



EFEITOS DE TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA A MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*

CAROLINE DELAZERI BETTIO^{1,2*}, ALINE VANESSA GOULART^{1,2}, CRISTIANE
FUNGHETTO FUZINATTO^{2,3}

1 Introdução

Devido ao crescimento da produção e, conseqüentemente, da utilização dos nanomateriais para as mais variadas aplicações, nos mais diversos setores, principalmente no industrial, houve um significativo aumento da exposição humana a esses compostos, o que gerou uma certa preocupação quanto aos níveis de exposição e as suas conseqüências (LOURO; BORGES; SILVA, 2013).

Com o intuito de compreender a interação desses materiais de dimensão nanométrica com os sistemas biológicos, começaram a ser realizados testes ecotoxicológicos cuja finalidade é saber se, e em quais concentrações, as substâncias químicas, isoladas ou na forma de misturas, são nocivas, e a causa e o local onde manifestam-se os efeitos (KNIE; LOPES, 2004). Para isso, são utilizados organismos vivos que possuam as características desejáveis e que sejam representativos do nível trófico de estudo (TORTELLA et al., 2020), visto que, quando expostos a substâncias tóxicas, os organismos respondem com reações específicas a todas as intervenções, sejam elas diretas ou indiretas (KNIE; LOPES, 2004).

2 Objetivos

Avaliar os efeitos de toxicidade à microalga verde de água doce, *Desmodesmus subspicatus*, após a exposição às nanopartículas metálicas de prata e óxido de cobalto.

3 Metodologia

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Qualidade da Água da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim – RS. Para o cultivo da microalga *D. subspicatus* utilizou-se o meio CHU, preparado conforme a ABNT NBR 12.648 (2011), autoclavando-o ao final com o intuito de garantir a esterilização necessária. Ao meio de cultivo resfriado, inseriu-se, em condições de assepsia, o inóculo da microalga, a qual foi mantida constantemente a 23 °C, sob iluminação, aeração e agitação constante.

A partir de uma solução estoque do organismo teste, foram feitas consecutivas diluições em

1 Acadêmica do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, contato: carolinedelazeribettio@gmail.com.

2 Grupo de Pesquisa Biodiversidade e Conservação da Fauna - GPCON.

3 Prof^ª. Dr^ª. em Engenharia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, **Orientadora**.



meio CHU com a finalidade de realizar a quantificação da densidade celular e, com isso, a construção de uma curva de correlação entre a contagem de células em microscópio ótico, na câmara de Neubauer, e a leitura da absorbância no comprimento de onda de 682 nm. A partir disso, tornou possível dar início aos testes de sensibilidade para a microalga, fundamentais para realizar aos testes de toxicidade.

Os testes de sensibilidade foram feitos, também, de acordo com a ABNT NBR 12.648 (2011), expondo a microalga, *D. subspicatus*, a uma substância de referência: o dicromato de potássio. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, com o dicromato de potássio nas concentrações 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 e 0,9 mg/L, além de um controle negativo composto apenas pelo meio de cultivo, totalizando um volume de 100 mL. Os erlenmeyers contendo os ensaios foram distribuídos aleatoriamente na mesa agitadora com temperatura controlada (23 °C), agitação de 150 rpm e iluminação contínua por um período de 72 horas.

A biomassa algácea foi determinada no início e no fim do teste de sensibilidade, por espectrofotometria a fim de definir qual foi o aumento na densidade celular. E, a partir da curva de equivalência, os valores de absorbância foram transformados em número de células e inseridos no *software* GraphPad Prism[®] 6.0, resultando em um valor de sensibilidade.

Por fim, fez-se a síntese da nanopartícula de prata, realizada de acordo com o descrito por Fernandes (2014), com algumas modificações. Seu preparo consistiu na solubilização de 1 g de PVA em 50 mL de água de osmose sob agitação e aquecimento. Posteriormente, o PVA foi resfriado enquanto diluiu-se em 25 mL de água de osmose gelada 0,00315 g de AgNO₃ e 0,0014 g de NaBH₄. O PVA foi colocado em um béquer, sob banho de gelo e agitação constante, onde adicionou-se o NaBH₄ já diluído. O AgNO₃ diluído foi inserido em uma bureta e gotejado lentamente no béquer.

Na sequência, seria sintetizada também a nanopartícula de óxido de cobalto, feita a caracterização de ambas nanopartículas e iniciado aos testes toxicológicos de forma similar ao teste de sensibilidade, porém, utilizando ao invés do dicromato de potássio, a nanopartícula de interesse, o que, infelizmente, não foi possível, já que as atividades referentes a este projeto de pesquisa estão paralisadas em consequência da situação atual em que o país de encontra decorrente do decreto de Pandemia COVID-19.

4 Resultados e Discussão

A partir das leituras de absorbância no espectrofotômetro e da contagem do número de células pelo microscópio ótico, gerou-se a curva de equivalência entre as variáveis (Figura 1).

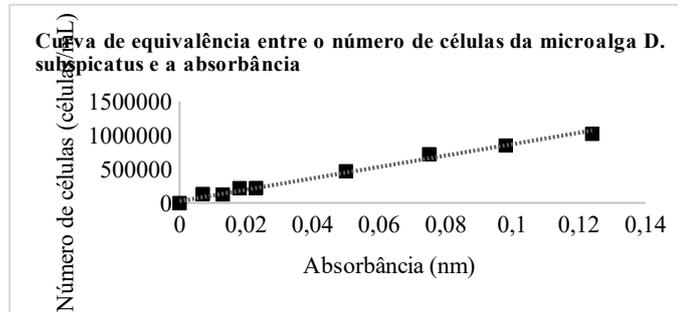


Figura 1. Correlação entre o número de células da microalga *D. subspicatus* e a absorvância a 682 nm a partir de diluições em meio CHU da solução estoque do organismo teste.

Através da Figura 1, percebe-se um comportamento linear, sendo que o aumento do número de células significa também o aumento da absorvância. Com isso, obteve-se a equação da reta, bem como um coeficiente de correlação (R^2) muito satisfatório.

Quanto ao teste de sensibilidade, o pH inicial dos controles 1 e 2 foram, respectivamente, 7,11 e 7,09, enquanto o final, 7,50 e 7,43, não ultrapassando a variação de 1,5, fundamental para sua validação. E, com as leituras de absorvância de todas as concentrações iniciais e finais e, com o auxílio da equação obtida pelo gráfico de correlação entre as duas variáveis, conseguiu-se identificar o aumento na quantidade de células durante as 72 horas de teste, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Valores de absorvância e aumento do número de células da microalga *D. subspicatus* exposta a diversas concentrações de dicromato de potássio por um período de 72 horas

Concentração (mg/L)	Absorvância (nm)	Número de células por mL no período (células/mL)
Controle 1	0,043	405075
Controle 2	0,045	421075
0,1 A	0,040	381075
0,1 B	0,042	397075
0,3 A	0,038	365075
0,3 B	0,039	373075
0,5 A	0,037	357075
0,5 B	0,036	349075
0,7 A	0,034	333075
0,7 B	0,034	333075
0,9 A	0,033	325075
0,9 B	0,031	309075

Considerando que o crescimento máximo da microalga foi o obtido no controle e, com base nisso, transformando para percentual o número de células de cada concentração, obteve-se,



através do *software* GraphPad Prism® 6.0, um valor para a sensibilidade de 1,30 mg/L. Autores como Knie (2004), citam que a faixa de sensibilidade, usando como substância de referência o dicromato de potássio, é de $0,53 \pm 0,2$ mg/L e que, quando o valor encontra-se fora dessa faixa, significa que algum fator no ambiente do sistema sofreu alteração, de forma que o mesmo deve ser reavaliado. Como o resultado encontrado foi superior à literatura, tem-se o indicativo de que o organismo apresenta uma maior resistência e, por isso, para ser visualizado algum efeito, ele necessitaria ficar exposto a concentrações superiores da substância em um mesmo intervalo de tempo. Além disso, cabe ressaltar que o resultado encontrado foi baseado em poucas repetições e a metodologia estava na fase de adaptação às condições de laboratório.

5 Conclusão

Os resultados apresentados são preliminares. O projeto se encontrava em fase de adaptação de metodologias às condições e aos equipamentos de laboratório da UFFS. Desta forma, foram realizadas poucas repetições dos testes. Com a paralisação das atividades presenciais nos Campi da UFFS em 16/03/2020, devido a pandemia do Novo Coronavírus (COVID-19), o projeto de pesquisa precisou ser paralisado e, por isso, os testes previstos para a identificação dos efeitos de toxicidade após a exposição a nanopartículas de prata e nanopartículas de óxido de cobalto para a microalga *D. subspicatus* não foram identificados.

Referências

- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648:2011** - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica: Método de ensaio com algas. Rio de Janeiro, 2011.
- FERNANDES, P. **Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata**. 2014. 101 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2014.
- KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/ GTZ, 2004.
- LOURO, H.; BORGES, T.; SILVA, M. J. Nanomateriais manufaturados: novos desafios para a saúde pública. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, [S.L.], 2013.
- TORTELLA, G. R. *et al.* Silver nanoparticles: toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], 2020.

Palavras-chave: nanopartículas metálicas; toxicidade; *Desmodesmus subspicatus*.

Financiamento: UFFS