágil, com maiores rugosidades no exoesqueleto e rupturas no envoltório, possivelmente ficara mais suscetível a danos causados pelo processamento.

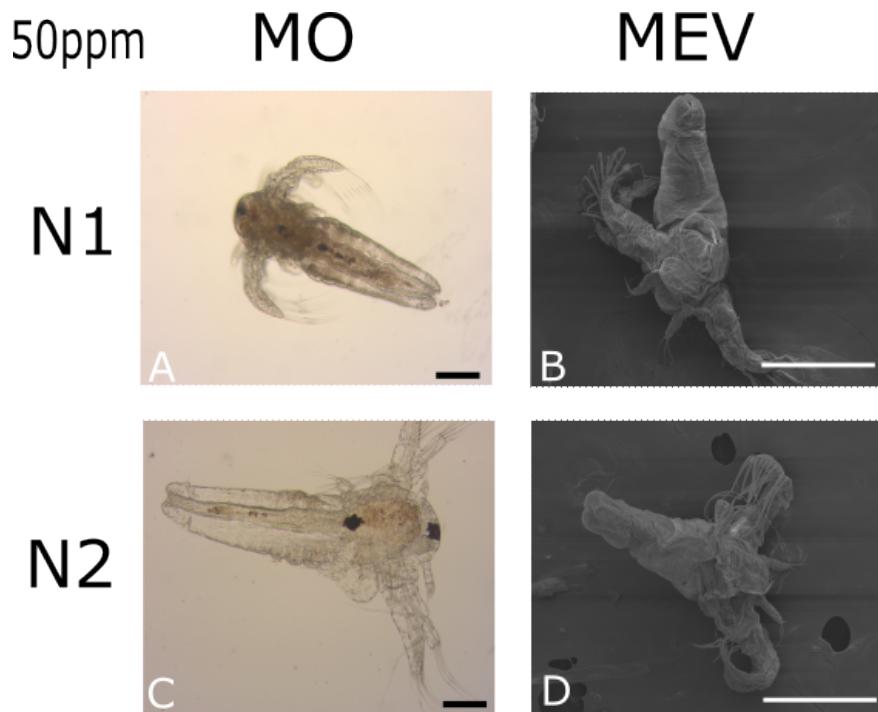
Figura 5 - Amostra de *A. salina* em nanopartícula na concentração de 25ppm: A) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 1 em concentração de 25ppm, B) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 1 em concentração de 25ppm, C) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 2 em concentração de 25ppm, D) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 2 em concentração de 25ppm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Em comparação à 25ppm, as amostras de 50ppm já apresentam uma redução na quantidade de partículas presentes no interior no animal (figura 5-A e B e figura 6-A), nas imagens de ótico ainda não apresentam danos morfológicos, contudo, nas imagens de MEV apresentam os danos externos e enrugamento do exoesqueleto já perceptível nas de 25ppm (figura 5-B e D), entretanto com uma redução nos danos mesmo que mais significativos quando comparados a 6 e 12,5 (figura 3 e 4- B e D).

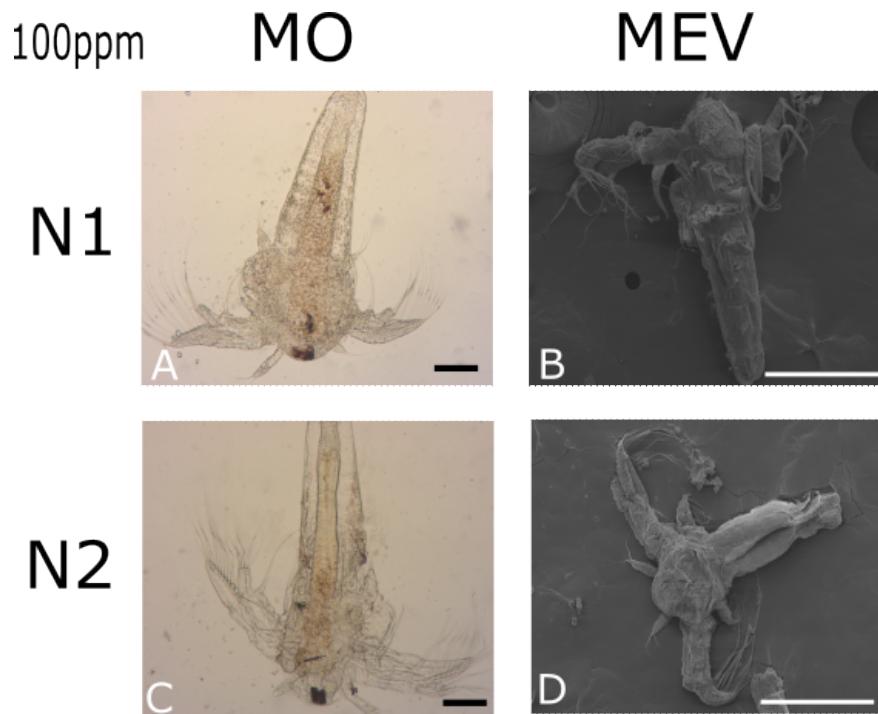
Figura 6 - Amostra de *A. salina* em nanopartícula na concentração de 50ppm: A) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 1 em concentração de 50ppm, B) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 1 em concentração de 50ppm, C) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 2 em concentração de 50ppm, D) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 2 em concentração de 50ppm.



Fonte: Elaborado pela autora.

As imagens de 100 ppm são similares à de 6 ppm com relação ao conteúdo do trato digestivo do animal, não sendo visível partícula no interior (figura 7- A e C), e sem nenhuma alteração morfológica significativa (figura 3 e 7-A e C), antenas apêndices e olhos presentes como observado em todas as imagens anteriores, mesmo que as imagens de MEV possam demonstrar algum dano externo e rugosidades, além dos danos perceptíveis no N2 (figura 7-C) tais danos podendo ser atribuído ao tratamento da amostra para a microscopia.

Figura 7 - Amostra de *A. salina* em nanopartícula na concentração de 100ppm: A) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 1 em concentração de 100ppm, B) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 1 em concentração de 100ppm, C) *A. salina* em microscopia óptica amostra do experimento com náuplio 2 em concentração de 50ppm, D) *A. salina* em microscopia eletrônica de varredura amostra do experimento com náuplio 2 em concentração de 100ppm.



Fonte: Elaborada pela autora.

5 DISCUSSÃO

5.1 Aglomeração da partícula (NpAg)

Os experimentos demonstraram que a NpAg tem tendências similares de aglomeração, se mantendo numa faixa fora do que seria esperado para o seu tamanho original, independente da concentração utilizada, contudo, a discrepante alteração no período de 48 horas entre as mesmas concentrações feitas analisadas em soluções diferentes demonstrou que algo no meio interferiu no tamanho e na tendência das aglomerações (CARAPAR et al., 2022). Sendo as partículas encontradas na água ultrapura menores que as encontradas na água do mar artificial no mesmo período de tempo.

Com isso e de acordo com (ELZEY; GRASSIAN, 2010; WEI et al., 2015), os quais afirmam que o pH interfere na aglomeração da partícula, particularmente os meios ácidos, quanto mais ácido maior é a tendência de diluição, o que pode-se relacionar ao possível pH básico da água do mar artificial, se levarmos em consideração que, mesmo não tendo medido o pH durante o experimento, de acordo com o fabricante do sal utilizado (Red Salt) o pH da solução ficaria em torno de 8, sendo um valor básico (BURIĆ et al., 2023; FERREIRA et al., 2023; YONTAR; ÇEVIK, 2023) .

Em contrapartida, se espera da água ultrapura tenha neutralidade de íons, ou seja, livre de componente que possam afetar o seu pH em primeiro momento (FERREIRA et al., 2023; PERETYAZHKO; ZHANG; COLVIN, 2014), contudo, necessita-se averiguar se houve algum processo de acidificação do meio (MA et al., 2023; MESSINA; COSTANTINI; EENS, 2023) devido ao tempo a qual a água ultrapura ficou em contato com a partícula e se for devido a esses ácidos presentes no meio que a tendência dos gráficos de 48 horas foi se manter abaixo dos 200 nanômetros.

Outra abordagem sobre o porquê de se ter encontrado tal intervalo de tamanho na água ultrapura pode-se basear em duas vertentes além da acidificação da água. A primeira sendo que as partículas se agregaram rapidamente e não foram detectadas na leitura do equipamento, essa hipótese descartaria o pH como principal agente de agregação no meio, ou pode-se considerar que a neutralidade da água não favoreceu as partículas se agregarem e elas tenderam a ficar diluídas no meio, (BURIĆ et al., 2023; FERREIRA et al., 2023; YONTAR; ÇEVIK, 2023) sendo possivelmente mais diluídas pela sua acidificação pela liberação de íons H⁺

pela água.

Todos os parâmetros se encaixariam como formas de justificar os dados obtidos nas análises de tamanho feitas em DLS, não sendo essencialmente relevante a concentração da nanopartícula no meio, mas sim o pH do mesmo para aumentar ou retardar a aglomeração.

Comparando os dados dos gráficos pode-se perceber que o tamanho da partícula não interferiu na mortalidade em vista que, menos com partículas maiores 6 ppm em água do mar matou menos que 100ppm que teve valores de agregação menores. Também é importante ressaltar o valor obtido na dl50 que foi possível calcular, (21,86), um valor de concentração próximo do intermediário, onde se tem o maior número de mortos alem de uma queda no tamanho das partículas.

5.2 Toxicidade e mortalidade

De acordo com (BECARO et al., 2015; LIU; HURT, 2010; PALÁCIO et al., 2021), nanopartículas de prata são ingeridas por nauplios de *A. salina* e podem se aglomerar no trato digestório do animal, interferindo assim na ingestão de alimentos, impedindo, absorção de nutrientes, o que levaria morte deles por uma má nutrição, as partículas de prata impediriam que os nutrientes entrassem no corpo do animal.

Contudo, não fora disponibilizado nutrição no meio, o que não interferiria na absorção de nutrientes do animal, pois o experimento já foi programado tendo em vista as reservas nutricionais presentes durante o desenvolvimento do cisto (ARULVASU et al., 2014; DE PAIVA PINHEIRO et al., 2023; GONÇALO DAS NEVES SILVA et al., [s.d.]; KOWALSKA-GÓRALSKA et al., 2011), ou seja, mesmo que não houvesse nenhum nutriente no meio para ser ingerido ou se a partícula impedisse essa absorção o próprio animal já teria os nutrientes necessários para sobreviver durante o período do experimento.

Ademais, os espécimes em água do mar artificial (controle em que todos os indivíduos devem permanecer vivos), não apresentaram as mesmas mortes mesmo na ausência de alimentação, o que reforçaria que as mortes levadas pela ingestão da partícula nos períodos acompanhados não se deram por obstrução do trato digestivo.

Também é importante ressaltar que em N1, estágio no qual os indivíduos não tinham trato digestivo completo nas primeiras 24 horas, teve-se um aumento considerável no número de mortos, mesmo nos casos sem partículas no interior do

animal, ou seja, o mecanismo de toxicidade da nanopartícula não estaria relacionado ao impedimento da nutrição da artêmia, ou a ingestão da partícula diretamente para oferecer um grau letal de toxicidade.

A ingestão pode ser relacionada como um meio de aumentar o nível de letalidade da partícula (BURIĆ et al., 2023; YONTAR; ÇEVIK, 2023), entretanto, a ingestão é um mecanismo secundário em relação a exposição, ou seja, intensifica os riscos. Como vistos que N1, mesmo sem ingestão se obteve um número de mortes relativamente alto e as partículas foram encontradas dentro dos animais, o próprio contato pode levar a infiltrar a partícula pelo exoesqueleto de uma forma ainda desconhecida (DAS NEVES et al., 2023; LARESE et al., 2009; MOHAMADHOSSINE et al., [s.d.]), além da relação entre tamanho da partícula e seu nível de toxicidade não terem sido esclarecidos por completo, o que necessitaria de experimentos mais aprofundados e específicos para cada perspectiva, com uma acompanhamento diferenciado do processo de intoxicação do animal (ALI, 2023) .

5.3 Toxicidade e morfologia

Outro fator que pode ter interferido nos resultados obtidos nos testes de toxicidade é o armazenamento como colocado em (AHLBERG et al., 2014; GORHAM et al., 2014; KITTLER et al., 2010; LOK et al., 2007). O armazenamento da nanopartícula pode vir a interferir no seu nível de toxicidade, quanto mais velha (produzida a mais tempo) for a nanopartícula maior será a quantidade de íons liberados em suspensão e maior será seu efeito tóxico. Afetando diretamente as taxas de mortalidade que podem ser obtidas nos experimentos, uma variável não mensurada por completo, ou seja não há estudo que estipule uma data limite em que a partícula alcançara a toxicidade máxima em solução nem se o método de produção afeta essa tendência de liberação dos íons em solução.

Em outro ponto de vista, as imagens de MO e MEV apresentam uma diminuição na quantidade de nanopartículas encontradas dentro da artêmia, à medida em que se aumenta a concentração da nanopartícula, sendo praticamente inexistente em 6 e 100 ppm.

Ademais, é possível fazer um paralelo entre as concentrações e a existência de partículas no intestino, pois, mesmo que 100 ppm não apresente a partícula ingerida, tem uma quantidade de mortos muito superior à 6ppm, podendo-se concluir que a ingestão não é o único mecanismo que influencia na toxicidade, mas contribui significativamente para agravar seus efeitos, sendo a alta concentração o maior responsável pelas mortes.

Em paralelo a morte dos indivíduos temos seu desenvolvimento durante o período do experimento, pois os indivíduos que iniciaram os testes em estágio de N1 ainda tem a tendência biológica de continuar seu desenvolvimento. Foi observado que, mesmo com algumas rugosidades observadas no exoesqueleto, que também podem ser atribuídas ao processo de preparação das artêmias para microscopia, que é um animal delicado e o processo é agressivo a amostra, os indivíduos de N1 em comparação geral atingiram o estágio de desenvolvimento de N2 em todas as concentrações expostas.

Temos, em outra perspectiva, mortes que não estão diretamente relacionadas a falhas no desenvolvimento, o que se pode teorizar que foram mortas após alcançarem o estágio de N2. Além de não se vincular ao processo de desenvolvimento, o aumento da mortalidade não se vincula a danos ao exoesqueleto do animal, em vista que não foi comprovado danos morfológicos externos significativos, podendo-se atrelar os encontrados ao processamento para microscopia, o qual é agressivo para a amostra frágil.

Análoga a possibilidade de que a ingestão aumente a probabilidade de morte, outro ponto é de que só é possível perceber as partículas ou aglomerados de partículas, no trato digestivo as quais são visíveis ao olho humano, já que análises em microscópios de maior potência de resolução não foram feitas (ARULVASU et al., 2014; DE PAIVA PINHEIRO et al., 2020, 2023; MIGUEL et al., 2021), como a microscopia eletrônica de transmissão.

6 CONCLUSÃO

Portanto, com o presente estudo conclui-se que, baseado na comparação dos gráficos, a aglomeração da partícula não demonstra discrepância significativa ao variar a concentração seja em água do mar filtrada ou água ultrapura, não mostrando ter relação direta com os níveis de mortalidades encontrados nos testes de toxicidade. A mortalidade, por outro lado, pode ter uma relação direta com o consumo das partículas, pois, (12,5 e 25ppm) apresentaram mais mortes e mais partículas no interior do animal. Sobre os possíveis danos externos que a NpAg poderia causar em contato com o animal, nota-se que ela pode tornar o indivíduo mais frágil, como visto nas imagens B e D das figuras 5 e 6. O estágio de náuplio 2 é o mais afetado pela nanopartícula, sendo apenas a concentração de 6ppm não tóxica para os indivíduos nas primeiras 24 horas. Em contrapartida, para náuplio 1 as concentrações mais tóxicas foram 12,5 e 25 ppm nas primeiras 24 horas e todas exceto 6 ppm ao passar das 48 horas.

Por fim, pode-se pressupor que as concentrações testadas afetam cada estágio de desenvolvimento da artêmia de forma diferente, sendo assim novos experimentos com concentrações intermediais as utilizadas são necessárias, para a obtenção de teses mais sólidas sobre o efeito da partícula. Além da necessidade de implementação de um protocolo de qualidade para a testagem das partículas, em vista que parâmetros não considerados durante o experimento, podem ser variáveis que interferem no resultado final, como a própria vida útil da partícula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, M. What function of nanoparticles is the primary factor for their hyper-toxicity? **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 314, p. 102881, abr. 2023.
- ARULVASU, C. et al. Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp artemia. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- ASADI DOKHT LISH, R. et al. On how environmental and experimental conditions affect the results of aquatic nanotoxicology on brine shrimp (*Artemia salina*): A case of silver nanoparticles toxicity. **Environmental Pollution**, v. 255, 2019.
- BECARO, A. A. et al. Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 3, p. 22–29, 2015.
- BURIĆ, P. et al. Particle Size Modulates Silver Nanoparticle Toxicity during Embryogenesis of Urchins *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, 1 jan. 2023.
- ČARAPAR, I. et al. Simultaneous Influence of Gradients in Natural Organic Matter and Abiotic Parameters on the Behavior of Silver Nanoparticles in the Transition Zone from Freshwater to Saltwater Environments. **Nanomaterials**, v. 12, n. 2, 1 jan. 2022.
- COLMAN, B. P. et al. Emerging contaminant or an old toxin in disguise? Silver nanoparticle impacts on ecosystems. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 9, p. 5229–5236, 2014a.
- COLMAN, B. P. et al. Emerging contaminant or an old toxin in disguise? Silver nanoparticle impacts on ecosystems. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 9, p. 5229–5236, 2014b.
- DAS NEVES, M. DA S. et al. Antibacterial Activity of Biodegradable Films Incorporated with Biologically-Synthesized Silver Nanoparticles and the Evaluation of Their Migration to Chicken Meat. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2023.
- DE PAIVA PINHEIRO, S. K. et al. Toxic effects of silver nanoparticles on the germination and root development of lettuce (*Lactuca sativa*). **Australian Journal of Botany**, v. 68, n. 2, p. 127–136, 1 jun. 2020.
- DE PAIVA PINHEIRO, S. K. et al. Acute toxicity of titanium dioxide microparticles in *Artemia* sp. nauplii instar I and II. **Microscopy Research and Technique**, 1 jun. 2023.
- DESHMUKH, S. P. et al. Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, n. July 2018, p. 954–965, 2019.
- ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 2, p. 129–137, 2012.

ELZEY, S.; GRASSIAN, V. H. Agglomeration , isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments. p. 1945–1958, 2010.

FERREIRA, A. M. et al. Vaterite vectors for the protection, storage and release of silver nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 631, p. 165–180, 1 fev. 2023.

GOKCEKAYA, O. et al. Effect of precursor deficiency induced ca/p ratio on antibacterial and osteoblast adhesion properties of ag-incorporated hydroxyapatite: Reducing ag toxicity. **Materials**, v. 14, n. 12, 2021.

GONÇALO DAS NEVES SILVA, E. et al. **Artemia salina Leach in photoprotection: A new model to evaluate the potential of nanoparticles for topical application**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://ssrn.com/abstract=4435446>>.

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

KITTLER, S. et al. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 16, p. 4548–4554, 24 ago. 2010.

KOWALSKA-GÓRALSKA, M. et al. IMPACT OF SILVER CONTAINED IN THE NANO SILVER PREPARATION (*Artemia salina* LEACH 1819) LARVAE. v. 18, n. 3, 2011.

LARESE, F. F. et al. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. **Toxicology**, v. 255, n. 1–2, p. 33–37, 8 jan. 2009.

LIU, J.; HURT, R. H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 6, p. 2169–2175, 15 mar. 2010.

LOK, C. N. et al. Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 527–534, maio 2007.

MA, X. et al. Enhanced hydrogen production of acidified ruddlesden–popper type perovskite oxides in water and seawater by coupled piezo-photocatalysis. **Materials Today Nano**, v. 21, 1 mar. 2023.

MADHAV, M. R. et al. Toxicity and accumulation of Copper oxide (CuO) nanoparticles in different life stages of *Artemia salina*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 52, n. November 2016, p. 227–238, 2017.

MESSINA, S.; COSTANTINI, D.; EENS, M. **Impacts of rising temperatures and water acidification on the oxidative status and immune system of aquatic ectothermic vertebrates: A meta-analysis**. **Science of the Total Environment** Elsevier B.V., , 10 abr. 2023.

MIGUEL, T. B. A. R. et al. Protective Effect of Natural and Processed Coconut Water by Non-thermal Technologies Against Oxidative Stress in Brine Shrimp (*Artemia salina*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 4, p. 702–716, 2021.

MOHAMADHOSSEIN, F. et al. **Comparative toxicity of single-wall and multi-wall carbon nanotubes to brine shrimp Artemia salina** *Research in Marine Sciences*. [s.l: s.n.].

MORRIS-SCHAFFER, K.; MCCOY, M. J. A Review of the LD50 and Its Current Role in Hazard Communication. **ACS Chemical Health and Safety**, v. 28, n. 1, p. 25–33, 2021.

MOTTA, G. et al. Preliminary Toxicological Analysis in a Safe-by-Design and Adverse Outcome Pathway-Driven Approach on Different Silver Nanoparticles: Assessment of Acute Responses in A549 Cells. **Toxics**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2023.

MOURDIKOUDIS, S.; PALLARES, R. M.; THANH, N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**, v. 10, n. 27, p. 12871–12934, 2018.

NAM, D. H. et al. Uptake and bioaccumulation of titanium- and silver-nanoparticles in aquatic ecosystems. **Molecular and Cellular Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 9–17, 2014. NEMMAR, A. et al. Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: A review of the in vivo and in vitro studies. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

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

PERETYAZHKO, T. S.; ZHANG, Q.; COLVIN, V. L. Size-controlled dissolution of silver nanoparticles at neutral and acidic pH conditions: Kinetics and size changes. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 20, p. 11954–11961, 21 out. 2014.

SALAMA, B. et al. Silver Nanoparticles Enhance Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Liver and Kidney Tissues: Potential Protective Role of Thymoquinone. **Biological Trace Element Research**, 1 jun. 2022.

SORGELOOS, P.; REMICHE-VAN DER WIELEN, C.; PERSOONE, G. **The Use of *Artemia Nauplii* for Toxicity Tests-A Critical Analysis** *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY*. [s.l.] Harwich and Scott, 1978.

UNAL, I.; EGRI, S.; ATES, M. Green Synthesis (*Paeonia kesrouanensis*) of Silver Nanoparticles and Toxicity Studies in *Artemia salina*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 109, n. 6, p. 1150–1154, 2022.

WEI, L. et al. Silver nanoparticles : synthesis , properties , and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 5, p. 595–601, 2015.

YONTAR, A. K.; ÇEVIK, S. Effects of Plant Extracts and Green-Synthesized Silver Nanoparticles on the Polyvinyl Alcohol (PVA) Nanocomposite Films. **Arabian Journal for Science and Engineering**, 2023.

ZIELINSKA, A. et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. **Molecules**, v. 25, n. 16, 2020.